



eDNA afgeronde activiteiten

Dit is een overzicht van afgeronde activiteiten die uitgevoerd zijn om de projectagenda te realiseren.

Dit overzicht van activiteiten is primair bedoeld om alle betrokkenen een idee te geven hoe en in welk tijdbestek onderdelen van de project agenda zijn uitgevoerd. Dit geeft iedereen houvast om zijn/haar bijdrage aan het behalen van de resultaten van de projectagenda te herkennen.

De activiteiten in het overzicht van afgeronde activiteiten zullen georganiseerd worden via gedefinieerde experimenten waarbij de bijbehorende (sub)onderdelen alsmede de gerelateerde rolverdeling van de partners en geassocieerde tijdsplanning zal worden genoemd.

Hieronder volgt een lijst met afgeronde activiteiten volgens de projectopbouw:

> *Onderdeel* >> *Subonderdeel* >>> *Deelproject* >>>> *Activiteit*.

1 Optimaliseren MBR-eDNA bemonstering

a - Optimaliseren monstername

Sp-naam: MAD1000-P025-E004 Reproduceerbaarheid in 1 locatie

Deelproject: Dp1a1

Act 1. Reproduceerbaarheid bepalen

Tijdpad: 11-2018

Partners: UvA, Muskusrattenbeheer West- en Midden Nederland (HDSR)

Doel:

- Aantonen wat de reproduceerbaarheid van de eDNA detectie is wanneer we uitgaan van dezelfde locatie.
- Grofweg bepalen op welke waterdiepte het beste gemeten kan worden.

Beschrijving

- We gaan op een aantal plekken op hetzelfde tijdstip replica monsters nemen die heel dicht bij elkaar liggen gebruik makend van een vast bemonsteringsstramien met 6 monsters op gelijke afstand
- We gaan op een aantal plekken op hetzelfde tijdstip replica monsters nemen op verschillende dieptes (0, 50 en 100 cm)

Resultaat

- In totaal 288 muskusrat eDNA analyses.
- Totaal eDNA opbrengst redelijk vergelijkbaar over locaties bij 0 en 50 cm. Bij 100 cm was deze bij bijna alle locaties meerdere malen hoger
- Bemonstering aan het oppervlak (0 cm) of 50 cm diep gaf vergelijkbare muskusrat eDNA detectie
- Bemonstering op 100 cm diep gaf meestal veel lagere signalen en moet verder vermeden worden

Conclusie:

Bemonsteren aan het oppervlak of tot maximaal 50 cm diep.

SP-naam: MAD1000-P025-SP02 Houdbaarheid eDNA vriezen-ontdooien

Deelproject: DP1a2

Act1: Bepalen houdbaarheid eDNA bij verschillende temperaturen

Tijdpad: 11-2018 – 12-2018

Partners: UvA, HDSR

Doel:

- Aantonen wat de houdbaarheid is van eDNA monsters
- Aantonen wat de beste conditie is om watermonsters te bewaren: kamertemperatuur, koelkast, vriezer
- Aantonen of laten staan van de monsters (uitzakken) het signaal beïnvloedt

Beschrijving:

- We gaan monsters bewaren bij verschillende temperaturen
- We gaan monsters nemen zonder uitzakken en met uitzakken

Resultaat:

In totaal 192 muskusrat eDNA analyses.

Alle qPCR analyses waren negatief. Er is waarschijnlijk ergens iets fout gegaan.

Conclusie: Monsters in het veld voor dit experiment waren genomen twee week na de andere monsters genomen voor positief materiaal, en op iets andere locatie. Waarschijnlijk waren deze plekken niet (meer) positief.

SP-naam: MAD1000-P025-SP02 Houdbaarheid eDNA vriezen-ontdooien

Deelproject: DP1a3

Act.2: Bepalen effect vriezen dooien DNA

Tijdpad: 11-2018 – 12-2018

Partners: UvA

Doel: Aantonen of herhaald vriezen en dooien van monstermateriaal een negatief effect heeft op de houdbaarheid van eDNA in de context van MBR-qPCR-analyses.

Beschrijving:

- We gaan een aantal positieve controle monsters een aantal opeenvolgende vries/dooi cycli laten ondergaan. Wordt het qPCR signaal zwakker bij opeenvolgende vries/dooi cycli?
- We gaan parallel een keer 3 monsters afdraaien in de tafel centrifuge op max snelheid om al het eventueel overgebleven DNA af te draaien
- We gaan in het supernatant van 15 ml DNA isolaties checken of er nog DNA is achtergebleven

Resultaat:

- Het ondergaan van tot 5 vries-dooi cycli had geen negatief effect op de totale eDNA opbrengst en detectie van muskusrat eDNA met qPCR mits geïsoleerd door middel van precipitatie.

- Wel veel schommelingen in de totale eDNA opbrengst en qPCR metingen tussen de vries-dooi cycli. De monsters waren mogelijk niet homogeen genomen/ingevroren.
- Hoewel er ongeveer gelijke totale eDNA opbrengst uit de monsters kwam, is het aandeel muskusrat eDNA (qPCR) tot wel 25x verschillend
- Door afdraaien van grote volumes bij lage snelheid:
 - Treed een sterk wisselend verlies van 0-57% muskusrat eDNA op
 - Treed een constanter verlies van ~25% total eDNA op
 - Dit lijkt monster afhankelijk
 - Bron van muskusrat eDNA is (cel)klontjes in het monster?
- Reproduceerbaarheid tussen 3 technische replica's is laag. De monsters waren mogelijk niet homogeen door klontjes of het pellet wordt misschien verstoord/verwijderd tijdens het wassen.

Conclusie: Vries/dooi cycli hebben geen negatief effect op totale eDNA concentratie. De concentratie van eDNA in de watermonsters is niet homogeen, waardoor de reproduceerbaarheid zelfs tussen technische replica's laag is.

SP-naam: MAD1000-P025-E007 Praktijkproef Friesland polder#5 -01

Deelproject: Dp1a4

Act. 1: Praktijkproef Friesland

Tijdpad: 11-2018

Partners: UvA, Wetterskip Fryslân (WF)

Doel:

- MBR-eDNA-bemonstering set testen in praktijk
- Bestrijders uit Friesland een eerste kennismaking met eDNA bemonstering geven
- Bepalen hoeveel eDNA er gemiddeld uit 1 ml water kan worden gehaald
- Bepalen wat de range is van eDNA opbrengst per ml watermonster
- Bepalen hoeveel uitval er voorkomt bij eDNA isolatie
- Uitproberen opschalen van individuele DNA-isolatiekolom naar 96-wells format
- Uitproberen eDNA isolatie van “gepoolde” monsters via PES filter (vergelijk eDNA opbrengst)
- Testen of de negatieve waterwegen ook echt MBR eDNA negatief zijn

Beschrijving:

Polder #5 opdelen in blokken van 40 monsters (= 4 km hoofdwatgang per blok):

- In tochten e.d. om de 100 meter, dit zijn alleen de hoofdwatgangen
- Bij kavelsloten alleen op de aansluiting met een hoofdwatgang
- De boezem laten we even links liggen
- Monsternamen in duo's uit te voeren: 1 persoon neemt het monster, de tweede registreert de coördinaten en schrijft het nummer op de monsterbuis.
- Per bestrijders duo, 2 blokken van 40 monsters verzamelen.
- Met 4 duo's op 1 dag = 8 blokken = 320 monsters

Resultaat

- In totaal 160 muskusrat eDNA analyses.
- De MBR-eDNA-bemonstering set was uitvoerig in het veld getest door bestrijders en werkte naar behoren
- Gemiddelde eDNA opbrengst bij de precipitatie isolatie methode was ~32 ng/ml monster
- Gemiddelde eDNA opbrengst bij de filter isolatie methode was ~79 ng/ml monster
- eDNA isolatie via filtering was 2,4x efficiënter (= gevoeliger) dan via precipitatie
- Glycoblue had geen negatief effect op de PCR reactie
- Alle MR-qPCR reacties (n = 160 + 12 controles) waren negatief. Dit lag in de lijn der verwachting.

SP-naam: MAD1000-P025-E009 Controle na wegvangen jongen Friesland

Deelproject: Dp1a5

Act. 1: Controle na wegvangen jongen Friesland

Tijdpad: 12-2018 – 03-2020

Partners: UvA, WF

Doel:

- Ervaring opdoen voor Friesland met eDNA in de praktijk
- Definitief negatief verklaren van een specifieke locatie waar eerder muskusratten zijn weggevangen

Beschrijving: Locatie waar half oktober jongen en een vrouwtjes muskusrat zijn gevangen. Doordat de sloot gehekeld is kan er niet goed zichtbaar worden vastgesteld of er nog muskusrat activiteit is. Mogelijk kan eDNA uitkomst bieden.

- Vraat sporen gezien tijdens bemonstering. Zes extra monsters naar aanleiding van melding burger
- Iteratief experiment, waarbij de cyclus “eDNA meten > vangen” wordt herhaald tot de locatie leeg is
- 24 monsters per test volgens een vooraf opgesteld bemonsteringsschema

Resultaat:

In totaal 138 muskusrat eDNA analyses.

Cyclus 1

- 24 monsters om de 15 meter
- 7 monsters positief (>0.5 pg); 13 monsters zwak positief; 4 monsters negatief
- Naar aanleiding van de positief geteste locaties waren klemmen geplaatst en binnen 5 dagen in totaal 4 muskusratten gevangen.

Cyclus 2

- 24 monsters om de 15 meter + 20 monsters om de 100 meter
- 25 monsters positief; 3 zwak positief; 16 monsters negatief

- Naar aanleiding van de positief geteste locaties waren klemmen geplaatst en in totaal 3 muskusratten gevangen.

Cyclus 3

- 40 monsters fijnmazig om de 100 meter
- 18 monsters positief; 2 monsters zwak positief; 20 monsters negatief
- Naar aanleiding van de positief geteste locaties waren klemmen geplaatst en in totaal 4 muskusratten gevangen.

Cyclus 4

- 39 monsters fijnmazig om de 100 meter
- 17 positief, 21 zwak positief, 1 zeer zwak positief (<0.1 pg)

Cyclus 5

- 1 monster positief, 25 zwak positief, 8 zeer zwak positief, 5 negatief

Cyclus 6:

- 7 positief, 12 zwak positief, 11 zeer zwak positief, 9 negatief

Cyclus 7:

- 7 zeer zwak positief, 32 negatief

Cyclus 8 (autosampler):

- 4 trajecten 1 Km, 4 positief

Cyclus 9 (puntbemonstering):

- 1 monster zwak positief, 38 negatief

Conclusie

- Er is een duidelijk kwalitatieve toegevoegde waarde van de eDNA aanpak.
- Er worden muskusratten gevangen, daar waar niet verwacht op basis van de ervaring van bestrijders.
- Bestrijders gaan langer door, omdat het eDNA aantoont dat er nog muskusratten aanwezig zijn.
- eDNA heeft muskusrat bouwen kunnen aanwijzen met ~ 15 meter nauwkeurigheid.

Daarnaast zijn er een aantal leermomenten

- Bestrijders dienen opgeleid te worden voor eDNA bemonstering, omdat ze geneigd zijn ervaring mee te nemen in het besluit wat wel/niet te bemonsteren. terwijl bemonstering “blind” dient te gebeuren.
- In dit geval is er vanuit een eerste positieve locatie steeds verder naar buiten gewerkt. Dit is niet efficiënt: NIEUWE STRATEGIE = eerst grofmazig de randen van het territorium van de gevonden muskusratpopulatie bepalen en dan fijnmazig van buiten naar binnen werken en een grofmazige nacontrole doen met het oorspronkelijke raster.

- De bestrijders (en leidinggevend) zijn na deze ervaring volledig overtuigd dat eDNA een zeer bruikbare tool is voor muskusratbestrijding

Sp-naam: MAD1000-P025-E008 Ad-Hoc testen Friesland

Deelproject: Dp1a6

Act. 1: Ad-Hoc testen Friesland

Tijdpad: 11-2018

Partners: UvA, WF

Doel: Bepalen of er op een aantal ad-hoc gekozen locaties muskusrat eDNA aanwezig is

Beschrijving:

- 5 monsters meegenomen gedurende experiment MAD1000-P025-E007
- 6 monsters genomen naar aanleiding van een melding van een zwemmende muskusrat door een burger

Resultaat:

- In totaal 11 muskusrat eDNA analyses.
- 1 monster zwak muskusrat positief

Conclusie

eDNA signaal gedetecteerd

SP-naam: MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP17 1e pooling test
Sloterplas\DataWetlab\1 - Test 11x 5 km pools

Deelproject: DP1a7

Act. 1: testen 5 Km pools

Doel: Testen van eDNA Detectie in gepoolde monsters over 5 Km totaal volume 500 ml

Tijdpad: 08-2019

Partners: UvA, HDSR

Beschrijving: Rondom de Sloterplas bemonsterd en pools gemaakt van 500 ml over totaal 5 Km

Pools zijn gefilterd en opgewerkt met de CTAB/BioEcho methode

Alle 11x 5 km pools opwerken en qPCRen. Input in qPCR (ml water): 250 ml, 125 ml, 62.5 ml, en 31.25 ml.

Resultaat:

- Sample 095 is positief

- Sample 075 en 085 waren twijfelachtig
- Overige samples waren allemaal negatief
- een van de samples leek inhibitie te tonen bij 'teveel' input
- Muskusratten gevangen dichtbij locatie 090 (mannelijke & vrouwtje plus jong) en bij/op locatie 072 (mannelijke & vrouwtje)
- verder in het gehele gebied niets gevangen

Conclusie:

-Dat sample 095 positief is komt overeen met de vangst. Vervolg is opwerken van de 1 km pools van de locaties 095, 085, 075 en 065. Zien we dat de 1 km pool (090) ook echt het hoogste signaal geeft? en meten we wat bij 072?

SP-naam: MAD1000-P025-SP17 1e pooling test Slotterplas\DataWetlab\2 - Test 1 km subpools

Deelproject: DP1a7

Act. 2 : Test 1 km subpools

Doel: Bevestigen resultaten 5 Km Pools

Tijdpad: 08-2019

Partners: UvA, HDSR

Beschrijving: Uit voorgaand experiment (11x 5 km pools Slotterplas) blijkt dat 095 positief was, dit komt overeen met de vangsten.

075 en 085 waren twijfelachtig, maar in het gebied van 075 waren wel meerdere ratten gevangen (waarom is dit sample dan niet positiever?)

Er waren muskusratten gevangen bij 090 en 072, we verwachten dit terug te zien in de 1 km pools

Van de volgende samples worden de vijf 1 km pools (50 ml elk) opgewerkt:

095 - positief

085 - twijfelachtig

075 - twijfelachtig

065 - negatief (dit geeft echt geen enkel signaal in de 5 km pool)

Dit wordt opgewerkt door 50 ml te filteren, gevolgd door CTAB/BioEcho protocol

totaal 20 samples

Per sample 2 metingen in de qPCR: equivalent van 40 ml en van 10 ml water

Resultaat: De 1km pools van monsters 72, 82, 84, 90 en 92 waren positief (>0.1 pg). De 1 Km monsters van 74, 80, 83 en 91 waren zwak positief (<0.1 pg). De rest van de monsters waren negatief.

Conclusie: De locaties 090 en 072 waar muskusratten gevangen werden waren inderdaad in de 1 Km pool positief. Voor monsters die in de 5Km pool twijfelachtig waren de sub-pools van 1 Km wel positief op de locaties waar in de buurt muskusratten gevangen waren. Twijfelachtige resultaten in de 5 Km pools kunnen dus een indicatie zijn voor de aanwezigheid van muskusratten. 1 Km sub-pools kunnen gebruikt worden om detectie te bevestigen.

SP-naam: MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP17 1e pooling test
Sloterplas\DataWetlab\3 - Test autosampler

Deelproject: DP1a7

Act.3 : Test traject bemonstering met autosampler

Doel: Her-testen trajecten met de prototype autosampler

Tijdpad: 11-2019

Partners: UvA, HDSR

Beschrijving: Met de prototype autosampler (om deze in het veld te testen) de positieve monsterposities nogmaals bemonsterd. door een traject van ca. 1 km te varen =500ml. (autosampler stond afgesteld op 10 ml /20mtr)

5 flessen van ca 500 ml = sample 1 tm 5

Samples gefilterd over 0.45 µM PES filter en vervolgens opgewerkt met : eDNA isolation from PES 0.45 µm filters with Enhanced CTAB lysis v 1.3

Na BioEcho kolom terug gedampt naar 30 µl -> per sample 20 en 10 µl in qPCR 50 µl reacties.

Resultaat:

Monster 4 en 5 waren positief voor muskusrat sample 4 aanzienlijk hoger!

Het leek er op dat sample 5 mogelijk via de autosampler leiding besmet is geraakt door het eerder gesampelde stuk nr 4.

Traject 4 werd opnieuw met autosampler en daarna weer traject 5 met de autosampler (4A en 5A). traject 5 werd ook met de hand gesampeld (5B).

4A was zoals verwacht weer positief. echter monster 5A en 5B ook. omdat 5B met de hand is bemonsterd zonder autosampler kon er niet meer gesproken worden van een besmetting door de autosampler en leek dit pos. signaal echt in het water te zitten.

Conclusie: De resultaten behaald met de autosampler komen overeen met de hand bemonsteren. Deze kan dus inderdaad ingezet worden voor het bemonsteren van trajecten

SP-naam: MAD1000-P025-SP16 Periodieke beverrat eDNA test kooien en knooppunten

Deelproject: Dp1a8

Act.1 : Periodieke beverrat eDNA test kooien en knooppunten

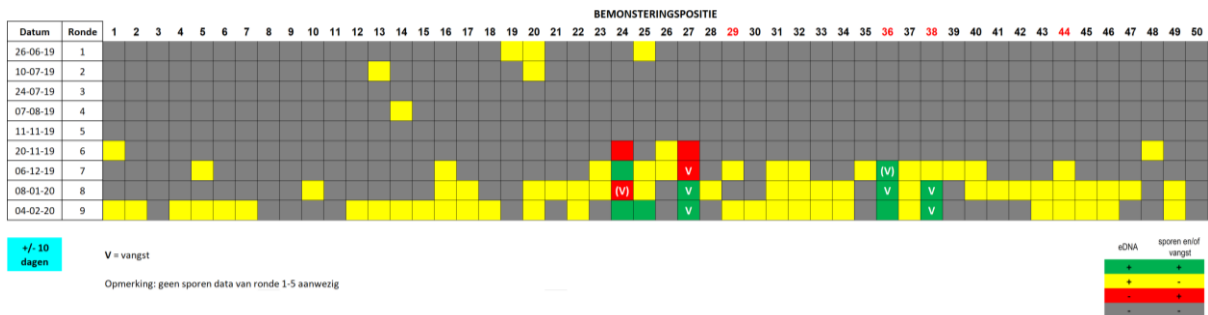
Doel: Geschiktheid eDNA methode voor detectie beverratten bepalen/inzicht krijgen migratie routes beverratten.

Tijdpad: 07-2019 – 05-2020

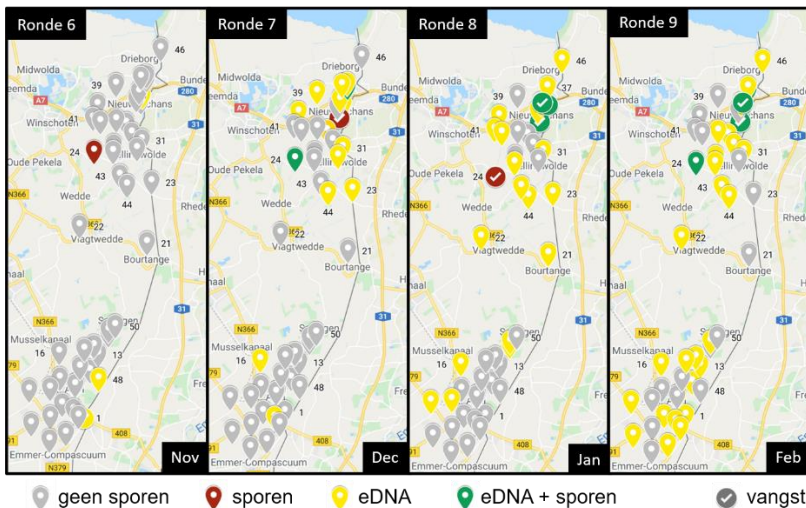
Partners: UvA, Hunze & Aa's (H&A)

Beschrijving: Beverratten komen vanuit Duitsland Nederland binnen. In Oost Groningen wordt er op 50 door Hunze en Aa's aangewezen locaties op punten in semi-cirkels vanaf de Duitse grens landinwaarts punt-monsters genomen. De uitslagen van de eDNA test worden vergeleken met de sporen waargenomen door de bestrijders, en met vangst. De bemonstering vindt maandelijks plaats.

Resultaat:



- Er waren duidelijk meer eDNA signalen dan veldsporen
- Meer signalen in de wintermaanden
- Maar 10% locaties zonder eDNA signaal
- (geen sporen/vangstgegevens rondes 1-5)



- eDNA signalen werden het vaakst gedetecteerd in Noord Oost Groningen
- Meer signaal in de winter maanden

Conclusie: Het meest opvallend was dat er meer eDNA signalen gevonden worden dan dat er sporen gevonden waren. Echter op 10% van de locaties werd er geen eDNA signaal gevonden. Ook was er op

een aantal locaties wel sporen gevonden en/of vangst geweest, maar geen eDNA gedetecteerd. Opvallend was ook dat er meer eDNA gesignaleerd werd in de wintermaanden.

De eDNA methode door puntbemonstering kan dus gebruikt worden om beverratten te detecteren, echter er is nog veel onduidelijk. Er zullen hierom een zestal vervolg experimenten gedaan worden, waarin meer duidelijkheid vergrepen moet worden over bijvoorbeeld, het overeenkomen tussen eDNA signaal en aanwezigheid beverratten, dynamiek in de tijd van beverrat eDNA, eDNA detectie potentieel en migratieroutes.

SP-naam: MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP23_BeRa eDNA vervolg experimenten\Experiment 3

Deelproject: Dp1a9

Act. 1: Beverrat eDNA vervolg experimenten experiment 3

Doel: Bepalen of punt bemonsteren zinvol is in het pinpointen van beverrat locaties & of het gebruikt kan worden om vermoeden bij onduidelijke signalen te bevestigen.

Tijdpad: 04-2020-06-2020

Partners: UvA, H & A

Beschrijving: 4 locaties met duidelijke beverrat sporen/vangst en 2 locaties met vermoeden gekozen door bestrijders

- Voor de gekozen locaties de stroomrichting en snelheid beschrijven/een foto van de locaties nemen.

Beantwoorden 3 vragen:

1. Is het mogelijk om de aanwezigheid van beverratten met behulp van punt bemonsteren aan te tonen in een klein gebied?
2. Kan met behulp van eDNA verdere duidelijkheid gegeven worden over aanwezigheid van beverratten bij vermoeden, maar geen duidelijke sporen?
3. Wat is het effect van de stroming/water volume?

Resultaat:

Er was op 5 locaties monsters genomen. De locaties met duidelijke sporen op moment van monsternamen waren de locaties Helofyten filter en Nieuwe Pekela. Locaties met vermoeden waren Westervoldse Aa en Veendiep. Locatie Jipsinghuizen is een locatie waar een melding van 2 Beverratten gedaan was.

Alleen op de locatie Jipsinghuizen was geen eDNA gedetecteerd

De detectie van eDNA kwam overeen met de vermoedens van de bestrijders.

De stroming/watervolume lijkt inderdaad een effect te hebben

Conclusie: We kunnen voorzichtig de conclusie trekken dat punt bemonsteren gebruikt kan worden voor het detecteren van beverratten in een klein gebied, en dat deze methode gebruikt kan worden om de aanwezigheid van beverratten te bevestigen. Om meer zekerheid te zijn moeten we weten of

er na het moment van bemonsteren nog nieuwe sporen zijn of dat er vangst is geweest. Experiment 2, dynamiek in de tijd kan ook helpen bij meer duidelijkheid verkrijgen, omdat we hieraan kunnen zien of het eDNA afkomstig is van nog aanwezige beverratten, of dat het eDNA is wat er nog is van beverratten die ondertussen gevangen of verder getrokken zijn.

SP-naam: MAD-RBAB\03_RBAB-internal\MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP23_BeRa eDNA vervolg experimenten

Deelproject: Dp1a9

Act. 2: vervolg experiment 3

Doel: beverrat detectie met autosampler

Tijdpad: sept 2020

Partners: UvA, H & A

Beschrijving: 3 locaties in de buurt van Foxhol worden getest op aanwezigheid van beverratten. Op 1 locatie was een melding, op de andere twee zijn sporen van beverratten moeilijk te herkennen door aanwezigheid bevers. Er was getest op beverrat, bever en muskusrat en bever.

Resultaat:

Er zijn 3 trajecten gevaren:

1. Haven van camping Meerwijck. (waarneming)
 - Traject b970-0076 ongeveer 1km
2. Foxholstermeer/Energieweg. (bevers)
 - Traject b970-0078 ongeveer 5 km
3. En een traject in de Drentsche Diep. (bevers)
 - Traject b970-0080 ongeveer 5km

Geen bever en beverrat eDNA gedetecteerd. Wel op met name trajecten b970-0076 en b970-0078 positieve signalen opgepikt voor muskusratten.

Conclusie: Geen beverratten gedetecteerd, mar we kunnen nooit met 100% zekerheid zeggen dat er geen beverratten zijn. Geen bever eDNA was verassend, aangezien er wel degelijk bevers zitten.

SP-naam: MAD1000-P025-SP23_BeRa eDNA vervolg experimenten\experiment 7 Gevangen beverrat

Deelproject: Dp1a6

Act. 3: experiment 7 bemonsteren verblijf Gevangen beverrat

Doel: Inzicht krijgen in eDNA concentraties achtergelaten door BeRa

Tijdpad: 10-2020

Partners: UvA, H & A

Beschrijving: Het is nog niet helemaal duidelijk wat voor concentraties eDNA beverraten achterlaten. Voor het nemen van positieve samples voor de monsterbank waren er hoge concentraties voor de bouw, maar lage 10 m verderop. We gaan het afgesloten gebied uitgebreid bemonsteren met zowel punt als pool monsters, en bemonsteren aan beide kanten van het afgesloten stuk

16 puntmonsters in verblijf

puntmonsters op 10, 20, 40, 60, 100 en 150 aan weerszijden verblijf

4 500ml monsters in verblijf

50ml monsters om de 10m aan weerszijden sloot, die gepoold worden.

Resultaat:

De dag voor het bemonsteren was de sloot geschouwd, waardoor het water erg troebel was

7,5ml puntmonsters

Alle 16 7,5ml puntmonsters in het verblijf waren negatief voor beverrat eDNA. De puntmonsters genomen aan weerszijden van het verblijf waren ook negatief.

500ml monsters in verblijf

Alle poolmonsters in het verblijf waren positief, met de hoogste concentratie in het monster genomen voor de kunstbouw

Poolmonsters weerszijden verblijf

Het poolmonster wind afwaarts was redelijk positief, het poolmonster win opwaarts was zwak positief. Het is mogelijk dat het monster wind opwaarts besmet was geraakt, omdat er nog wat aanslag aanwezig was na schoonmaken van de bemonster unit, en dit de unit was waar daarvoor het monster met de hoogste concentratie.

Conclusie

Er gaat een vervolg experiment gedaan worden om de vragen met betrekking tot negatieve puntmonsters en mogelijke besmetting pool monsters te beantwoorden.

SP-naam: MAD1000-P025-SP23_BeRa eDNA vervolg experimenten\experiment 7 Gevangen beverrat\experiment -7 gevangen -BeRa

Deelproject: Dp1a9

Act. 4: controle precipitatie methode met monsters genomen voor de schouw

Doel: Bepalen waarom de puntmonsters genomen in en om het verblijf negatief waren in vorig experiment

Tijdpad: November 2020

Partners: UvA

Beschrijving: Omdat alle puntsamples (7,5 ml) negatief waren bij vorig experiment terwijl 500 ml samples vlakbij wel Beverrat eDNA bevatten wordt er van sample SBM07 (historisch positief voor

beverrat) 3x 7,5 ml geprecipiteerd en opgewerkt. Als precipitatie niet goed werkt voor Beverrat zal deze negatief terugkomen. De samples die negatief waren, waren genomen vlak nadat de sloot geschouwd was.

Tevens worden van de 500 ml samples (a,b,c,d,e,g) het equivalent van 7,5 ml in pcr ingezet (=0.6 µl van 40 ul eluaat). om te bepalen dat dit überhaupt detecteerbaar is.

Resultaat:

Alle geteste samples waren positief voor beverrat eDNA.

Conclusie: De precipitatie methode werkt voor beverrat eDNA, aangezien de historisch positieve monsters, opgewerkt met de eDNA methode positief waren. 7,5 ml is in principe genoeg om eDNA vanuit punt bemonsteren te detecteren, want ook het equivalent van 7,5ml aan eDNA genomen van de gepoolde monsters waren positief. Het is mogelijk dat vervuiling van de sloot door de schouw problemen had opgeleverd bij het zuiveren van de monsters. De aanslag die vorige keer aanwezig was in de filter eenheden en mogelijk voor besmetting kan leiden, kan makkelijk verwijderd worden met een afwasborstel.

SP-naam: MAD1000-P025-SP23_BeRa eDNA vervolg experimenten\experiment 7 Gevangen beverrat\experiment-7b gevangen BeRa vervolg

Deelproject: Dp1a9

Act. 5: Experiment 7b gevangen beverrat vervolg puntmonsters veld

Doel: Bepalen of na de negatieve uitslag van de puntmonsters genomen vlak na de schouw, de punt monsters nu wel positief zijn. Bepalen wat het beste volume is voor puntmonsters voor beverrat detectie

Tijdpad: November 2020

Partners: UvA H&A

Beschrijving:

In het vorige experiment waren er in de poolsamples + signalen gedetecteerd, met de hoogste signalen voor de bouw. Echter de puntbemonsteringsamples gaven geen + signalen. Mogelijk is deze methode mindergeschikt, b.v. omdat de poep in grotere klonten zit, waardoor de kans dat met puntbemonstering een stukje poep gesampled wordt kleiner is dan met poolmonsters. Ook was de sloot net geschouwd, waardoor er veel verontreiniging was.

Op posities A tm C 5x 7,5ml bemonsteren dus A1 tm A5, B1 tm B5 en C1 tm C5

Op posities A tm C 5x 25 ml bemonsteren dus A1 tm A5, B1 tm B5 en C1 tm C5

Ter controle op plekken A tm C 2x 500ml poolmonsters nemen.

Resultaat:

500 ml monsters

eDNA uit deze monsters is geïsoleerd volgens het PES filter protocol. De concentratie is zoals verwacht het hoogst bij het monster (B) genomen vlak voor de kunstbouw. Sample A en C zijn genomen op

ongeveer 10m van de kunstbouw waarbij A nog in het hok ligt, en C er buiten. De concentratie eDNA op locatie C buiten het hok is hoger dan de concentratie op locatie A binnen het hok.

7,5 en 25ml monsters

De concentratie eDNA voor de 25 ml monsters komt overeen met de eDNA concentratie van de 500 ml monsters. Voor de 25ml monsters hebben de monsters genomen op positie B (voor de bouw) de hoogste concentratie, en de monsters genomen op positie A de laagste concentratie.

Echter voor de 7,5 ml monsters is de eDNA concentratie hoger op positie A (gemiddeld 6pg) dan op positie C waar de gemiddelde eDNA concentratie maar 0.1pg is.

De replica's van de puntmonsters zijn voor zowel 7,5 ml en 25 ml redelijk consistent, zonder grote uitschieters. Er zaten geen negatieve monsters tussen, maar de concentraties voor 7.5ml op locatie C waren zeer laag.

Conclusie:

eDNA werd gedetecteerd in zowel in de met de precipitatie methode geïsoleerde punt monsters als met de PES filter methode geïsoleerde 500ml monsters. Dit bevestigt nogmaals dat de precipitatie methode geschikt is voor de detectie van beverrat eDNA, en dat mogelijk vervuiling van het water door de schouw de oorzaak was van de negatieve uitslag.

Wat betreft het meest geschikte volume komen de eDNA concentraties van de 25ml monsters meer overeen met de concentraties van 500ml monsters. Mogelijk speelt inderdaad de manier waarop de poep uiteenvalt een rol, en is de kans stukjes poep te vinden groter in 25ml.

Er moet een afweging gemaakt worden wat wenselijk is voor het sample volume voor de beverrat puntmonsters, of 25ml wat gevoeliger is, of 7,5ml wat minder gevoelig is, maar waar meer monsters tegelijkertijd verwerkt kunnen worden.

SP-naam: MAD1000-P025-SP23_BeRa eDNA vervolg experimenten\experiment 7 Gevangen beverrat\experiment-7b gevangen BeRa vervolg

Deelproject: Dp1a9

Act. 6: Experiment 7b gevangen beverrat vervolg puntmonsters veld

Doel: Bepalen of na de negatieve uitslag van de puntmonsters genomen vlak na de schouw, de punt monsters nu wel positief zij. Bepalen wat het beste volume is voor puntmonsters voor beverrat detectie

Tijdpad: November 2020

Partners: UvA H&A

Beschrijving:

In het vorige experiment waren er in de poolsamples + signalen gedetecteerd, met de hoogste signalen voor de bouw. Echter de puntbemonsteringssamples gaven geen + signalen. Mogelijk is deze methode mindergeschikt, b.v. omdat de poep in grotere klonten zit, waardoor de kans dat met

puntbemonstering een stukje poep gesampled wordt kleiner is dan met poolmonsters. Ook was de sloot net geschouwd, waardoor er veel verontreiniging was.

Op posities A tm C 5x 7,5ml bemonsteren dus A1 tm A5, B1 tm B5 en C1 tm C5

Op posities A tm C 5x 25 ml bemonsteren dus A1 tm A5, B1 tm B5 en C1 tm C5

Ter controle op plekken A tm C 2x 500ml poolmonsters nemen.

Resultaat:

500 ml monsters

eDNA uit deze monsters is geïsoleerd volgens het PES filter protocol. De concentratie is zoals verwacht het hoogst bij het monster (B) genomen vlak voor de kunstbouw. Sample A en C zijn genomen op ongeveer 10m van de kunstbouw waarbij A nog in het hok ligt, en C er buiten. De concentratie eDNA op locatie C buiten het hok is hoger dan de concentratie op locatie A binnen het hok.

7,5 en 25ml monsters

De concentratie eDNA voor de 25 ml monsters komt overeen met de eDNA concentratie van de 500 ml monsters. Voor de 25ml monsters hebben de monsters genomen op positie B (voor de bouw) de hoogste concentratie, en de monsters genomen op positie A de laagste concentratie.

Echter voor de 7,5 ml monsters is de eDNA concentratie hoger op positie A (gemiddeld 6pg) dan op positie C waar de gemiddelde eDNA concentratie maar 0.1pg is.

De replica's van de puntmonsters zijn voor zowel 7,5 ml en 25 ml redelijk consistent, zonder grote uitschieters. Er zaten geen negatieve monsters tussen, maar de concentraties voor 7.5ml op locatie C waren zeer laag.

Conclusie:

eDNA werd gedetecteerd in zowel in de met de precipitatie methode geïsoleerde punt monsters als met de PES filter methode geïsoleerde 500ml monsters. Dit bevestigt nogmaals dat de precipitatie methode geschikt is voor de detectie van beverrat eDNA, en dat mogelijk vervuiling van het water door de schouw de oorzaak was van de negatieve uitslag.

Wat betreft het meest geschikte volume komen de eDNA concentraties van de 25ml monsters meer overeen met de concentraties van 500ml monsters. Mogelijk speelt inderdaad de manier waarop de poep uiteenvalt een rol, en is de kans stukjes poep te vinden groter in 25ml.

Er moet een afweging gemaakt worden wat wenselijk is voor het sample volume voor de beverrat puntmonsters, of 25ml wat gevoeliger is, of 7,5ml wat minder gevoelig is, maar waar meer monsters tegelijkertijd verwerkt kunnen worden.

SP-naam: MAD1000-P025-SP23_BeRa eDNA vervolg experimenten\Experiment-10-Weerribben-autosampler

Deelproject: Dp1a9

Act. : 10

Doel: eDNA voor detectie beverrat Weerribben.

Tijdpad: 06-2021

Partners: UvA, Hunze & Aas, DOD

Beschrijving: Bemonsteren van een deel van de Weerribben met de autosampler

Resultaat:

16 1Km trajecten bemonsterd in de weerribben. Bestrijders hebben zelf de trajecten gemaakt. Alle samples waren negatief voor beverrat eDNA, 8 hadden een zeer zwak signaal voor muskusrat < 1pg/l

Conclusie:

Bemonsteren met autosampler en zelf trajecten bepalen werkt in dit natuurgebied. Niet alle plekken zijn per boot te bereiken. Op de geteste plekken is geen beverrat aanwezig.

SP-naam: MAD1000-P025-SP23_BeRa eDNA vervolg experimenten\Experiment-10-Weerribben-autosampler\vervolg

Deelproject: Dp1a9

Act. : 11

Doel: eDNA voor detectie beverrat Weerribben.

Tijdpad: 10-2021

Partners: UvA, Hunze & Aas, DOD

Beschrijving: 9 1Km en 2 5Km trajecten bemonsterd met de boor en autosampler in het gebied waar op 22 en 23 September 2 beverrat mannetjes gevangen waren. De trajecten zijn in het veld bepaald.

Resultaat:

Twee van de elf beverrat monsters (31 en 36) waren sterk positief voor beverrat eDNA. Monsters 27 en 32 waren zwak positief voor beverrat eDNA (tabel 1). Monsters 28, 30 en 32 waren sterk positief voor muskusrat eDNA. Bij het bemonsteren was voor monster 30 een dode muskusrat aangetroffen. Het traject gevaren voor monster 28 grenst aan dat voor monster 30. Monsters 27, 29 en 36 waren zwak positief voor muskusrat eDNA.

Conclusie:

Er waren duidelijke concentraties eDNA voor zowel beverrat als muskusrat aangetroffen. Voor traject 31 en 36 waren de concentraties beverrat eDNA zeer hoog. Ook waren er hier tijdens het bemonsteren sporen aangetroffen. Dit zou afgaande op deze resultaten een goede plek kunnen zijn voor het plaatsen van kooien.

Ook voor muskusratten zijn er duidelijke signalen aanwezig. Voor traject 30 en het aangrenzende traject 28 kan niet met zekerheid gezegd worden of hier nog een levende muskusrat zit, omdat er waarschijnlijk veel eDNA van het dode dier in deze trajecten aanwezig was. Traject 32 is wel interessant omdat deze niet in de buurt van traject 30 ligt, en dit traject we duidelijk positief was.

SP-naam: MAD1000-P025-SP23_BeRa eDNA vervolg experimenten\Experiment-11-Beverratten voorkeurslokaties

Deelproject: Dp1a9

Act. : 12

Doel: Bepalen of er op voorkeurslokaties beverratten in de winter van 21 ook beverratten zitten.

Tijdpad: 12-21

Partners: UvA, Hunze & Aas

Beschrijving: Van een aantal gebieden in Groningen en Drenthe is bekend dat het voorkeurslokaties van beverratten. Er worden hier vrijwel elke winter beverratten gesignaleerd. Deze gebieden liggen tussen de 9 en 24km van de landsgrens. Op het moment (oktober) zijn er geen sporen zichtbaar vanwege dichte begroeiing en of de verborgen leefwijze van de beverrat.

Op 5 lokaties waren er in December 2021 trajecten van ongeveer een kilometer bemonsterd zonder de autosampler. Op een 6e lokatie was er een controle op het afwezig zijn van Bever. Op deze lokatie was op 21-10 een bever weggevangen, en nabij Sellingen weer uitgezet. Hier wordt gecontroleerd met eDNA of er geen bevers meer zitten,

Verder waren er twee 5Km trajecten bemonsterd in Stadskanaal met de autosampler.

Resultaat:

| locatie | sample | nr-kaart | muskusrat | beverrat | bever |
|---------------------------|---------|----------|-----------|----------|--------------|
| Mandelanden | HeA-A-1 | 1 | afwezig | afwezig | aanwezig |
| Lofar | HeA-A-2 | 2 | afwezig | afwezig | aanwezig |
| Vloevelden Veenhuizen | HeA-A-3 | 3 | aanwezig | aanwezig | onduidelijk* |
| Höfte (Wessinghuizen) | HeA-A-4 | 4 | aanwezig | aanwezig | aanwezig |
| Zoerselanden | HeA-A-5 | 5 | afwezig | aanwezig | aanwezig |
| Westerbroek | HeA-A-6 | 6 | afwezig | afwezig | afwezig |
| Stadskanaal, Stadskanaal | HeA-A-1 | 7 | aanwezig | afwezig | |
| Dreefleiding, Stadskanaal | HeA-A-2 | 8 | aanwezig | aanwezig | |

Conclusie:

In totaal waren er op 4 van de 8 locaties (3, 4, 5 en 8) eDNA signalen voor de beverrat gemeten. Op locatie 3 (vloevelden Veenhuizen) zijn in Januari 3 beverratten gevangen. Een groter 4^e exemplaar is wel gespot maar nog niet gevangen. In de overige onderzochte locaties staan er vangmiddelen maar zijn er in de onmiddellijke nabijheid geen vangsten geweest. Op locatie 5 zijn recent wel keutels gevonden dus wordt de vangactie geïntensiveerd.

De eDNA resultaten tonen de aanwezigheid van bever aan op locaties 1, 2, 5 en 4. Op deze locaties zijn diverse beverburchten aanwezig, en dit is dus duidelijk terug te zien in de meeting. Er zijn geen bevers meer aanwezig op locatie 6, waar bevers niet gewenst zijn.

Muskusrat eDNA was gedetecteerd op lokaties 3, 4, 7 en 8. Na de eDNA meting is er op locatie 4 1 muskusrat gevangen (een 2^e is zuidelijk hiervan gevangen). Noordelijk van locatie 7 zijn 3 muskusratten gevangen en op locatie 8 is er 1 muskusrat gevangen.

SP-naam: MAD1000-P025-SP23_BeRa eDNA vervolg experimenten\Experiment-4_eDNA detectie potentieel

Deelproject: Dp1a9

Act. : 12

Doel: : Het detectie potentieel van beverrat eDNA in het veld bepalen

Tijdpad: 1^e helft 2022

Partners: UvA, Hunze & Aas

Beschrijving:

Het is nog niet helemaal duidelijk hoe gevoelig de eDNA methode is voor het detecteren van beverrat eDNA in het veld. Om deze reden willen we rondom een uitgezette Judas rat gaan bemonsteren. Hierdoor kunnen we informatie krijgen tot op welke afstand we nog steeds eDNA kunnen meten

Resultaat: Uit de eerste resultaten blijkt dat punt bemonstren rondom de beverratten minder opleverde dan verwacht. Ondanks de aanwezigheid van een beverrat in een relatief afgesloten stuk water bij Fiemel waren er minder punten positief dan door de bestrijders verwacht.

Bij het bemonstren met trajectenop 2 locaties was 1 waar poep in het water gezien was zwak positief, en de ander waar geen poep in het water gezien was negatief

Conclusie:

Het is lastig om aan de hand van de bemonstering rondom 3 beverratten harde conclusies te trekken. Wel lijkt het er opdat gezien het gedrag van beverratten (meer tijd op land door brengen, en niet op meerdere plekken in hun gebied bouwen maken) Dat puntmonsters minder geschikt zijn voor detectie van beverratten

SP-naam: MAD1000-P025-SP23_BeRa eDNA vervolg experimenten\Experiment-12-Zwartemeer-weerribben

Deelproject: Deelproject: Dp1a9

Act. : 13

Doel: Bepalen of er beverratten aanwezig zijn in de vermoedelijke migratie route naar de weerribben

Tijdpad: zomer 2022

Partners: UvA H&A, DOD

Beschrijving: Er worden trajectmonsters genomen rond en op de schokkerplaat en de weerribben

Resultaat: Geen beverratten eDNA gedetecteerd in de bemonsterde waterwegen

Conclusie: op moment van bemonsteren waarschijnlijk geen beverratten aanwezig in de bemonsterde waterwegen

SP-naam: \MAD1000-P025-SP23_BeRa eDNA vervolg experimenten\Experiment-11-Beverratten voorkeurslokaties\BeRa-voorkeurslokaties-vervolg-1

Deelproject: Dp1a9

Act. : 2

Doel: Bepalen of er na de vangtsronde in December 2021 er nog steeds beverratten aanwezig zijn op de voorkeurslokaties

Tijdpad: maart 2022

Partners: H&A, UvA

Beschrijving: Vorig jaar December waren er een aantal voorkeurs lokaties in het beheergebied van Hunze & Aa's bemonsterd (zie verslag voorkeurslokaties + controle bever). Van deze lokaties is bekend dat er regelmatig beverratten zitten. Sinds de vorige bemonstering zijn er op een aantal plekken vangsten geweest. Eind maart 2022 was er her bemonsterd met om te bevestigen dat op deze plekken ook daadwerkelijk alle beverratten weg zijn gevangen. Ook is er weer getest op muskusrat en bever.

Resultaat:

| monsters maart-22 | nr | lokatie | beverrat maart-22 | beverrat dec-21 |
|-------------------|----|-----------------------------|-------------------|-----------------|
| HeA-A-1 | 1 | Mandelanden | nee | nee |
| HeA-A-2 | 2 | Lofar | nee | ja |
| HeA-A-3 | 10 | vloevelden Veenhuizen lok 1 | ja | ja |
| HeA-B-3 | 3 | vloevelden Veenhuizen lok 2 | nee | nvt |
| HeA-A-4 | 9 | Hofte Ruiten Aa | nee | nvt |
| HeA-B-4 | 4 | Hofte Mussel Aa | nee | ja |
| HeA-A-5 | 5 | Zoerschelanden | nee | ja |
| HeA-B-1 | 7 | Stadkanaal, stadskanaal | ja | nee |
| HeA-A-6 | 8 | Stadskanaal dreefleiding | ja | ja |
| puntmonster | 11 | | ja | nvt |

Tabel 1. Vergelijking uitslagen beverrat maart 2022 kolom 4 met December 21 kolom 5. In maart 2022 was er op de Locatie Veenhuizen 2x bemonsterd (nrs 10 en 3) en in December vorig jaar 1X. In maart 2022 was zowel de Mussel Aa (4) als de Ruiten Aa (9) bemonsterd. Het puntmonster was genomen Ten Noorden van de N365 waar de Ruiten Aa onder de N365.

Resultaten muskusratten en bevers staan in verslag

Conclusie:

bemonstering stroomopwaarts in de vloevelden 2 beverratten gevangen. Vermoedelijk zitten er hier nog meer. Dit komt dus overeen met de hoge concentratie.

Vloeiervelden locatie 2 (nr 3) was negatief voor beverrat eDNA, echter er waren hier nog wel uitwerpselen gevonden. Een mogelijke reden hiervan is dat de bemonstering hier handmatig gedaan was door ongeveer om de 100m een monster te nemen. Het kan zijn dat de concentraties in dit gebied nu dermate laag zijn dat er tenzij dicht genoeg bij een poepje bemonsterd wordt, er niet voldoende eDNA bemonsterd wordt om boven de detectie grens uit te komen.

Locatie 10 was negatief. Er waren op dit stuk sinds December vorig jaar 10 beverratten gevangen, met de laatste vangst op 01-03-22.

Er was deze keer een langer stuk van de Mussel Aa (4) bemonstert dan vorige keer. Bij de bemonstering in December 2021 was het destijds bemonsterde stuk van de Mussel Aa nog positief voor Beverrat. Deze keer was het over grotere lengte bemonsterd stuk negatief voor beverrat eDNA. Het lijkt er dus op dat er hier geen beverratten meer aanwezig zijn

De Ruiten Aa was ook negatief voor beverrat eDNA. Echter het puntmonster was zwak positief. Het is dus mogelijk dat er stroomopwaarts van dit stuk nog beverratten aanwezig zijn.

De locatie Zoerschelanden (5) was in December nog positief voor beverrat eDNA, en was nu negatief. Hier zijn dus waarschijnlijk alle beverratten met succes weggevangen.

Verder is de locatie Mandelanden (1) nog steeds negatief voor beverrat eDNA, en was de lokatie Lofar die vorig jaar nog zwak positief was nu negatief.

SP-naam: \MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP30_ Instructie filtreren, coypu app & autosampler

Deelproject: DP1a10

Act. 1: Instructie/oefenen autosampler & coypu app

Doel: Instructie & veldtest traject bemonsteren met de autosampler met behulp van de coypu app.

Tijdpad: november 2020

Partners: UvA, Wetterskip Fryslân, Waterschap Zuiderzeeland

Beschrijving: Wim (UvA) en Maarten (WZ) gaan respectievelijk een instructie geven aan Bart en Abel (WF). Daarna wordt het bemonsteren met de autosampler aan de hand van de coypu app getest.

Resultaat:

Autosampler

Na een update had de autosampler een bug, waarbij wanneer de standaard bemonsteringsafstand van 5 km geselecteerd werd, de autosampler 2,5 Km bemonsterde in plaats van 5km. Hierdoor zijn de trajecten dieper bemonsterd dan normaal. Dit was doorgegeven aan Tjeerd (de ingenieur) , en was dezelfde dag nog gecorrigeerd.

Vanwege de bug in het selecteren van de traject afstand is het 2^e traject niet volledig bemonsterd, omdat de fles vol zat.

Het bemonsteringsvolume was iets minder dan de gewenste 500 ml. Waarschijnlijk moet de autosampler opnieuw gekalibreerd worden, vanwege een nieuwe filter aan uiteinde slang.

Coypu app/GPS data opslag

Het gebruik van de coypu app in combinatie met de autosampler werkt goed. Bij het inscannen van de fles registreert de coypu app op het startpunt de juiste coördinaten

Ook de ID van de autosampler die gescand kan worden via QR code vanaf de autosampler aan het begin van het traject. In de file van gegenereerd door de coypu app kan ook de uitslag ingevoerd worden na analyse.

Gebruik/visualisatie veld

(Uit communicatie Maarten aan Wietze (app ontwikkelaar) oorspronkelijke tekst in experiment map)

Voor de gebruik in het veld zou het handig zijn als het puntje van het live tracking iets groter was, omdat als je uit zoomt deze minder goed te zien is. Als er te ver in gezoomt is, is het lastiger te zien waar je bent op het traject. Hierdoor ben je als snel te ver als je even niet op het scherm kijkt.

Tijdens het varen heb je geen last van de uitschieters die de app maakt. Wanneer de uitschieters over andere watergangen gaan wordt het lastig om een overzichtelijke kaart te houden.

Uitslag analyse

De 2 trajecten (WF_000340 en WF_000366) waren negatief voor muskusrat eDNA

Conclusie:

Over het algemeen was de instructie/oefening geslaagd. Het registreren van bemonsteringsflessen en code autosampler in de coypu werkte goed. Ook de start coördinaten van een traject in de coypu app is accuraat. Aan de hand van de ervaringen in het veld is er gevraagd voor wat kleine aanpassingen aan de visualisatie in de coypu app.

De autosampler had een bug na de update, maar deze is er inmiddels uit. Verder werkte de autosampler naar behoren, en is hij gebruiksvriendelijk.

De trajecten waren negatief voor muskusrat eDNA, dus opvolging met puntbemonstering was niet nodig.

SP-naam: \MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP30_ Instructie filtreren, coypu app & autosampler

Deelproject: DP1a10

Act. 2: Instructie/oefenen autosampler & coypu app

Doel: Instructie & veldtest traject bemonsteren met de autosampler met behulp van de coypu app.

Tijdpad: november/december 2020

Partners: UvA, HDSR, Waterschap Zuiderzeeland

Beschrijving: Wim (UvA) en Maarten (WZ) gaan respectievelijk een instructie geven aan Bart & Peter (HDSR). Daarna wordt het bemonsteren met de autosampler aan de hand van de coypu app getest.

Resultaat:

Tijdens het bemonsteren in Noord-Holland was het erg koud en regenachtig, normaal gaan de bestrijders dan niet op de boot. Als het regent is het soms lastig om de boot in/uit het water te krijgen. Nu waren ze 2 uur bezig geweest omdat 1 van de auto's vast zat in de modder.

Het volume dat de autosampler inneemt is op het moment > 500ml. Wim neemt hierover contact op met Tjeerd.

Als het regent is het lastig om op sommige mobiele dingen te zien/ aan te klikken

Er was tijdens het varen mogelijke sporen van muskusratten gezien.

Er is een extra traject meegenomen door Bart, welke niet in de app aangegeven was. Dit is traject HHN_000046. Omdat dit traject niet in de coypu app stond overlapt het traject deels met traject HHN_000045

Alle 3 trajecten worden geanalyseerd

Bij het exporteren van de bestanden gegenereerd door de coypu app stond niet voor elk traject de code van de autosampler in het bestand. Alleen voor monster HHN-A-4 stond de autosampler code (af18-0010) in het bestand.

Conclusie

Het volume dat de autosampler inneemt moet aangepast worden, en er moet uitgezocht worden waarom niet alle QR codes van de autosampler in de coypu app geregistreerd worden.

SP-naam: MAD1000-P025-SP33_Administratie-uitslagen\6-Feedback bestrijders

Deelproject: DP1a10

Act. : 1

Doel: Testen lokaliseren stap veld-protocol

Tijdpad: 03-2021

Partners: UvA, MRB-NH

Beschrijving: De huidige methode voor lokaliseren zoals beschreven in het veldprotocol was in de praktijk getest op het positief bevonden Amstelmeerkanaal.

Resultaat:

Het is ondoenlijk om in de boot in de coypu app een punt vast te zetten, scannen en dan nog op dezelfde plek te liggen om het sample te nemen.

Het neemt te veel tijd in beslag. Veel efficiënter is het dit varend te doen. Buizen van tevoren 1 tm 50 nummeren en via app bijhouden wanneer de buis in het water moet volgende en dus niet scannen. Het Amstelmeerkanaal was op deze manier bemonsterd en daar was men met 3 man 4 uur mee bezig exclusief boot in en uit water.

Op de manier zoals het in het veldprotocol staat zou men hier nog veel langer mee bezig zijn, en is dit niet met 1 persoon te doen.

Het inscannen van QR codes vanaf de buizen in de coypu app werkt niet. Ook waren er voor 1 telefoon problemen met de GPS. Waarschijnlijk hebben deze problemen de oorsprong in de camera & settings van de mobiel.

Conclusie: Op deze manier het lokaliseren is te tijdrovend en vereist te veel personen. Het veldprotocol wordt aangepast. In plaats van direct te beginnen met punt-monsters over een heel 5Km traject, wordt er straks eerste met de autosampler 1 Km sub-trajecten gevaren. Daarna zal op de positieve sub-trajecten gelijktijdig bemonsterd en gespeurd worden. Door dit gelijktijdig te doen, wordt er tijd bespaard. De puntmonsters dienen zo om moeilijk te vinden bouwen te detecteren, en er hoeven veel minder puntmonsters genomen worden.

SP-naam: MAD1000-P025-SP34_Bever experimenten

Deelproject: DP3a10

Act.1 : Monstervolume voor detectie bever

Doel: Bepalen welke monstervolumes en methodes (pool & punt) geschikt zijn voor de detectie van bevers.

Tijdpad: 2021

Partners: UvA H & A

Beschrijving: Hunze & Aa's wil weten of er bevers ten Noorden van de A7 zitten. Voor dat we hier kunnen gaan testen, moeten we de beste manier van monsters nemen bepalen. Er is hiervoor een experiment opgezet om rondom bewoonde bever bouwen verschillende manieren van bemonsteren te testen. Hiervoor is op twee locaties, 1 met stromend en 1 met stilstaand water een experiment gedaan. Op verschillende afstanden van de burcht waren monsters genomen, en er was met de autosampler verschillende afstanden bemonsterd (zie verslag MAD1000-P025-SP34_Bever experimenten)

Resultaat: De volgende range concentraties waren gemeten

500ml stromend: 2.5-6.5 pg

500ml stilstaand: 20-115 pg

25ml stromend: 0.4-8 pg

25ml stilstaand: 1.5 tot 15.5 pg.

Stromend autosampler 1 km: 6 pg

Stromend autosampler: 2,5 km: 3.7 pg

Stromend autosampler 5 km: 3.7 pg

Stilstaand autosampler: 28 pg

Conclusie: Met elke methode waren duidelijke concentraties eDNA gedetecteerd, De autosampler kan ook gebruikt worden voor het bemonsteren voor bever eDNA.

b - Ontwikkeling handmatig MBR eDNA bemonstering gereedschap

SP-naam: MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP01 Bemonsteringsapparaten\E01 Handsampler hengel

Deelproject: DP1b1

Act1: Handsampler hengel

Tijdpad: 11-2018 – 06-2019

Partners: UvA

Doel: Ontwerpen & ontwikkelen 15ml MBR-monstername instrument

Beschrijving:

- Er is een CAD-ontwerptekening gemaakt voor het monstername instrument door het Technologiecentrum van de UvA
- Het monstername instrument is in het veld nabij de UvA (locatie Science Park) getest

Resultaat:

Het MBR-monstername instrument

- Ligt goed in de hand
- Heeft een goed gewicht
- De monsterbuis is er gemakkelijk en goed in vast te klemmen
- Het is gemakkelijk een dop op een vastgeklemde buis te draaien.
- Roestvrijstaal (niet magnetisch)
- Kosteneffectief
- Gemakkelijk na te bestellen

Conclusie:

Er zijn 18 exemplaren geproduceerd

SP-naam: MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP01 Bemonsteringsapparaten\E01 Handsampler hengel

Deelproject: DP1b1

Act2: Samenstellen complete MBR-eDNA-bemonstering set

Tijdpad: 11-2018 – 06-2019

Partners: UvA

Doel: Bij elkaar zoeken & samenstellen complete MBR-eDNA-bemonstering set

Beschrijving: Er zijn diverse onderdelen bij elkaar gezocht die nodig zijn om in het veld in combinatie met het monstername instrument effectief te kunnen bemonsteren: opbergkoker/beschermhoes, hengel, draad, bevestigingsmiddelen, buizenhouders (voor opslag), buizen, notitieblok + pennen, reserveonderdelen en robuuste koffer om de set in te vervoeren.

Resultaat:

Er zijn 18 complete MBR bemonstering sets geproduceerd, waarvan er momenteel (maart 2019)

Conclusie:

6 van de sets worden door de betrokken waterschappen in het veld worden gebruikt.

SP-naam: MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP01 Bemonsteringsapparaten\E01 Handsampler hengel

Deelproject: DP1b1

Act.3: Testen van complete MBR-eDNA-bemonstering set in de praktijk

Tijdpad: 11-2018 – 06-2019

Partners: UvA, UvW, WF, HDSR

Beschrijving:

- Door UvA: Testen sterkte diverse typen lijnen (tussen hengel en MBR monstername instrument)
- Door UvA: Testen leesbaarheid plaklabel onder diverse condities (blootstelling aan water, vaatwasser, vloeibare stikstof)
- Door Waterschappen: De set verspreiden onder diverse medewerkers van muskusrat beheer in het Wetterskip Fryslân en Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier

Resultaat:

Lijnen test: 60.5 kg 1 mm lijn voldoet het best omdat deze het minst veert en de monsterhouder trekt de draad toch snel strak, ook in winderig weer.

Plaklabel test: de labels blijven alle onder geteste condities leesbaar. Ze worden slecht leesbaar wanneer ze op de hoogte zitten van de Terryklem (beschadiging).

SP-naam: MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP01 Bemonsteringsapparaten\E01 Handsampler hengel

Deelproject: DP1b1

Act. 4: 50 ml MBR-monstername instrument

Tijdpad: 11-2018 – 06-2019

Partners: UvA

Doel: ontwikkeling 50 ml-monstername instrument

Beschrijving:

- Er is een CAD-ontwerptekening gemaakt voor het monstername instrument door de UvA werkplaats
- Het monstername instrument is in het veld nabij de UvA getest

Resultaat: Zie hierboven voor het 15 ml monstername instrument.

Conclusie:

We verwachten dat deze alleen in de kleinere, specialistische experimenten zal worden gebruikt.

SP-naam: MAD1000-P025-SP01 Bemonsteringsapparaten\E02 Autosampler lopend

Deelproject: DP1b2

Act. : 1

Doel: Autosampler aan passen voor lopend bemonsteren

Tijdpad: 1^e helft 2021

Partners: UvA

Beschrijving: Sommige gebieden kunnen niet bemonsterd worden met quad, boot of varende drone. Voor dit soort situaties moet er lopend bemonsterd worden. Hiervoor moet de autosampler in plaats van continu zelf te bemonsteren, handmatig bediend kunnen worden. In dit geval kan de autosampler aangeven wanneer er 100m afgelegd is, zodat ongeveer om de 100m bemonsterd kan worden. Door op een knop te drukken kan dan een monster genomen worden. De autosampler kan bij houden wat de precieze afstand is tussen de bemonsterde punten.

Resultaat:

Handvat voor bemonsteren is gemaakt. Voor Friesland en Noord-Holland nu elk 1 autosampler klaar voor handmatig bemonsteren. De andere autosamplers kunnen opgestuurd worden voor aanpassing

SP-naam: MAD1000-P025-SP01 Bemonsteringsapparaten\E02 Autosampler lopend

Deelproject: DP1b2

Act. : 2

Doel: Aanpassen stok voor bemonsteren met autosampler

Tijdpad: 2021

Partners: UvA

Beschrijving: Aanpassen stok voor slang autosampler

Resultaat: Stok voorzien van ringen om slang in hangen, zodat deze niet in de weg zit bij inschuiven

Bevestiging voor handvat van autosampler aan stok

Conclusie:

Voltooid. Afhankelijk van feedback veld kunnen nog aanpassingen gedaan worden.

c - Ontwikkeling GPS-ondersteund semi-automatisch MBR eDNA bemonsteringsapparaat

SP-naam: MAD1000-P025-SP01 Bemonsteringsapparaten\E07 meetings

Deelproject: DP1c1

Act.1 : prototype autosampler

Doel: Ontwikkelen prototype autosampler voor het bemonsteren van trajecten

Tijdpad: 06-2019 – 09-2019

Partners: UvA

Beschrijving: Ontwikkelen van een prototype autosampler voor gebruik op een boot. De autosampler moet voorzien zijn van GPS om positie te bepalen om hoeveel meter er een monster genomen moet worden. Autosampler voorzien van inlaat filter om opzuigen waterplanten etc. te voorkomen. Inname slang met dobber met loodje in water laten.

Resultaat: Een is een prototype autosampler ontwikkeld door het technologie centrum van de UvA ter grootte van een kleine koffer. Voorzien van GPS met instelbare bemonsteringsafstand en hoeveelheid. De gevaren trajecten kunnen via een SD-Kaart lezer naar computer geëxporteerd worden. Aan de autosampler wordt een fles van 500ml bevestigd. Er moet een spoelfunctie zijn.

Conclusie: Prototype autosampler klaar voor testen.

SP-naam: MAD1000-P025-SP01 Bemonsteringsapparaten\E07 meetings

Deelproject: DP1c1

Act.1 : Eerste test prototype autosampler

Doel: Testen prototype autosampler

Tijdpad: 09-2019

Partners: UvA

Beschrijving: Lopende test met prototype autosampler

Resultaat:

- Als mogelijkheid om op terug te vallen: handmatige sampling moet mogelijk zijn.
- Voor de loopmodus zou op het moment dat de afstand bereikt is een piepje moeten afgaan. Vervolgens de monstername met een knopje handmatig verrichten. Nadeel van de huidige procedure is dat je de inlaat voortdurend door het water moet slepen.
- Fles aan de bedieningskoffer zou gekanteld moeten kunnen worden.
- Spoelen zou door continue drukken moeten kunnen bewerkstelligd worden. Nu moet je te vaak op de knop drukken voor een volledige spoeling.
- Het zou handig zijn als de display aan de buitenkant van de koffer zichtbaar en bedienbaar zou zijn.
- Na afloop de GPS track bekeken; op het oog heeft deze een zeer grote precisie.

Conclusie:

De GPS is zeer precies. Belangrijke punten voor verbetering zijn: een verbeterde spoelfunctie, een bedienbare display die aan de buiten kant zichtbaar is, de bemonsteringsfles moet gekanteld kunnen worden.

SP-naam: MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP01 Bemonsteringsapparaten\E03 Autosampler varend remote control

Deelproject: DP1b2

Act. 1: Autosampler varend remote control

Tijdpad: 04-2020 – 08-2020

Partners: UvA

Doel: Identificeren/ontwikkelen benodigheden afstand bestuurbaar bootje met autosampler waarop de autosampler geplaatst kan worden

Beschrijving: Sommige waterwegen zullen te smal zijn of te veel obstakels hebben om varend te bemonsteren. Voor deze trajecten is het handig om de autosampler op een klein op afstand bestuurbaar bootje te zetten.

Hiervoor zijn twee op afstand bestuurbare karper voedingsbootjes gekocht:

1. Anatec Pacboat start'r Evo Camo Ivy (449,99)
2. Amewi V3 (305)

Resultaat:

Elektronica:

- Elektronica van boot 1 is degelijker dan van boot 2
- Elektronica van boot 1 is makkelijk te vervangen dan boot 2
- Elektronica van boot 1 is beter beschermd tegen vocht

- Accu van boot 1 is erg zwaar bijna 5 x zwaarder dan boot 2
- Van boot 2 is het niet duidelijk wat voor type accu het betreft, waarschijnlijk een Li-Po.
- Beide accu's zijn voorzien van trage laders wat maakt dat lege accu's overnacht herladen moeten worden.

Besturing:

- Zender van boot 1 is aanzienlijk zwaarder dan zender van boot 2
- Zender van boot 1 heeft vermoedelijk meer bereik door een krachtiger signaal gezien de 12 volt waar deze op werkt in tegen stelling tot de mogelijke 4.2 volt van zender van boot 2

Draagbaarheid:

- Boot 1 (4.9Kg) is twee maal zo zwaar als boot 2 (2.45kg) en zal bij lange looptochten mogelijk niet meer zo comfortabel zijn.
- Boot 2 is licht maar het handvat is onbruikbaar om te gebruiken.

Overig:

- Boot 1 vaart sneller en is wendbaarder mede door ontwerp schroef en het hebben van een achteruit en roer
- Boot 2 kan niet achteruit en heeft een grote draaicirkel doordat er geen roer is maar er gestuurd wordt met een linker of rechter motor.
- Ondanks dat boot 2 twee schroeven heeft zorgt dit niet voor een hogere vaarsnelheid.
- Boot 1 heeft een ingebouwd smeersysteem wat de broodnodige smering van de as verzorgt dit voorkomt tevens binnen komen van water.
- Boot 2 heeft geen smering systeem. De boot moet gedemonteerd worden om dit uit te voeren. (nog maar de vraag of de as dan überhaupt is in te vetten).



Boot 1: Ligging in water met de autosampler voorin en volle sample fles achter in.



Boot 1: Ligging in water met volle sample fles en autosampler achterin

Conclusie:

De nieuwe autosampler beta versie 1.1 weegt 1450 gram. De autosampler past redelijk makkelijk voorin en kan er ook weer uit. (wat wel betekent dat de samplefles naar achteren moet). In beide gevallen, om de boot stabiel te houden, moet er in de boot wel het een en ander verplaats worden met name de zware lood accu zijn een uitdaging. Een lichtere accu is mogelijk maar gezien het relatief zware gewicht van de autosampler komt dit nogal precies. Boot 2 is gezien zijn lage snelheid (met belading) niet geschikt om te gebruiken. Buiten dat laat de besturing ook te wensen over links en rechts is Niet traploos te besturen met gevolg dat je in een zigzag patroon vaart en rechtdoor bijna niet mogelijk is.

SP-naam: MAD1000-P025-SP01 Bemonsteringsapparaten\E03 Autosampler varend remote control

Deelproject: DP1b2

Act.2 : baitstar xpvt

Doel: 1 testen baitstar xpvt

Tijdpad: 04-2021-06-2021

Partners: UVA

Beschrijving: Baitstar expert stabiele karper voerboot die aangepast kan worden voor autosampler

Resultaat: 1^e testen goed verlopen. Bootje is stabiel ook met auotsampler er in. Bijgeleverde afstand bediening niet van beste kwaliteit

Conclusie: Uit eerste testen blijkt het bootje geschikt. Klaar voor veld-test

SP-naam: MAD1000-P025-SP01 Bemonsteringsapparaten

Deelproject: DP1b2

Act.3 : veldtest baitstar xpvt

Doel: Testen remote control boot en handmatig bemonsteren autosampler

Tijdpad: 2021-07

Partners: UvA, WF

Beschrijving: Autosampler met aanpassing handmatig bemonsteren, en de op afstand bestuurbare boot mee naar Zurich Friesland om te testen.

Resultaat: Bootje werkte goed. Moet andere kleur hebben (oranje) voor zichtbaarheid, en betere afstandsbediening. Mogelijk ook zwaardere accu handig. Voerklep dichtmaken om weerstand te verminderen. Waterplanten zijn problematisch vooral draad alg en dichte begroeiing aan oppervlak. Rekening houden met seizoen bij inzet. Meerwaarde vooral op plekken waar niet op een andere manier bemonsterd kan worden.

Programma handmatig bemonsteren goed. Moet lampje komen voor op quad om aan te geven wanneer afstand bereikt is. Piepje moet harder. Stok wordt nog getest,

Conclusie:

Test geslaagd. Aanpassingen worden doorgevoerd.

SP-naam: MAD1000-P025-SP01 Bemonsteringsapparaten

Deelproject: DP1b2

Act.4 : aanpassingen baitstar xpvt

Doel: aanpassen baitstar na feedback bestrijders

Tijdpad: 2022 eerste helft

Partners: UvA

Beschrijving: Maken aanpassingen voor zichtbaarheid, beter verdeling gewicht, houder voor fles betere besturing

Resultaat: Bootje voorzien van een houder voor de waterfles, oranje strepen voor zichtbaarheid, handgreep voor meenemen. Aanpassing voor beter verdeling gewicht autosampler, rubberband voor vastzetten autosampler. Nieuwe afstandsbediening (x-lite)



Conclusie

Aanpassingen geslaagd bootje vaart goed

SP-naam: MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP01 Bemonsteringsapparaten\E03 Autosampler varend remote control

Deelproject: DP1b2

Act. 3 : Autosampler varend remote control vervolg

Doel: aanpassen van op afstand bestuurbare boot

Tijdpad: 2020/2021

Partners: UvA, UvW

Beschrijving: Voor het bemonsteren van sloten/vaarten te smal zijn voor boor/kano en die door bijvoorbeeld rietkragen moeilijk vanaf de kant te bemonsteren zijn is een op afstand bestuurbare boot gewenst. OP deze boot moet de autosampler gezet kunnen worden, en deze kan dan gebruikt worden om moeilijk bereikbare plekken te bemonsteren.

Resultaat: Andere besturing die feedback geeft wanneer buiten range. Autosampler nu meer midden in bootje gelokaliseerd voor betere gewichtsverdeling. Oranje strepen aangebracht om zichtbaarheid te verhogen. Voerklep dichtgemaakt

Conclusie:

Aanpassingen afgerond, en kan gebruikt worden voor bemonstering.

SP-naam: MAD1000-P025-SP01 Bemonsteringsapparaten\E07 meetings

Deelproject: DP1c3

Act. 1: Varende test prototype autosampler

Doel: Testen functionaliteit autosampler tijdens varen

Tijdpad: 09-2020

Partners: UvA

Beschrijving: De prototype autosampler wordt varend in een kano getest

Resultaat: Tijdens het varen komt de inlaat al gauw uit het water omhoog

Conclusie: Er moet een oplossing komen waardoor de inlaat tijdens het varen in het water blijft.

SP-naam: SP-naam: MAD1000-P025-SP01 Bemonsteringsapparaten\E07 meetings

Deelproject: DP1c3

Act.2 : Proof of concept test

Doel: Testen van de prototype autosampler in het veld op een locatie met muskusratten

Tijdpad: 11-2019

Partners: UvA, HDSR

Beschrijving:

- Testen POC autosampler op real-life locatie. Bij de eerste pooling test rond de Sloterplas zijn een 3-tal muskusrat eDNA positieve locaties gevonden. Er zijn een aantal muskusratten gevangen. De huidige sampling is gedaan als nacontrole waarbij gekozen is voor kleinere 1 km trajecten.
- 5 x 1 km trajecten gevaren met een motorboot
- Samplevolume ingesteld op 0.5 l/km

Resultaat:

- start knop instructie in handleiding duidelijker
- 4 x 1 km trajecten duren elk bij een vaarsnelheid van ~5 km/u ongeveer 10 min; dus 20-25 km/dag is mogelijk.
- bij 2e monster is route onderbroken (met stop/start)
- montage dop op fles: beter los want schroeven is lastig met een kort slangetje tussen koffer en deksel
- piepje handig, maar niet goed hoorbaar met deksel dicht
- verstopte aanzuiging -> signaal?
- slepen: verzamelt waterplanten -> puntmetingen, automatisch onderdompelen?
- aan het eind van het laatste traject raakte de "buitenboordhengel" een paaltje en het zeefje brak los

- hengelininstallatie moet helemaal binnen boord te halen zijn i.v.m. zeer smalle doorgangen (bv brug)
- felgekleurde sticker op samplemond -> volgen diepte i.v.m. vuilheid water en planten
- filtermond fixeren op buis i.p.v. los bungelen
- reserveonderdelen voor zaken die in de praktijk stuk gaan/slijten
- bij locatie sample 4 waren sporen te zien.

Rond de bouw is een apart sampleschema gebruikt omdat het water onderbroken was door een duiker waar niet door/omheen gevaren kon worden. Er is gekozen dit trajecten als twee losse trajecten links en rechts van de bouw te samplen. Deze zijn verzameld in dezelfde 500 ml pool

Conclusie: De autosampler werkt in veld situaties, echter er zijn een aantal punten voor verbetering. De filtermond moet gefixeerd worden op een buis om te voorkomen dat deze loslaat, en om hem beter in het water te houden. Het piepje is handig, maar niet hoorbaar. Kort slangetje tussen autosampler en fles lastig met dop dichtdraaien.

SP-naam: MAD1000-P025-SP01 Bemonsteringsapparaten\ E04 Autosampler varende kano

Deelproject: DP1c3

Act. 3: Prototype autosampler varende benodigdheden

Tijdpad: 06-2019

Partners: UvA, HDSR

Doel: Identificeren/ontwikkelen benodigdheden varen bemonsteren met de autosampler

Beschrijving: Voor het zo efficiënt mogelijk te maken zijn er hulpmiddelen ontwikkeld. Omdat de boot een hogere snelheid heeft dan de andere methodes, is er een effect op bijvoorbeeld de waterligging van de slang.

Resultaat: Om te zorgen dat de slang in het water blijft is wordt deze met behulp van een bevestigingssysteem voor een buitenboordmotor in het water gehouden. De slang van het bemonsteringsapparaat gaat door de buis van het bevestigingssysteem. Om te voorkomen dat er waterplanten mee opgezogen worden die het systeem kunnen verstopten is een 100 micron zeefje bevestigd aan het uiteinde.

Conclusie: Buitenboordmotor houder houdt slang efficiënt in water, filter voorkomt opzuigen waterplanten.

SP-naam: MAD1000-P025-SP01 Bemonsteringsapparaten\ E04 Autosampler varende kano

Deelproject: DP1c3

Act.4: Ontwikkelen en testen verbeterde automatische sampler (autosampler beta versie)

Tijdpad: 06-2019 – 08-2020

Partners: UvA

Doel: Ontwikkelen van een verbeterde automatisch monstername apparaat voor het bemonsteren van trajecten.

Beschrijving: De nieuwe autosampler zal een kleinere en gebruiksvriendelijker versie zijn van het prototype. Verwacht wordt dat deze in augustus klaar zullen zijn voor gebruik. Het plan is om samen met MRB Noord-Holland een test traject te varen met de nieuwe autosampler.

Resultaat: In Augustus 2020 zijn twee van de 10 autosamplers klaar voor de veldtesten. De overige units zijn grotendeels fysiek in elkaar en zullen aan de hand van de eerste veldtesten waar nodig aangepast worden.

Conclusie: De eerste beta versie autosamplers zijn klaar voor gebruik, en kunnen in het veld getest worden.

SP-naam: MAD1000-P025-SP01 Bemonsteringsapparaten\ E06 slangen & filters

Deelproject: DP1c3

Act. 5: buizen/filters autosampler

Tijdpad: 09-2020

Partners: UvA

Doel: filters autosampler

Beschrijving: bepalen welke grote filter er voor de slang moet komen. nu ongeveer 100 micron, maar mogelijk werkt andere grote beter omdat het muskusrat eDNA mogelijk in klompjes cellen zit. Wanneer de nieuwe autosampler beschikbaar is, zal er getest worden of filters met een grotere porie grootte ook verstopping kunnen voorkomen.

Resultaat:

Filter 1: na 500 ml SP (Science Park) water nog steeds 20 ml door bij spoel programma (gemeten in maatcilinder) na 1 l SP water komt er wel vast materiaal op het filter te zitten. Door dat het een gesloten behuizing betreft spoelt dit er niet makkelijk van af. Het filter zou tussen samples door in het veld opengeschroefd moeten worden om goed te kunnen reinigen.

Filter 2: na 500 ml SP water nog steeds 20 ml door bij spoel programma (gemeten in maatcilinder) na 1 l SP water komt er wel vast materiaal op het filter te zitten maar dit laat zich er makkelijk afspoelen. Dit gebeurt dan waarschijnlijk ook niet bij varend bemonsteren.

Filter 3: na 500 ml SP water nog steeds 20 ml door bij spoel programma (gemeten in maatcilinder) na 1 l SP water komt er wel vast materiaal op het filter te zitten. Door dat het een gesloten behuizing betreft spoelt dit er niet makkelijk van af. Het filter zou tussen samples door in het veld opengeschroefd moeten worden om goed te kunnen reinigen. Wat mogelijk wel een optie is om in deze behuizing een metalen gaasje te plaatsen zodat er ook een grotere porie grootte ontstaat

Conclusie:

Het open maken van filters om ze te reinigen tussen trajecten door is niet praktisch. De voorkeur gaat dan ook uit naar filter type 2: een open sinterfilter. Dit type filter is ook vanaf het begin in de ontwikkeling van de autosampler gebruikt.

Uiteindelijk lijkt een zeef filter met een filter size van 1mmx1mm het beste. Plantenresten worden dan wel tegen gehouden maar eventuele cel klompjes kunnen dan ongehinderd door het filter.

SP-naam: MAD1000-P025-SP01 Bemonsteringsapparaten\E08 autosampler test Noord-Holland

Deelproject: DP1c3

Act. 5 : Beta autosampler test

Doel: Beta autosampler testen in het veld

Tijdpad: 09-2020

Partners: UvA, HDSR

Beschrijving: Om de nieuwe autosampler in het veld te testen willen we samen met Bart in Noord-Holland gaan varen. Aan de hand van de feedback zullen we autosampler aanpassen.

- Instructie autosampler
- Op door Bart gekozen locatie stuk varen met de nieuwe autosampler
- Bart geeft feedback
- Feedback wordt doorgegeven aan technologie centrum, en verbeteringen doorgevoerd

Resultaat: Er moeten een paar aanpassingen van de tekst op het display plaatsvinden. En het spoel en leeg volume moeten worden opgevoerd naar 50ml. Ondanks het regenachtige weer geen problemen met GPS of zichtbaarheid op display. Bart heeft ook informatie gegeven over het gedrag van muskusratten, en wat voor problemen de bestrijders tegenaan lopen met begroeiing, waardoor sommige waterwegen niet het gehele jaar bemonsterd kunnen worden.

Conclusie: De autosampler presteert goed, en er waren alleen kleine aanpassingen nodig.

SP-naam: MAD1000-P025-SP01 Bemonsteringsapparaten\E04 Autosampler varende kano

Deelproject: DP1c3

Act. : 6

Doel: aanpassing om te switchen tussen varen en lopend bemonsteren op dezelfde logfile

Tijdpad: 02-22-04-22

Partners: UvA

Beschrijving: Verzoek van Abel om opvaarten te kunnen bemonsteren die wegens diepte of waterplanten niet varen te bemonsteren zijn. Daarom switchen op dezelfde logfile. Eerst 1 autosampler aanpassen om te testen.

Resultaat: 1 autosampler is hiervoor aangepast, en dit werkt nu goed

Conclusie:

Aanpassing klaar en functioneert. Kan op andere autosamplers gezet worden

SP-naam: MAD1000-P025-SP01 Bemonsteringsapparaten\E04 Autosampler varend kano

Deelproject: DP1c3

Act. : 6

Doel: aanpassing om te switchen tussen varen en lopend bemonsteren op dezelfde logfile

Tijdpad: 02-22-04-22

Partners: UvA

Beschrijving: Verzoek van Abel om opvaarten te kunnen bemonsteren die wegens diepte of waterplanten niet varen te bemonsteren zijn. Daarom switchen op dezelfde logfile. Eerst 1 autosampler aanpassen om te testen.

Resultaat: 1 autosampler is hiervoor aangepast, en dit werkt nu goed

Conclusie:

Aanpassing klaar en functioneert. Kan op andere autosamplers gezet worden

SP-naam: MAD1000-P025-SP01 Bemonsteringsapparaten\ E05 Autosampler vliegend

Deelproject: DP1c4

Act. 1: Autosampler vliegend

Tijdpad: 01-2020

Partners: UvA

Doel: Identificeren of gebruik vliegende drone mogelijk is

Beschrijving: Sommige gebieden kunnen mogelijk via de andere methodes niet bemonsterd worden, hiervoor kan een vliegende drone uitkomst bieden.

Resultaat: grote technische uitdagingen + mogelijk problemen met wetgeving.

Conclusie: Past vooralsnog niet binnen project

d - Vastleggen van bemonsteringstrajecten van alle waterwegen

SP-naam: MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP19 Bemonsteringskaarten maken\Trajecten definiëren\Trajecten maken\geteste manieren trajecten maken GIS

Deelproject: DP1d1

Act.1 : Kaart kiezen

Doel: Kiezen kaarttype voor maken trajecten kiezen

Tijdpad: 01-2020

Partners: UvA

Beschrijving: Bepalen welke kaarttypes het meest geschikt zijn voor het maken van trajecten. Bijvoorbeeld google maps of BGT

Resultaat: De Basisregistratie Grootchalige Geografie kaarten zijn het meest geschikt voor het maken van trajecten. Google maps is niet gedetailleerd genoeg.

Conclusie: Trajecten worden gemaakt met behulp van BGT kaarten

SP-naam: MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP19 Bemonsteringskaarten maken\Trajecten definiëren\Trajecten maken\geteste manieren trajecten maken GIS

Deelproject: DP1d1

Act.2 : Geografisch information system

Doel: Kiezen van geografisch information system (GIS)

Tijdpad: 01-2020 - 02-2020

Partners: UvA

Beschrijving: BGT kaarten moeten voor optimaal gebruik geopend worden in GIS. Er zijn twee veel gebruikte GIS programma's, het commerciële ArcGIS en het gratis qGIS. Deze zijn met elkaar vergeleken.

Resultaat: Beide programma's zijn gebruiksvriendelijk, alleen voor ArcGIS ben je beperkt in het aantal functies wat je kunt gebruiken in de gratis versie. qGIS is zowel gebruiksvriendelijk, als alle functies zijn gratis beschikbaar.

Conclusie: Gekozen voor qGIS

SP-naam: MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP19 Bemonsteringskaarten maken\Trajecten definiëren\Trajecten maken\geteste manieren trajecten maken GIS

Deelproject: DP1d1

Act.3 : Waterdeel laag vs waterloop laag

Doel: Bepalen welke waterlaag het meest geschikt is voor het maken van trajecten.

Tijdpad: 02-2020

Partners: UvA

Beschrijving: In de BGT zijn twee verschillende lagen beschikbaar die de waterwegen weergeven de waterdeel laag en de waterloop laag (Watercourse). De waterdeel laag is een vector laag en bevat informatie over de breedte van de waterwegen. De waterloop laag is een raster laag.

Resultaat: De waterloop laag is minder compleet dan de waterdeel laag, met name in Friesland. De Waterdeel laag komt overeen met de meest recente luchtfoto, en bevat informatie over de breedte van de waterwegen.

Conclusie: Waterloop laag wordt gebruikt voor maken trajecten.

SP-naam: MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP19 Bemonsteringskaarten maken\Trajecten definiëren\Trajecten maken\geteste manieren trajecten maken GIS

Deelproject: DP1d1

Act.4 : Geteste manieren trajecten maken

Doel: Er zijn drie mogelijke manieren om trajecten te maken getest in qGIS

Tijdpad: 03-2020

Partners: UvA

Beschrijving: Drie manieren om trajecten te maken in qGIS zijn getest.

1. Trajecten maken met de watercourse kaart door middel van knippen en plakken
2. Trajecten door middel van nieuwe vector laag
3. Trajecten door middel van QDRAW

Resultaat:

1. Trajecten maken met de watercourse kaart door middel van knippen en plakken
 - De rasterkaart van de waterwegen geeft niet voor elk gebied de waterwegen aan
 - De methode van knippen en plakken blijkt ingewikkelder dan de tekenmethodes
2. Trajecten door middel van nieuwe vector laag
 - Het voordeel is dat de trajecten en delen van trajecten makkelijk aangepast kunnen worden en dat er eenvoudig nieuwe trajecten toegevoegd kunnen worden
 - Het nadeel van het maken van de trajecten is dat de afstand niet bijgehouden wordt tijdens het tekenen omdat naar iedere klik de teller zich weer reset
3. Trajecten door middel van QDRAW
 - QDRAW houdt tijdens het tekenen de afstand bij, ook als er geklikt wordt
 - Trajecten kunnen samengevoegd worden in 1 bestand door een nieuw traject toe te voegen aan een bestaande tekening.
 - Wanneer de trajecten opgeslagen zijn als geopackage met line geometry kunnen de trajecten ook aangepast worden.
 - Nadeel, het aanpassen van gedeeltes van trajecten is lastig

Conclusie: Initieel leek het maken van de trajecten met QDRAW het meest makkelijk. Echter naar mate er meer trajecten gemaakt moeten worden en er meer ervaring is met qGIS bleek het maken van trajecten met de eigen functie van qGIS (nieuwe vector laag) het makkelijkst.

SP-naam: MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP19 Bemonsteringskaarten maken\Trajecten definiëren\Trajecten maken\geteste manieren trajecten maken GIS

Deelproject: DP1d1

Act. 5: Selecteren punten voor punt bemonstering na vangst.

Doel: De beste manier bepalen om punten voor monstern te plaatsen in de kaart nadat er vangst is geweest.

Tijdpad: 03-2020

Partners: UvA

Beschrijving: Twee manieren geprobeerd:

1. met QGIS (Toolbox)
2. Handmatig

Resultaat:

1. met QGIS (Toolbox)
 - a. 500m square buffer rondom vangst punt
 - b. Regular points met interval van 100m in 500m buffer
 - c. 5m buffer rondom regular points
 - d. Intersect met waterwegen.
 - e. Resulteert 15-30 punten

Deze methode is niet ideaal, omdat het omslachtig is, en niet een goede coverage geeft van de alle relevante waterwegen.

2. Handmatig
 - a. met behulp van de boven beschreven buffer methode 500m gebied afbakenen.
 - Desgewenst met de regular points methode om de 100m indicatie te geven.
 - b. Punten plaatsen op 100 m intervals vanaf vangstlocatie

Conclusie: Methode 2 is het meest gebruiksvriendelijk en nauwkeurig

SP-naam: MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP19 Bemonsteringskaarten maken\Trajecten definiëren\Trajecten maken\geteste manieren trajecten maken GIS

Deelproject: DP1d1

Act. 6: GPS coördinaten importeren

Doel: Importeren coördinaten vangstpunten

Tijdpad: 04-2020

Partners: UvA

Beschrijving: Wanneer er vangst is worden de coördinaten vastgelegd in de coypu app. Deze moeten geïmporteerd worden in qGIS

Resultaat: Coördinaten kunnen als CVS geëxporteerd worden uit de Coypu app als cvs. Vervolgens in qGIS: Data source manager > Delimited text > file name (csv. bestand) Point coordinates X- field en Y field aangeven en juiste Geometry CRS kiezen (amersfoort/RD new)

Conclusie:

Punt coördinaten kunnen makkelijk geïmporteerd worden in qGIS

SP-naam: MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP19 Bemonsteringskaarten maken\Trajecten definiëren\Trajecten maken\geteste manieren trajecten maken GIS

Deelproject: DP1d1

Act. 7 : Export GPS coördinaten

Doel: GPS coördinaten exporteren

Tijdpad: 04-2020

Partners: UvA

Beschrijving: Exporteren van punt GPS coördinaten uit qGIS voor puntbemonsteringsvoorstellen.

Resultaat: selecteer laag > toolbox > vector geometry > add geometry attributes > add daarna selecteer coördinaten> export > save features as > csv

Conclusie: Punt coördinaten kunnen makkelijk geëxporteerd worden naar csv waarna ze in de Coypu app ingevoerd kunnen worden.

SP-naam: MAD1000-P025-SP19 Bemonsteringskaarten maken\Trajecten definiëren\Trajecten maken\geteste manieren trajecten maken GIS

Deelproject: DP1d1

Act.8 : Exporteren trajecten

Doel: Exporteren trajecten om vervolgens in de coypu app te importeren

Tijdpad: 07-2020

Partners: UvA

Beschrijving: De trajecten moeten vanuit qGIS geëxporteerd worden in een met de coypu app compatibel format.

Resultaat: Er zijn meerdere mogelijkheden, bijvoorbeeld GPX, GML, CSV. Voorbeeld: selecteer trajecten layer > **Export save features as:** GPX > **CRS:** default CRS: EPSG -WGS 84 of project Amersfoort> **Export symbology:** symbol layer > **geometry:** Linestring

Conclusie: Er zijn veel mogelijkheden om trajecten te importeren, dus afhankelijk van de eisen van de copy app kan er voor een bepaald format gekozen worden.

SP-naam: MAD1000-P025-SP19 Bemonsteringskaarten maken\Trajecten definiëren\Trajecten maken\ instructie filmpjes

Deelproject: DP1d1

Act. 9: Instructie filmpjes

Doel: Instructie filmpjes maken voor trajecten maken in qGIS

Tijdpad: 03-2020

Partners: UvA

Beschrijving: Om het maken van trajecten in qGIS te demonstreren aan anderen was met behulp van de gratis software Vimeo het maken van de trajecten gefilmd. Zowel het maken door nieuwe vector laag als QDRAW was gedemonstreerd.

Resultaat: 7 korte filmpjes gemaakt voor elk onderdeel van het maken van trajecten, voor elk onderdeel van het maken van trajecten in qGIS

Conclusie: Filmpjes kunnen gebruikt worden ter instructie.

SP-naam: MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP19 Bemonsteringskaarten maken\Trajecten definiëren\Trajecten maken\Experiment 3 manieren trajecten maken

Deelproject: DP1d1

Act. 10: 3 manieren trajecten maken-2

Doel: Trajecten maken op fysieke kaart, daarna in qGIS

Tijdpad: 03-2020 – 04-2020

Partners: UvA HDSR

Beschrijving: Dit maakt deel uit van een overkoepelend experiment, waar verschillende manieren van trajecten maken geprobeerd worden, waarna de trajecten in het veld getest worden.

Om trajecten te bemonsteren moeten er bemonsteringsvoorstellen van trajecten gemaakt worden. 1 manier om dit te doen is om eerst door de eDNA specialist de trajecten in hun gebied in te laten tekenen op een fysieke kaart, waarna de trajecten overgenomen worden in qGIS.

Resultaat: Op een fysieke kaart op A0 formaat waren 2 gebieden in de Wieringermeer ingetekend door MRB Noord-Holland. Vervolgens werden deze door de UvA in qGIS ingevoerd.

- Of alle relevante waterwegen erop staan hangt af van hoe recent de kaart is. In dit geval stonden de relevante waterwegen erop.

- Trajecten op de fysieke kaart waren vaak langer dan 5 km (soms 20 km) met name in gebieden waar de waterwegen geen raster structuur hebben.
- Er vindt dubbele inzet plaats, eerst inteken op fysieke kaart, daarna in qGIS.

Conclusie: In principe is deze manier mogelijk, de eDNA specialist kent de te bemonsteren gebieden goed, en kan de veldkennis gebruiken voor het intekenen van de kaart. Er is wel een hulpmiddel zoals bijvoorbeeld een curvie meter nodig, om de afstand van de trajecten bij te houden. Een nadeel is dat er dubbele inzet is.

SP-naam: MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP19 Bemonsteringskaarten maken\Trajecten definiëren\Trajecten maken\Experiment 3 manieren trajecten maken

Deelproject: DP1d1

Act. 11: 3 manieren trajecten maken-3

Doel: Testen maken van trajecten direct in qGIS

Tijdpad: 04-2020 – 07-2020

Partners: UvA, HDSR, WF

Beschrijving: De trajecten worden direct in qGIS gemaakt, waarna ze gecontroleerd worden door de eDNA specialist en de bestrijders.

Resultaat:

- Of alle relevante waterwegen erop staan hangt af van hoe recent de kaart is. In dit geval was er wat zeer recent veranderd in Harlingen, waardoor een aantal waterwegen niet meer relevant waren.
- Er moet bij het maken van de trajecten rekening gehouden worden met peilbesluiten, wat met name in Friesland ingewikkeld is vanwege de vele kleine peil besluiten.
- Er vindt geen dubbele inzet plaats
- Het is lastig om in natuur trajecten van te voren trajecten in te teken, omdat de Waterloop kaart hier niet nauwkeurig is, en de omgeving snel van vorm kan veranderen.

Conclusie: Deze optie is goed mogelijk. Er moet rekening gehouden met de peilbesluiten. Dit is voor vaar trajecten relatief eenvoudig, omdat dammen en sluizen obstakels vormen. Voor loop trajecten is dit in Friesland ingewikkelder. Echter vanuit het oogpunt van eDNA vormt dit voor eDNA geen probleem, aangezien wanneer een traject positief er punt bemonsterd wordt, en er dus makkelijk achterhaald kan worden in welk peil besluit het positieve signaal zich bevind

SP-naam: MAD1000-P025-SP19 Bemonsteringskaarten maken\Trajecten definiëren\Trajecten maken\Experiment 3 manieren trajecten maken\ Veld testen methode 2 en 3

Deelproject: DP1d1

Act. 12: testen vooraf gemaakte trajecten

Doel: testen vooraf gemaakte trajecten in het veld

Tijdpad: 11-2020 – 03-2021

Partners: UvA, WF, HDSR, waterschap Zuiderzeeland

Beschrijving: De van te voren vastgelegde trajecten (direct in de computer of eerst met de hand ingetekend) worden in het veld getest. De trajecten worden weergegeven in de coypu app. De trajecten worden middels live tracking weergegeven in de coypu app en het gevaren traject wordt opgeslagen in de autosampler.

Resultaat: De eerste van te voren gemaakte trajecten zijn getest in Noord-Holland en Friesland. De methode werkt, maar af en toe is er een afwijking in het veld noodzakelijk, vanwege b.v.b obstakels die niet op de kaart te zien zijn. Soms is een andere versie van varen logischer in het veld. In Friesland zijn trajecten aangepast op basis van de feedback van de bestrijders. Wat betreft de coypu app is het handig dat de trajectnummers ook zichtbaar zijn op de mobiel. Dit maakt het makkelijker voor de mensen in het veld de trajecten te onderscheiden.

Er zit een bug in sommige autosamplers, waardoor als er sporadisch als er op de middelste functie knop gedrukt wordt, hij teruggaat naar het hoofdmenu. Hierdoor worden de GPS coördinaten niet meer gelogd.

Af en toe gaat er iets niet helemaal goed met het selecteren van trajecten in de coypu app. Dit is voor een deel wennen aan de app. Op sommige mobielen valt het symbooltje voor het plaatsen van de pin uit beeld waardoor naar beneden gescrold moet worden. en 1 keer stonden de trajecten nog op klad

Conclusie:

Methode werkt, soms moet afgeweken worden, maar met de log data van de autosampler kan dit aangepast worden.

SP-naam: MAD1000-P025-SP19 Bemonsteringskaarten maken\Trajecten definiëren\Trajecten maken\Experiment 3 manieren trajecten maken\Methode 1 en Introductie eDNA methode Oost Friesland

Deelproject: DP1d1

Act. 13: 3 manieren trajecten maken-3

Doel: Introductie autosampler Oost-Friesland + direct traject maken in het veld

Tijdpad: 09-2020 – 05-2021

Partners: UvA, WF

Beschrijving: Het doel van dit experiment is de bestrijders in Oost Friesland bekend te maken met de eDNA methode, en specifiek het bemonsteren van trajecten met de autosampler. Tegelijkertijd kunnen we het experiment zelf trajecten maken in het veld afronden. Met de nieuwe autosampler zullen de bestrijders zelf een aantal trajecten (bvb 3) varen in de Alde Feanen en/of een ander (natuur) gebied in oost Friesland. Wim en Mirjam zullen eerst een instructie over de autosampler geven, en de watermonsters weer mee nemen naar de UvA voor analyse.

Opzet

- In overleg met Friesland wordt een gebied gekozen waar het lastig is om op de kaart/computer trajecten te tekenen (b.v.b natuurgebied).
- De bestrijders krijgen een instructie over het gebruik van de autosampler
- De bestrijders kiezen zelf trajecten van 5 km
- Bestrijders geven feedback over ervaringen
- De monsters worden aan het eind van de dag meegenomen voor analyse
- De trajecten worden van de autosampler naar qGIS geïmporteerd door Mirjam
- Mocht een traject positief blijken dan kunnen de vervolg stappen doorlopen worden

Resultaat: Dit is ook gedaan in de Wieringermeer. De trajectvoorstellen in de coypu app stonden nog op klad, en waren niet zichtbaar. De bestrijders hadden zelf in het gebied trajecten gevaren. Dit ging grotendeels goed. 1 traject aangeduid in GIS als quad/lopen bleek gevaren te kunnen worden, en staat nu als vaartraject in het systeem. Andere trajecten waren iets anders gevaren dan in GIS aangeduid, en deze zijn aangepast aan de hand van de GPS data van de autosampler. Twee trajecten waren korter dan 3Km waarvan 1 maar 1 Km was. Het traject van 1Km is verworpen , omdat dit te kort is voor monitoringsbemonstering.

Dit is getest in het natuurgebied de Alde Feanen, op verzoek van de bestrijder daar.. Er zat op het moment van testen nog een bug in de autosampler waardoor door statische elektriciteit bij indrukken knoppen een storing kan ontstaan en de coördinaten niet meer worden gelogd, deze wordt opgelost.

De methode is ook met succes getest in natuurgebied de weerrribben

Conclusie

Het zelf bepalen van trajecten is een goed alternatief voor natuurgebieden Om dit goed te laten werken met de coypu app is het, het handigst om rechte strepen te tekenen waar de sample en autosampler id aan verbonden kunnen worden. De bestrijder bepaald vervolgens zelf het traject, wat geregistreerd wordt door de autosampler.

SP-naam: MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP14 Coypu_app

Deelproject: DP1d2

Act. 1: Coypu app. traject bemonstering

Doel: Coypu app. Geschikt maken voor traject bemonstering

Tijdpad: 09-2020

Partners: Waterschap Zuiderzeeland (WZ), UvA, Python United

Beschrijving:

De coypu app was initieel geschikt gemaakt voor puntbemonstering. Om te voorkomen dat er met verschillende apps gewerkt moet worden tijdens het bemonsteren wordt er bepaald of data opslaan via de coypu app ook voor traject bemonstering kan.

Samen met Maarten is overlegd met Python United wat er nodig is om de coypu app ook te kunnen gebruiken voor traject bemonsteren. Er wordt door Wietze van Python United een offerte gemaakt welke goedgekeurd moet worden door Dolf.

Resultaat: De trajecten kunnen ingeladen worden in de coypu app als GeoJSON format met CRS EPSG:4326 - WGS 84

Conclusie: Importeren van Trajecten naar coypu app werkt

SP-naam: MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP30_ Instructie filtreren, coypu app & autosampler

Deelproject: DP1d2

Act. 2: testen coypu app en autosampler

Doel: Lopen van een test traject met de autosampler en coypu app om de functionaliteit van beide te testen

Tijdpad: 11-2020

Partners: UvA WZ

Beschrijving: Maarten (WZ) en Wim (UvA) gaan de functionaliteit van de autosampler en de coypu app testen. Het is de bedoeling dat de bemonsteringsgegevens bijgehouden worden in de coypu app. De autosampler logt de GPS, maar de coypu app heeft een functionaliteit om een traject te volgen. De coypu app wordt getest door het lopen van het traject rondom FNWI gebouw. Na een recente update was de optie van het inscannen van scannen QR code autosampler verdwenen uit de user interface voor zowel android als iphone, en kon op een iphone de data niet opgeslagen worden.

Resultaat:

Resultaten

Coypu app

- Het inscannen van de QR code van de autosampler is inderdaad verdwenen uit de userinterface, en het is niet duidelijk waarom.
- De GPS van de coypu app is voor dit traject niet accuraat waardoor de volgfunctie niet goed werkt.

Autosampler:

- Mogelijk kan de autosampler nog gebruiksvriendelijker gemaakt worden door de gebruiker meer door het menu te leiden:
 - Bijvoorbeeld door direct doorsturen naar legen, dan spoelen en weer legen, en hierdoor het aantal keuzemomenten te beperken.

Conclusie:

Er moeten nog wat verbeteringen plaatsvinden aan de coypu app voordat deze over gedragen kan worden aan de bestrijders voor gebruik in het veld. De problemen met de GPS zijn lastig om aan te passen. Dit dient meer als een extra optie inde app. Het belangrijkste is dat er aan het begin van het traject een punt gezet kan worden en de bemonsteringssessie gekoppeld kan worden aan een traject.

Het scannen van de QR-codes moet weer in de interface komen. De autosampler kan mogelijk nog gebruiksvriendelijker worden gemaakt door het aantal keuzemomenten te beperken.

SP-naam: MAD1000-P025-SP31_Opvolging bij positief traject monster\Test punten coypu app

Deelproject: Dp1d2

Act. 3: testen puntbemonstering coypu app

Doel: Bepalen of het inscannen van QR codes werkt voor puntbemonsteren, en de nauwkeurigheid van de GPS testen.

Tijdpad: 11-2020

Partners: UvA

Beschrijving: Een puntbemonsteringsvoorstel was gemaakt voor science park (bebouwde kom) en het Zuigerplasbos (landelijk). Het vinden en plaatsen van de punten met de coypu app was getest in het veld. Daarna werden de coördinaten behorend bij de in het veld geplaatste punten geëxporteerd.

Resultaat:

Importeren & exporteren coypu app

- Het importeren van de punt coördinaten voor het puntbemonsteringsvoorstel als geojson bestand is eenvoudig.
- Exporteren vanuit coypu app is ook makkelijk
- Voor importeren in qGIS moet het bestand geëxporteerd worden naar csv (UTF 8)

Resultaten veld test

- Beide testen zijn uitgevoerd in de regen. Het was dus bewolkt.
- Rondom de zuigerplas was de GPS niet nauwkeurig, ~500m. Coypu app was niet herstart. De bemonsteringspunten waren geplaatst aan de hand van herkenning punten op de kaart. Het plaatsen van punten komt wel overeen met de werkelijke positie.
- Het inscannen van de QR codes vanaf papier werkte. Vanwege de regen zijn maar een aantal punten op de kaart gezet, omdat de inkt door de regen begon uit te lopen.
- Rondom het science park waren er initieel ook problemen met het vinden van de GPS, maar na herstarten van de coypu app was de GPS nauwkeurig tot 0.5m

Conclusie:

In principe werkt de app wel. Het is alleen vervelend dat het soms een tijdje duurt voordat de app de coördinaten goed weergeeft, of dat de app opnieuw opgestart moet worden om goede GPS posities te krijgen.

e - Inrichten van filtreerstations op veldlocaties

SP-naam: MAD-RBAB\03_RBAB-internal\MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP22_filteren op locatie

Deelproject: DP1e1

Act.1 : Filtreer apparatuur

Doel: Filtreer apparatuur kiezen en aanschaffen voor filteren op locatie

Tijdpad: 03-2020

Partners: UvA

Beschrijving: Op het moment worden de gepoolde watermonsters gefilterd op het lab van de UvA, echter voor grotere monster stromen is dit niet ideaal, omdat het water zo snel mogelijk gefilterd moet worden om het eDNA te conserveren. Daarom is besloten dat het filteren het best gedaan kan worden door de bestrijders op hun uitvalsbasis. Hiervoor zijn de zelfde filtereenheden nodig als die nu op het lab gebruikt wordt.

Resultaat:

| | artikel nr |
|---|-----------------|
| diaphragm vacuum pomp Laboport N 840.3 FT.18 | KNF_28016 |
| Merck™ Express™ PLUS-membraanfilters (100pcs) | HPWP04700 |
| VacTrap, 4L, PP, Red Bin, 1/4" ID Tubing | 305-4001-FLS |
| MF5, 47mm PES Magnetic Filter Holder, 500ml Funnel (long stem with stopper) | 00829 200500-01 |
| MultiVac 600-MS, 6-Place Stainless Steel Manifold | 180600-01 |

Conclusie: Er zijn twee sets besteld, 1 voor Noord-Holland, en 1 voor Friesland.

SP-naam: MAD-RBAB\03_RBAB-internal\MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP24_test labels veld protocol

Deelproject: DP1e2

Act.1: Labelen monsters

Doel: Bepalen of met het gebruik van QR-codes de monsters gelabeld kunnen worden

Tijdpad: 07-2020

Partners: UvA

Beschrijving: Om te voorkomen dat monsters verwisseld worden moeten ze gelabeld worden. Er is hier voor een test gedaan in het lab waarin flessen met watermonsters gelabeld worden, en vervolgens gefilterd. De flessen zullen altijd een vaste QR-code hebben, en de potjes voor de filters ook.

Resultaat: In het lab kwamen we tot de volgende workflow

In het veld:

- Voer traject ID in op formulier
- Scan QR-code fles
- Traject varen
- Sessie ID autosampler invoeren in formulier

Bij het filterstation:

Omdat aan de flessen met de QR-codes op het oog niet te zien is bij welk traject ze horen moeten ze hier nog een keer gescand worden. Het is handig om de sub-eenheden van het filterstation een nummer te geven (1-6). Door dit te doen maakt het niet uit of de flessen elkaar raken, en in principe kunnen ze weggezet worden als ze geleegd zijn.

- Filters in filter units
- Scan QR-code fles
- Giet water in filter sub-eenheid, en noteer het nummer in het formulier bij het juiste traject
- Stop het filter in her potje, doe dicht en scan de code in bij het juiste traject
 - o Dit moet 1 voor 1 dus niet eerst alle filters in een potje en dan scannen, omdat dat er dan verwisseling plaats kan vinden.
- Controle of alles ingevuld is
- Potjes op de post, en formulier naar lab mailen en GPS routes van autosampler naar UvA mailen.

Conclusie: Aan de hand van dit experiment, en discussie hebben we een aantal dingen aangepast. De fles en de postjes krijgen dezelfde QR code. Ook worden de flessen en potjes genummerd 1-6. Het filterstation heeft 6 sub-eenheden, deze worden ook genummerd. Er zullen meerde series van potjes en flessen komen. Deze kunnen bijvoorbeeld alfabetisch gelabeld worden. In plaats van een formulier, zullen de QR-codes in-gescand worden in de Coypu app.

Nieuwe workflow:

- Selecteer traject in coypu app
- Scan QR code fles in coypu app
- Scan autosampler sessie ID
- Bemonster traject
- Filter monsters (juiste fles bij juiste sub-eenheid filter station)
- Filter in juiste potje met buffer
- Verzenden

SP-naam: \MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP30_ Instructie filtreren, coypu app & autosampler

Deelproject: DP1e2

Act. 4: Instructie Filtreerstations

Doel: Filtreren monsters op locatie

Tijdpad: 12-2020 - 01-2021

Partners: UvA, Waterlab Wetterskip Fryslân, Water Proef)

Beschrijving: Wim geeft de instructie van de filtreer stations aan Yvonne van water lab WF en Martin van Water proef. Zij zullen daarna de filtreerstations naar de uiteindelijke locaties brengen en de instructies geven aan de bestrijders.

Resultaat: Vanwege covid en de korte termijn waarop de instructie moest gebeuren, zijn de eerste instructies gegeven door Wim. In de toekomst zal de instructie aan nieuwe bestrijders wel gegeven worden door vertegenwoordigers van de waterlaboratoria

Conclusie: De filtreerstations zijn aanwezig op de aangewezen plaatsen in Noord-Holland en Friesland. Alle benodigdheden voor het filtreren, en verzenden van de filters zijn ook op locatie.

2 Ontwikkelen gestandaardiseerde eDNA speurprotocollen

a - Voor “Check” muskusrat (fase-IV = leeg bevestigen)

SP-naam: MAD-RBAB\03_RBAB-internal\MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP21_Veldprotocollen

Deelproject: DP2b1

Act. 1: Monitoringsprotocol

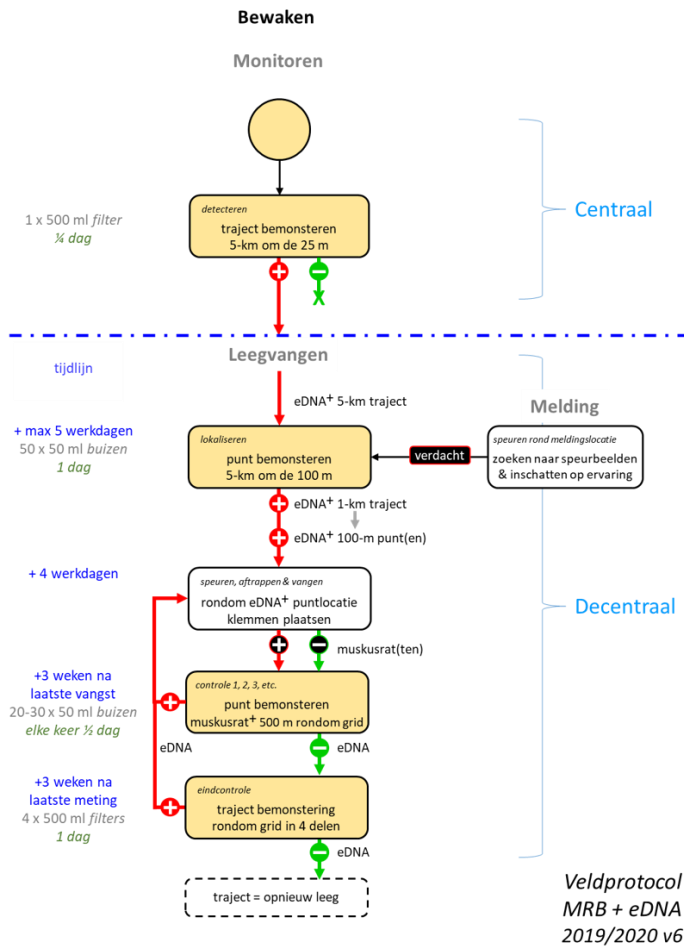
Doel: Maken veldprotocol voor monitoring

Tijdpad: 2019 - 2023

Partners: UvA, UvW

Beschrijving: In overleg met UvW is een protocol ontworpen voor de Bewaking van trajecten die in stap II leeg gevangen waren.

Resultaat:



Conclusie: Bewaking bestaat uit jaarlijkse monitoring van de trajecten. Als er door migratie weer muskusratten in het gebied aanwezig zijn, zal er het tweede deel van het protocol ingegaan worden.

b - Voor “Bewaken” muskusrat (fase-III = leeg houden)

SP-naam: MAD-RBAB\03_RBAB-internal\MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP21_Veldprotocollen

Deelproject: DP2b1

Act. 1: Bewakingsprotocol

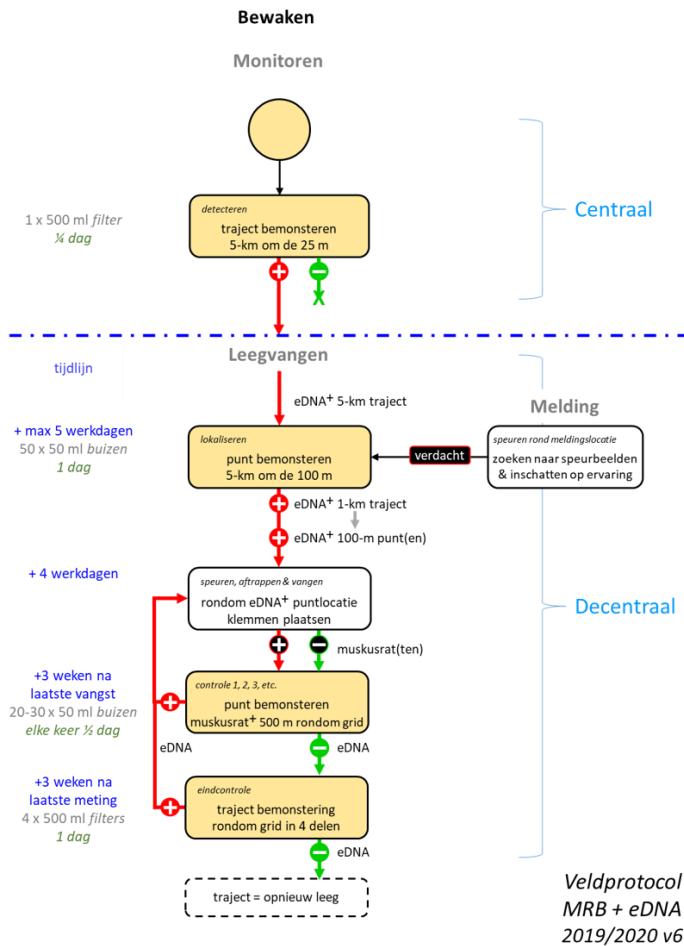
Doel: Maken veldprotocol voor Bewaking

Tijdpad: 2019 - 2023

Partners: UvA, UvW

Beschrijving: In overleg met UvW is een protocol ontworpen voor de Bewaking van trajecten die in stap II leeg gevangen waren.

Resultaat:



Conclusie: Bewaking bestaat uit jaarlijkse monitoring van de trajecten en reactie op meldingen. Wanneer volgens het volledig verwijdering veld protocol een traject leeg gevangen is zal het traject jaarlijks gemonitord worden volgens het eerste deel van dit protocol. Mocht er een melding zijn, of toch muskusrat eDNA aangetroffen worden, dan wordt het tweede deel van het protocol gevolgd.

c - Voor “Volledig-verwijderen” muskusrat (fase-II = leeg krijgen)

SP-naam: MAD-RBAB\03_RBAB-internal\MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP21_Veldprotocollen

Deelproject: DP2c1

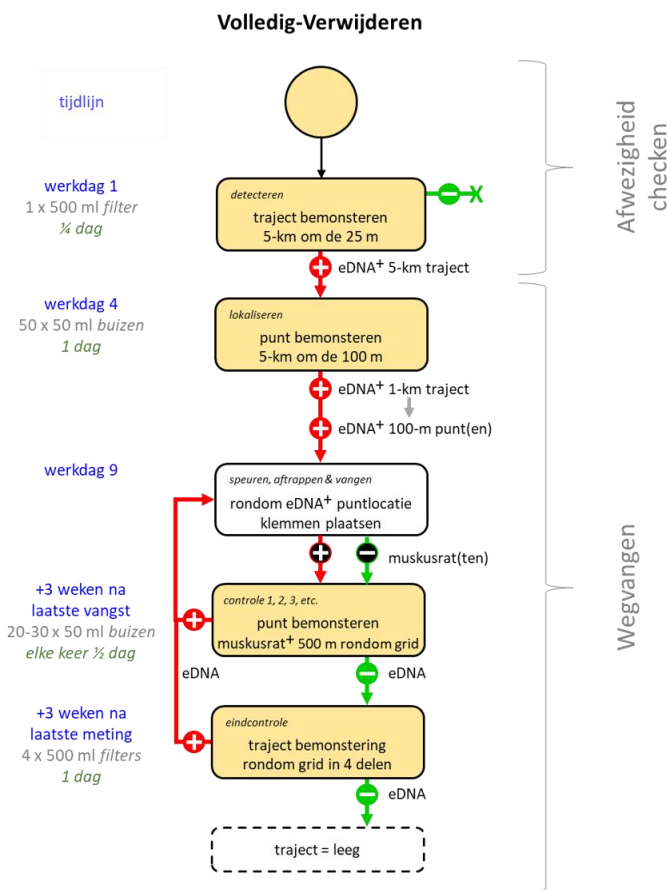
Act. 1: Veldprotocol volledig verwijderen

Doel: Veld protocol ontwikkelen voor volledig verwijderen

Tijdpad: 2019 – 2023

Partners: UvA, UvW

Beschrijving: Voor het volledig verwijderen van muskusratten uit de Nederlandse waterwegen is een veldprotocol nodig. Naar discussie tussen UvA en UvW is het onderstaande protocol voor de volledige verwijdering tot stand gekomen.

Resultaat:

Conclusie: Het bovenstaande protocol zal in het veld getest gaan worden

d - Voor "Verminderen" muskusrat (fase-I = leger maken)

SP-naam: MAD-RBAB\03_RBAB-internal\MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP21_Veldprotocollen

Deelproject: DP2c1

Act. 1: Veldprotocol verminderen

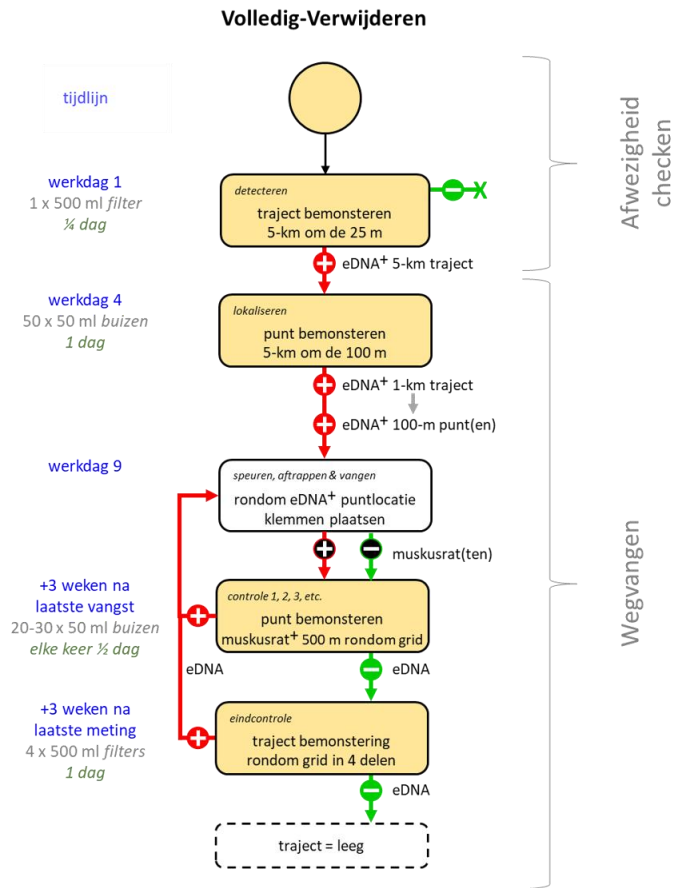
Doel: Veld protocol ontwikkelen voor verminderen

Tijdpad: 2019 – 2023

Partners: UvA, UvW

Beschrijving: Voor het volledig verminderen van muskusratten uit de Nederlandse waterwegen wordt hetzelfde protocol gebruikt als voor volledig verwijderen. In gebieden met muskusrat populaties, zal initieel eerst vermindering plaats vinden, omdat wegens migratie uit aangeleggen gebieden een traject lastig leeg te krijgen is.

Resultaat:



Conclusie: Het bovenstaande protocol zal in het veld getest gaan worden

e - Voor monitoren beverrat migratie en populatie

f - Aansluiting met nieuwe MBR speurtechnieken (speurhonden/cameravallen)

3 Optimaliseren eDNA detectie (= laboratoriumanalyse)

a - Optimaliseren MBR-eDNA-qPCR

SP-naam: MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP00 Testen monsterlocaties

Deelproject: DP3a1

Act1: Verkrijgen positieve monsters voor testen in het lab

Tijdpad: 07-2018 – 11-2018

Partners: UvA, HDSR

Doel: Verkrijgen van positieve muskusrat eDNA monsters voor gebruik in ontwikkelen van de muskusrat eDNA isolatie en qPCR protocollen.

Beschrijving:

- Voor allerlei experimenten zijn positieve veld samples nodig.
- Hiervoor worden locaties uitgekozen waar bestrijders activiteit vermoeden/weten
- 10 locaties bemonsterd in veld door MRB Noord-Holland.

Resultaat:

- 4 monsters sterk positief, 1 positief, 1 zwak positief 4 negatief

Conclusie:

Sterk positieve monsters gebruikt voor vervolg experimenten

SP-naam: MAD1000-P025-E011 MonsterBank MuRa

Deelproject: DP3a1

Act.2: sample bank muskusrat eDNA

Tijdpad: 11-2019

Partners: UvA, HDSR

Doel: Monstercollectie verzamelen opslaan van 10 locaties die positief zijn voor muskusrat eDNA (in verschillende mate) voor gebruik in lab experimenten

Beschrijving

- 10 locaties (max. 5 meter brede waterweg)
- 3 liter per locatie bemonsteren (2 x 1.5 liter)
- Zelfde dag op het lab flessen combineren in emmer en mengen
- 7.5 ml monster + isopropanol -> DNA isolatie
- Rest: 20 x 50 ml en 4 x 0.5 ml -> direct -20 C

Resultaat: In totaal 4 muskusrat eDNA analyses.

Monsters SBM01 t/m SBM03 zijn genomen direct nadat ~3 muskusratten per locatie uit eerder geplaatste klemmen zijn verwijderd. De muskusrat eDNA signalen zijn zeer hoog (26–645 pg per 7.5 ml watermonster), waarschijnlijk om deze reden. Deze monsters zijn genomen met een omgevingstemperatuur van rond het vriespunt met enkele cm ijs op het water.

Conclusie: Positieve monsters met hoge concentratie voor gebruik in lab experimenten.

SP-naam: MAD1000-P025-SP15 Validatie MuRa specificiteit qPCR assay\1 - Validatie MuRa qPCR verschillende species

Deelproject: DP3a1

Act.3: validatie qPCR

Tijdpad: 05-2019 - 07-2019

Partners: UvA

Doel: Bepalen specificiteit muskusrat qPCR primers

Beschrijving: Muskusrat primers getest op verschillende soorten: nutria, mens, zebra vis, bacillus subtilis, muis en aardappel.

Resultaat: Geen amplificatie van DNA van deze soorten.

Conclusie: Geen specifieke amplificatie op deze soorten

SP-naam: MAD1000-P025-SP15 Validatie MuRa specificiteit qPCR assay\2 - Woelrat in MuRa en BeRa qPCR

Deelproject: DP3a1

Act. 4: Woelrat in muskusrat en beverrat qPCR

Doel: Uitsluiten dat woelrat DNA een signaal geeft in de qPCR

Tijdpad: 07-2019 – 08-2019

Partners: UvA, HDSR

Beschrijving:

- verschillende concentraties woelrat DNA ingezet met de detectie primer set voor muskusrat (cytb en cox) en beverrat (cox)

- Geen interne controle mee genomen om inhibitie in het woelrat sample uit te sluiten maar isolaties met purelink gDNA kit weefsel materiaal zijn doorgaans zuiver zonder inhibitor

Resultaat: Bij beide sets en elke concentratie woelrat DNA geen enkel signaal in qPCR.

Conclusie: Geen detectie woelrat DNA met specifieke muskusrat en beverrat primers/ probes

SP-naam: MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP14 Coypu_app

Deelproject: DP3a1

Act. 4:

Doel: Positieve beverrat eDNA monsters voor experimenten

Tijdpad: 09-2020

Partners: UvA, H & A

Beschrijving:

OP verschillende plekken in het verblijf van de gevangen Beverrat zijn 50-1000 ml monsters genomen die gebruikt zullen worden als positieve controle in experimenten

Resultaat: Voor de bouw is een goede concentratie gemeten, en dit kan gebruikt worden als positieve controle. Echter 10m van de bouw waren erg lage concentraties.

Conclusie: Er is een positieve controle, maar we willen verder onderzoeken waarom de concentraties verderop zo laag zijn. Dit is belangrijk voor het detecteren van sporen in het veld.

SP-naam: MAD1000-P025-E012 Maximum eDNA input PCR reactive

Deelproject: DP3a2

Act.1: Maximum eDNA input PCR reactive

Tijdpad: 11-2018 – 12-2018

Partners: UvA, WF

Doel: Het bepalen hoeveel eDNA er maximaal in een PCR reactie kan worden gestopt om de gevoeligheid van de gehele analysemethode zo hoog mogelijk te krijgen.

Beschrijving Een oplopende hoeveelheid eDNA gebruiken met elke keer dezelfde hoeveelheid target in-spijken:

- eDNA van een eerder uitgevoerd experiment gebruiken
- Rond het Friese dorp Wommels 8 x 4 km waterweg om de 100 m = 320 monsters -> MAD1000-025-007
- Restant van deze monsters zijn gepoold:
- Van elke waterweg per monster ca. 12 ml gepoold tot een totaal van 40 x 12 ml = ca. 500 ml per waterweg (Letter A t/m H)
- 500 ml over 0.22 µM PES filter (Corning)
- Filter uitsnijden -> ¼ deel opwerken volgens protocol: 'eDNA isolation from Corning PES 0.2 µm filters'

Resultaat:

- In totaal 64 muskusrat eDNA analyses.
- Bovenstaande is uitgevoerd met de NanoDrop meter, dus aanwezigheid van RNA kan de juiste input van eDNA in de qPCR sterk vertekenen

- Input tot 10 µg total eDNA geeft nauwelijks verstoring van het muskusrat eDNA qPCR signaal
- Het tijdens de precipitatie gebruikte GlycoBlue heeft ook geen effect

Conclusie:

Input tot 10 µg total eDNA geeft nauwelijks verstoring van het muskusrat eDNA qPCR signaal

SP-naam: MAD1000-P025-SP12 Optimalisatie qPCR\0 - Primer designs

Deelproject: DP3a2

Act. 1: Primer design muskusrat

Tijdpad: 09-2016

Partners: UvA

Doel: ontwerpen specifieke primers en probe voor muskusrat DNA

Beschrijving: ontwerpen en testen van verschillende primers op genen in mitochondriaal DNA muskusrat.

Resultaat: Primers en FAM-probes ontworpen voor COX en CYTB

Conclusie: Primer en probe sets binden op genen in mitochondriaal DNA muskusrat

SP-naam: MAD1000-P025-SP12 Optimalisatie qPCR\2 - qPCR optimalisatie temperatuur

Deelproject: DP3a2

Act. 2: Muskusrat Primer annealing temperatuur

Tijdpad: 07-2019

Partners: UvA

Doel: Bepalen optimale annealing temperatuur muskusrat qPCR

Beschrijving: Primer sets getest bij verschillende annealing temperaturen

Resultaat: 5 verschillende annealing temperaturen getest

Conclusie: Optimale annealing temperatuur 59 °C

SP-naam: MAD1000-P025-SP12 Optimalisatie qPCR\3 - qPCR optimalisatie door toevoegingen

Deelproject: DP3a2

Act. 3: optimalisatie door toevoegingen

Tijdpad: 09-2019

Partners: UvA

Doel: Bepalen of toevoegingen een positief resultaat hebben op de qPCR

Beschrijving: BSA zou op basis van literatuur een positief effect hebben op monsters vervuild met humic acid. DMSO kan volgens literatuur een positief effect hebben. Experiment gedaan met verschillende concentraties BSA en DMSO

Resultaat: negatief effect toevoeging BSA en geen effect DMSO

Conclusie: BSA en DMSO worden niet gebruikt als toevoeging in de qPCR.

SP-naam: MAD1000-P025-SP12 Optimalisatie qPCR\4 - MuRa BeRa multiplex

Deelproject: DP3a2

Act. 4 : muskusrat en beverrat multiplex PCR

Tijdpad: 08-2019

Partners: UvA

Doel: Bepalen of multiplex van muskusrat en beverrat qPCRs mogelijk is

Beschrijving: efficiëntie van de afzonderlijke qPCRs bepaald met probe gelabeld met FAM of TAMRA. En de efficiëntie van de multiplex qPCR wordt bepaald

Resultaat: beverrat qPCR hogere efficiëntie met TAMRA. Voor de multiplex is de muskusrat probe gelabeld met FAM en de beverrat met TAMRA.

Conclusie:

Voor multiplex beverrat, muskusrat qPCR, beverrat probe labelen met TAMRA en muskusrat met FAM.

SP-naam: MAD1000-P025-SP12 Optimalisatie qPCR\ 5 - Mastermix IDT vs Taqman fast advanced Mastermix

Deelproject: DP3a2

Act. 5: Vergelijken effect 2 mastermixen

Tijdpad: 08-2019

Partners: UvA

Doel: Bepalen of de qPCR geoptimaliseerd kan worden door gebruik van een ander qPCR mastermix

Beschrijving: De muskusrat en beverrat qPCRs worden in qPCR master mix van IDT (integrated DNA technologies) en de Taqman fast advanced Mastermix van Themofisher.

Resultaat: Lagere Ct waardes in beverrat PCR in taqman mastermix. Verwaarloosbare verlaging Ct voor muskusrat qPCR in Taqman mastermix.

Conclusie: Taqman mastermix voornamelijk beter voor de beverrat qPCR.

SP-naam: MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP12 Optimalisatie qPCR\9 - primer_probe_concentratie_titratie

Deelproject: DP3a2

Act. 6 : Optimalisatie primer probe concentratie muskusrat qPCR

Tijdpad: 10-2020

Partners: UvA

Doel: Bepalen of andere primer probe concentraties de efficiency kunnen verhogen, en dus gevoeligheid vergroten.

Beschrijving:

de 2 gebruikte primersets worden afzonderlijk van elkaar getest dus Cytb en Cox apart.

eind Conc.primers: eind conc.probe

750 nM 250 nM

500 nM 200 nM

250 nM 100 nM

125 nM 50 nM

Resultaat:

- Combinaties met 50nM probe laten een vroege afvlakking zien
- Geen groot verschil in efficiency van de verschillende primer probe combinaties, en zijn goed reproduceerbaar.
- COX en CYTB reageren ongeveer hetzelfde op de concentraties
- Kijkend naar welke combinaties het eerste opkomen (en de PCR dus gevoeliger is) dan maakt de primer concentratie niet zoveel uit, maar tussen de probe concentratie en gevoeligheid is een lineair verband, waarbij hogere probe concentratie tot iets meer dan 1 cycle gevoeliger is.

Conclusie:

Cox en cytb primer probe worden nu gezamenlijk getest voor efficiency met de volgende concentraties: 250, 500, 750 voor elke primer en 50, 150, 250 voor elke probe.

SP-naam: MAD1000-P025-SP12 Optimalisatie qPCR\ MAD1000-P025-SP12 Optimalisatie qPCR\6 - Interne controle spike

Deelproject: DP3a2

Act. 7 : Interne controle primer dimer check

Tijdpad: 01-2020 - 10-2020

Doel: Bepalen of er in onze buffer en onze PCR settings geen primer dimers gevormd worden

Tijdpad: 10-2020

Partners: UvA

Beschrijving:

verdunningsreeks (6 punten) pcDNA3-EGFP vector: 10 ng, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001

qPCR was uitgevoerd volgens standaard protocol van Solis BioDyne met 250nM final conc primers. Er zijn 2 reeksen in duplo gedaan een voor de -2-R reverse primer en een voor de -10-R reverse primer. Na de amplificatie was een melting curve gedaan, om te kijken of er meerdere producten/primer dimers gevormd worden.

Resultaat:

Er werd voor beide qPCRs (132 bp en 177 bp) maar 1 fragment gevormd, en er waren geen primer dimers zichtbaar.

Conclusie: Beide primer sets zijn geschikt voor onze condities, aangezien er geen primer dimers of andere a-specifieke producten werden gevormd

SP-naam: MAD1000-P025-SP12 Optimalisatie qPCR\ MAD1000-P025-SP12 Optimalisatie qPCR\6 - Interne controle spike

Deelproject: DP3a2

Act. 8 : Interne controle efficiency

Tijdpad: 01-2020 - 10-2020

Partners: UvA

Doel: Ontwikkelen van een interne controle om inhibitie aan te tonen in de qPCR

Beschrijving: Een interne controle kan gebruikt worden om te bepalen of een negatieve uitslag het gevolg is van inhibitie in de QPCR of afwezigheid van target DNA. Nu bepalen we dit door altijd drie verschillenden hoeveelheden monster te testen in de qPCR. Dit werkt goed, echter het vereist meer mastermix en probes, en is meer werk dan het gebruik van een interne controle. De eerder geteste interne controles hadden een te lage efficiëntie beneden 95% met schone monsters. pGLO plasmide met GFP gaf de hoogste met 87%. Er is een nieuwe vector en primer probe combinatie besteld die vaak in de diagnostiek gebruikt wordt.

Resultaat:

Er zijn twee reeksen ingezet. De eerste reeks van 10ng- 0.0001ng (6 punten). Hierbij was de efficiency voor de 2R was 129.0% voor 10R 124.8%. Dit is te hoog voor beiden.

Een mogelijke oorzaak voor de te hoge efficiency, is een te hoge template concentratie, laagste punt van de ijklijn is 100 femtogram. Nieuwe reeks inzetten met 3 lagere punten en 2 hoogste punten weg laten.

Nieuwe reeks: 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001, 0.000001, 0.0000001ng (laagste punt is dus 0.1 femtogram).

Deze resultaten gaven voor 2R --> 105.0% efficiency en voor 10R --> 103.2% efficiency. Dit ligt in de range van 90-110%. Het laagste punt van de ijklijn (0.1 femtogram) is hierbij weggelaten.

Het laagste punt kwam voor 1 niet op en voor de anderen niet goed genoeg. Theoretisch gezien zou de 5 femtogram (paper) opkomen tussen 30 en 35 CT.

Conclusie:

De nieuwe interne controle werkt voor beide primer sets goed. De efficiency ligt in de gewenste range.

SP-naam: MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP12 Optimalisatie qPCR_beverrat_muskusrat\6 - Interne controle spike

Deelproject: DP3a2

Act. 9: Bepalen effect aanwezigheid interne controle op efficiency muskusrat qPCR

Doel: Bepalen effect aanwezigheid interne controle op efficiency muskusrat qPCR

Tijdpad: 12-2020

Partners: UvA

Beschrijving: Het effect van de interne controle op de muskusrat qPCR Verschillende concentraties muskusrat DNA werd getest met verschillende concentraties van de interne controle (IC) vector .

- muskusrat totDNA concentratie (Ct = 30) = 0.1, 0.01, 0.001
- IC concentratiereeks laag -> hoog (Ct = 40 -> 20)= 7 punt verdunningsreeks van af 0.1 ng
- beide IC amplicons (reverse primers)
- Concentratie beide probes = standaard en gelijk = 250 nM eindconcentratie
- Primerconcentraties = standaard en gelijk = 750 nm eindconcentratie

Resultaat:

-Bij gebruik van R2 IC weinig tot geen effect in verschuiving van Ct muskusrat DNA conc 0.1 en 0,01 ng bij in spiken van IC R2 of R10 met concentratie reeks 0.1 tm 0.0000001 ng.

-bij een concentratie van 1 pg muskusrat totDNA fluctueert de CT iets. Tussen geen GFPE en max input GFP levert een verschil in detectie op van muskusrat DNA van 1.4 CT, wat onverwacht was want met meer GFP er in was de verwachting dat de CT van muskusrat qPCR stijgt. Echter bij een input van 1 pg muskusrat DNA fluctueert de Ct altijd in deze mate.

-Voor het R10 Amplicon geldt het zelfde als bovenstaand

Conclusie:

Bij gebruik van, in de praktijk realistische concentraties, muskusrat DNA lijkt geen reactie component tekort ontstaan (er was geen afvlakking van de muskusrat amplificatie-curve bij hoge GFP input)

IC stoort niet in de detectie (Ct value) ongeacht de hoeveelheid GFP en/of te detecteren muskusrat DNA.

Efficiëntie van de GFP spike amplificatie zijn van R2 en R10 vergelijkbaar (allebei goed) er wordt met amplicon R2 verder te testen. R2 amplicon is 45 bp korter dan het R10 en, ook al bleek uit het experiment dat reactie componenten niet opraken, is dit het veiligst.

Een Ct waarde van ca. 30 voor de spike geeft een betrouwbaar signaal dit komt overeen met 0.0001 ng IC vector. Besloten wordt om reacties in het vervolg te spiken met 0.0001 ng GFP vector als interne controle.

SP-naam: MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP12 Optimalisatie qPCR_beverrat_muskusrat\6 - Interne controle spike\spike_6_GFP_vector\03_GFP primer_probe_concentratie reeks

Deelproject: DP3a2

Act.10 : Effect verschillende primer probe concentraties interne controle

Doel: Bepalen wat het effect van verschillende primer probe concentraties voor de interne controle op de muskusrat qPCR is.

Tijdpad: 12-2020

Partners: UvA

Beschrijving:

- Vaste IC concentratie : 0.0001ng (Ct = ca. 30)
- reeks muskusrat eDNA concentratie 0.1 - 0.01 - 0.001 ng
- Concentratie muskusrat probe = 250 nM eind
- Concentratie muskusrat primer = 750 nM eind
- Primer concentratie IC reeks laag -> hoog: 250 - 500 - 750 nM eind
- Probe concentratie GIC reeks laag -> hoog: 50 - 150 - 250 nM eind

Resultaat:

Er is tot maximaal 0.4ct verschil te zien

Conclusie:

Het IC signaal in een PCR met niet optimale condities (lage primer/probe) veranderd ook niet bij een verhoogde muskusrat DNA concentratie. Er is tot maximaal 0.4 CT verschil te zien, dit is verwaarloosbaar.

SP-naam:

Deelproject: DP3a2

Act.11 : Interne controle inhibitie

Doel: Testen van interne controle in aanwezigheid van inhibitoren

Tijdpad: 01-2021

Partners: UvA

Beschrijving: Om te kijken wat het effect is van inhibitie in de PCR op de interne controle in combinatie met muskusrat signaal werd er een reeks van laag naar hoge inhibitie ingezet met drie concentraties muskusrat DNA. een vaste GFP concentratie en 2 concentraties aan GFP (interne controle) primers. namelijk 750 nM en 300 nM eind concentratie.

inhibitie in sample = 6x 500 ml SP (science park)water opgewerkt volgens: " eDNA isolation from PES 0.45 µm filters with enhanced CTAB lysis v 1.0"

zonder BioEcho kolom maar met 1 x pellet wash met 70 % EtOH. Resultaat is een bruin pellet, alle 6 opgelost in 50 µl H₂O gepoold en gebruikt in PCR als toevoeging die inhibeerd.

1 ul staat gelijk aan 10 ul SciencePark water

concentratie inhibitie pool gemeten op Qubit brDNA kit -> 190ng/µl eDNA

Resultaat:

-hoe meer muskusrat DNA hoe sneller de GFP reactie afvlakte. De Ct blijft zo goed als hetzelfde. De plateaufase wordt beïnvloed

-Als muskusrat signaal geïnhibeerd wordt, wordt GFP signaal dit ook.

-wat geïsoleerd werd als inhibitor is een krachtige inhibitor bij 60 x verdunning (0.5 ul in 30 ul) Dit was terug te zien in een duidelijk afvlakking van de reactie.

- Bij een lagere primer concentratie (300 nM) leek het verloop van de interne controle GFP PCR meer beïnvloed te worden door inhibitie dan bij 750 nM GIC primer.

Conclusie:

De GFP interne controle is geschikt om inhibitie aan te tonen. Bij een lagere primer concentratie was een groter effect van inhibitie te zien.

SP-naam: MAD1000-P025-SP12 Optimalisatie qPCR_beverrat_muskusrat\6 - Interne controle spike\spike_6_GFP_vector\05_GFP in eDNA achtergrond

Deelproject: DP3a2

Act. 12: eDNA achtergrond

Doel: Bepalen of hoge concentraties eDNA van andere bronnen effect hebben op de efficiency van de interne controle

Tijdpad: 01-2021

Partners: UvA

Beschrijving: Om te bepalen of eDNA uit 500 ml in 1 reactie niet dusdanig stoort wordt dit met verschillende concentraties muskusrat DNA ingezet in combinatie met de interne controle spike IC (interne controle). Ook wordt de voorheen gebruikelijk manier om inhibitie te testen ingezet namelijk een reeks van 20, 10, 5 en 1 μ l sample.

15 x 500 ml Science park water gefilterd en opgewerkt inclusief BioEcho kolom.

na BioEcho kolom =90 μ l alles gepoold en gesplitst in 15x 90 μ l en ingedampt tot 40 μ l deze samples verder ingedampt naar 13 μ l voor de volledige samples.

concentratie pool = 75 ng/ μ l -> 90 μ l is input voor indampen dit levert dus 90x 75ng = 6750 ng dit wordt ingedampt dus in 40 μ l zit 6450ng = 168,75 ng/ μ l

Toegevoegde inhibitie is resultaat van 500ml opwerken zonder BioEcho kolom. eluaat is 50 μ l waarbij dus 1 μ l overeenkomt met 10 ml SP water.

GFP in concentratie 0.1 pg

GFP primers 750 om 250nM eind concentratie

Resultaat:

-Afhankelijk van individuele samples verontreinigingen kunnen deze in hun geheel in de PCR reactie, echter is er behoorlijke inhibitie voornamelijk te zien door dat het GFP signaal verschuift.

-Door de reeksen van 20, 10 ,5 en 1 μ l is duidelijk te zien dat de IC reactie gevoeliger is voor inhibitie dan de muskusrat reactie.

-Bij toegevoegde inhibitie zien we ook grotere effecten op het IC signaal dan op het muskusrat signaal

Conclusie:

-De GFP spike is prima geschikt want is gevoelig voor de inhibitie ondanks de wat hogere gevoeligheid voor deze inhibitie.

-De negatieve controle (NTC)is nu ook NTC voor IC. Dit blijkt niet handig te zijn, liever willen we GFP zien zonder inhibitie. In vervolg word de NTC negatief voor Muskusrat DNA, maar een positieve controle voor GFP. Heirdoor kunnen we het interne controle signaal kunnen zien zonder inhibitie en dus een goeie indicatie kunnen krijgen hoe erg een reactie geinhibeerd word.

SP-naam: MAD1000-P025-SP12 Optimalisatie qPCR\0 - Primer designs

Deelproject: DP3a8

Act. 1: Primer design beverrat

Tijdpad: 09-2017

Partners: UvA

Doel: ontwerpen specifieke primers en probe voor beverrat DNA

Beschrijving: ontwerpen en testen van verschillende primers op genen in mitochondriaal DNA beverrat.

Resultaat: Primers en FAM-probes ontworpen voor COX en CYTB

Conclusie: Primer en probe sets binden op genen in mitochondriaal DNA beverrat

SP-naam: MAD1000-P025-SP12 Optimalisatie qPCR\7 - Test nieuwe BeRa qPCR

Deelproject: DP3a8

Act. 2 : Nieuwe beverrat qPCR

Tijdpad: 01-2020

Partners: UvA

Doel: Bepalen of de beverrat qPCR geoptimaliseerd kan worden door gebruik van zowel COX3 als CYTB

Beschrijving: beverrat qPCR werd eerst alleen uitgevoerd met COX3 primer, omdat CYTB minder goed presteerde. Nieuwe primers voor CYTB besteld en experiment gedaan met beide primer sets.

Resultaat: De Ct values van de primersets bij elkaar zijn bij elke concentratie van de ijk lijn lager dan de afzonderlijke sets. ongeveer 1 Ct.

Conclusie: qPCR marginaal beter met beide primer sets

SP-naam: MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP18 Bever identification

Deelproject: DP3a9

Act.1 : Bever identificatie

Doel: Bepalen of een poot gevonden door Hunze & Aa's afkomstig is van een bever.

Tijdpad: 11-2019

Partners: UvA, H & A

Beschrijving: Hunze & Aa's had een poot gevonden die mogelijk afkomstig was van een bever.

Poot ontvangen via on-gekoelde post.

Poot in staat van ontbinding.

sample genomen van weefsel bovenop poot plus reserve.

DNA geïsoleerd met purelink kit

Evagreen pcr ingezet met muskusrat en beverrat primers.

Resultaat: Poot sample geeft geen signaal in de muskusrat en beverrat PCR's. Bever specifieke primers ontworpen voor SYBR Green PCR. Verdunningsreeks ingezet met bever specifieke primers en muskusrat en beverrat primers als controle. PCR positief voor Bever.

Conclusie: poot is naar alle waarschijnlijkheid (geen echte + controle aanwezig) afkomstig van bever.

SP-naam:

Deelproject: DP3a9

Act. 2 : Taqman probe bever

Doel: Ontwerpen taqman probe detectie bevers

Tijdpad: 01-2021

Partners: UvA

Beschrijving: Voor detectie van bevers maakten we tot nu toe gebruik van de SybrGreen methode. qPCR met taqman probes is specifiek, en kan in combinatie met de interne controle gebruikt worden.

Resultaat: taqman probe, en nieuwe primers ontworpen, en besteld voor bevers

Conclusie: Primer en probe kunnen gebruikt worden in combinatie met de Interne controle

SP-naam: MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP35_controle uitslagen en cut off qPCR

Deelproject: DP3a10

Act. 1: controleren detectie grens verschillende vaarten

Doel: Testen of de huidige qPCR detectiegrens geschikt is voor alle soorten vaarten.

Tijdpad: 1^e helft 2021

Partners: UvA, HDSR, WF

Beschrijving: Omdat de huidige detectiegrens bepaald is aan de hand van een beperkt aantal bemonsterde vaarten, moet getest worden of deze ook geschikt is voor andere vaarten. Voor een aantal vaarten zal een week na bemonsteren een traject opgedeeld worden in 1Km sub-trajecten Door dit te doen voor zowel positieve als negatieve trajecten, krijgen we een idee of de huidige detectie grens geschikt is. We krijgen inzicht mogelijke vals negatieven, alsmede meer inzicht welke positieve waarden duiden op aanwezigheid, en welke resultaat zijn van bvb passerende ratten, signalen andere kant gemalen etc.

Resultaat: Tot nu toe zijn er voor verschillende vaarten die zwak positief zijn 1Km opvolgingen gedaan. Voor 1 zwak + traject in Friesland was 1 van de 1Km trajecten sterk positief, er waren puntmonsters genomen, en oude vraatsporen gevonden. De puntmonsters waren alle negatief.

Voor alle nadere zwak positieve trajecten waren de 1Km monsters negatief

Conclusie: Voorlopig wordt niet direct na een zwak positief signaal (alleen + in 20ul of < 1 pg/l in 10ul) opgevolgd met 1Km trajecten. Dit wordt nu gedaan na 6-8 weken, om uit te sluiten dat het signaal van

een langstreckende rat was, en er dus te veel tijd gestoken wordt in opvolgen met puntmonsters. Sterk positieve signalen worden wel direct opgevolgd met 1Km trajecten.

b - Optimaliseren van de MBR-eDNA analyse voor gepoolde monsters

SP-naam: MAD1000-P025-E006 Vergelijk filtersystemen

Deelproject: DP3b3

Act. 1: Vergelijken filter systemen

Tijdpad: 02-2019-04-2019

Partners: UvA

Doel: Het vergelijken van filtersystemen om tot een juiste keuze te komen

Beschrijving

- Keuze van verschillende filtertypen: nitrocellulose (NC), polyethersulfone (PES)
- Beschikbare informatie raadplegen
- “de facto” standaard vergelijken met de filtreer methoden in 2017 UvA MBR pilot experiment

Resultaat

- In totaal 6 eDNA isolaties.
- Water gaat veel sneller door PES, zelfs bij kleinere poriegrootte (0.22 μm)
- Fenol/chloroform geeft betere total eDNA opbrengst, 2 x meer dan Powerwaterkit
- PES lost helemaal op in fenol waardoor al het DNA vrijkomt
- NC poriegroottes van 1.2 - 8.0 μm geven ongeveer dezelfde opbrengst (~15 ng/ml monster)
- NC poriegrootte 0.45 μm geeft lagere opbrengst (9 ng/ml), maar doorlooptijd is 45 in plaat van <5 min) -> DNA vast in filter en komt niet meer vrij bij gebruik beads in powerwaterkit

Conclusie:

PES 0.45 μm zal gebruikt worden voor het filteren.

SP-naam: MAD1000-P025-E013 Filteren gesimuleerde pools

Deelproject: DP3b3

Act. 2: Detectie limiet eDNA

Tijdpad: 02-2019

Partners: UvA

Doel: Testen of eDNA van 1 positief monster in een pool van ~50 monsters nog steeds te detecteren is.

Dit is noodzakelijk als we willen gaan werken met grotere pools waarin een enkele muskusrat eDNA positieve locatie verdund wordt door een groot aantal negatieve locaties uit het gehele gebied.

Uit het eerste experiment is gebleken dat optimalisatie noodzakelijk is. De gekozen aanpak is daarom opgesplitst in verschillende onderdelen.

Beschrijving

- Watermonsters van 3 verschillende eerder positief geteste locaties 50x verdunnen in 3 verschillende negatieve watermonsters.
- eDNA concentreren/isoleren door filtratie (0.2 µm) omdat standaard precipitatie niet mogelijk is door te groot volume (0.5 liter)
- Vergelijk met de muskusrat eDNA qPCR of hetzelfde signaal in de pool waar te nemen is.

Resultaat

- In totaal 35 muskusrat eDNA analyses.
- 30 tot 70 x eDNA qPCR signaal gaat verloren als een positief monster verdund wordt in de pool en eDNA geïsoleerd wordt door middel van filtering
- De verdunningsfactor komt niet goed terug, mogelijk door de achtergrond in het ‘negatieve’ monster
- Zonder 8 µm prefilter blijft er slechts 20% beoogde signaal over. Met prefilter blijft er bijna niets over. -> 20% in cellen/mitochondriën?

Conclusie:

Het eDNA raakt ergens kwijt in het proces, waarschijnlijk door het filteren. Voor de individuele monsters wordt namelijk het standaard precipitatieprotocol gebruikt.

SP-naam: MAD1000-P025-SP13 Optimalisatie eDNA isolatie\2 - eDNA in flowthrough

Deelproject: DP3b3

Act. 3: verlies eDNA

Tijdpad: 02-2019 – 04-2019

Partners: UvA

Doel: Achterhalen waar verlies eDNA plaatsvindt

Om uit te zoeken waar we het eDNA verliezen, stellen we de volgende vragen:

- Wat is de recovery van eDNA van het filter?
- Zit het eDNA in de doorloop/filtraat?
- Verliezen we eDNA tijdens de kolomzuivering?

Beschrijving:

- eDNA uit de doorloop isoleren d.m.v. het standard (precipitatie) protocol
- Totaal eDNA bepalen voor en na de kolomzuivering

Resultaat

- In totaal 6 muskusrat eDNA analyses.
- 30-40% na kolomzuivering
- 15-30% totaal eDNA gaat verloren in de doorloop
- 30-45% muskusrat eDNA gaat verloren in de doorloop
- 1-5% muskusrat eDNA over na het filtreren van bevroren monsters

Conclusie:

Al deze test zijn gedaan met ingevroren positieve watermonsters, waarvan we eerder hebben laten zien dat invriezen niet tot qPCR signaalverlies leidt. Hierbij is wel het standaard precipitatieprotocol. Zou deze vinding niet opgaan voor filtratie en het verlies in signaal verklaren?

SP-naam: \MAD1000-P025-SP13 Optimalisatie eDNA isolatie\3 - Effect vries-dooi

Deelproject: DP3b3

Act. 4: Verlies verse vs vries/dooi monsters

Tijdpad: 02 –2019 – 04-2019

Partners: UvA

Doel: Controleren of eDNA verlies door filtratie ook optreedt bij het gebruik van verse watermonsters.

Beschrijving: Vers muskusrat eDNA positief watermonster direct testen met filtratie of na 1 en 2 vries-dooi cycli.

- Bepaal muskusrat eDNA in de filterfractie
- Bepaal muskusrat eDNA in de doorloop door middel van precipitatie
- Vergelijk met het directe precipitatie protocol als standaard

Resultaat

In totaal 7 muskusrat eDNA analyses.

- Er gaat met vers watermonster ~2,5 x zoveel totaal eDNA door het filter als erop achterblijft
- Totale eDNA recovery (filter + doorloop) is wel ~100%
- Van het muskusrat eDNA qPCR signaal gaat ~10% door het filter
- Totale muskusrat eDNA recovery (filter + doorloop) is ~75%
- Na 1-2 vries-dooi cycli neemt de totale muskusrat eDNA recovery (filter + doorloop) af tot ~30%
- ~90% van het muskusrat eDNA qPCR signaal blijft na vries-dooien op het filter achter
- Het gebruik van verse monsters geeft een ~3x hoger muskusrat eDNA qPCR signaal

Conclusie: Van het totaal eDNA gaat het overgrote deel door het filter, terwijl van het specifieke muskusrat eDNA signaal het overgrote deel juist door het filter wordt tegengehouden. Mogelijk is het muskusrat eDNA vooral afkomstig van hele cellen/mitochondriën terwijl de bulk van het eDNA cel-vrij en gefragmenteerd is

Sp-naam: MAD1000-P025-SP13 Optimalisatie eDNA isolatie\4 - Phenol pH test

Deelproject: DP3b3

Act.5 : Effect pH fenol

Tijdpad: 02-2019

Partners: UvA

Doel: Controleren of een te lage pH van de gebruikte fenoloplossing ervoor zorgt dat DNA uit de waterfase in de organische fase gaat zitten tijdens de DNA extractie uit het filter.

Beschrijving:

- Controleren pH van de gebruikte fenol stockoplossing
- pH bufferen naar het juiste niveau (7-8)
- Vergelijk DNA recovery van PES filter en doorloop met directe precipitatie

Resultaat:

- In totaal 7 muskusrat eDNA analyses.
- pH van de gebruikte fenol is te laag ~6
- Buffering van fenol naar 7-8 geeft verwaarloosbare verschillen, dus dit is geen probleem
- ~20% totaal muskusrat eDNA gaat door het filter
- In filter + doorloopfractie samen vinden we deze keer maar ~50% van het muskusrat eDNA signaal terug
- De resultaten verschillen nogal per experiment

Conclusie: Er vindt verlies plaats door dat een fractie van het eDNA door het filter gaat. De hoeveelheid die er doorheen gaat is variabel.

SP-naam: MAD1000-P025-SP13 Optimalisatie eDNA isolatie\5 - Phenol vs Powerwaterkit

Deelproject: DP3b23

Act. 6: Fenol vs Power Water kit

Tijdpad: 02-2019

Partners: UvA

Doel: Controleren of een DNA isolatie protocol zonder fenol beter werkt.

Beschrijving: Gebruik de Power Water kit van Qiagen die speciaal is ontwikkeld voor isolatie van DNA van filters en vergelijk met standaard fenol isolatie uit PES filters.

Resultaat:

- In totaal 6 muskusrat eDNA analyses
- Power Water kit geeft zeer lage opbrengst uit PES filters
- Fenol isolatie van PES filter geeft nu opeens een hoger muskusrat eDNA signaal dan de standaard precipitatie methode -> inconsistente resultaten!

Conclusie: De Power Water geeft zeer lage opbrengst en is dus niet geschikt. De hoeveelheid DNA geïsoleerd doormiddel van filtratie en fenol isolatie is variabel.

SP-naam: MAD1000-P025-SP13 Optimalisatie eDNA isolatie\6 - Spike MuRa eDNA

Deelproject: DP3b3

Act. 7: Spike muskusrat eDNA

Tijdpad: 02-2019 – 03-2019

Partners: UvA

Doel: Bepalen gevoeligheid qPCR na verschillende isolatie methodes

Beschrijving: 3 isolatie methodes getest, PES/fenol, geen kolom na fenol, en precipitatie flow through. Voor elke conditie zijn 3 verschillende muskusrat eDNA concentraties getest.

Resultaat: Geen kolom na fenol gaf de hoogste eDNA opbrengst, en de precipitatie het laagste. Echter geen kolom na fenol gaf inhibitie in de qPCR.

Conclusie: De gevoeligheid van de qPCR is het hoogst bij de PES/fenol isolatie, met extra zuivering over een kolom.

SP-naam: MAD1000-P025-SP13 Optimalisatie eDNA isolatie\7 - H2O Spike MuRa eDNA

Deelproject: DP3b3

Act. 8 : H2O spike muskusrat eDNA

Tijdpad: 03-2019 – 04-2019

Partners: UvA

Doel: Hoeveel genomisch DNA gaat door het filter

Beschrijving: Schoon kraanwater wordt gespiked met gezuiverd genomisch DNA van muskusrat

Resultaat: Erg lage yields

Conclusie: Gezien de erg lage yields gaat gezuiverd genomisch DNA grotendeels door de filters. In vervolg testen met positieve monsters uit het veld, en oppervlakte water voor betere reflectie werkelijkheid.

Sp-naam: MAD1000-P025-SP13 Optimalisatie eDNA isolatie\10 - CTAB DNA isolatie 1e poging

Deelproject: DP3b3

Act. 9: CTAB buffer

Tijdpad: 06-2019 – 07-2019

Partners: UvA

Doel: Bepalen of het gebruik van CTAB buffer hogere yield geeft en inhibitie verminderd

Beschrijving: In literatuur protocol gevonden voor isolatie eDNA uit "moeilijke" watersamples verontreinigd met humic acids, polyfenolen etc. Protocol in duplo getest op positieve monsters.

Resultaat:

- CTAB geeft hogere eDNA yields -> ~6x hogere eDNA yield
- CTAB geeft lagere Ct in qPCR met dezelfde eDNA input -> ~10x hoger muskusrat signaal
- Samen geeft dit een ~60 x gevoeligere detectie.

Conclusie: Verdere experimenten om geschiktheid CTAB te bevestigingen.

SP-naam: MAD1000-P025-SP13 Optimalisatie eDNA isolatie\11 - CTAB op samplebank samples

Deelproject: DP3b3

Act. 10: CTAB op sample bank samples

Tijdpad: 06-2019 – 07-2019

Partners: UvA

Doel: Bevestigen geschiktheid CTAB met muskusrat sample bank monsters

Beschrijving: 4 sample bank monster zijn in duplo gezuiverd met na-zuivering met PureLink kolom. Voor elk monster zijn zeven verschillende volumes monster getest in de qPCR

Resultaat:

- CTAB werkt nog steeds beter ~7.5x (range 3.5-11.7)
- Bij SBM01 en 02 treedt PCR inhibitie op bij hogere input
- PCR inhibitie effect correleert met samplekleur tijdens isolatie

Conclusie: CTAB presteert beter. Ook na PureLink treed er nog inhibitie op, met name in de meest donker gekleurde monsters.

SP-naam: MAD1000-P025-SP13 Optimalisatie eDNA isolatie\12 - CTAB cleanup kolommen vergelijken\A - CTAB cleanup-spike

Deelproject: DP3b3

Act.11 : Zuiveringskolommen vergelijken

Tijdpad: 01-2020

Partners: UvA

Doel: effectiviteit testen van verschillende clean up kolommen op verminderen inhibitie

Beschrijving:

Aanname: kleur = inhibitor

Kleur lijkt mee te zuiveren met DNA (bij fenolen, precipiteren en kolommen), dus andere clean up methode testen:

- BioEcho (gebaseerd op gel filtratie)
- PureLink gDNA
- PureLink Plant
- Power Soil
- Power Fecal

Sample is 10 x 250 ml SP water (negatief) opgewerkt voor tests van verschillende kolommen.

Negatief sample gespiked met 100 pg muskusrat staart DNA na clean ups.

Resultaat:

- Allen halen kleur (grotendeels) weg
- Yield varieert van 2.8 - 12 microgram totaal eDNA
- BioEcho geeft beste 260/280 en 260/230
- Groot verschil tussen Nanodrop en Qubit bij BioEcho (7x meer) -> RNA contaminatie

Andere kits hebben RNase behandeling en hooguit 1.8x verschil

- qPCR: zonder clean up grote inhibitie, met clean up alle methoden zelfde Ct!!! -> geen verschil in inhibitie tussen kolommen

Conclusie: -Mogelijk is er te weinig eDNA (en dus contaminant) in de PCR gedaan om de kolommen te kunnen vergelijken. Kijken wat het effect is van de verschillen in yield op de qPCR bij spiking vooraf

SP-naam: MAD1000-P025-SP13 Optimalisatie eDNA isolatie\12 - CTAB cleanup kolommen vergelijken\b- CTAB spike-cleanup

Deelproject: DP3b3

Act.12 : Zuiveringskolommen vergelijken

Tijdpad: 08-2019

Partners: UvA

Doel: effectiviteit testen van verschillende clean up kolommen op verminderen inhibitie

Beschrijving: Er is gekozen om voor de kolomzuivering te spiken met muskusrat DNA om: (1) alleen naar PCR inhibitie te kunnen kijken met een hogere hoeveelheid DNA (=reproduceerbaar), en (2) door vooraf te spiken neem je ook het DNA verlies van de kolom mee in het eindresultaat (niet gedaan in vorige exp).

Er is 200 pg gespiked aan het equivalent van 100 ml water. Het qPCR signaal bij 50 ml water zou bij 100 pg op moeten komen.

Negatief sample (Science Park water) is ook gespiked met 200 pg muskusrat staart DNA voor de cleanups.

Resultaat:

- Allen halen kleur (grotendeels) weg
- Yield varieert van 4.2 - 13 microgram totaal eDNA
- qPCR: ruwe input, geeft veel inhibitie: signaal stort snel in
 - PureLink gDNA en de BioEcho geven het hoogste signaal
 - lijkt reflectie van de yield (opbrengsten) na kolomzuivering

Conclusie: een verschil in inhibitie tussen kolommen (curves vlakken nog niet af), er moet meer water als input gebruikt worden. Waarschijnlijk is er te weinig eDNA (en dus contaminant) in de PCR gedaan om de kolommen te kunnen vergelijken? Uiteindelijk zal er namelijk 10 x zoveel water worden gebruikt en dus in de PCR gaan.

SP-naam: MAD1000-P025-SP13 Optimalisatie eDNA isolatie\12 - CTAB cleanup kolommen vergelijken\c - CTAB spike-cleanup brede reeks

Deelproject: DP3b3

Act.13 : clean up kolommen vergelijken

Tijdpad: 01-2020

Partners: UvA

Doel: Bepalen hoe efficiënt de kolommen inhibitors verwijderen bij een groter volume water (400ml)

Beschrijving:

Negatief sample (Science Park water) is gebruikt als input.

Er wordt voor de kolom zuivering gespiked met muskusrat staart DNA 100 pg/ 250 ml water.

- BioEcho (gebaseerd op gel filtratie)
- PureLink gDNA
- PureLink Plant
- Power Fecal

(per kolom is het equivalent van 1 liter gezuiverd)

Voor het ruw (ongezuiverde) sample wordt er voor de qPCR gespiked

input range: 400 ml, 250 ml, 125 ml, 62.5 ml, 31.3 ml, 15.6 ml, 7.8 ml en 3.9 ml water.

Er is hier gebruik gemaakt van 50 ul qPCR reactie volume

Resultaat:

- Bij toenemende water input vlakken de curves af voor: PureLink plant, PureLink gDNA
- BioEcho geeft zeer goed resultaat, en vlakt haast niet af.
- Power Fecal vlakt niet af, maar geeft minder hoog signaal (door verlies op de kolom)
- De hoeveelheden eDNA (uit 250 ml of 400 ml) geven geen inhibitie in de qPCR (BioEcho)

Conclusie: De BioEcho kolom geeft de beste resultaten

SP-naam: MAD1000-P025-SP13 Optimalisatie eDNA isolatie\22 - bio echo vs biorad microspin column

Deelproject: DP3b3

Act. 14: BioEcho vs Biorad microspin column

Tijdpad: 03-2020

Partners: UvA

Doel: Bepalen welke zuivering het beste de inhibitors verwijderd

Beschrijving: Gepoolde monsters worden na de fenol/chloroform zuivering over een bio echo of microspin kolom gehaald. Het verwijderen van de gekleurde stoffen wordt gebruikt als indicatie voor verwijderen van inhibitoren.

Resultaat: Monsters na de BioEcho kolom helder, na Biorad microspin nog steeds gekleurd

Conclusie: BioEcho beter dan Biorad microspin

SP-naam: MAD1000-P025-SP13 Optimalisatie eDNA isolatie\16 - Enhanced CTAB vs Longmire vs ATL lysis

Deelproject: DP3b3

Act.15 : Enhanced CTAB vs Longmire vs ATL lysis

Doel: Vergelijken verschillende lysis buffers

Tijdpad: 10-2019

Partners: UvA

Beschrijving: Het huidige lysis buffer gebruikt in de opwerking van gepoolde samples (0,45 µm PES filter) moet vers worden gemaakt en bevat 2 componenten die gewogen moeten worden. sneller zou zijn (en beter voor de uiteindelijke implementatie) om een commercieel verkrijgbaar lysis buffer te

gebruiken. ATL lysis buffer van Qiagen zou volgens een protocol op protocols.io ook moeten werken op eDNA filters

Resultaat: Ten opzichte van CTAB lijkt ATL 1.2-1.3x zo hoog signaal te geven in de qPCR. Wel redelijk wat spreiding in de triplos, en 2 BioEcho kolom zuiveringen nodig

Conclusie: Blijkbaar is er wel wat te winnen wat, gevoeligheid betreft, door gebruik van andere lysis buffers. meerdere lysis methoden testen en kijken of ATL aangepast kan worden zodat er geen 2 BioEcho kolommen nodig zijn. Omdat SDS waarschijnlijk een belangrijke component is in ATL, zal er ook gekeken worden wat SDS (hoge en lage conc.) voor effecten heeft in een standaard lysis buffer (Tris-HCL, NaCl en EDTA). Standaard protocollen waarbij gebruik gemaakt wordt van ATL zijn in combinatie met ProtK, daarom zal dit in een vervolg experiment ook worden meegenomen.

SP-naam: MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP13 Optimalisatie eDNA isolatie\17 - ProtK en hoog laag SDS

Deelproject: DP3b3

Act. 16: ProtK en hoog laag SDS

Tijdpad: 10-2019 – 11-2019

Partners: UvA, HDSR

Doel: Vergelijken toevoeging Proteinase K (ProtK) en verschillende concentraties SDS

Beschrijving: Omdat SDS waarschijnlijk een belangrijke component is in ATL, zal er ook gekeken worden wat SDS (hoge en lage concentratie) voor effecten heeft in een standaard lysis buffer (Tris-HCL, NaCl en EDTA). Standaard protocollen waarbij gebruik gemaakt wordt van ATL zijn in combinatie met ProtK, daarom zal dit in een vervolg experiment ook worden meegenomen.

Resultaat: Grote variatie tussen replica's maakt de betrouwbaarheid en interpretatie moeilijker. Laag en hoog SDS (beide relatief erg simpele lysis buffers) yielden de hoogste eDNA concentraties. Hoog SDS en ATL leveren een minder mooie scheiding tussen de 2 fases.

Hoog SDS met of zonder ProtK geven de hoogste hoeveelheid muskusrat DNA aan en lijken dus beter te presteren dan ATL en Enhanced CTAB. echter door de niet reproduceerbaarheid is dit niet betrouwbaar.

Experiment opnieuw met triplo 's en een vers positief muskusrat water sample.

Het herhalingsexperiment laat niet hetzelfde resultaat zien.

ATL + ProtK geeft veel inhibitie maar als deze uit verdund is wel de hoogste detectie.

Enhanced CTAB + ProtK geeft hoge detectie en weinig inhibitie maar lager dan ATL + protK (zie resultaat met 5 µl input)

Beide methoden met incubatie van 2 uur bij 55 graden zijn vergelijkbaar of beter dan overnacht bij 4 graden gevolgd door 10mi bij 65 °C dus vanaf nu 2uur bij 55 °C als incubatie in protocol.

Conclusie: Besloten wordt de ATL lysis aan te passen om vermindering van inhibitie te krijgen. door toevoeging van verschillende percentages PVP40 aan ATL toe te voegen dit vergeleken met Enhanced CTAB met dezelfde percentages PVP40.

SP-naam: MAD1000-P025-SP13 Optimalisatie eDNA isolatie\18 - BSA or Bmecap in lysis

Deelproject: DP3b3

Act. 17: BSA (Bovine Serum Albumine) of β -mercapthoethanol in lysis buffer

Tijdpad: 10-2019

Partners: UvA

Doel: Bepalen effect van BSA of β -mercapthoethanol vooral in lysis buffer

Beschrijving: β -mercapthoethanol en BSA toevoeging in de lysis van planten wordt in de literatuur vaak gebruikt om tannines weg te vangen. Gedacht wordt dat de paarsige kleur die ontstaat tijdens lysis met ATL buffer van eDNA filters tannines zijn. Verschillende concentraties β -mercapthoethanol en BSA worden getest.

Resultaat: -bij toevoeging van ATL + 10 % β -mercapthoethanol. kleurde de oplossing direct paars. dit was na 10 min schudden verdwenen.

-BSA in ATL met PCI gaf zelfde paarse kleur als normaal

-BSA waterige fase is paars zoals altijd

- β -mercapthoethanol in ATL met PCI geeft bij 1 % nog paarse kleur daar na is het mengsel licht groen en lijkt de paarse kleur verdwenen.

- β -mercapthoethanol waterige fase is bij 1 en 2 % paars bij 3,4,5 en 10 licht bruin.

-Waterige fase na de CI stap + 1/10 deel NaAce (natrium acetaat) (3M pH 5.3) ontkleurd alle samples. de kleur leek aftehangen van de pH zuur is geel basisch is paars.

-Na precipitatie overnacht met 100 % alcohol en afdraaien was het pellet donker gekleurd na resuspendieren in water

-samples in qPCR gezet gespiked met ong. 18 pg per reactie. en ingezet met 20, 10, 5,1 μ l sample om zicht te krijgen op inhibitie.

Conclusie: -1%BSA toevoeging in lysis lijkt een positief effect te hebben zeker bij de 20 μ l input. De overige inputs (10,5 en 1 μ) lijkt 1 %BSA vooral de reactie beter te laten lopen maar dit resulteert niet in een hogere Ct value.

Overige concentraties geen verbetering.

-10 % β -mercapthoethanol toevoeging in lysis lijkt een positief effect te hebben zeker bij de 20 μ l input. De overige in puts (10,5 en 1 μ) lijkt 1 % β -mercapthoethanol vooral de reactie beter te laten lopen maar dit resulteert niet in een hogere Ct value.

Overige concentraties geen verbetering. nog steeds en zijn er 2 Bio- echokolommen nodig om het helder te krijgen (1 kolom gebruikt) dus niet geschikt voor in de toekomst.

SP-naam: MAD1000-P025-SP13 Optimalisatie eDNA isolatie\19 - PVP40 range in ATL and enhanced CTAB

Deelproject: DP3b3

Act. 18: Verschillende concentraties PVP in ATL en Enhanced CTAB

Tijdpad: 11-2019

Partners: UvA

Doel: Vergelijken effect verschillende concentraties PVP40 in lysis buffer

Beschrijving: In vorige experimenten lijkt ATL buffer de hoogste detectie te geven maar ook het meest last te hebben van inhibitie. PVP wordt in de Enhanced CTAB methode gebruikt om polyfenolen weg te vangen. Verschillende concentraties PVP40 (0, 2, 4, 8%) worden toegevoegd aan ATL en Enhanced CTAB

Resultaat:

PVP toevoeging geeft geen hoger detectie in ATL buffer.

Enhanced CTAB 4% PVP geeft hoogste detectie.

ATL zorgt voor erg veel inhibitie.

Conclusie: ATL niet meer mee verder maar Enhanced CTAB verder optimaliseren door concentratie van individuele ingrediënten van het buffer te optimaliseren.

SP-naam: MAD1000-P025-SP13 Optimalisatie eDNA isolatie\23 - conc. NaCl in enhanced CTAB lysisbuffer

Deelproject: DP3b3

Act. 14 : concentratie. NaCl in Enhanced CTAB lysis buffer

Tijdpad: 03-2020

Partners: UvA

Doel: Bepalen welke concentratie NaCl in CTAB het best presteert

Tijdpad: 11-2018 – 12-2018

Partners: UvA

Beschrijving: 4 concentraties NaCl (1, 1.4, 2 en 3 Molair) zijn in triplo getest

Resultaat: filters opgewerkt volgens: "eDNA isolation from PES 0.45 µm filters with enhanced CTAB lysis v 1.4" concentratie van eDNA laat zien dat bij gebruik van 1,4 molair NaCl de yield het hoogst is. Yield muskusrat DNA laat zien dat bij gebruik van 1.4 Molair NaCl de detectie het hoogste is.

Conclusie: Het huidige protocol wat betreft NaCl concentratie werkt het best.

SP-naam: MAD1000-P025-SP13 Optimalisatie eDNA isolatie\24 - conc. CTAB in enhanced CTAB lysisbuffer

Deelproject: DP3b3

Act.15: concentratie CTAB in Enhanced CTAB lysis buffer

Tijdpad: 03-2020

Partners: UvA

Doel: Optimale concentratie CTAB in Enhanced CTAB buffer bepalen

Beschrijving: Testen 4 concentraties: 1,2, 3 en 4 % CTAB

Resultaat: eDNA isolatie van PES 0.45 µm filters met Enhanced CTAB lysis v 1.4" concentratie van eDNA laat zien dat bij gebruik van 1% CTAB de yield het hoogst is. Yield muskusrat DNA laat zien dat bij gebruik van 4% CTAB de detectie het hoogste is daarna presteert 2% CTAB het best.

Conclusie: Gezien de problemen die 4% CTAB in oplossing (slecht oplosbaar en erg viskeus als opgelost) is het gebruikelijke 2 % aan te raden.

SP-naam: MAD1000-P025-SP13 Optimalisatie eDNA isolatie\30 - conc. PVP40 in enhanced CTAB lysisbuffer

Deelproject: DP3b3

Act. 16: concentratie PVP 40 in Enhanced CTAB lysis buffer

Doel: Bepalen of verschillen in PVP40 percentage effect heeft op inhibitie

Tijdpad: 09-2020

Partners: UvA

Beschrijving:

480 ml SP water

20 ml sbm05 positief water

filteren over 0.45 um PES filter

4 concentraties pvp40 testen: 1,2,4 en 6 % in 3voud is 12 samples.

sample 1,2 en 3 =1%

sample 4,5 en 6 =2%

sample 7,8 en 9 =4%→standaard protocol

sample 10,11 en 12 =6%

Resultaat: na precipitatie is er geen verschil in kleur of omvang pellets te zien tussen de % PVP40. 6% pvp40 in het lysis buffer geeft hoger CT bij elke input in qPCR

Conclusie: Dit waren, gezien het niet inhiberende effect bij 20 µl, relatief schone samples mogelijk is hier de toegevoegde waarde van pvp40 überhaupt slecht zichtbaar.

Er lijkt geen noodzaak te zijn om het bestaande protocol wat al naar derden gecommuniceerd is te wijzigen en dus blijft pvp40 in een eind concentratie van 4% staan.

SP-naam: MAD1000-P025-SP13 Optimalisatie eDNA isolatie\25 - Sylphium vs enhanced CTAB method

Deelproject: DP3b3

Act.17: Sylphium vs enhanced CTAB method

Tijdpad: 06-2020 - 07-2020

Partners: UvA

Doel: Vergelijken Sylphium kit met Enhanced CTAB method

Beschrijving: De Sylphium isolatie kit wordt gebruikt door Aqualysis deze kit bestaat uit een sampling/filter(SYL001 – Environmental sampling kit) en isolatie deel (SYL002 – Environmental DNA isolation kit). De vraag is of deze kit beter presteert dan onze procedure met 0.45 µm PES filter en enhanced CTAB als lysis buffer.

De test zal bestaan uit:

3x Sylphium: 180 ml SP + 20 ml SBM04 = 200ml= sample 7, 8 en 9

3x Sylphium: 180 ml SP + 20 ml SBM04 = 200ml gevolgd door BioEcho kolom= sample 4,5 en 6

3x MAD procedure: 180 ml SP + 20 ml SBM04 = 200ml gevolgd door BioEcho kolom = sample 1,2 en 3
9 samples in qPCR met 20, 10, 5 en 1 µl + muskusrat ijklijn en NTC (H₂O)

Resultaat: De kit van Sylphium werkt met een 0.2 µm filter van Millipore (sterivex) en een syringe van 60 ml. Hun procedure is dat je via een stok de syringe bediend en zo water samples kan nemen die je door het sterivex filter drukt en dit eventueel herhaald. Uit een voortest, met sciencepark (SP) water, is er met moeite max 200 ml door het sterivex filter te drukken. Onze 500 ml water is niet haalbaar. Uit de voortest blijkt ook dat het uiteindelijke resultaat van Sylphium een enorm bruin sample oplevert (ons eigen isolatie buffer gebruikt) en per definitie niet is geschikt om te PCRen. In dit op zicht is onze procedure in combi met BioEcho al beter en door de hoeveelheid te filteren water ook waarschijnlijk gevoeliger. De vergelijkingstest zal dan ook met 200 gespiked water uitgevoerd worden.

-Sylphium procedure laat ca 50% waterige fase achter.

De yield eDNA zijn per methode nog al verschillend onze methode levert veruit het meeste eDNA op bijna dubbele van Sylphium en driedubbel als Sylphium plus BioEcho.

- sample 7,8, en 9 zijn erg bruin gekleurd en geven met elke hoeveelheid input geen enkel resultaat.
- sample 1,2,3 zijn heel licht gelig en er is dan ook waarschijnlijk inhibitie bij de hogere inputs.
- sample 4 ,5 en 6 zijn niet zichtbaar gekleurd (Opmerking deze samples zijn afkomstig van de helft van de waterige fase dus ook de helft minder troep)

Conclusie: Sylphium op zich zelf is niet te gebruiken: er kan maar 200 ml water gefilterd worden en daarna is het sample bruin en werkt de PCR niet.

Sylphium gevolgd door een BioEcho levert wel goede resultaten en lijkt het zelfs beter te doen als onze eigen methode echter doordat je bij sylphium de helft input gebruikt (immers 50% waterige fase laat je achter) isoleer je ook minder verontreiniging. Een BioEcho kolom heeft ook maar een bepaalde capaciteit en laat bij onze methode toch nog inhiberende stoffen door waardoor deze minder lijkt te presteren in de PCR. In deze test is dus niet goed te bepalen welke van de twee methodes nou beter is.

Gezien de Sylphium methode alleen maar werkt met 200 ml en een BioEcho kolom is de kit niet beter en dus niet te gebruiken maar mogelijk de lysis buffer wel. Het geeft aan dat wij met ons lysis buffer toch wel erg veel inhiberende stoffen mee isoleren die onze gevoeligheid te niet doet. Zeker omdat onze methode 3 maal zoveel eDNA isoleert maar ondanks dat toch minder presteert dan Sylphium. Vervolg hier op is nodig

SP-naam: MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP13 Optimalisatie eDNA isolatie\25 - Sylphium vs enhanced CTAB method\vervolg

Deelproject: DP3b3

Act. 18: Vervolg enhanced CTAB vs Sylphium buffer

Doel: Bevestigen van de eerder behaalde resultaten waarin Sylphium minder inhibitors mee zuivert

Tijdpad: 08-2020

Partners: UvA

Beschrijving:

3x 480ml SP (Science-Park) water met 20 ml SBM05 opwerken met enhanced CTAB buffer volgens MAD protocol: eDNA isolation from PES 0.45 µm filters with enhanced CTAB lysis v 1.4= sample 1,2,3

3x 480ml SP water met 20 ml SBM05 opwerken met Sylphium lysis buffer volgens MAD protocol: eDNA isolation from PES 0.45 µm filters with enhanced CTAB lysis v 1.4= sample 4,5,6

20, 10, 5 en 1 ul in qPCR met NTC en muskusrat ijklijn.

Resultaat:

Na toevoeging phenol kleurt ook de vloeistof met sylphium buffer rood/paarsig op het oog iets minder dan bij de enhanced CTAB.

De eDNA concentratie is net als voorgaande keren hoger met enhanced CTAB buffer, echter deze keer is er geen inhibitie te zien in de qPCR bij de enhanced CTAB buffer monsters.

Conclusie: Het Science Park water was deze keer schoner dan de vorige keer, dus waarschijnlijk zaten er minder inhibitors in, waardoor er geen inhibitie plaatsvond in de qPCR.

SP-naam: MAD1000-P025-SP13 Optimalisatie eDNA isolatie\25 - Sylphium vs enhanced CTAB method\vervolg\vervolg met vies filter

Deelproject: DP3b3

Act. 19 Sylphium vs enhanced CTAB vieze filters

Doel: Herhalen experiment Sylphium vs enhanced CTAB met viezer water om te kijken of dit inhibitie geeft

Tijdpad: 08-2020

Partners: UvA

Beschrijving:

3x 480ml SP (Science-Park) water met 20 ml SBM05 opwerken met enhanced CTAB buffer volgens MAD protocol: eDNA isolation from PES 0.45 µm filters with enhanced CTAB lysis v 1.4= sample 1,2,3

3x 480ml SP water met 20 ml SBM05 opwerken met Sylphium lysis buffer volgens MAD protocol: eDNA isolation from PES 0.45 µm filters with enhanced CTAB lysis v 1.4= sample 4,5,6

20, 10, 5 en 1 µl in qPCR met NTC en muskusrat ijklijn.

Resultaat:

Hogere eDNA concentratie bij isolatie met enhanced CTAB buffer. In de qPCR hangt de inhibitie af van de hoeveelheid DNA. Bij 5-10 µl input monster presteert de enhanced CTAB buffer beter, bij minder dan 5 µl en meer dan 10 µl presteert de Sylphium lysis buffer.

Conclusie: De resultaten van de experimenten zijn tot nu toe variabel en hangen af van het soort water wat gebruikt wordt alsmede de hoeveelheid toegevoegd eDNA. Het is nuttig om een test te doen met water van verschillende locaties om er achter te komen of de Sylphium buffer inderdaad in meer condities beter presteert dan de enhanced CTAB buffer.

SP-naam: MAD1000-P025-SP13 Optimalisatie eDNA isolatie\21 - Filtratie van zout-alcohol monster

Deelproject: DP3b3

Act. 20: Filtratie van zout-alcohol monster

Tijdpad: 02-2020-03-2020

Partners: UvA

Doel: Bepalen of water geconserveerd in zout/alcohol gefilterd kan worden

Beschrijving: Na de eerste puntbemonstering wordt een deel van de puntmonsters tot pools samengevoegd. Is het mogelijk deze sub-pools te filteren over een PES filter?

Resultaat: Grote volumes water met zout/isopropanol die normaal worden geprecipiteerd kunnen ook door een .045 µm filter worden verwerkt, er is in de qPCR dan wel meer inhibitie.

Conclusie: Waarschijnlijk precipiteer je meer dan alleen DNA dat wat op het filter achterblijft en zo het sample meer verontreinigd.

SP-naam: MAD1000-P025-SP13 Optimalisatie eDNA isolatie\26 - Filter drogen vs filter direct opwerken

Deelproject: DP3b3

Act. 21: Filter drogen vs filter direct opwerken

Tijdpad: 06-2020

Partners: UvA

Doel: Bepalen of filters gedroogd verstuurd kunnen worden

Tijdpad: 11-2018 – 12-2018

Partners: UvA

Beschrijving: Het effect van drogen op eDNA degradatie wordt vergeleken met direct in buffer

Resultaat: Uit het experiment waarin 3 filters direct in buffer geplaatst zijn en 3 aan de lucht gedroogd bleek dat er iets meer degradatie van DNA was voor de aan de lucht gedroogde filters dan de filters direct in buffer, maar niet extreem. De gevoeligheid in de qPCR is iets hoger voor de direct in buffer geplaatste monsters.

Conclusie: Aan de hand van dit experiment zijn er dus geen grote bezwaren tegen drogen van filters. Echter er zijn vanuit het oogpunt van menselijk handelen wel nadelen voor het drogen van filters.

SP-naam MAD1000-P025-SP13 Optimalisatie eDNA isolatie\29 - filter in 25 ml potje vs normaal (filter in 2 ml ep)

Deelproject: DP3b3

Act. 22 : filter in 25 ml potje vs normaal (filter in 2 ml ep)

Doel: Bepalen verlies eDNA filters verzonden in potjes/beste methode bepalen verdere behandeling filter.

Tijdpad:

Partners: UvA

Beschrijving: Isolatie van eDNA vanuit een pool van samples levert een filter op die normaliter in een 2 ml epje gerold wordt. Dit vereist echter een beetje kennis van de technische zaken en is mogelijk te lastig om over te dragen aan de bestrijders als ze op locatie gaan filteren. Daarom is gekozen voor een potje van 25 ml met een grote opening waar het filter makkelijk met een pincet ingelegd kan worden.

Bij toevoegen van 1 ml lysis aan het potje raak je ongeveer 250 μ l kwijt tevens bevat het filter nog kleur van verontreiniging van samplewater en dus ook mogelijk nog eDNA. Om zicht te krijgen of en zo ja hoeveel signaal er verloren gaat wordt onderstaand experiment ingezet:

- 3x 180 ml SP water + 20 ml SBM04-> filter oprollen in 2ml ep en verwerken volgens protocol: "eDNA isolation from PES 0.45 μ m filters with enhanced CTAB lysis v 1.5" sample 1,2 en 3
- 3x 180 ml SP water + 20 ml SBM04-> filter op de kop in 25 ml potje +1 ml Lysis->zoveel mogelijk af pipetteren -> "eDNA isolation from PES 0.45 μ m filters with enhanced CTAB lysis v 1.5" sample 4,5 en 6
- 3x 180 ml SP water + 20 ml SBM04-> filter op de kop in 25 ml potje +1 ml Lysis-> lysis plus filter overbrengen in epje-> "eDNA isolation from PES 0.45 μ m filters with enhanced CTAB lysis v 1.5" sample 7,8 en 9 20,10,5 en 1 μ l in qPCR + ijk lijn muskusrat

Resultaat: filters van sample 5 tm 9 zijn na 2 uur incuberen bij 55C en vortexen nog behoorlijk vies.

Af pipeteren van samples 4,5 en 6 geeft ongeveer 800 μ l lysisbuffer=verlies van ong 200 μ l =20%

filter overbrengen naar 5 ml ep van sample 7,8 en 9 is relatief vieze vingers werk en dus bij elk filter nieuwe handschoenen of schone pincet noodzakelijk

Conclusie: Als de filters niet mee worden genomen in de phenol stap (sample 4,5 en 6) geeft dit een lagere detectie grens in het slechtste geval ongeveer 50% lager.

Verschil tussen de normale methode en filter uit 25 potje overbrengen in 5 ml buis is er eigenlijk bijna niet. Ware het niet dat bij de normale methode de hoogste input veel inhibitie geeft wat niet het geval is bij de samples uit het potje waarschijnlijk is dit niet representatief door lage aantal replica's in combi met slechte reproduceerbaarheid van de eDNA methode.

Kortom als het potje van 25 ml wordt gebruikt dan is het noodzakelijk om het filter ook mee te nemen in de isolatie.

SP-naam: MAD1000-P025-SP13 Optimalisatie eDNA isolatie\27- MAD protocol vs MAD potocol without Phenol

Deelproject: DP3b3

Act. 23: MAD protocol vs MAD potocol zonder fenol

Tijdpad: 06-2020 – 07-2020

Partners: UvA

Doel: Bepalen of het MAD protocol werkt zonder fenol, de meest giftige component.

Beschrijving: Bij gebruik van de sylphium kit lijkt dat er een stuk minder inhiberende stoffen mee geïsoleerd worden (zie exp 25_ Sylphium vs Enhanced CTAB). Dit Sylphium protocol lijkt in grote lijnen op het MAD (Enhanced CTAB) protocol maar met als groot verschil dat er bij Sylphium geen Phenol wordt gebruikt maar alleen Chloroform Isoamylalcohol (CI/IAA). Om dat het onbekend is welk lysis buffer sylphium gebruikt wordt ons lysis buffer gebruikt met ons protocol maar nu opwerken met en zonder phenol.

Resultaat: Na toevoeging phenol/CIA aan lysis buffer ontstaat de kenmerkende paarsige kleur. Bij allen CIA niet.

In de waterige fase is dit kleur verschil nog steeds aanwezig.

Na toevoeging van NaAc verdwijnt de paarsige kleur en wordt dit gelig, gelijk aan de samples die opgewerkt zijn zonder Phenol.

Na de precipitatie zijn de pellets gelijk donkerbruin van kleur en alle samples zijn na BioEcho kolom en indampen naar 40 ul heel licht gelig.

Conclusie: Doordat 1 sample (nr5) veel meer muskusrat DNA bevat gaat het gemiddelde van de zonder phenol behandelde samples omhoog en zo lijkt de methode zonder phenol het beter te doen dan de samples die zijn opgewerkt met phenol. Deze laatste groep laat duidelijk inhibitie zien van >10 µl input in qPCR.

Echter als dit sample als uitbijter wordt gezien en weggelaten, dan zijn beide methodes gelijk in detectie gevoeligheid en mate van inhibitie.

Het kunnen weglaten van fenol heeft voordelen wat betreft afval stromen, veiligheid en financiën.

Om op basis van drie samples en 1 uitbijter dit te concluderen is wat mager dus zal de test worden herhaald met 9 samples per methode met verschillende positieve spike ins.

SP-naam: MAD1000-P025-SP13 Optimalisatie eDNA isolatie\27- MAD protocol vs MAD potocol without Phenol\herhaling met meerdere samples

Deelproject: DP3b3

Act.24 : Met en zonder fenol met meer monsters

Tijdpad: 06-2020

Partners: UvA

Doel: In het vorige experiment waren 3 monsters per methode gebruikt wat een twijfelachtig resultaat opleverde. Om een beter beeld te krijgen wordt het experiment herhaald en uitgebreid.

Beschrijving: 3 biologische replica's met fenol en 3 biologische replica's zonder fenol elk met 3 technische replica's

alle 18 monsters over BioEcho kolom en in qPCR zetten met input 20, 10 ,5 en 1 µl

+ muskusrat ijk lijn

+ NTC (H2O)

Resultaat: Na toevoeging phenol/CIA(chloroform isoamylalcohol) aan lysis buffer ontstaat de kenmerkende paarsige kleur. Bij allen CIA niet.

In de waterige fase is dit kleur verschil nog steeds aanwezig.

Na toevoeging van NaAc (Natrium acetaat) t.b.v. precipitatie verdwijnt de paarsige kleur en wordt dit gelig, gelijk aan de samples die opgewerkt zijn zonder Phenol.

Na de precipitatie zijn de pellets gelijk donkerbruin van kleur en alle samples zijn na BioEcho kolom en indampen naar 40 µl heel licht gelig.

Conclusie: De methode zonder fenol geeft meer inhibitie in de qPCR. Het is echter nog niet helemaal duidelijk of dit alleen door het ontbreken van fenol komt, of dat het komt door de extra chloroform stap komt die in het oorspronkelijk protocol zit.

SP-naam: MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP13 Optimalisatie eDNA isolatie\28 - Isopropanol vs ethanol precipitatie poolsamples

Deelproject: DP3b3

Act.25 : Isopropanol vs ethanol precipitatie poolsamples

Tijdpad: 07-2020

Partners: UvA

Doel: Bepalen of isopropanol of EtOH beter werkt in de precipitatie van het DNA (na opwerken van een gepooled sample) Daarnaast precipiteren we nu altijd overnacht, en is de vraag of dit ook in 30 min bij -20 zou kunnen

Beschrijving:

Een gesimuleerd gepooled monster is gemaakt door science park water te mengen met muskusrat positief water, opgewerkt volgens het Enhanced CTAB protocol tot aan stap 15 (waterige fase naar schone Eppendorf buis). Vervolgens zijn in duplo de volgende monsters verder opgewerkt

- 1x volume 100% EtOH o/n -20C sample 1,2
- 1x volume 100% EtOH 30 min -20C sample 3,4
- 1x volume isopropanol o/n -20C sample 5,6
- 1x volume isopropanol 30 min -20C sample 7,8

Werk de 8 samples op en voer de qPCR uit op muskusrat eDNA

20, 10, 5 en 1 ul in qPCR + NTC en ijklijn

Resultaat: grootte verschil van pellets leek er niet te zijn. Opbrengst eDNA ondanks exact zelfde startmateriaal lijkt nog steeds niet reproduceerbaar.

Resultaten qPCR liggen dicht bij elkaar. Weinig verschil of in ieder geval geen overtuigend verschil tussen de verschillende precipitatie methodes.

Conclusie:

Ethanol vs Isopropanol als precipitatie maakt weinig tot geen verschil. ook de incubatie tijd laat geen tot weinig verschil zien. De voorkeur gaat dan ook uit naar 1 deel 100% ethanol 30 min bij -20 °C. Protocol zal aangepast worden.

SP-naam: MAD1000-P025-SP13 Optimalisatie eDNA isolatie\20 - Homemade gelfiltratiekolommen

Deelproject: DP3b3

Act.26 : Homemade gelfiltratie kolommen

Doel: Goedkoper/beter alternatief vinden voor de BioEcho gelfiltratie kolommen

Tijdpad: 09-2020

Partners: UvA

Beschrijving: De BioEcho kolommen halen chemicaliën als polyfenolen, humic acids etc. uit de monsters. Deze stoffen kunnen inhibitie geven in de qPCR. De BioEcho kolommen zijn echter vrij prijzig en er wordt gezocht naar een goedkoper alternatief, bijvoorbeeld door zelf kolommen te maken. Er worden 3 alternatieven in 3voud getest en vergeleken met de Bioecho kolom

weglengtes resin:

| | |
|-----------------------------------|------|
| sample 1,2 en 3: sephacryl S-400 | 18mm |
| sample 4,5 en 6: sepharose CL-4B | 13mm |
| sample 7,8 en 9: Toyopearl HW-65F | 20mm |
| sample 10,11 en 12: Bioecho | 15mm |

Resultaat:

-bioecho (sample 10 licht gekleurd) en sephacryl hebben de helderste eluaten. De andere, sepharose en toyopearl zijn donker tot licht gekleurd.

-wat betreft recovery van eDNA presteert sephacryl vergelijkbaar met BioEcho namelijk 78% recovery.

sepharose en tyopearl hebben een recovery van 54%

In de qPCR preseteren sepharose en toyopearl slechter dan BioEcho. Sephacryl presteert vergelijkbaar.

Conclusie: Zelfgemaakte kolommen met sephacryl kunnen als alternatief gebruikt worden voor BioEcho. Om te bepalen of dit gunstiger is qua prijs zal een kosten berekening gemaakt moeten worden, bij welke hoeveelheid samples dit goedkoper is. Dit kan meegenomen worden in de berekeningen voor opschaling en robotisering

SP-naam: MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP35_controle uitslagen en cut off qPCR

Deelproject: DP3a10

Act. 1: controleren detectie grens verschillende vaarten

Doel: Testen of de huidige qPCR detectiegrens geschikt is voor alle soorten vaarten.

Tijdpad: 1^e helft 2021

Partners: UvA, HDSR, WF

Beschrijving: Omdat de huidige detectiegrens bepaald is aan de hand van een beperkt aantal bemonsterde vaarten, moet getest worden of deze ook geschikt is voor andere vaarten. Voor een aantal vaarten zal een week na bemonsteren een traject opgedeeld worden in 1Km sub-trajecten. Door dit te doen voor zowel positieve als negatieve trajecten, krijgen we een idee of de huidige detectie grens geschikt is. We krijgen inzicht mogelijke vals negatieven, alsmede meer inzicht welke positieve waarden duiden op aanwezigheid, en welke resultaat zijn van bvb passerende ratten, signalen andere kant gemalen etc.

Resultaat: Tot nu toe zijn er voor verschillende vaarten die zwak positief zijn 1Km opvolgingen gedaan. Voor 1 zwak + traject in Friesland was 1 van de 1Km trajecten sterk positief, er waren puntmonsters genomen, en oude vraatsporen gevonden. De puntmonsters waren alle negatief.

Voor alle nadere zwak positieve trajecten waren de 1Km monsters negatief

Conclusie: Voorlopig wordt niet direct na een zwak positief signaal (alleen + in 20ul of < 1 pg/l in 10ul) opgevolgd met 1Km trajecten. Dit wordt nu gedaan na 6-8 weken, om uit te sluiten dat het signaal van een langstreckende rat was, en er dus te veel tijd gestoken wordt in opvolgen met puntmonsters. Sterk positieve signalen worden wel direct opgevolgd met 1Km trajecten.

SP-naam: MAD1000-P025-SP13 Optimalisatie eDNA isolatie\31 - Chloroform vs BCP

Deelproject: DP3b3

Act. : 27

Doel: Alternatief vinden voor Chloroform in eDNA extractie

Tijdpad: 04-2021

Partners: UvA

Beschrijving: Van uit de waterlaboratoria is er de wens voor een minder toxisch alternatief voor chloroform in eDNA extractie. Een mogelijk alternatief is BCP, wat hier getest is.

Resultaat:

9x 450 sciencepark water + 40 ml SBM03 (historisch positief water) gefilterd en gelyseerd.
Phenol/chloroform/IAA toegevoegd.

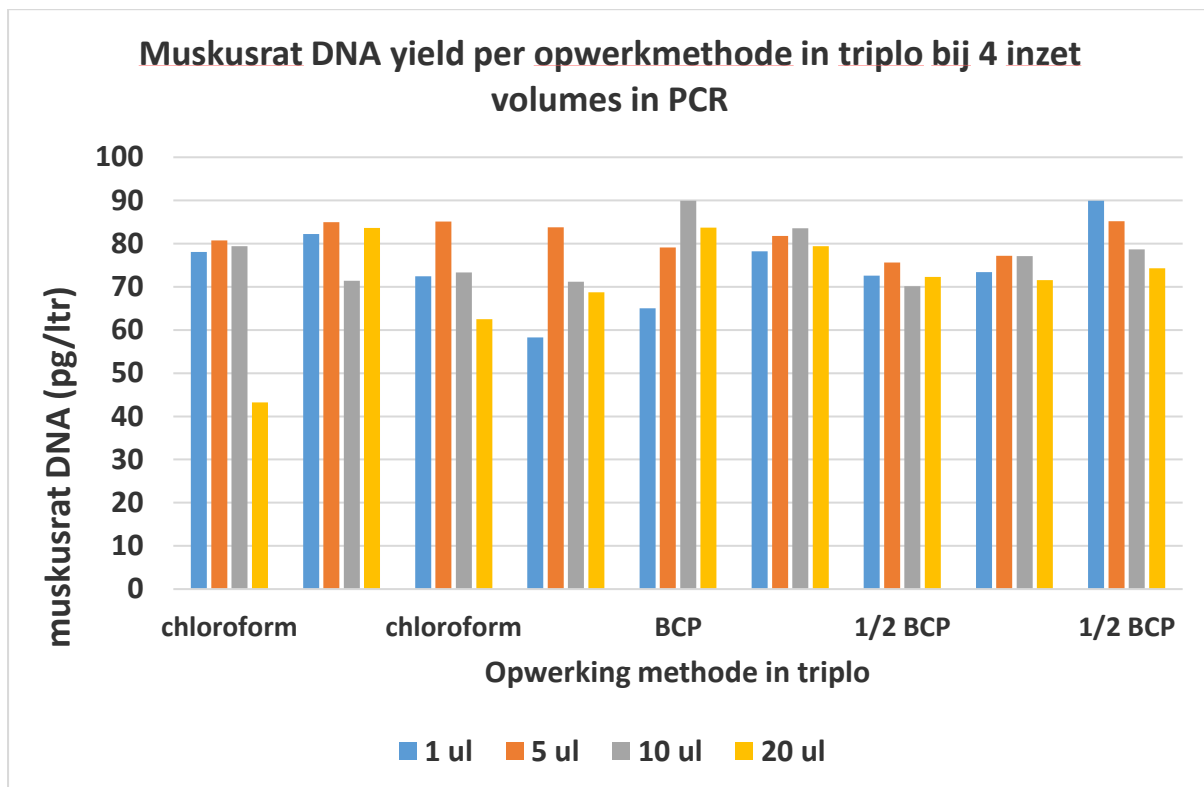
waterige fases van de 9 samples gepoold en uitverdeeld in 9 x 850 ul.

bij 3 van de 9 opgewerkt met 850 ul chloroform= sample 1,2 en 3

bij 3 van de 9 opgewerkt met 850 ul BCP = sample 4,5 en 6

bij 3 van de 9 opgewerkt met 425 ul BCP =sample 7,8 en 9

de 9 samples waren vervolgens ingezet met 20,10,5 en 1 ul in de qPCR

**Conclusie:**

1/2 BCP lijkt een eenduidiger beeld te geven dan chloroform. Er was geen verschil te zien in scheiding tussen de fasen tussen chloroform, BCP en 1/2BCP. Wel is BCP minder vluchtig, en drupt het niet uit de pipetpunt zoals gauw gebeurt met chloroform. BCP en 1/2 BCP kunnen gebaseerd op deze resultaten gebruikt worden als vervanger voor Chloroform.

c- Optimaliseren MBR-eDNA analyse voor individuele monsters

SP-naam: MAD1000-P025-SP13 Optimalisatie eDNA isolatie\9 - Direct eDNA uit sample met kolom

Deelproject: DP3c2

Act.1: Direct eDNA uit sample met kolom

Tijdpad: 04-2019 -07-2019

Partners: UvA

Doel: Bepalen of eDNA isolatie zonder precipitatie mogelijk is door direct over kolom te halen.

Beschrijving: 2 verschillende kits DNeasy en PureLink zijn vergeleken met de precipitatie methode. Hoeveelheid water monster dat maximaal in 1 keer op een kolom kan is 500 µl vs 7,5 ml in de precipitatie methode.

Resultaat: de concentratie eDNA na zuiveren is ongeveer 10x lager voor de direct op kolom methode. Waarbij de PureLink kolom iets beter presteert dan de DNeasy kolom

Conclusie: Omdat het input volume voor de direct op kolom methode veel lager is dan voor de precipitatie methode is de opbrengst veel lager. De direct op kolom methode is niet geschikt.

SP-naam: MAD1000-P025-SP13 Optimalisatie eDNA isolatie\14 - CTAB op geprecipiteerd sample

Deelproject: DP3c2

Act. 2: CTAB op geprecipiteerd sample

Tijdpad: 08-2019 – 09-2019

Partners: UvA

Doel: Bepalen of Enhanced CTAB beter werkt dan Purelink lysis buffer in het precipitatie protocol

Beschrijving: Het Enhanced CTAB lysis buffer gebruikt in de EDNA van 0.45µM PES filters werkt goed, mogelijk werkt dit ook beter dan de PureLink lysis buffer in het precipitatie protocol.

7,5 ml SBM02 precipiteren en opwerken met normaal protocol, enhanced CTAB en enhanced CTAB + RNase allen triplo = 9 samples

Concentratie. meten en in qPCR met verschillende hoeveelheden

Resultaat: PureLink lysis in combi met kolom werkt het beste. opvallend is dat de toevoeging van RNase een negatief effect heeft.

Conclusie: PureLink lysis buffer blijven gebruiken voor precipitatie protocol.

SP-naam: MAD1000-P025-SP13 Optimalisatie eDNA isolatie\15 - Purelink vs Bioecho

Deelproject: DP3c2

Act. 3: Purelink vs Bioecho kolom

Tijdpad: 08-2019 – 09-2019

Partners: UvA

Doel: Bepalen of na een precipitatie direct een BioEcho kolom gebruikt kan worden (dus zonder lysis) zo ja hoe verhoudt zich dit dan tot het normale protocol met een Purelink kolommen.

Beschrijving: 6 x 7,5 ml SBM02 geprecipiteerd 3x opwerken met Purelink en dus standaard protocol 3x opwerken door pelet op te lossen in 110 µl 1xTris en over BioEcho kolom. Terug dampen naar 40 µl en met 20,10,5 en 1 µl in qPCR voor muskusrat detectie

Resultaat: BioEcho kolommen geven een lagere yield van muskusrat DNA dan de Purelink methode.

Conclusie: Bioecho kolommen niet geschikt voor een versnelde isolatie procedure. Het lijkt er op dat het muskusrat DNA in eDNA samples toch grotendeels in intacte cellen zit (immers de BioEcho kolom yield is veel lager)

4 Opzetten routinelabs MBR-eDNA analyse

a - Overdracht eDNA kennis, *know-how* en protocollen van UvA naar waterlaboratoria

SP-naam: MAD-RBAB\03_RBAB-internal\MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025 LIFE MICA Project (MAD)\Progress reports\eDNA protocols

Deelproject: DP4a1

Act. 1: eDNA protocollen naar waterlabs

Doel: De eDNA protocollen overdragen aan de waterlaboratoria.

Tijdpad: 06-2020

Partners: UvA, Waterproef, lab WF

Beschrijving: De eDNA protocollen zijn overgedragen aan de twee waterlaboratoria in de gebieden waar het testen begint.

Resultaat: Waterproef en Wetterskip Fryslân hebben de protocollen

Conclusie: Waterproef en Wetterskip Fryslân hebben de protocollen, en hebben alle benodigdheden, behalve de DNA isolatie kits, die makkelijk te bestellen zijn. Er zal vanaf nu regelmatig overleg plaatvinden met de waterlaboratoria.

SP-naam: MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP25_oefening poolmonsters

Deelproject: Dp4a1

Act.1 : qPCR

Doel: experiment om de qPCRs tussen de 3 labs te vergelijken

Tijdpad: 09-2020 – 01-2021

Partners: UvA, Waterlab Fryslân, Water Proef.

Beschrijving:

Vergelijken qPCR

- UvA levert zuiver DNA
- Waterlaboratoria maken zelf ijklijn en vergelijken.
- Waterlaboratoria doen zelf analyse resultaten, maar ruwe data wordt ook naar UvA gestuurd i.v.m verschillen analyse software

Resultaten: De 3 labs hebben de resultaten van de qPCR vergelijken. Waterproef en UvA hebben het zelfde qPCR apparaat, en kwamen het meest overeen. Wetterskip Fryslân heet een Biorad, en deze gaf steeds 1 CT lager.

Conclusie: De waarden gevonden komen dermate goed overeen, dat het gebruik van verschillende apparatuur geen probleem gaat opleveren voor de analyse.

-naam: MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP25_ oefening poolmonsters

Deelproject: Dp4a1

Act.2 : Vergelijken verwerking puntmonsters

Doel: experiment om de qPCRs tussen de 3 labs te vergelijken

Tijdpad: 1^e helft 2021

Partners: UvA, Waterlab Fryslân, Water Proef.

Beschrijving:

De verwerking van puntmonsters tussen de drie labs wordt vergeleken ter voorbereiding van het verwerken van puntmonsters uit het veld.

Resultaat: Alle 3 de labs scoorden de juiste puntmonsters als positief voor eDNA. Echter de concentratie lag lager bij zowel Waterproef als Wetterskip. Dit is waarschijnlijk het gevolg van het type centrifuge.

Conclusie

Waterlabs kunnen puntmonsters opwerken, echter eenzelfde centrifuge als dat de UvA heeft is wenselijk

SP-naam: MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP25_ oefening poolmonsters

Deelproject: Dp4a1

Act.3 : Vergelijken verwerking gepoolde monsters

Doel: experiment om de isolatie van eDNA van filters van poolmonsters tussen de 3 labs te vergelijken

Tijdpad: 2021

Partners: UvA, Waterlab Fryslân, Water Proef.

Beschrijving:

- 6 monsters met science park water maken
- Moet positieve en negatieve monsters bevatten
- De watermonsters worden gefilterd
- Resultaten worden naar afloop met elkaar gedeeld op dezelfde manier als voor de qPCR
- Waterlaboratoria geven feedback over de ervaringen met het isolatie protocol

Resultaat: Het experiment was 2x gedaan, de 1^e keer met een lage concentratie a eDNA en de 2^e keer met een hogere concentratie eDNA. Uit het experiment met de lage concentratie bleek dat de resultaten tussen Wetterskip en UvA goed overeen kwamen. UvA had meer inhibitie door indampen van de monsters, dan Wetterskip wat geen apparaat heeft voor indampen. Waterproef had niet alle samples positief, en had door gebruik van 2ul ipv 1ul pipet bij pipeteren ijklijn grote afwijking.

Bij het experiment met hogere concentraties eDNA had Wetterskip de hoogste concentraties gemeten gemiddeld 2X hoger dan UvA, en waren de concentraties van Waterproef het laagst (22x lager dan Wetterskip) . Alle 3 labs hadden de juiste monsters als positief gescoord.

Conclusie:

Alle drie labs scoren de juiste monsters als positief. Waterproef schaft een 1ul pipet aan. Ondanks verschillen in gemeten concentraties is besloten verder te gaan met veld monsters. Voor een korte periode zullen van elk waterlab 12 monsters per week dubbel gedraaid worden door de UvA (door de helft van sample naar UvA ter sturen) Om te kijken met welke cut offs rekening gehouden moet worden

SP-naam: MAD1000-P025-SP42-Transitie-monsteranalyse-waterlabs

Deelproject: Dp4a1

Act. : 4

Doel: Vergelijken analyse monsters UvA & Waterlabs

Tijdpad: 1^e helft 2022

Partners: UvA, WF, en Waterproef

Beschrijving: gedurende de eerste helft van het jaar splitsen de waterlabs de monsters, door naar filtreren en toevoegen phenol chloroform en oplossen filteren, de helft van de waterige fase naar de UvA op te sturen. Hiervoor wordt begonnen met bemonsteren in gebieden met een wat hogere populatie muskusratten (grensgebieden WF, poldergebied NH).

Resultaat:

De waardes gevonden door UvA en WF kwamen het meest overeen (zelfde PCR apparaat). De waardes gemeten door WF waren initieel lager, maar kwamen later meer overeen.

Voor de puntmonsters werden tussen NH en UvA redelijk grote verschillen, echte UvA heeft samples opgewerkt met plaat, en er was volledige inhibitie in 10ul.

De puntmonsters tussen WF en UvA verschilden in het begin sterk, waarin UvA veel hogere concentraties mat. Later samples kwamen meer overeen.

Uit vergelijking van de monstervolumes toegevoegd aan qPCR, bleek voor de poolmonsters 10ul het meest geschikt, en voor de puntmonsters 5ul.

Conclusie:

Waterlabs helemaal klaar voor verwerken monsters, over op alleen 10ul voor pollmonsters 5ul voor puntmonsters

[b - Opschalen en standaardiseren van de eDNA analyse](#)

5 Bepalen bedrijfskundige aspecten

a - Aanpak overgangsfase van traditioneel naar traditioneel + MBR-eDNA beheer

b - Opstellen businessplan

SP-naam: MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\Project-information\MAD1000-P025-Business case

Deelproject: DP5b1

Act. 1: Berekenen kosten waterlaboratoria

Doel: Bepalen kosten water laboratoria gedurende het project

Tijdpad: 10-2020

Partners: UvA, Waterproef, WF

Beschrijving: Inschatten van de materiaal en personeelskosten voor de waterlaboratoria Waterproef en Wetterskip Fryslân gedurende het project. Voorbereiding voor businesscase.

Resultaat: De inschatting van de kosten door de 3 laboratoria komt overeen. De kosten dalen naar mate er meer samples per keer geanalyseerd worden. Het analyseren van kleine hoeveelheden samples door de waterlaboratoria moet zo veel mogelijk voorkomen worden.

| | Wetterskip Fryslan (oranje) vs Waterproef (groen) | | | | | |
|--------------------|---|---------|--------------------|---------|--------------------|---------|
| Kosten per monster | (Per monster (5)) | | (per monster (24)) | | (Per monster (48)) | |
| Puntmonsters | € 56.83 | € 55.15 | € 19.81 | € 18.53 | € 15.99 | € 14.98 |
| Poolmonstes | € 63.92 | € 62.08 | € 21.57 | € 20.87 | € 17.46 | € 17.03 |

Conclusie: In overleg met UvA en waterlaboratoria is besproken dat vooralsnog de pool samples door de UvA geanalyseerd zullen worden. Vanaf de zomer zullen de waterlaboratoria beginnen met het analyseren van punt monsters.

c - Strategie bepalen voor verandering in bedrijfsvoering (splitsen speuren-vangen?)

d - Communicatie (intern & extern)

SP-naam: MAD1000-P025 LIFE MICA Project (MAD)\Management\Communication\Communication plan

Deelproject: DP5d1

Act 1. : Communication plan

Doel: Goedkeuren communicatie plan

Tijdpad: 12-2019 – 02-2020

Partners: Alle Life-MICA partners

Beschrijving: Communicatie plan voor communicatie aan verschillende externe partijen via diverse media.

Resultaat: Feedback geleverd en communicatie plan goedgekeurd

Conclusie: Communicatie plan goedgekeurd door alle Life-MICA partijen.

SP-naam: MAD1000-P025 LIFE MICA Project (MAD)\Management\Communication\LIFE-MICA website

Deelproject: DP5d2

Act. 1: Life-MICA website

Doel: Content leveren voor Life-MICA website

Tijdpad: 01-2020

Partners: Alle Life-MICA partners

Beschrijving: Voor de website van Life- MICA is content nodig van de partners over hun deel in het project.

Resultaat: Content geleverd over het eDNA gedeelte voor de Life-MICA website

Conclusie: Life-Mica website met info over eDNA en de content geleverd door de andere partners

SP-naam: MAD1000-P025 LIFE MICA Project (MAD)\Management\Communication\notice boards

Deelproject: DP5d3

Act.1 : Notice boards

Doel: Informatie borden voor Life-MICA gebieden

Tijdpad: 02-2020-03-2020

Partners Alle Life-MICA partners

Beschrijving: Voor de Life-MICA informatie borden in de test gebieden is informatie van de partners nodig voor hun deel van het project.

Resultaat: Informatie over eDNA en autosampler geleverd

Conclusie: De Life-MICA informatie borden zullen door de Waterschappen geplaatst worden in de Life-MICA gebieden.

SP-naam: MAD1000-P025 LIFE MICA Project (MAD)\Management\projectplan

Deelproject: DP5d4

Act. 1: Project plan

Doel: Goedkeuren projectplan

Tijdpad: 04-2020 – 07-2020

Partners: Alle Life-MICA partners

Beschrijving: Er moet een project plan goedgekeurd worden, waarin de globale planning en management aspecten van het project beschreven staan.

Resultaat: Feedback geleverd en project plan goedgekeurd

Conclusie: Project plan goedgekeurd door alle partners

SP-naam: MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP29_Filmen labwerkzaamheden

Deelproject: DP5d4

Act. 1: filmen werkzaamheden veld en lab

Doel: informatie filmpje over de methode voor EU

Tijdpad: 11-2020 12-2020

Partners: UvW, UvA, WF

Beschrijving: Het bemonsteren met de autosampler, filtreren en de lab werkzaamheden worden gefilmd ter behoeve van een informatie filmpje. Er worden korte shots van de belangrijkste handelingen gemaakt, en er komt een voice over (Nederlands) en ondertiteling (Engels)

Resultaat:

Er zijn filmpjes gemaakt van het bemonsteren met de autosampler op een boot in Fryslân en van de handelingen in het lab.

Conclusie:

De losse filmpjes zijn gemonteerd door Dolf (UvW) tot een informatie film voor Life MICA.

6 Overig

a - Opzetten integrale data managementstructuur en omgeving voor eDNA MBR beheer

SP-naam: MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP33_Administratie-uitslagen

Deelproject: DP6a1

Act.1 : Administratie resultaten 1e fase project

Doel: Overzichtelijke manier om de resultaten op te slaan tijdens het project

Tijdpad: 2021

Partners: UvA

Beschrijving: Er moet een manier komen voor het bijhouden van de resultaten. Voor nu wordt dit gedaan in excel. We gaan wanneer de eerste resultaten binnen komen testen of de opzet goed werkt, en waar nodig aanpassen. Dit is een voorlopige manier van resultaten opslaan. De uiteindelijke manier van data opslaan als het project landelijk gaat wordt bepaald door de waterschappen.

Resultaat: Een voorlopige opzet is gemaakt in excel. Voor het lab zijn aparte mappen waar de resultaten bijgehouden worden. Alle uitslagen worden voor Noord-Holland & Friesland apart bijgehouden. De trajectvoorstellen, autosampler logfiles, en de coypu app data worden in aparte mappen opgeslagen

Conclusie: Deze manier werkt als voorlopige oplossing. Voor het landelijk bemonsteren moet er een nieuw systeem komen.

SP-naam: MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP33_Administratie-uitslagen

Deelproject: DP6a1

Act. 2: Data bijhouden in qGIS

Doel: Geo data en uitslagen bijhouden in qGIS

Tijdpad: 2021

Partners: UvA

Beschrijving: Het voordeel van qGIS is, dat ook de geografische data hierin weergegeven kunnen worden. De uitslagen andere data kunnen hier dan aan verbonden. De data kunnen ook heel gemakkelijk gexporteerd worden naar andere formats zoals excle.

Resultaat: De data worden nu bijgehouden in een Geopackage database. Dit werkt goed. De trajectvoorstellen kunnen makkelijk bijgewerkt worden naar de echte gevaren routes met de data van de autosampler.

Conclusie: Voorlopig verder met bijhouden data hierin

b - Losse ideeën/experimenten

SP-naam: MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP20 LAMP-PCR

Deelproject: DP6b1

Act. 1: LAMP-PCR

Doel: Bepalen of LAMP PCR gebruikt kan worden als alternatief voor qPCR

Tijdpad: 01-2020-02-2020

Partners: UvA

Beschrijving: LAMP-PCR is een goedkoop alternatief voor qPCR, omdat er geen qPCR apparaat voor nodig is, de reactie kan met een hitte blok gedaan worden. Door een kleurverandering in dit geval roze naar geel kan gezien worden of het monster positief is.

Resultaat:

- LAMP-PCR primers ontworpen voor muskusrat en beverrat
- 6 concentratie getest + negatieve controle
- De reactie is gedaan door verhitting bij 65 °C gedurende 45 min
 - o Alle monsters verkleurd, ook negatieve controle
- Nieuwe reactie gestart: 30 min 65 °C, gevolgd door in-activatie van 5 min bij 95 °C
 - o Duidelijke kleurverandering bij de muskusrat LAMP-PCR
 - Detectie limiet 1pg
 - o Kleurverandering bij beverrat LAMP-PCR veel minder duidelijk

Conclusie: LAMP-PCR kan heeft voor de beverrat een detectie limiet van 1pg, dit is een stuk hoger dan qPCR. Het is mogelijk dat door optimalisatie van de condities de detectie limiet verlaagd kan worden. Voor de beverrat LAMP-PCR was de kleurverandering niet overtuigend, mogelijk kan er door andere primers een beter resultaat behaald worden. Vooralsnog blijven we bij de qPCR, omdat deze veel gevoeliger is.

SP-naam: MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP39-MuRa-Slotermeer

Deelproject: Dp6b2

Act. : 1

Doel: Detectie muskusrat slotermeer

Tijdpad: 06-2021

Partners: WF, UvA

Beschrijving: Melding van een muskusrat in Slotermeer. Muskusrat is gefilmd, en voersporen waren gevonden 150 van de gespotte MuRa. Verder zijn er geen vraatsporen of bouwen gezien.

Vraag van bestrijders, of hier bemonsterd kan worden om de bouw op te sporen.

Resultaat:

16 puntsamples in een grid rondom de vindplek
Plus 10 x 1 km trajecten langs alle randen van het meer (andere inhammen negeren).

Conclusie:

Op de bemonsterde plekken geen muskusrat eDNA gedetecteerd.

SP-naam: MAD1000-P025-MBR_eDNA_Toolkit\MAD1000-P025-SP36_MuRa & BeRa Denemarken

Deelproject: Dp6b3

Act. : 1

Doel: eDNA detectie muskusrat en beverrat in Denemarken

Tijdpad: 04-2021-06-2021

Partners: UvA, UvW, MST

Beschrijving: Op verzoek van de Deense Environmental protection agency is bemonsterings apparatuur naar denemarken verstuurd. De monsters waren vervolgens geanalyseerd door de UvA

Resultaat: In de trajectmonsters was geen beverrat eDNA gedetecteerd. <1pg/l. In het opgestuurde puntmonster van een aquarium met beverratten waren zeer hoge concentraties beverrat gemeten. > 120ng/l. 4 andere monster hadden ook beverrat signalen van >10pg/l. Denemarken heeft aangegeven dat ze mogelijk deze monsters besmet hadden met het zeer sterk positieve monster.

Conclusie: In de traject monsters genomen langs de Duitse grens waren geen beverrat sporen gedetecteerd. De concentraties muskusrat eDNA waren dermate laag, dat dit niet duidt op een grote muskusrat populatie in deze gebieden. De Denen waren blij met de resultaten, en geïnteresseerd in de bemonsteringsmethode.

...

