

Vismonitoring in de Dommel met eDNA

Vismonitoring in de Dommel met eDNA

Project 2019.03 | Maart 2020

Projectmanager

Berry van der Hoorn

Auteur(s)

Kevin Beentjes

Berry van der Hoorn

Kwaliteitsborging

Michiel Hootsmans

Krijn Trimbos

Verzonden aan

Jako van der Wal (Aquon)

Matthijs Koole (ATKB)

Mark Scheepens (Waterschap De Dommel)

Samenvatting

Op verzoek van Aquon heeft BioMon met behulp van eDNA onderzoek gedaan naar de visstand in de Dommel. Behalve de reguliere Kaderichtlijn Water monitoring is specifiek gekeken naar de aanwezigheid van exotische grondels. Op 53 trajecten is door adviesbureau ATKB met elektrovisen de visstand bepaald. Over dezelfde trajecten is door ATKB een liter water gefilterd. De filters zijn naar de labs van Naturalis Biodiversity Center gestuurd voor DNA extractie, PCR, sequencing en analyse. De volgende onderzoeksvragen stonden centraal:

1. Hoe ziet de soortensamenstelling van de visstand op basis van eDNA er uit?

In totaal zijn veertig soorten zoetwatervissen met eDNA aangetoond. De meeste soorten werden vastgesteld in de Dommel en de Tongelreep, met een maximum aantal van 29 op een enkele locatie in de Tongelreep. Opmerkelijke soorten betreffen de beekdonderpad, sneep, dwergmeerval en brakwatergrondel. Zeven vissoorten (17,5%) betreffen exoten. Op een locatie in de Gender was zelfs al het DNA afkomstig van een exoot, van de Amerikaanse hondsvijl.

Op zeven locaties werden lage concentraties van de zalm vastgesteld. Dit kan betrekking hebben op consumptievissen en zou visueel moeten worden geverifieerd. Ook haring, ansjovis en platvis zijn aangetoond.

Behalve van vissen is ook DNA van andere gewervelden aangetroffen. Zo werd op zeven locaties de aanwezigheid van bever vastgesteld, in de Tongelreep, de Dommel en de Nieuwe Leij. Overige soorten bijvangst betreffen onder andere alpenwatersalamander, kleine watersalamander, bosspitsmuis en rosse woelmuis. De gebruikte primers zijn echter specifiek voor vissen ontworpen, waardoor het beeld voor amfibieën en zoogdieren mogelijk incompleet is en ze op meer locaties voorkomen.

2. Wat is de verspreiding van exotische grondels in het onderzoeksgebied?

De exotische marmergrondel werd op 25 locaties aangetroffen, en lijkt vrij algemeen in met name de Dommel en de Tongelreep. De zwartbekgrondel werd slechts aangetroffen op twee locaties, in de Tongelreep en in de Beeksche Waterloop.

3. Wat zijn de overeenkomsten en verschillen tussen de eDNA resultaten en de morfologische resultaten?

De soortenrijkdom die met eDNA is vastgesteld correleert sterk met die van elektrovisen. Dus op locaties waar met eDNA relatief weinig soorten zijn aangetroffen is dat met elektrovisen ook het geval. Wel is per locatie het gemiddelde aantal soorten met eDNA bemonstering tweemaal zo hoog als met elektrovisen (respectievelijk 13,6 en 6,6).

In totaal elf soorten zijn uitsluitend met eDNA vastgesteld en niet met elektrovisen. Drie soortparen konden met eDNA niet worden onderscheiden, te weten gibel en goudvis, Siberische steur en diamantsteur, en zwarte dwergmeerval en bruine dwergmeerval. Geen

van deze soorten is met elektrovisen vastgesteld. De beekprik is niet met eDNA gedetecteerd maar wel op één locatie vastgesteld met elektrovisen. Mogelijke verklaringen hiervoor zijn de lage dichtheden van deze soort en zijn levenswijze op en in de bodem, waardoor de detectiekans van het DNA in de bovenste waterlaag klein is.

Een mogelijke verklaring voor de toename in het aantal aangetroffen soorten is, naast de verhoogde gevoeligheid voor zeldzame soorten, het feit dat stromend water naar alle waarschijnlijkheid eDNA sporen meebrengt vanuit bovenstroomse gebieden. Bij het elektrovisen is een afgebakend traject bemonsterd, terwijl de watermonsters ten behoeve van eDNA een groter stroomgebied kunnen representeren.

4. Is er een relatie tussen eDNA abundanties en morfologisch bepaalde aantallen of biomassa?

Uit de data blijkt geen correlatie tussen de relatieve abundantie op basis van eDNA (DNA fragmenten) en de relatieve abundantie op basis van elektrovisen (aantallen). Mogelijke verklaringen hiervoor zijn verschillen in de hoeveelheid eDNA die verschillende soorten achterlaten, alsmede kunstmatige verschillen die optreden als gevolg van de verwerking in het laboratorium. Daarnaast zou elektrovisen een onjuist beeld kunnen geven van de abundanties van aanwezige vissoorten.

1 Inleiding

Waterschap De Dommel heeft Aquon gevraagd om in 2019 onderzoek te doen naar de visstand in de Dommel. Naast de reguliere monitoring voor de KRW heeft het waterschap interesse in enkele specifieke onderwerpen in een aantal specifieke waterlichamen, waaronder de effecten van droogval en hout obstructies en de verspreiding van exotische grondels. De conventionele uitvoering met elektrovissen wordt uitgevoerd door adviesbureau ATKB. Kenniscentrum BioMon is door Aquon gevraagd om een aanvullende monitoring voor zoetwatervissen uit te voeren met gebruik van environmental DNA (eDNA). Verschillende onderzoeken hebben laten zien dat met eDNA een goed beeld gevormd kan worden van de aanwezige vissoorten in een ecosysteem (Shaw et al. 2016, Van der Kamp et al, 2017, Sigsgaard et al, 2017, Stoeckle et al. 2017). Er zijn nog wel enkele uitdagingen voor de toepassing van eDNA bij vissen, bijvoorbeeld voor de bepaling van abundantie.

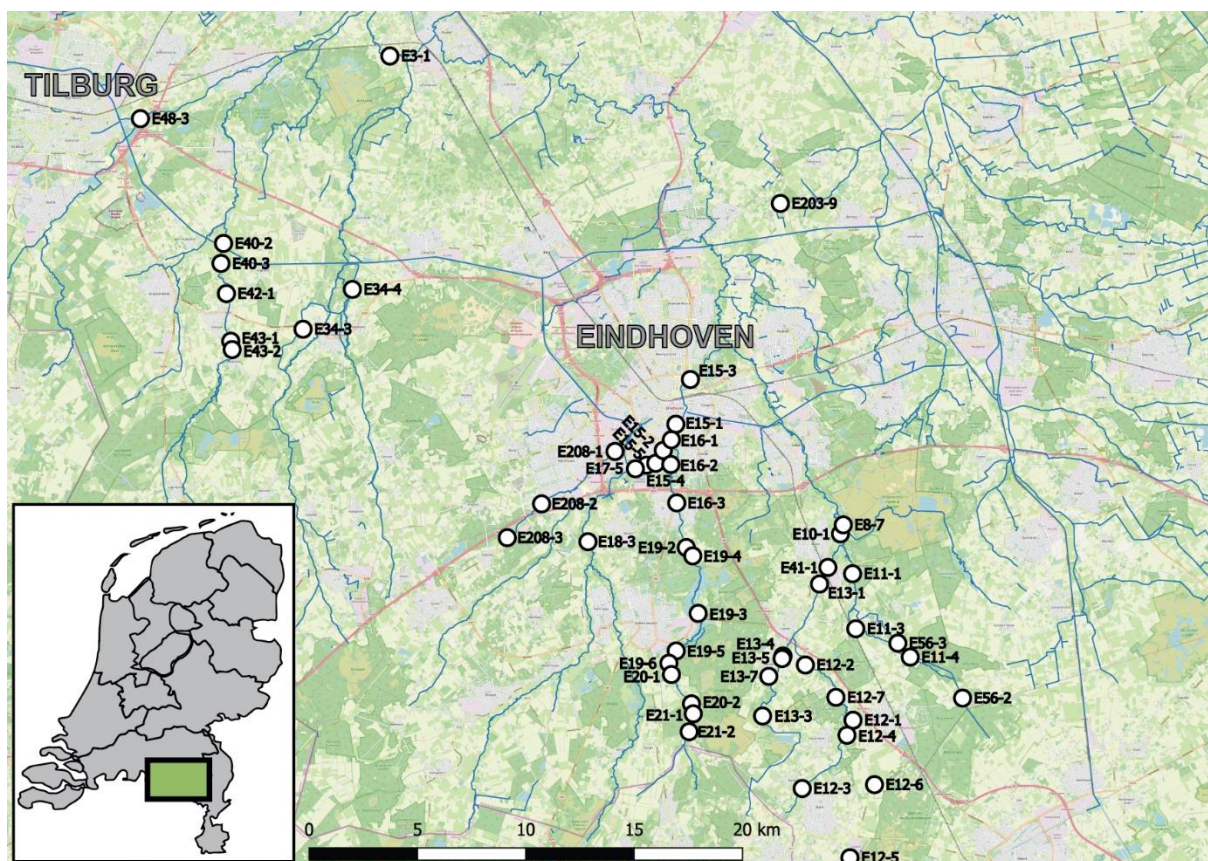
AQUON en BioMon werken samen aan kennisontwikkeling op het gebied van environmental DNA en toepassingen ten behoeve voor waterkwaliteit. Voor het onderzoek naar de visstand in de Dommel zijn voor dit eDNA onderzoek de volgende onderzoeksvragen gedefinieerd:

1. Hoe ziet de soortensamenstelling van de visstand op basis van eDNA er uit?
2. Wat is de verspreiding van exotische grondels in het onderzoeksgebied?
3. Wat zijn de overeenkomsten en verschillen tussen de eDNA resultaten en de morfologische resultaten?
4. Is er een relatie tussen eDNA abundanties en morfologisch bepaalde aantallen of biomassa?

2 Materiaal en methoden

2.1 Monsterlocaties

De monsterlocaties zijn geselecteerd door waterschap De Dommel. Op alle locaties is visonderzoek uitgevoerd met zowel eDNA als met elektrovisen. In totaal zijn op 53 locaties eDNA monsters verzameld als aanvulling op de traditionele monitoring. Een overzicht van alle meetpunten staat in bijlage 1, figuur 1 toont de meetpunten op een kaart.



Figuur 1: Kaart met bemonsterde locaties.

2.2 Monstername

De bemonstering van het eDNA is uitgevoerd door adviesbureau ATKb. Voor elke locatie is in totaal één liter water gefilterd met gebruik van een opstelling met vacuümpomp. Via herbruikbare trechters is water door een polyethersulfone (PES) filter (poriegrootte 0,45µm) gepompt. Wanneer door troebel water de filters voortijdig verstopt raakten is het totale volume van een liter verdeeld over meerdere filters. Tussen de verschillende monsterlocaties zijn de herbruikbare trechters grondig gereinigd met bleek, om te voorkomen dat eDNA wordt overgedragen naar monsters die daarna genomen zijn. Controlemonsters met demiwater zijn tussendoor gefilterd om kruisbesmetting tussen monsters in het veld te kunnen uitsluiten.

Direct na het filteren zijn de filters overgebracht in een buisje met CTAB buffer om afbraak van eDNA te voorkomen. De gebruikte CTAB buffer stabiliseert DNA bij kamertemperatuur, waardoor koeling niet nodig is. De filters zijn vervolgens opgestuurd naar Naturalis Biodiversity Center voor verwerking.

2.3 DNA extractie en sequencing

Uit de aangeleverde filters is DNA geëxtraheerd middels een CTAB extractieprotocol (op basis van Turner et al. 2014). Bij de extractie wordt het PES filter opgelost in chloroform, zodat er geen delen van het filter resteren waarin nog eDNA gevangen zit. Op die manier wordt zoveel mogelijk eDNA geëxtraheerd uit de filters. Voor elke monsterlocatie is een vaste hoeveelheid DNA extract gegeneerd, ook als er meerdere filters waren, zodat elk DNA extract een vergelijkbare concentratie bevatte. De controlemonsters met demiwater zijn op dezelfde manier behandeld als de andere monsters.

De toegepaste primers zijn specifiek ontworpen om zo goed mogelijk de Nederlandse zoetwatervissen te kunnen detecteren en onderscheiden. In de praktijk is gebleken dat behalve zoetwatervissen ook andere soorten met deze primers worden aangetoond. Bij de resultaten wordt aandacht besteed aan deze “bijvangst”.

Voor elk monsterpunt zijn 12 afzonderlijke PCR replica's gedaan met bovengenoemde universele vissenprimers. Door meerdere PCR replica's te draaien is de kans groter om zeldzame soorten, waarvan de eDNA concentraties in het monster laag zijn, te detecteren. Voor iedere stap in het DNA proces is een negatieve controle opgenomen om de kwaliteit van het laboratoriumproces te kunnen bewaken. Dit betreft monsters waarin geen DNA zit, waardoor verontreinigingen in het lab kunnen worden gedetecteerd. Ook is een tweetal monsters meegenomen van vissen die niet in het onderzoeksgebied voorkomen maar wel signaal geven met de gebruikte primers: de gewone zeedonderpad (*Myoxocephalus scorpius*) en de snotolf (*Cyclopterus lumpus*). Het DNA van deze vissen wordt tijdens de analyse gebruikt om eventuele kruisbesmettingen tussen monsters in het laboratorium of tijdens het sequencing te detecteren en daarvoor te corrigeren.

Met behulp van next-generation sequencing technieken zijn de sequenties van het vissen DNA bepaald. Elk monster is voorzien van een set unieke labels, waarmee in de analyse van de ruwe data kon worden bepaald welk van de DNA fragmenten bij welk monster hoorde. In totaal zijn enkele miljoenen DNA fragmenten uitgelezen.

2.4 Barcode referenties

BioMon beschikt over een eigen DNA referentiedatabank waarin de DNA profielen van de Nederlandse zoetwatervissen zijn opgeslagen. Elk DNA profiel is afkomstig van een fysiek exemplaar dat door specialisten op naam is gebracht. Een deel van de exemplaren is bovendien opgeslagen in de natuurhistorische collectie van Naturalis Biodiversity Center, en op die manier toegankelijk voor verder onderzoek. Van de meeste soorten zijn meerdere exemplaren opgenomen in de referentie. Voor een aantal nauw verwante soorten is daardoor te zien of het onderscheid tussen DNA profielen van deze soorten consequent is.

Het DNA fragment dat wordt vermeerderd (amplificatie) door de gekozen primers tijdens een PCR reactie, is gekozen omdat het zo kort mogelijk is (om ook eDNA te kunnen detecteren dat al deels is afgebroken), maar toch goed onderscheid kan maken tussen de verschillende vissoorten. Voor de meeste Nederlandse vissoorten zijn de DNA profielen uniek en op basis van de gekozen primers goed te onderscheiden. Enkele nauw verwante soorten laten binnen het gekozen korte DNA fragment geen verschillen zien, waardoor ze op basis van dit DNA fragment niet uit elkaar te halen zijn. Deze uitzonderingen zullen worden besproken bij de resultaten.

Alle soorten die zijn aangetroffen met elektrovisen door ATKB zijn vertegenwoordigd in de DNA referentiedatabank van BioMon. Daarnaast zijn de DNA profielen uit de eDNA monsters die geen directe match hadden met de BioMon referentie nog vergeleken met een internationale publieke databank (NCBI GenBank) om te zien of er nog soorten aanwezig waren die niet in de BioMon referentie aanwezig waren.

2.5 Bioinformatica en data analyse

De ruwe databestanden met sequenties van de DNA profielen zijn verwerkt en geanalyseerd in een op maat gemaakte bioinformatica pijplijn van Naturalis Biodiversity Center (Beentjes et al. 2019). Sequenties van lage kwaliteit zijn verwijderd. De overgebleven sequenties zijn vergeleken met de DNA referentiedatabank, waarbij alleen matches van 98% similariteit of hoger werden meegeteld voor de soortenlijst. Op basis van de positieve en negatieve controles is de dataset opgeschoond. Dit resulteerde uiteindelijk in een matrix met zoetwatervissen en de hoeveelheid DNA fragmenten per monster (digitale bijlage S1).

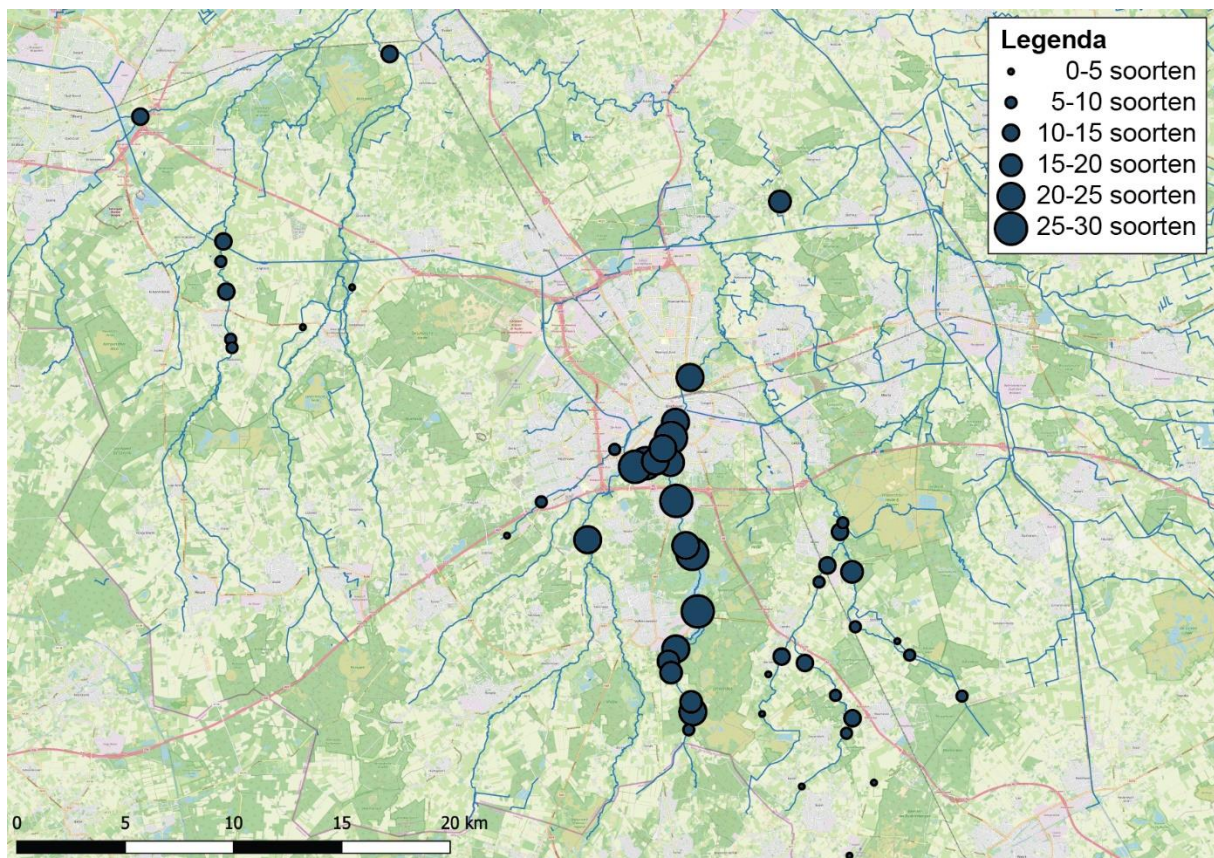
De analyses en statistische toetsen zijn uitgevoerd in R. Voor de vergelijkingen tussen de abundanties van eDNA en elektrovisen, zijn respectievelijk de hoeveelheid sequenties en het aantal aangetroffen exemplaren per locatie omgezet in relatieve abundanties.

3 Resultaten

3.1 Vastgestelde vissoorten

In totaal zijn veertig soorten (of soortgroepen) vis met eDNA aangetoond. Gemiddeld zijn in de geanalyseerde monsters 13,6 vissoorten gedetecteerd, waarbij de aantallen uiteenliepen van één enkele soort in een monsterpunt in de Gender (E208-3), tot maximaal 29 soorten vis in een monsterpunt in de Tongelreep (E19-4). In twee monsters werd met eDNA geen enkele vissoort aangetroffen: een punt in de Boschloop (E12-6) en een punt in het Sterkselsch Kanaal (E56-3). Met elektrovisseren zijn echter op deze twee locaties ook geen vissen aangetroffen. In figuur 2 is per locatie aangegeven hoeveel soorten zijn gedetecteerd. In bijlage 1 is van elke monsterlocatie een overzicht met de aangetroffen aantallen soorten voor zowel de eDNA bemonstering als de traditionele vismonitoring met elektrovisseren.

In figuur 3 en digitale bijlage S1 is een overzicht te vinden van de aangetroffen soorten per locatie, met daarbij de hoeveelheid DNA sequenties die van elke soort zijn aangetroffen in de betreffende monsters.



Figuur 2: Kaart met bemonsterde locaties, waarin de grootte van de cirkels een maat is voor de soortenrijkdom van vissen die met eDNA gedetecteerd zijn.

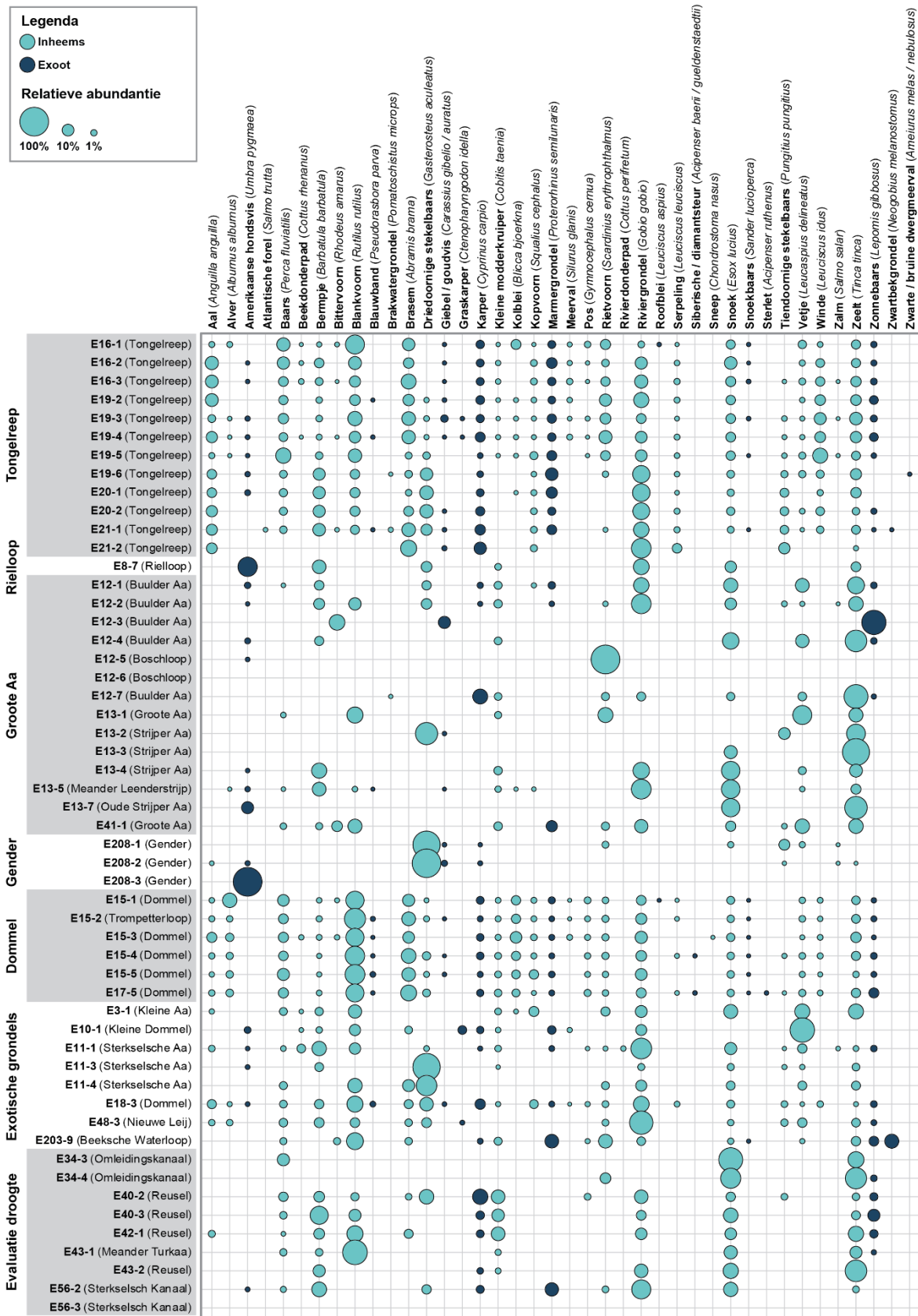
De volgende soorten werden middels eDNA gedetecteerd in één of meer monsters:

1. Aal	<i>Anguilla anguilla</i>
2. Alver	<i>Alburnus alburnus</i>
3. Amerikaanse hondsvij	<i>Umbra pygmaea</i>
4. Atlantische forel	<i>Salmo trutta</i>
5. Baars	<i>Perca fluviatilis</i>
6. Beekdonderpad	<i>Cottus rhenanus</i>
7. Berrnpje	<i>Barbatula barbatula</i>
8. Bittervoorn	<i>Rhodeus amarus</i>
9. Blankvoorn	<i>Rutilus rutilus</i>
10. Blauwband	<i>Pseudorasbora parva</i>
11. Brakwatergrondel	<i>Pomatoschistus microps</i>
12. Brasem	<i>Abramis brama</i>
13. Driedoornige stekelbaars	<i>Gasterosteus aculeatus</i>
14. Giebel / Goudvij	<i>Carassius gibelio / auratus</i>
15. Graskarper	<i>Ctenopharyngodon idella</i>
16. Karper	<i>Cyprinus carpio</i>
17. Kleine modderkruiper	<i>Cobitis taenia</i>
18. Kolblei	<i>Blicca bjoerkna</i>
19. Kopvoorn	<i>Squalius cephalus</i>
20. Marmergrondel	<i>Proterorhinus semilunaris</i>
21. Meerval	<i>Silurus glanis</i>
22. Pos	<i>Gymnocephalus cernua</i>
23. Rietvoorn	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>
24. Rivierdonderpad	<i>Cottus perifretum</i>
25. Riviergrondel	<i>Gobio gobio</i>
26. Roofblei	<i>Leuciscus aspius</i>
27. Serpeling	<i>Leuciscus leuciscus</i>
28. Siberische / Diamantsteur	<i>Acipenser baerii / gueldenstaedtii</i>
29. Sneep	<i>Chondrostoma nasus</i>
30. Snoek	<i>Esox lucius</i>
31. Snoekbaars	<i>Sander lucioperca</i>
32. Sterlet	<i>Acipenser ruthenus</i>
33. Tiendoornige stekelbaars	<i>Pungitius pungitius</i>
34. Vetje	<i>Leucaspis delineatus</i>
35. Winde	<i>Leuciscus idus</i>
36. Zalm	<i>Salmo salar</i>
37. Zeelt	<i>Tinca tinca</i>
38. Zonnebaars	<i>Lepomis gibbosus</i>
39. Zwartbekgrondel	<i>Neogobius melanostomus</i>

Slechts één extra soort werd gevonden met de publieke databank Genbank:

40. Zwarte / bruine dwergmeerval	<i>Ameiurus melas / nebulosus</i>
----------------------------------	-----------------------------------

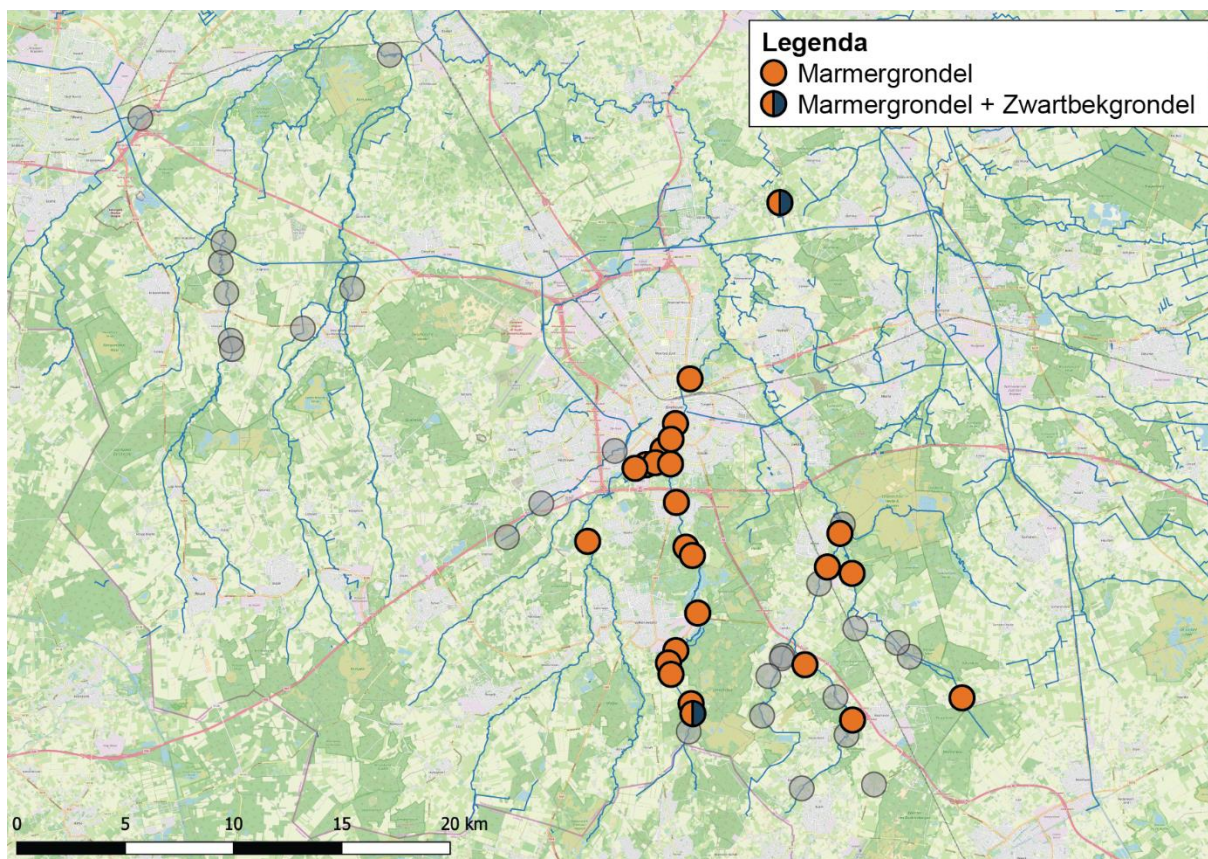
Voor een aantal soorten kan op basis van de DNA profielen geen onderscheid worden gemaakt. Dit betreft de volgende soorten: giebel (*Carassius gibelio*) en goudvij (*C. auratus*), Siberische steur (*Acipenser baerii*) en diamantsteur (*A. gueldenstaedtii*), en zwarte dwergmeerval (*Ameiurus melas*) en bruine dwergmeerval (*A. nebulosus*). Voor de analyses in dit rapport zijn deze soorten daarom consequent als soortpaar behandeld. Geen van de soorten die met DNA niet zijn te onderscheiden werden gevonden met elektrovissen, waardoor ook hiermee geen uitsluitel gegeven kan worden.



Figuur 3. Een overzicht te vinden van de aangetroffen soorten per locatie. In deze figuur is een onderscheid gemaakt tussen inheemse soorten (licht blauw) en exoten (donkerblauw). Het formaat van de cirkels is een maat voor de relatieve abundantie van eDNA per locatie, waarbij grotere cirkels een hogere relatieve abundantie van eDNA weerspiegelen.

3.2 Exoten

Op basis van eDNA zijn twee soorten exotische grondels aangetroffen: de marmergrondel (*Proterorhinus semilunaris*) en de zwartbekgrondel (*Neogobius melanostomus*). De marmergrondel is in totaal op 25 locaties aangetroffen, en lijkt vrij algemeen in met name de Dommel en de Tongelreep. De zwartbekgrondel werd slechts aangetroffen op twee locaties, in de Tongelreep (E21-1) en in de Beeksche Waterloop (E203-9). Op beide locaties waar de zwartbekgrondel werd gevonden, werd tevens de marmergrondel aangetroffen (figuur 4).



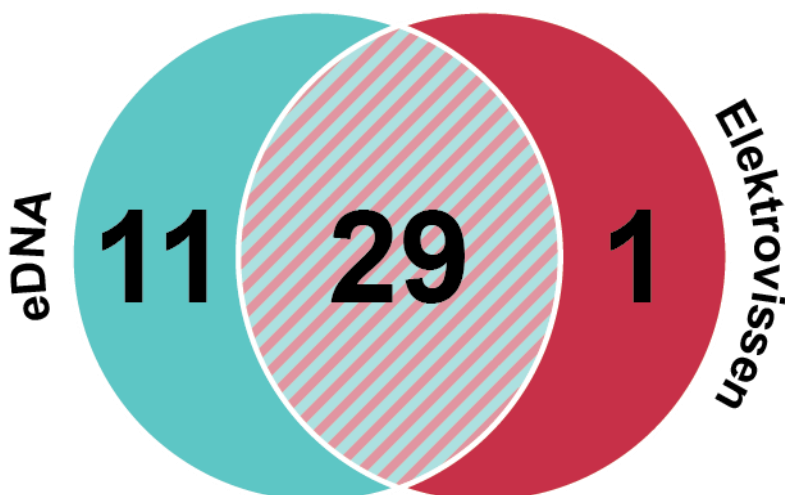
Figuur 4: Locaties waar eDNA van de exotische marmergrondel (*Proterorhinus semilunaris*) en zwartbekgrondel (*Neogobius melanostomus*) zijn aangetroffen. De grijze cirkels markeren de locaties waar geen eDNA van de exotische grondels is gedetecteerd.

Acht locaties waren in het bijzonder aandachtsgebieden voor onderzoek naar exotische grondels (bijlage 1). In drie locaties werd marmergrondel gedetecteerd: in de Kleine Dommel (E10-1), de Sterkselsche Aa (E11-1) en in de Dommel (E18-3). Op één locatie werden zowel marmergrondel als zwartbekgrondel aangetroffen, te weten in de Beeksche Waterloop (E203-9). Op deze laatste locatie was het aandeel eDNA ook hoog met respectievelijk 15,5% en 16,6% van het totaal (figuur 3).

Naast de twee soorten grondels zijn nog een vijftal andere exoten aangetroffen, waaronder een aantal soorten die niet met elektrovisen zijn vastgesteld. In figuur 3 zijn alle soorten die in het Nederlands Soortenregister zijn geregistreerd als exoot in donkerblauw gemarkeerd.

3.3 Vergelijking eDNA en traditioneel

Voor beide methoden samen werden in totaal 41 soorten vis aangetroffen in de 53 locaties. Hiervan werden 29 soorten met zowel elektrovisseren als eDNA gedetecteerd. Elf soorten werden uitsluitend met eDNA aangetroffen. Eén soort werd uitsluitend met elektrovisseren aangetroffen (figuur 5, tabel 1).

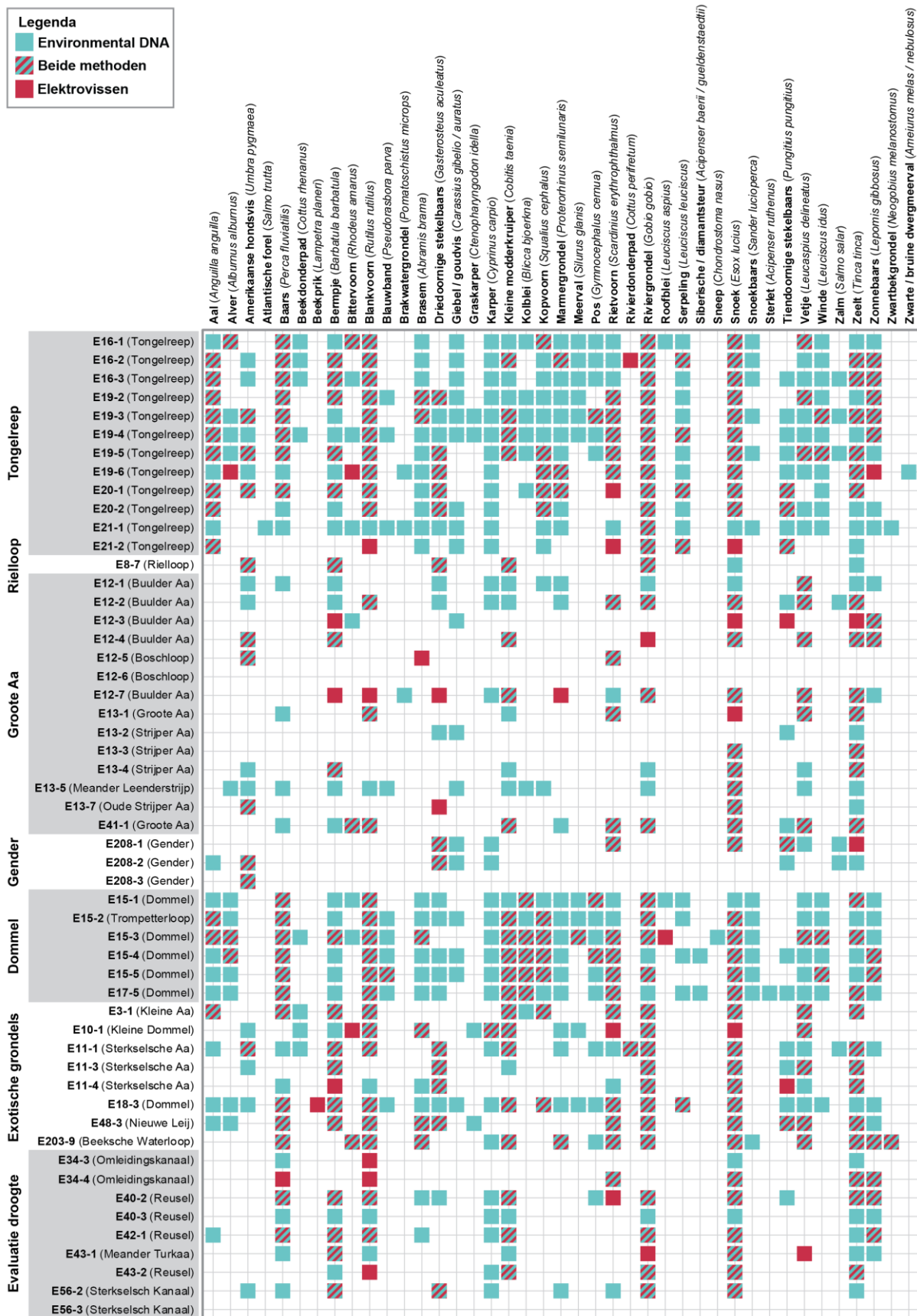


Figuur 5. Een Venn diagram met daarin de aantallen soorten die met de verschillende methoden werden aangetroffen, over alle monsterpunten bij elkaar opgeteld.

Tabel 1. Overzicht van vissen die uitsluitend met één van de twee gebruikte methoden werden aangetroffen.

Uitsluitend met eDNA	Uitsluitend met elektrovisseren
Atlantische forel (<i>Salmo trutta</i>)	Beekprik (<i>Lampetra planeri</i>)
Beekdonderpad (<i>Cottus rhenanus</i>)	
Brakwatergrondel (<i>Pomatoschistus microps</i>)	
Giebel / goudvis (<i>Carassius gibelio/auratus</i>)	
Graskarper (<i>Ctenopharyngodon idella</i>)	
Siberische / diamantsteur (<i>A. baerii/gueldenstaedtii</i>)	
Sneep (<i>Chondrostoma nasus</i>)	
Snoekbaars (<i>Sander lucioperca</i>)	
Sterlet (<i>Acipenser ruthenus</i>)	
Zalm (<i>Salmo salar</i>)	
Zwarte / bruine dwergmeerval (<i>A. melas/nebulosus</i>)	

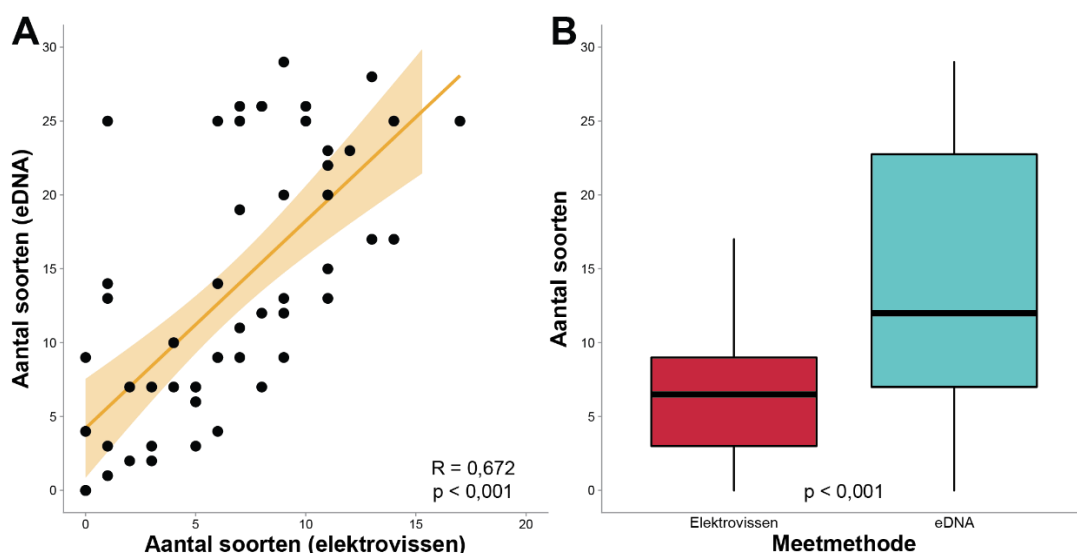
In paragraaf 4.2 zal verder worden ingegaan op mogelijke verklaringen van de verschillen tussen eDNA en elektrovisseren. In figuur 6 is een overzicht te zien van de locaties en vissoorten, waarin is weergegeven welke soorten met welke methode zijn aangetroffen. Deze gegevens zijn samengevat per locatie en per soort in respectievelijk bijlage 2 en 3.



Figuur 6. Aangetroffen soorten per locatie met elektrovissen, eDNA en beide methoden.

Uit de data blijkt een sterke correlatie tussen de soortenrijkdom per locatie gebaseerd op eDNA bemonstering en die gebaseerd op elektrovisen (Pearson correlatie, $r = 0,672$, $p < 0,001$) (figuur 7A). Met andere woorden, op locaties waar met elektrovisen meer vissoorten zijn gevonden, zijn met eDNA analyse ook meer soorten aangetroffen. Wel is het zo dat het gemiddelde aantal soorten met eDNA bemonstering (gemiddeld 13,6) significant hoger ligt dan bij elektrovisen (gemiddeld 6,6) (figuur 7B).

Met behulp van de vastgestelde soorten is gekeken naar de onderlinge patronen tussen monsterlocaties, op basis van verschillen tussen de soortenlijsten per locatie. De onderlinge verschillen en gelijkenissen tussen monsterpunten op basis van de vastgestelde vissoorten met behulp van eDNA zijn matig gecorreleerd aan de onderlinge verschillen en overeenkomsten op basis van elektrovisen (Mantel, $r = 0,524$, $p = 0,001$). Dat wil zeggen dat monsters die met de traditionele vismonitoring meer op elkaar lijken, bij eDNA bemonstering ook meer op elkaar lijken.



Figuur 7. Vergelijking van de soortenrijkdom gevonden met zowel elektrovisen en met eDNA. Er is een duidelijke correlatie tussen beide methoden (A). Het geel gearceerde deel rond de lijn laat het 95% betrouwbaarheidsinterval zien. Met eDNA zijn gemiddeld meer soorten gevonden dan bij het traditionele onderzoek (B).

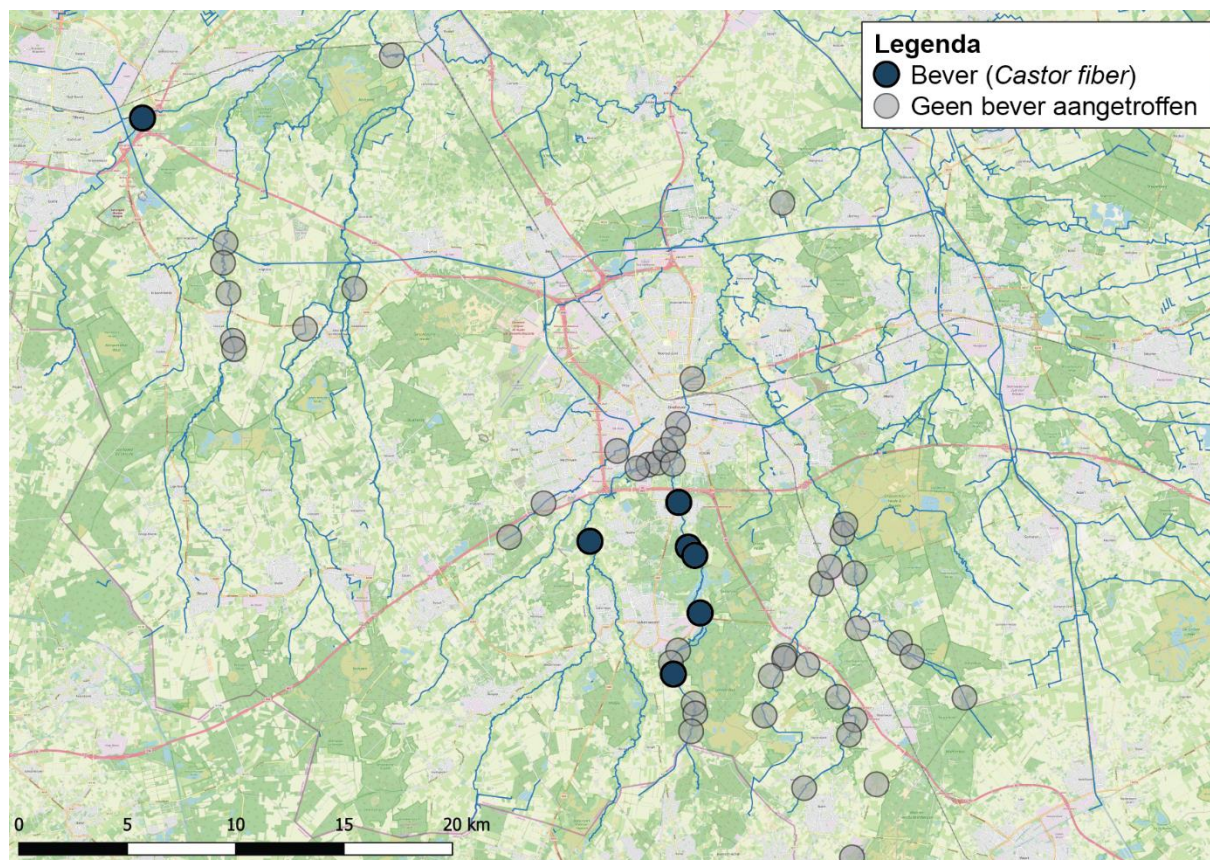
3.4 Abundanties

Om een vergelijking te maken tussen de abundanties gevonden met eDNA (aantallen DNA fragmenten) en de aantallen gevonden in de traditionele vismonitoring, is gekeken naar de soorten die met beide methoden zijn aangetroffen op dezelfde locatie. Uit de data blijkt geen correlatie tussen de relatieve abundanties op basis van eDNA en de relatieve abundantie op basis van elektrovisen (Pearson correlatie, $r = 0,080$, $p = 0,350$). De onderlinge verschillen tussen monsterpunten op basis van aanwezigheid/afwezigheid van vissen zijn sterk gecorreleerd met de onderlinge verschillen op basis van abundantie gegevens (Mantel, $r = 0,768$, $p = 0,001$). Dat wil zeggen dat abundanties slechts een beperkte invloed hebben op deze onderlinge verschillen bij gebruik van eDNA.

3.5 Bijvangst

De primers die zijn toegepast voor de eDNA analyse zijn specifiek ontworpen om zo goed mogelijk de Nederlandse zoetwatervissen te kunnen detecteren en onderscheiden. In de praktijk worden echter regelmatig andere soorten gedetecteerd die ook in het water aanwezig zijn, of waar DNA van aanwezig is in het water. Omdat ze buiten de doelgroep vallen van de primers, worden deze soorten ook wel “bijvangst” genoemd.

Behalve zoetwatervissen zijn diverse zoutwatervissen aangetroffen waarvan bekend is dat deze worden gebruikt als consumptievis, zoals haring (*Clupea harengus*), sprot (*Sprattus sprattus*) en platvis (*Pleuronectiformes* sp.). Daarnaast zijn enkele gewervelden gedetecteerd, waaronder amfibieën zoals Alpenwatersalamander (*Ichthyosaura alpestris*) en kleine watersalamander (*Lissotriton vulgaris*), zoogdieren zoals bosspitsmuis (*Sorex araneus*) en rosse woelmuis (*Myodes glareolus*), en diverse watervogels (bijlage 4). De Europese bever (*Castor fiber*) is op zeven locaties aangetroffen in de Tongelreep (E16-3, E19-2, E19-3, E19-4 en E20-1), de Dommel (E18-3) en de Nieuwe Leij (E48-3) (figuur 8). Er kan echter niets gezegd worden over het voorkomen van deze soorten en andere amfibieën en zoogdieren op andere locaties, omdat de methodiek toegespitst is op de detectie van vissen. Dergelijke onderzoek is wel nog te doen op de genomen monsters, op basis van soort- of groep-specifieke primers voor andere soorten, die de trefkans bij lage concentraties eDNA verbeteren.



Figuur 8: Bemonsterde locaties waar DNA van de bever (*Castor fiber*) is aangetroffen (blauw) en waar dat niet het geval is (grijs).

4 Discussie

4.1 Vastgestelde vissoorten met eDNA

In totaal zijn veertig vissoorten met eDNA aangetoond. De meeste soorten werden vastgesteld in de Dommel en de Tongelreep, met een maximum aantal van 29 op een enkele locatie in de Tongelreep. De locatie met de meeste soorten vissen (E19-4) ligt echter wel benedenstrooms van een afluut van de natuurvijvers op landgoed Valkenhorst. Mogelijk is eDNA van een aantal soorten die gevonden zijn op deze locatie afkomstig uit dit natuurvijvercomplex.

DNA breekt doorgaans binnen enkele dagen tot maximaal twee weken af (Dejean et al. 2011, Thomsen et al. 2012). Hierdoor is er met uitzondering van consumptievissen (zie paragraaf 4.2) zeer waarschijnlijk dat de vissoorten zeer recentelijk aanwezig waren. Wel is het nog mogelijk dat eDNA afkomstig was van gebieden stroomopwaarts. Onderzoek met eDNA in stromende wateren heeft namelijk aangetoond dat eDNA zich tot enkele kilometers van de bron kan verspreiden, afhankelijk van de condities in het water en de stroomsnelheid (Deiner & Altermatt 2014, Civade et al. 2016).

Een aantal soorten kan op basis van hun DNA profielen niet van een andere soort worden onderscheiden. De aanwezigheid van deze soorten is dus lastig vast te stellen. Dit betreft in deze studie de volgende soorten:

- Giebel (*Carassius gibelio*) en goudvis (*C. auratus*)
- Siberische steur (*Acipenser baerii*) en diamantsteur (*A. gueldenstaedtii*)
- Zwarte dwergmeerval (*Ameiurus melas*) en bruine dwergmeerval (*A. nebulosus*)

Mogelijk geldt dit ook voor de beekdonderpad (*Cottus rhenanus*) en de rivierdonderpad (*C. perifretum*) (zie discussie in paragraaf 4.2).

Zeven van de veertig (17,5%) vissoorten betreffen exoten. De exotische marmergrondel is op 25 locaties aangetroffen, en lijkt vrij algemeen in met name de Dommel en de Tongelreep. De zwartbekgrondel is slechts aangetroffen op twee locaties, in de Tongelreep en in de Beeksche Waterloop. Behalve de grondels zijn nog vijf andere exoten aangetroffen. Op sommige locaties betreft het grootste deel van de DNA concentratie exoten. Op locatie E208-3 in de Gender is zelfs al het DNA afkomstig van de Amerikaanse hondsvij.

Behalve vissen werd ook DNA van andere gewervelden aangetroffen, waaronder amfibieën, vogels en zoogdieren, waaronder de bever. De ideale primers hebben geen bijvangst en zouden uitsluitend of in ieder geval voornamelijk vissen aantonen, zodat er geen data wordt “verspild” aan andere soorten dan de doelsoorten. De resultaten tonen de potentie van toepassingen van eDNA met andere soorten dan zoetwatervissen. Met soort-specifieke primers kan heel gericht gekeken worden naar beleidsrelevante taxa.

4.2 Vergelijking vissoorten met elektrovisen

De soortenrijkdom die met elektrovisen is vastgesteld correleert sterk met die van eDNA. Wel is het gemiddelde aantal soorten bij eDNA bemonstering tweemaal zo groot als bij elektrovisen (respectievelijk 13,6 en 6,6). Ook uit andere studies is gebleken dat de trefkans met DNA groter is dan met traditionele vangmethoden (Herder & Kranenbarg, 2016; 2017). Het gebruik van eDNA is minder ingrijpend op het systeem dan elektrovisen, en de bemonstering is veel minder intensief. De resultaten in dit onderzoek zijn gebaseerd op een beperkte bemonsteringsinspanning voor eDNA, per monsterlocatie werd slechts één liter eDNA gefilterd. Daar tegenover staat dat met eDNA (nog) het geslacht, levensstadium of formaat van de aangetroffen vissoorten nog niet kan worden bepaald (Evans et al. 2017). Met behulp van de vastgestelde soorten (aanwezigheid/afwezigheid) is ook gekeken naar de onderlinge patronen tussen monsterlocaties, op basis van verschillen tussen de soortenlijsten per locatie. Deze patronen voor zowel eDNA als elektrovisen zijn matig, maar statistisch significant, met elkaar gecorreleerd. Dit laat zien dat eDNA bruikbaar is voor onderzoek waarin locaties met elkaar worden vergeleken, zoals bijvoorbeeld maatregel-effect analyses.

Een andere verklaring voor de toename in het aantal aangetroffen soorten met eDNA is, naast de verhoogde gevoeligheid, het feit dat stromend water naar alle waarschijnlijkheid eDNA sporen meebrengt vanuit bovenstroomse gebieden. Bij het elektrovisen is een afgebakend traject bemonsterd, terwijl de watermonsters ten behoeve van eDNA een groter stroomgebied kunnen representeren. Vissen die zich stroomopwaarts van de trajecten bevonden zijn op deze manier wel te detecteren met eDNA, terwijl ze met elektrovisen niet zijn aangetroffen.

In dit onderzoek werden met eDNA in totaal elf soorten vis aangetroffen die niet in de traditionele vismonitoring werden gevonden. Van de meeste soorten die alleen met eDNA werden aangetroffen was het aandeel van het totaal gevonden DNA erg laag, wat aangeeft dat deze soorten mogelijk in lage dichtheden aanwezig waren op de bemonsterde locaties, en daardoor niet gevonden zijn met elektrovisen.

Een opmerkelijke vondst betreft de beekdonderpad (*Cottus rhenanus*), een inheemse soort die normaal gesproken niet voorkomt in het onderzochte stroomgebied. De beekdonderpad werd op acht locaties aangetroffen met eDNA (zie ook figuur 6). De rivierdonderpad (*Cottus perifretum*), die veel algemener is in Nederland, werd met eDNA maar op één locatie aangetroffen. Op deze locatie (E11-1, Sterkselsche Aa) werden bovendien DNA profielen aangetroffen van beide soorten. De beekdonderpad en de rivierdonderpad lijken uiterlijk sterk op elkaar wat kan leiden tot determinatiefouten in het veld, en dus ook bij de exemplaren die zijn aangeleverd voor de gebruikte DNA referentiedatabank. In het verleden werden beide soorten in Nederland ten onrechte aangeduid als één soort, *Cottus gobio*. *Cottus gobio* betreft echter een derde soort uit hetzelfde geslacht, maar die komt niet in Nederland voor. De gebruikte DNA profielen van beide soorten donderpad verschillen consequent van elkaar op twee posities in de DNA sequentie.

Het aantreffen van de beekdonderpad kan mogelijk ook worden verklaard doordat de twee soorten hybridiseren in Nederland (Stemshorn et al. 2011). Hierdoor zijn de soorten op basis van het onderzochte DNA fragment mogelijk niet van hybriden (of zelfs van elkaar) te onderscheiden. Bij hybriden is het mogelijk dat ze morfologisch sterk op de ene soort lijken (in dit geval rivierdonderpad), maar een DNA profiel bezitten dat overeenkomt met de andere soort (beekdonderpad). Een (populatie)genetisch onderzoek naar deze soorten zou uitsluitend kunnen geven over het voorkomen van de beekdonderpad in Nederland.

De sneep (*Chondrostoma nasus*) is een vrij zeldzame inheemse soort, die niet is aangetroffen met elektrovisen maar wel met eDNA, op één locatie (15-3, Dommel). De gevonden hoeveelheid DNA was laag (0,01% van het totaal) wat waarschijnlijk indicatief is voor de zeer lage dichtheden van soort in het stroomgebied. Dat kan verklaren waardoor deze soort is gemist met elektrovisen. Ook de graskaper (*Ctenopharyngodon idella*) is niet heel algemeen in Nederland, mede omdat deze exoot zich niet voortplant in Nederlandse wateren. Deze soort werd in totaal op vier locaties aangetroffen met eDNA, maar in alle gevallen betrof het slechts een klein aandeel van de totale hoeveelheid DNA (0,04-3,8%).

Eveneens zeldzaam zijn de zwarte en bruine dwergmeerval (*Ameiurus melas / nebulosus*). Beide soorten zijn exoten afkomstig uit Noord-Amerika, en sporadisch waargenomen in Nederland. Morfologisch zijn ze lastig uit elkaar te houden, en de gebruikte primers kunnen geen onderscheid maken tussen de twee soorten. Met behulp van eDNA is een dwergmeerval aangetroffen op één locatie (E19-6, Tongelreep), hoewel de hoeveelheid eDNA slechts 0,03% van het totale monster betrof.

In een aanzienlijk aantal monsters is eDNA gevonden van twee gevestigde exoten, de gibel / goudvis (*Carassius gibelio / auratus*) en de snoekbaars (*Sander lucioperca*). Deze zijn op een groot aantal locaties aangetroffen (respectievelijk 18 en 13 locaties). De gibel / goudvis vertegenwoordigde in de meeste locaties slechts een klein deel van het gevonden DNA (0,01-2,1%), maar omvatte op één locatie (12-3, Buulder Aa) toch ruim 11% van het totaal. De snoekbaars vertegenwoordigde in alle locaties minder dan 0,2% van alle DNA. Deze lage concentraties betekenen waarschijnlijk dat het om sporadische exemplaren gaat die niet zijn opgepikt met de traditionele vismonitoring.

De brakwatergrondel (*Pomatoschistus microps*) is een inheemse soort die normaal gezien alleen in kustwateren voorkomt, en slecht zelden in zoetwater wordt aangetroffen. In de eDNA bemonstering is deze soort aangetroffen op drie locaties in de Tongelreep (E19-6 en E21-1) en de Buulder Aa (E12-7). Ook van deze soort werd weinig DNA gevonden, ten hoogste 0,28% van het totale DNA. Van deze soort zijn meer geïsoleerde waarnemingen bekend, zoals in het Zwarte Water.

Op zeven locaties werd eDNA van de zalm (*Salmo salar*) aangetroffen, eveneens met lage hoeveelheden DNA. Het aandeel zalm was het grootste op locatie E11-1 (Sterkselsche Aa, 0,12%), maar op de meeste locaties werd slechts weinig DNA gevonden (maximaal 0,02%). De Maas, waar de Dommel uiteindelijk via de Dieze in uitmondt, behoort tot de trekroute van de zalm naar het paaigebied. Het is dus niet ondenkbaar dat deze soort sporadisch in het

stroomgebied van de Dommel voorkomt. Omdat de zalm ook een belangrijke consumptievish is, zijn resten van menselijke consumptie een waarschijnlijke bron van DNA. Diverse andere consumptievissen werden aangetroffen in de eDNA monsters, waaronder haring en platvis. Op basis van DNA is (nog) niet te bepalen of een aangetroffen soort dood of levend was ten tijde van het DNA verlies. Bij deze mogelijke consumptievissen zou de aanwezigheid visueel moeten worden geverifieerd.

Hetzelfde geldt in mindere maten voor de Atlantische forel (*Salmo trutta*), die op één locatie werd aangetroffen met eDNA (E21-1, Tongelreep), met ook weer een zeer laag aandeel van het totaal gevonden DNA (0,12%). Atlantische forel is bovendien een aantal jaar terug op diverse plekken in de Tongelreep uitgezet ten behoeve van de sportvisserij. Deze wordt ook sporadisch nog door vissers gevangen, en is mogelijk nog aanwezig in het systeem. Het lijkt in dit geval daarom minder waarschijnlijk dat het om een vals positieve detectie gaat op basis van resten van consumptievissen.

De Siberische steur / diamantsteur (*Acipenser baerii* / *gueldenstaedtii*) en de sterlet (*Acipenser ruthenus*) werden op respectievelijk twee en één locatie aangetroffen. Op locatie E17-5 (Dommel) werden beide soorten aangetroffen, op locatie E15-4 (eveneens Dommel) alleen de Siberische steur / diamantsteur. Deze exoten worden veelal in vijvers gehouden en mogelijk is het eDNA afkomstig van afwatering. Deze soorten worden met enige regelmaat nog wel aangetroffen door sportvissers en waterbeheerders, dus het kan hier ook gaan om enkele uitgezette dieren.

Met eDNA werd over alle locaties in totaal één soort gemist die wel werd gevonden met traditionele bemonstering, en dat betreft de beekprik (*Lampetra planeri*). De beekprik werd op locatie E18-3 (Dommel) gevonden met twee exemplaren. Deze soort is wel aanwezig in de DNA referentiedatabank die gebruikt is in dit onderzoek, en de gekozen primers kunnen deze soort ook aantonen. Waarschijnlijk was de concentratie eDNA van de beekprik te laag in verhouding met de 25 andere soorten die wel werden aangetroffen. Tevens leeft de beekprik met name op en in de bodem, waardoor DNA in de bovenste waterlaag (welke in dit onderzoek is bemonsterd) afwezig of sterk verdund is. Bodemonsters of methoden die specifiek gericht zijn op de beekprik zouden in dit geval uitsluitel kunnen bieden.

4.3 Vergelijking abundanties met elektrovisen

Het gebruik van abundantie data met eDNA is omstreden. Onderzoek heeft laten zien dat bij diverse processtappen, van bemonstering in het veld tot aan sequencing, kunstmatige verschillen kunnen ontstaan in de verhoudingen tussen het DNA van soorten (zie bijvoorbeeld Elbrecht & Leese 2015). Een deel van de aangetroffen verschillen tussen soorten is gelegen in de biologie en ecologie van de vissen. Zo zullen grote en actieve vissen meer eDNA loslaten in de omgeving dan kleine of minder actieve vissen. Ook relatief gezien laten grote vissen andere hoeveelheden eDNA achter dan kleine vissen, omdat zij een andere biomassa-lichaamsoppervlakte verhouding hebben; de slijm laag van vissen is immers een voorname bron van eDNA. Incidenteel kan een relatief grote hoeveelheid eDNA in het water

terecht komen gedurende de paaitijd. Tijdens de bemonstering wordt ook het eDNA verzameld van alle andere organismen in het water. In wateren met bijvoorbeeld veel algen kan de hoeveelheid eDNA van vissen op het filter daardoor beperkt zijn. Ook op het lab kan de verhouding eDNA verstoord worden, bijvoorbeeld door verschillen in de bindingsplaats voor de gebruikte primers. Die zorgen er voor dat sommige soorten makkelijker opgepikt worden dan andere (ook wel bekend als de “primer bias”).

Verhoudingen eDNA zullen daarom meestal niet een goede weerspiegeling geven van de verhoudingen in aantallen exemplaren van soorten zoals ze zijn waargenomen met traditionele vismonitoring. In dit onderzoek is geen correlatie gevonden tussen de relatieve abundanties op basis van eDNA en de relatieve abundantie op basis van elektrovisen (Pearson correlatie, $r = 0,080$, $p = 0,350$). Eerder onderzoek in Nederlandse wateren heeft eveneens laten zien dat correlaties tussen eDNA abundanties en aantallen en/of biomassa gevonden met traditionele monitoring meestal erg laag liggen (Herder & Kranenbarg, 2016; 2017).

In dit onderzoek werd aangetoond dat de onderlinge verschillen tussen monsterpunten op basis van aanwezigheid/afwezigheid van vissen sterk gecorreleerd zijn met de onderlinge verschillen op basis van abundantie gegevens (Mantel, $r = 0,768$, $p = 0,001$). Dat wil zeggen dat abundanties slechts een beperkte invloed hebben op deze onderlinge verschillen bij gebruik van eDNA, en dat de verschillen die bestaan tussen visgemeenschappen op basis van eDNA gegevens ook bekeken kunnen worden zonder naar de (relatieve) abundanties te kijken. Eerder onderzoek bij macrofauna heeft aangetoond dat abundantie informatie voor bijvoorbeeld de ecologische kwaliteitsratio (EKR) weinig van invloed is. EKR-scores waren nagenoeg identiek voor data op basis van aantallen individuen per soort en data op basis van alleen aanwezigheid/afwezigheid van soorten (Beentjes et al. 2018).

5 Conclusies

Op basis van eDNA zijn in totaal veertig vissoorten aangetoond. Het aantal vissen dat is aangetroffen op de verschillende monsterpunten loopt uiteen van één enkele soort tot maximaal 29 soorten. Op twee locaties zijn geen vissen aangetroffen met eDNA, dit betroffen locaties die met elektrovisseren ook geen resultaat hadden opgeleverd.

In totaal is op 25 locaties de marmergrondel aangetroffen, en op twee locaties de zwartbekgrondel. Van de acht locaties die gedefinieerd zijn als aandachtsgebied voor het voorkomen van exotische grondels, is op drie plaatsen de marmergrondel gevonden, en op één locatie de zwartbekgrondel.

In totaal zijn elf soorten uitsluitend met eDNA gevonden, en één soort uitsluitend met elektrovisseren. Het aantal soorten dat met eDNA is gedetecteerd ligt tweemaal zo hoog als het aantal soorten dat met elektrovisseren is gevonden. Er is een sterke correlatie tussen de soortenrijkdom van de beide methoden.

Er is geen correlatie gevonden tussen de (relatieve) abundanties uit de eDNA analyse en de abundanties van vissoorten waargenomen met elektrovisseren. Er is een matige correlatie in de samenstelling van vissoorten tussen de monsterpunten op basis van eDNA en op basis van elektrovisseren, gebaseerd op aan- en afwezigheid. Abundantie heeft slechts beperkte invloed op deze onderlinge verschillen.

6 Aanbevelingen

Voor vismonitoring kan uitstekend gebruik worden gemaakt van eDNA technieken. Met behulp van eDNA kan een goed beeld worden gevormd van de soorten die aanwezig zijn in een watersysteem. Naast de meer uitgebreide soortenlijst, en de detectie van exoten op meer locaties in vergelijking met elektrovisserij, is het bemonsteren van eDNA ook minder arbeidsintensief, minder invasief op de leefomgeving, en makkelijker op te schalen naar meer monsters. Voor zeldzame soorten, of soorten die minder actief zijn in de waterkolom (zoals de beekprik) is het aan te raden om gebruik te maken van methoden die specifiek gericht zijn op deze soorten. Op die manier is de detectiekans te verhogen.

Voor de detectie van exoten in een waterlichaam lijkt eDNA zeer geschikt. Voor detectie van een bepaalde exoot kan een soort-specifieke methode ingezet worden om de detectiekans te verhogen, maar met behulp eDNA metabarcoding gegevens kan al een goed overzicht geproduceerd worden van het voorkomen van diverse exoten in een systeem. Zo werden de exotische grondels middels eDNA op meer locaties aangetroffen dan met elektrovisserij. De eDNA bemonstering kan worden ingezet om exoten sneller en met minder inspanning te detecteren.

Traditionele vismonitoring met elektrovisserij of vergelijkbare methoden zal noodzakelijk blijven in het geval van onderzoek naar samenstelling van populaties op basis van grootte, levenscyclus of geslacht van vissen, aangezien eDNA daar (nog) geen informatie kan voorzien. Daarnaast kunnen traditionele technieken ook uitsluitel geven op een aantal vragen die naar boven komen uit de eDNA analyses. De werkelijke aanwezigheid van consumptievissen zoals zalm zou visueel moeten worden geverifieerd.

Bij stromende wateren bestaat er nog een kans dat eDNA over langere afstanden getransporteerd wordt. Daardoor is het mogelijk om vissen benedenstrooms van hun verspreiding te detecteren. De afstanden zijn echter afhankelijk van veel factoren, waaronder de stroomsnelheid en de fysisch-chemische eigenschappen van het water. Er is nog maar beperkt onderzoek gedaan naar dit fenomeen, en om een beter inzicht te krijgen in de effecten van eDNA transport zou gericht onderzoek plaats moeten vinden.

Literatuur

Beentjes KK, Speksnijder AGCL, Schilthuizen M, Schaub BEM, van der Hoorn BB (2018) The influence of macroinvertebrate abundance on the assessment of freshwater quality in The Netherlands. *Metabarcoding and Metagenomics* 2:e26744. doi: 10.3897/mbmg.2.26744.

Beentjes KK, Speksnijder AGCL, Schilthuizen M, Hoogeveen M, Pastoor R, van der Hoorn BB (2019) Increased performance of DNA metabarcoding of macroinvertebrates by taxonomic sorting. *PLoS ONE* 14:e0226527. doi: 10.1371/journal.pone.0226527.

Civade R, Dejean T, Valentini A, Roset N, Raymond JC, Bonin A, Taberlet P, Pont D (2016) Spatial representativeness of environmental DNA metabarcoding signal for fish biodiversity assessment in a natural freshwater system. *PLoS ONE* 11:e0157366. doi: 10.1371/journal.pone.0157366.

Deiner K, Altermatt F (2014) Transport distance of invertebrate environmental DNA in a natural river. *PLoS ONE* 9:e88786. doi: 10.1371/journal.pone.0088786.

Dejean T, Valentini A, Duparc A, Pellier-Cuit S, Pompanon F, Taberlet P, Miaud C (2011) Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems. *PLoS ONE* 6:e23398. doi: 10.1371/journal.pone.0023398.

Elbrecht V, Leese F (2015) Can DNA-based ecosystem assessments quantify species abundance? Testing primer bias and biomass - sequence relationships with an innovative metabarcoding protocol. *PLoS ONE* 10:e0130324. doi: 10.1371/journal.pone.0130324.

Evans NT, Olds BP, Renshaw MA, Turner CR, Li Y, Jerde CL, Mahon AR, Pfrender ME, Lamberti GA, Lodge DM (2016) Quantification of mesocosm fish and amphibian species diversity via environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources* 16:29–41. doi: 10.1111/1755-0998.12433.

Evans NT, Shirey PD, Wieringa JG, Mahon AR, Lamberti GA (2017) Comparative cost and effort of fish distribution detection via environmental DNA analysis and electrofishing. *Fisheries* 42:90–99. doi: 10.1080/03632415.2017.1276329.

Herder J, Kranenbarg J (2016) eDNA metabarcoding vissen Verkennend onderzoek naar de mogelijke toepassing van eDNA voor de KRW vismonitoring. STOWA rapport 2016-19.

Herder J, Kranenbarg J (2017) eDNA metabarcoding vissen. STOWA rapport 2017-38.

van der Kamp M, Beers M, Hootsmans M, Wullings B (2017) Monitoring van vispopulaties met eDNA: de NL-vispopulatiescan als kansrijke benadering. *Water Matters* 2017 (Juni):12–15.

Lacoursière-Roussel A, Côté G, Leclerc V, Bernatchez L (2015) Quantifying relative fish abundance with eDNA: a promising tool for fisheries management. *Journal of Applied Ecology*. doi: 10.1111/1365-2664.12598.

Pilliod DS, Goldberg CS, Arkle RS, Waits LP, Richardson J (2013) Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 70:1123–1130. doi: 10.1139/cjfas-2013-0047.

Shaw JLA, Clarke LJ, Wedderburn SD, Barnes TC, Weyrich LS, Cooper A (2016) Comparison of environmental DNA metabarcoding and conventional fish survey methods in a river system. *Biological Conservation* 197:131–138. doi: 10.1016/j.biocon.2016.03.010.

Sigsgaard EE, Nielsen IB, Carl H, Krag MA, Knudsen SW, Xing Y, Holm-Hansen TH, Møller PR, Thomsen PF (2017) Seawater environmental DNA reflects seasonality of a coastal fish community. *Marine Biology* 164:128. doi: 10.1007/s00227-017-3147-4.

Stemshorn KC, Reed FA, Nolte AW, Tautz D (2011) Rapid formation of distinct hybrid lineages after secondary contact of two fish species (*Cottus* sp.). *Molecular Ecology* 20:1475–1491. doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04997.x.

Stoeckle MY, Soboleva L, Charlop-Powers Z (2017) Aquatic environmental DNA detects seasonal fish abundance and habitat preference in an urban estuary. *PLoS ONE* 12:e0175186. doi: 10.1371/journal.pone.0175186.

Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, Wiuf C, Rasmussen M, Gilbert MTP, Orlando L, Willerslev E (2012) Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology* 21:2565–73. doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05418.x.

Turner CR, Miller DJ, Coyne KJ, Corush J (2014) Improved methods for capture, extraction, and quantitative assay of environmental DNA from Asian bigheaded carp (*Hypophthalmichthys* spp.). *PLoS ONE* 9:e114329. doi: 10.1371/journal.pone.0114329.

Bijlagen

Bijlage 1

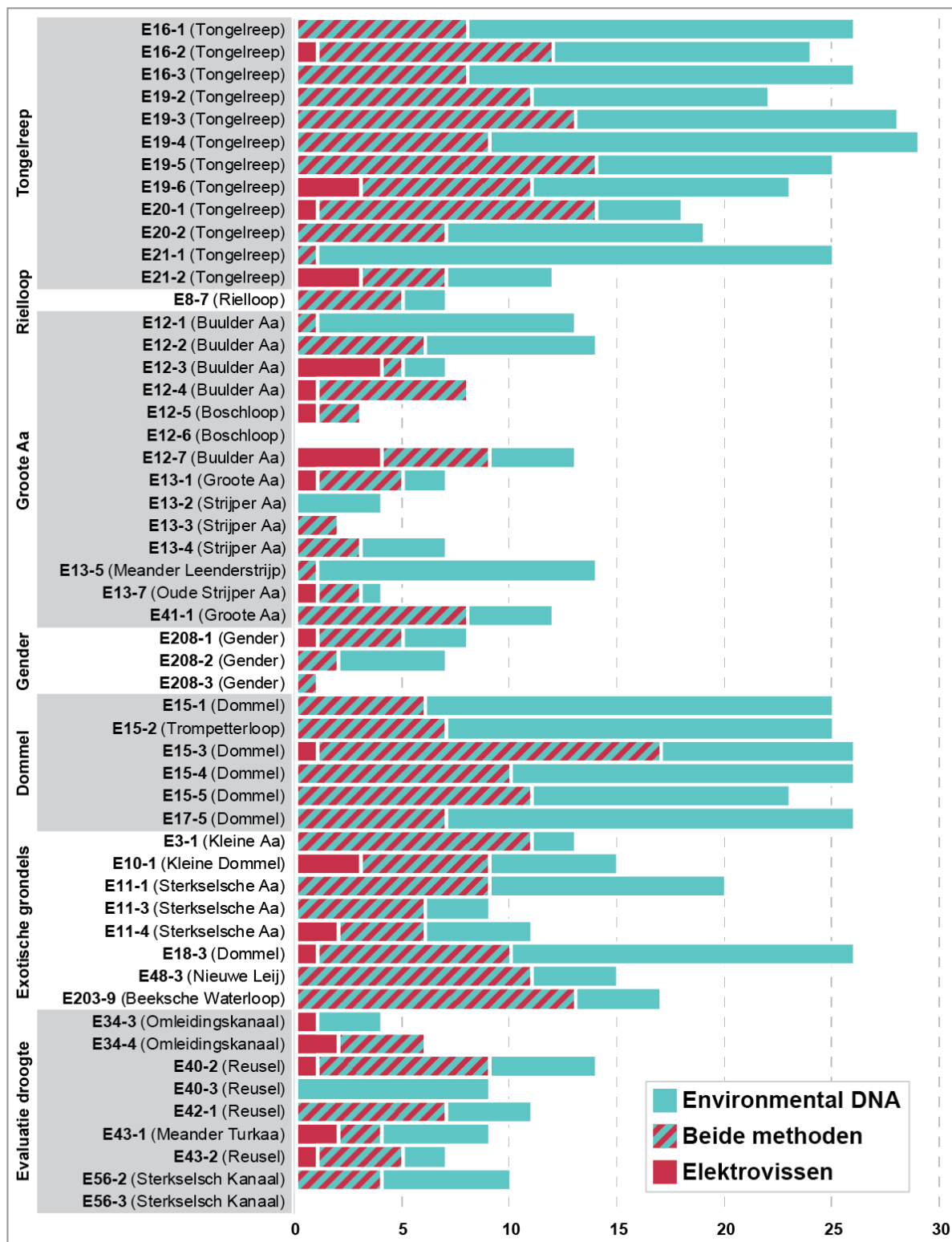
Overzicht bemonsterde locaties en aangetroffen aantal soorten voor zowel de traditionele vismonitoring als de eDNA bemonstering.

Traject / Project	Punt	Waterlichaam	RD-X	RD-Y	Elektro	eDNA
Tongelreep	E16-1	Tongelreep	161207	381892	8	26
	E16-2	Tongelreep	161184	380758	12	23
	E16-3	Tongelreep	161456	378997	8	26
	E19-2	Tongelreep	161897	376949	11	22
	E19-3	Tongelreep	162449	373926	13	28
	E19-4	Tongelreep	162196	376566	9	29
	E19-5	Tongelreep	161440	372200	14	25
	E19-6	Tongelreep	161104	371634	11	20
	E20-1	Tongelreep	161222	371116	14	17
	E20-2	Tongelreep	162150	369769	7	18
	E21-1	Tongelreep	162230	369312	1	25
	E21-2	Tongelreep	162040	368489	7	9
Rielloop	E8-7	Rielloop	169121	378004	5	7
Groote Aa	E12-1	Buulder Aa	169594	369033	1	13
	E12-2	Buulder Aa	167392	371566	6	14
	E12-3	Buulder Aa	167259	365888	5	3
	E12-4	Buulder Aa	169318	368343	8	7
	E12-5	Boschloop	169472	362709	3	2
	E12-6	Boschloop	170593	366074	0	0
	E12-7	Buulder Aa	168803	370081	9	9
	E13-1	Groote Aa	168034	375284	5	6
	E13-2	Strijper Aa	166283	367080	0	4
	E13-3	Strijper Aa	165424	369218	2	2
	E13-4	Strijper Aa	166360	371975	3	7
	E13-5	Meander Leenderstrijp	166319	371859	1	14
	E13-7	Oude Strijper Aa	165706	371039	3	3
	E41-1	Groote Aa	168416	376048	8	12
Gender	E208-1	Gender	158616	381352	5	8
	E208-2	Gender	155241	378946	2	8
	E208-3	Gender	153659	377397	1	1
Trajecten Dommel	E15-1	Dommel	161411	382604	6	25
	E15-2	Trompetterloop	160834	381401	7	25
	E15-3	Dommel	162078	384655	17	25
	E15-4	Dommel	160059	380723	10	26
	E15-5	Dommel	160488	380814	11	23
	E17-5	Dommel	159554	380558	7	26

Traject / Project	Punt	Waterlichaam	RD-X	RD-Y	Elektro	eDNA
Exotische grondels	E3-1	Kleine Aa	148288	399458	11	13
	E10-1	Kleine Dommel	168992	377591	9	12
	E11-1	Sterkselsche Aa	169554	375760	9	20
	E11-3	Sterkselsche Aa	169710	373236	6	9
	E11-4	Sterkselsche Aa	172222	371942	6	9
	E18-3	Dommel	157374	377210	10	25
	E48-3	Nieuwe Leij	136850	396620	11	15
	E203-9	Beeksche Waterloop	166193	392723	13	16
Evaluatie droogte	E34-3	Omleidingskanaal	144283	386964	1	3
	E34-4	Omleidingskanaal	146551	388784	6	4
	E40-2	Reusel	140643	390902	9	13
	E40-3	Reusel	140524	389986	0	9
	E42-1	Reusel	140769	388604	7	11
	E43-1	Meander Turkaa	140963	386421	4	7
	E43-2	Reusel	141026	386040	5	6
	E56-2	Sterkselsch Kanaal	174640	370067	4	10
	E56-3	Sterkselsch Kanaal	171648	372580	0	0

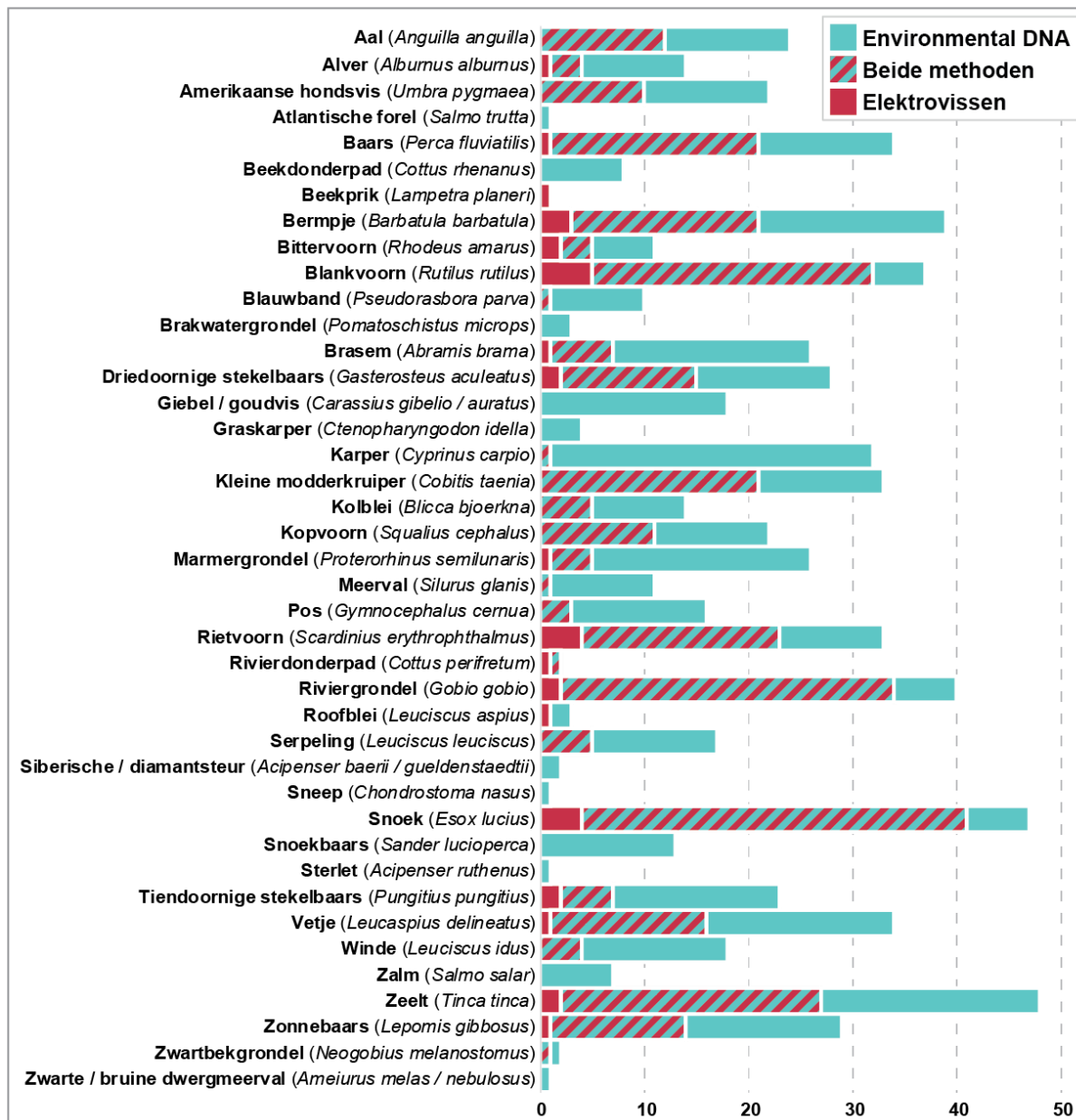
Bijlage 2

Het aantal aangetroffen soorten per monster voor zowel soorten die allen gevonden zijn met de morfologische of de eDNA methode, en de soorten die met beiden methoden zijn gevonden. De monsterlocaties zijn opgedeeld in de monitoringstrajecten of -projecten zoals deze zijn uitgevoerd door ATKB.



Bijlage 3

Het aantal locaties per soort, voor zowel de locaties waar soorten alleen met de morfologische of de eDNA methode werden aangetroffen, en de locaties waar de soorten met beiden methoden zijn gevonden.



Bijlage 4

Een beknopt overzicht van de aangetroffen soorten die als “bijvangst” gerekend zijn. Omdat de eDNA primers specifiek waren toegespitst op vissen, is het zeer goed mogelijk dat meer soorten aanwezig zijn dan hieronder beschreven, en dat de hieronder beschreven soorten op meer locaties voorkomen. Voor verder onderzoek aan deze soorten of soortgroepen kan worden verricht op de al genomen eDNA monsters, maar daar zijn primers nodig die specifiek zijn voor deze soorten. In totaal zijn drie soorten amfibieën aangetroffen in de eDNA analyse. Naast de bever zijn een aantal voornamelijk op land levende zoogdieren aangetroffen, en aantal vogels, waaronder een aantal vrij algemene watervogels.

Gewone pad (*Bufo bufo*)

- Aangetroffen op 15 locaties: E13-5, E13-6, E15-1, E15-4, E16-1, E17-5, E18-3, E20-1, E20-2, E21-1, E40-3, E48-3, E56-2, E208-1, E208-2

Alpenwatersalamander (*Ichthyosaura alpestris*)

- Aangetroffen op 14 locaties: E12-2, E12-3, E12-7, E13-4, E13-7, E15-3, E16-1, E16-2, E17-5, E18-3, E19-6, E21-1, E208-1, E208-2

Kleine watersalamander (*Lissotriton vulgaris*)

- Aangetroffen op 4 locaties: E13-6, E13-7, E16-1, E34-3

Bever (*Castor fiber*)

- Aangetroffen op 7 locaties: E16-3, E18-3, E19-2, E19-3, E19-4, E20-1, E48-3

Overige zoogdieren:

- | | |
|--|---|
| • Aardmuis (<i>Microtus arvalis</i>) | • Egel (<i>Erinaceus europaeus</i>) |
| • Rosse woelmuis (<i>Myodes glareolus</i>) | • Konijn (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) |
| • Bruine rat (<i>Rattus norvegicus</i>) | • Mol (<i>Talpa europaea</i>) |
| • Bosspitsmuis (<i>Sorex araneus</i>) | • Ree (<i>Capreolus capreolus</i>) |
| • Edelhert (<i>Cervus elaphus</i>) | |

Aangetroffen vogels (geen compleet overzicht):

- | | |
|--|--|
| • Bergeend (<i>Tadorna tadorna</i>) | • Muskuseend (<i>Cairina moschata</i>) |
| • Grauwe gans (<i>Anser anser</i>) | • Waterhoen (<i>Gallinula chloropus</i>) |
| • Grote Canadese gans (<i>Branta canadensis</i>) | • Waterral (<i>Rallus aquaticus</i>) |
| • IJsvogel (<i>Alcedo atthis</i>) | • Watersnip (<i>Gallinago gallinago</i>) |
| • Krakeend (<i>Mareca strepera</i>) | • Wilde zwaan (<i>Cygnus cygnus</i>) |
| • Mandarijneend (<i>Aix galericulata</i>) | • Zilvermeeuw (<i>Larus argentatus</i>) |
| • Meerkoet (<i>Fulica atra</i>) | |