



Vlaanderen
is wetenschap

eDNA-onderzoek naar de aanwezigheid van otter, muskusrat en de aanwezige visgemeenschappen in waterlopen van het Waterschap Brabantse Delta

Hanne Danneels, Charlotte Van Driessche, Teun Everts, Sabrina Neyrinck, Berdien De Beer
en Rein Brys

INSTITUUT
NATUUR- EN BOSONDERZOEK

Auteurs:

Hanne Danneels , Charlotte Van Driessche , Teun Everts , Sabrina Neyrinck , Berdien De Beer  & Rein Brys 

Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek

Reviewer:

Nick Dillen

Het INBO is het onafhankelijk onderzoeksinstituut van de Vlaamse overheid dat via toegepast wetenschappelijk onderzoek, data- en kennisontsluiting het biodiversiteitsbeleid en -beheer onderbouwt en evalueert.

Vestiging:

Herman Teirlinckgebouw

INBO Brussel

Havenlaan 88 bus 73, 1000 Brussel

vlaanderen.be/inbo

e-mail:

hanne.danneels@inbo.be

Wijze van citeren:

Danneels, H., Van Driessche, C., Everts, T., Neyrinck, S., De Beer, B. & Brys, R. (2025). eDNA-onderzoek naar de aanwezigheid van otter (*Lutra lutra*), muskusrat (*Ondatra zibethicus*) en de aanwezige visgemeenschappen in waterlopen van het Waterschap Brabantse Delta. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2025 (13). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.

DOI: doi.org/10.21436/inbor.121391450

D/2025/3241/104

Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2025 (13)

ISSN: 1782-9054

Verantwoordelijke uitgever:

Hilde Eggermont

Foto cover:

Muskusrat (*Ondatra zibethicus*), USO

Dit onderzoek werd uitgevoerd in opdracht van:

het Waterschap Brabantse Delta



Dit werk valt onder een [Creative Commons Naamsvermelding-GelijkDelen 4.0 Internationaal](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/)-licentie.

eDNA-onderzoek naar de aanwezigheid van otter (*Lutra lutra*), muskusrat (*Ondatra zibethicus*) en de aanwezige visgemeenschappen in waterlopen van het Waterschap Brabantse Delta

Hanne Danneels, Charlotte Van Driessche, Teun Everts, Sabrina Neyrinck, Berdien De Beer & Rein Brys

doi.org/10.21436/inbor.121391450

Dankwoord

Dit rapport werd opgesteld in opdracht van en gefinancierd door het Waterschap Brabantse Delta. Dank aan Michiel Cornelis voor de begeleiding van dit project. In het bijzonder ook dank aan Kevin Kerckhofs en de rattenvangers van het Waterschap Brabantse Delta voor de hulp bij de staalname.

Samenvatting

In deze studie onderzochten we de aanwezigheid van Europese otter (*Lutra lutra*) en muskusrat (*Ondatra zibethicus*) met behulp van eDNA-gebaseerde analyses in 50 waterstalen. Deze werden genomen in verschillende waterlopen die vallen onder de monitoringsverplichtingen van de Europese Kaderrichtlijn Water (KRW) en gesitueerd zijn binnen het Waterschap Brabantse Delta. De otter is een beschermde soort, terwijl de muskusrat een invasieve uitheemse soort is die intensief bestreden wordt vanwege zijn negatieve impact op landbouwgewassen, dijken en oevers. Met deze studie werd nagegaan of de otter terugkeert naar het studiegebied en of de herinrichtingswerken een positief effect hebben. Daarnaast werd er informatie bekomen die moet helpen om muskusrat gerichter te bestrijden. Tot slot werd via eDNA-metabarcoding op elk van de bemonsterde locaties ook de aanwezige visgemeenschap in kaart gebracht om bijkomende inzichten te bekomen over de visbestanden als potentiële voedselbron van de otter.

In de zomer van 2024 werden 50 eDNA-stalen verzameld. In twee stalen afkomstig van de Boven Mark troffen we tegen alle verwachtingen in DNA-sporen van otter aan, waarbij de signaalsterktes wijzen op de aanwezigheid van één of enkele individuen. Dit toont aan dat eDNA-onderzoek erg geschikt is om de verspreiding van moeilijk te detecteren soorten zoals de otter op een efficiënte manier in kaart te brengen. Muskusrat werd in maar liefst veertien waterstalen aangetroffen, vaak in hogere concentraties. Drie locaties (in de Bavelse Leij ten noorden van Ulvenhout, in het Zuiderafwateringskanaal en in de Mark ten noorden van Breda) vertoonden zeer hoge concentraties, wat duidt op de aanwezigheid van grote (sub)populaties muskusrat. Dit onderstreept het belang van een snelle en gerichte bestrijding op deze locaties. In één van de stalen positief voor otter-DNA (in de Boven Mark ten zuidwesten van Ulvenhout) werd ook muskusrat-DNA aangetroffen. Zeker in deze regio raden we aan om maatregelen te treffen om bijvangst van otter te vermijden door het plaatsen van otterringen in de gebruikte muskusrat-fuiken.

In totaal werden er over alle locaties heen 33 verschillende vissoorten gedetecteerd. Het studiegebied werd onderverdeeld in vier regio's, afhankelijk van hun geografische ligging ten opzichte van de Oosterschelde/Krammer-Volkerak en het Hollands Diep. Negentien soorten werden in al deze regio's waargenomen, terwijl andere vissoorten eerder regio-specifiek waren. Opvallende waarnemingen waren soorten zoals grote modderkruiper, serpeling en rivierdonderpad/beekdonderpad, terwijl we geen kopvoorn of winde konden detecteren. In de twee transecten in de Boven Mark waar otter-DNA gedetecteerd werd, was de soortenrijkdom aan vis hoog (gemiddeld 21 soorten). Daarnaast werden er enkele indicatoren voor een goede ecologische waterkwaliteit gedetecteerd. We detecteerden er ook drie vissoorten die doorgaans een groot aandeel uitmaken van het otterdieet. Dit maakt deze locaties, onder meer op basis van het voedselaanbod, tot ideale habitats voor otters.

English abstract

In this study, the presence of the European otter (*Lutra lutra*) and the muskrat (*Ondatra zibethicus*) was investigated using eDNA-based analyses in 50 water samples. Those were taken within different lotic systems that need to be monitored in support of the Water Framework Directive (WFD), and all are situated in Waterschap Brabantse Delta. The otter is a protected species, while the muskrat is an invasive alien species that is intensively controlled due to its negative impact on agricultural crops, dikes, and banks. This study aims to assess whether the otter is returning to the area and whether the restoration efforts may have a positive effect, as well as to gather information to help managing muskrat more effectively. Finally, eDNA metabarcoding was used on each sample to map the existing fish community at those locations, providing additional insights into the fish stocks as a potential food source for the otter.

In the summer of 2024, 50 eDNA samples were collected and subsequently analysed. In two samples from the Boven Mark, DNA traces of otter were found, with signal strengths indicating the presence of one or a few individuals. This shows that eDNA research is a very suitable approach for mapping the distribution of rare and elusive species, such as the otter, which is difficult to detect via conventional catch-based methods. Muskrats, on the other hand, were detected in fourteen water samples, often in higher concentrations. Three locations (in the Bavelse Leij north of Ulvenhout, in the Zuiderafwateringskanaal, and in the Mark north of Breda) showed very high concentrations, indicating the presence of large (sub)populations of muskrats and emphasizing the importance of rapid control efforts. In one of the samples (in the Boven Mark southwest of Ulvenhout), both otter and muskrat DNA were detected. Since otter and muskrat are both present in this region, it is strongly recommended to take measures to avoid bycatch of otter with muskrat-targeted traps, for example through the use of protective otter-rings in the fykes.

In total, 33 different fish species were detected across all locations. The study area was subdivided in four regions based on their geographical location in relation to the Oosterschelde (also known as the Eastern Scheldt estuary) and the Hollands Diep. Nineteen species were observed in all four regions, while other fish species were more region-specific. Notable observations included species such as the common dace, European bullhead and the European weather loach, whereas species such as the chub and ide were contrary to expectations not found. In the Boven Mark, where otter DNA was detected, the fish species richness was high (an average of 21 species). In addition, several indicators of good ecological water quality were detected. We also detected three fish species that usually make up a large part of the otter diet, indicating that these locations seem to be ideal habitats for otters based on the available food supply.

Inhoudstafel

Dankwoord	2
Samenvatting	3
English abstract	4
Inhoudstafel	5
Lijst van figuren	6
Lijst van tabellen	10
1. Beschrijving van de studie	11
2. Beschrijving van de soorten	13
I. Otter	13
II. Muskusrat.....	14
3. Technische details	15
I. Staalname in het veld.....	15
II. Labo analyses en kwaliteitscontrole	21
• Detectie van otter	25
• Detectie van muskusrat.....	27
• In kaart brengen van de visgemeenschappen.....	28
4. Resultaten	30
I. Algemeen	30
II. Otter detecties	33
III. Muskusrat detecties	34
IV. Aanwezige visgemeenschappen.....	37
• Algemeen	37
• Regio Binnenland.....	46
• Regio Hollands Diep	49
• Regio Oosterschelde/Krammer-Volkerak.....	51
• Regio Nabij Oosterschelde/Krammer-Volkerak	53
• Relatie tussen visdiversiteit en otteraanwezigheid	55
5. Conclusie	56
6. Referenties	59

Lijst van figuren

Figuur 1. Otter, muskusrat en andere semi-aquatische zoogdieren die via eDNA-barcoding efficiënt en gebiedsdekkend in hun natuurlijke habitat gedetecteerd kunnen worden. Tekening: ARK Rewilding Nederland.	12
Figuur 2. Europese otter (<i>Lutra lutra</i>). Foto: Peter Trimming.....	13
Figuur 3. Muskusrat (<i>Ondatra zibethicus</i>). Foto: USO	14
Figuur 4. Overzicht van de 50 riviertransecten in het Waterschap Brabantse Delta, waarbinnen in totaal op 182 staalnamelocaties water werd bemonsterd in de zomer van 2024 om via eDNA-analyses de aanwezigheid van otter, muskusrat, en de aanwezige visgemeenschappen in kaart te brengen. De staalnamelocaties binnen eenzelfde transect worden weergegeven in dezelfde kleur.	15
Figuur 5. Enkele staalnamelocaties in het Waterschap Brabantse Delta, a) Aa of Weerij, b) Boven Mark, c) zijstroom van de Mark, en d) hoogwatergeul van de Boven Mark. Elk van deze locaties werd bemonsterd in het kader van het eDNA-onderzoek voor de detectie van otter, muskusrat en de aanwezige visgemeenschappen in de zomer van 2024.....	16
Figuur 6. Voorbeeld van verschillende staalnamelocaties gesitueerd binnen drie verschillende riviertransecten in het Waterschap Brabantse Delta. Stalen genomen op de staalnamelocaties binnen een transect werden samengevoegd tot een mengstaal wat na filtratie resulteerde in één eDNA-staal dat onderworpen werd aan de verschillende DNA-analyses om de aanwezigheid van otter en muskusrat in kaart te brengen, en de samenstelling van de aanwezige visgemeenschappen te onderzoeken.	17
Figuur 7. Staalname in een waterlichaam waarbij water verzameld werd voor eDNA-analyses. Op een staalnamelocatie werden telkens vier tot vijf zakjes van een halve liter met oppervlaktewater gevuld met behulp van een uitschuifbare staalname stok (a-b). Het water van alle staalnamelocaties binnen een riviertransect werd samengevoegd en gehomogeniseerd tot een mengstaal dat vervolgens gefilterd werd met behulp van een peristaltische pomp (c-d).	20
Figuur 8. Laboprotocol dat werd gevolgd met a) DNA-extractie van de filters en, indien nodig, reiniging van de DNA-extracten, uitgevoerd in een DNA-vrije laboratoriuminfrastructuur bij het INBO, en b) voorbereiding van een 96-well plaat voor de uiteindelijke meting van de DNA-concentraties van de doelsoort in de ddPCR-machine.....	21

Figuur 13. Geografisch overzicht van alle staalnamelocaties binnen de 50 verschillende riviertransecten verspreid in het Waterschap Brabantse Delta waar waterstalen werden genomen in kader van het gevoerde eDNA-onderzoek naar de mogelijke aanwezigheid van de muskusrat (<i>Ondatra zibethicus</i>). Grijze punten geven de locaties weer waar muskusrat niet gedetecteerd kon worden, gele punten geven de locaties weer waar muskusrat met erg lage DNA-concentraties (< 0,02 kopieën/μL) werd gedetecteerd, oranje punten geven de locaties weer waar muskusrat met matige DNA-concentraties (tussen 0,02 en 0,04 kopieën/μL) werd gedetecteerd en rode punten geven de locaties weer waar muskusrat met aanzienlijke DNA-concentraties (tussen 0,05 en 0,10 kopieën/μL) werd gedetecteerd. Tot slot geven de paarse punten de locaties weer waar muskusrat met de hoogste DNA-concentraties werd gedetecteerd (> 0,70 kopieën/μL). Alle bovengenoemde concentraties zijn weergegeven in kopieën/μL, gecorrigeerd voor het gefilterde watervolume.....	35
Figuur 14. Geografisch overzicht van alle staalnamelocaties binnen de vier regio's verspreid in het Waterschap Brabantse Delta zoals onderzocht binnen deze studie. De zwarte punten zijn de staalnamelocaties binnen de regio 'Binnenland', de paarse punten zijn de staalnamelocaties binnen de regio 'Nabij Oosterschelde/Krammer-Volkerak', de blauwe punten geven de staalnamelocaties weer binnen de regio 'Hollands Diep', terwijl de groene punten de staalnamelocaties binnen de regio 'Oosterschelde/Krammer-Volkerak' aanduiden.	38
Figuur 15. Relatieve eDNA-abundantie van alle gedetecteerde vissoorten in alle stalen genomen in de verschillende regio's in het Waterschap Brabantse Delta.....	40
Figuur 16. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot van alle stalen genomen tijdens dit onderzoek. De stalen werden onderverdeeld in verschillende regio's en worden weergegeven in verschillende kleuren.....	42
Figuur 17. Relatieve eDNA-abundanties van de gedetecteerde vissoorten in de afwijkende riviertransecten 4, 5, 13, 23 en 37. Elke kleur geeft een andere vissoort weer en per riviertransect staan de indicatorsoorten weergegeven met hun stat-waarde. De asterisken geven de niveaus van significantie weer: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$	43
Figuur 18. Alle staalnamelocaties binnen de regio 'Binnenland'. De verschillende riviertransecten worden aangeduid met verschillende kleuren.	46
Figuur 19. Relatieve eDNA-abundantie per soort (kleuren) weergegeven van alle stalen genomen in de regio 'Binnenland'. De x-as geeft de bemonsterde riviertransecten weer.	47
Figuur 20. Relatieve eDNA-abundantie per soort (kleuren) van alle stalen in de regio 'Binnenland'. De x-as geeft de bemonsterde riviertransecten weer, en de grootte van de bollen weerspiegelt het relatieve aandeel van de soort binnen de visgemeenschap van dat staal.	48
Figuur 21 Alle staalnamelocaties binnen de regio 'Hollands Diep'. De verschillende riviertransecten worden aangeduid met verschillende kleuren.	49
Figuur 22. Relatieve eDNA-abundantie per soort (kleuren) weergegeven van alle stalen genomen in de regio 'Hollands Diep'. De x-as geeft de bemonsterde riviertransecten weer.	50

////////////////////////////////////

Lijst van tabellen

Tabel 1. Overzicht van de 50 eDNA-stalen die tijdens dit onderzoek genomen werden in waterlopen verspreid in het Waterschap Brabantse Delta, met het nummer van het onderzochte riviertransect, de naam van de betreffende waterloop, de filtercode, het gefilterd watervolume in mL, en de totale hoeveelheid DNA in ng bekomen met de Quantus fluorimeter (al dan niet na reiniging van het DNA-extract). De twee stalen die een positieve detectie gaven voor otter-DNA staan in het groen gemarkeerd. De veertien stalen die een positieve detectie gaven voor muskusrat-DNA staan in het rood en vet gedrukt..... 31

Tabel 2. De detectiekans (de detectieprobabiliteit op basis van de zes ddPCR-analyse herhalingen die werden uitgevoerd per staal) en de gemiddelde DNA-concentratie (in kopieën per μL DNA-extract) van muskusrat gecorrigeerd voor het gefilterde watervolume in elk van de veertien riviertransecten waarin muskusrat-DNA gedetecteerd werd tijdens dit onderzoek. De transecten zijn aangeduid in het geel wanneer muskusrat-DNA in erg lage concentraties ($< 0,02$ kopieën/ μL) werd gedetecteerd, in het oranje wanneer muskusrat-DNA in matige concentraties (tussen $0,02$ en $0,04$ kopieën/ μL) werd gedetecteerd, in het rood wanneer muskusrat-DNA in aanzienlijke concentraties (tussen $0,05$ en $0,10$ kopieën/ μL) werd gedetecteerd en in het paars wanneer muskusrat-DNA in erg hoge concentraties ($> 0,70$ kopieën/ μL) werd gedetecteerd. Alle bovengenoemde concentraties zijn weergegeven in kopieën/ μL , gecorrigeerd voor het gefilterde watervolume..... 36

Tabel 3. Resultaten van de ‘indicator species analysis’ voor de vijf afwijkende stalen uit de NMDS-plot (Fig. 16). De vissoorten die significant geassocieerd zijn met een riviertransect staan weergegeven, met de bijhorende indicatorwaarde tussen haakjes. De asterisken geven de niveaus van significantie weer: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Riviertransecten waarvoor geen indicatiesoort gedetecteerd kon worden, staan aangeduid met een /. 44

Tabel 4. Resultaten van de ‘indicator species analysis’ voor de weergegeven combinaties van regio’s. De vissoorten die significant geassocieerd zijn met een combinatie van regio’s staan weergegeven, met de bijhorende indicatorwaarde tussen haakjes. De asterisken geven de niveaus van significantie weer: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ 45

1. BESCHRIJVING VAN DE STUDIE

In de zomer van 2024 (19 juli – 12 augustus) werd een grootschalig onderzoek uitgevoerd in verschillende waterlopen van het Waterschap Brabantse Delta, in het zuidwesten van Nederland. Het doel van dit onderzoek was om de aanwezigheid van Europese otter (*Lutra lutra*) en muskusrat (*Ondatra zibethicus*) na te gaan in het betreffende gebied, en de aanwezige visgemeenschappen in kaart te brengen. Zowel de otter als de muskusrat brengen veel tijd door in het water en zijn overwegend nachtdieren waardoor ze bekend staan als uiterst ‘discrete’ soorten waarvan de aanwezigheid in het landschap doorgaans weinig opvallend is. Zeker bij otter maakt zowel zijn verborgen leefwijze als de zeer lage populatiedichtheid het moeilijk om de aanwezigheid van deze soort in het landschap aan te tonen. Hierdoor blijkt otter, maar eveneens muskusrat bij lage dichtheden, vaak in gebieden onder de radar aanwezig te zijn zonder dat zijn aanwezigheid (via conventionele methoden) aan het licht komt. Screening via eDNA-barcoding (via *droplet digital Polymerase Chain Reaction* (ddPCR) analyses) is hierbij een erg trefzekere en innovatieve methode, die zijn meerwaarde reeds heeft bewezen voor moeilijk te detecteren semi-aquatische soorten, zoals otter en muskusrat (Fig. 1).

In het volledige studiegebied tussen Tilburg, Benedenrivieren, Schelde-Rijnkanaal en de Belgisch-Nederlandse grens werden 50 riviertransecten onderzocht op basis van eDNA ('*environmental DNA*' of omgevings-DNA). Dit is DNA dat door organismen in de omgeving (bodem, lucht, water, etc.) is achtergelaten in de vorm van huid, schubben, uitwerpselen, slijm, geslachtscellen, etc. Omdat de genetische samenstelling van soorten onderling verschilt, kan eDNA gebruikt worden om de aanwezigheid van een welbepaalde soort of zelfs volledige gemeenschappen aan te tonen en in kaart te brengen, zonder dat de organismen rechtstreeks moeten worden waargenomen. De verschillende riviertransecten werden geselecteerd op basis van de toegankelijkheid van het gebied en de gebiedskennis van het Waterschap Brabantse Delta. Elk van de geselecteerde transecten werd onderverdeeld in meerdere staalnamelocaties, zodat water verspreid over het hele transect verzameld werd. Op deze manier werden op een gebiedsdekkende manier waterstalen genomen en een screening naar de betreffende soorten uitgevoerd. De staalname in het veld werd uitgevoerd in samenwerking met de rattenvangers van het Waterschap Brabantse Delta en medewerkers van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek (INBO). De 50 resulterende eDNA-stalen werden nadien geanalyseerd in het genetisch labo van het INBO.

Door gebruik te maken van eDNA-barcoding werden inzichten bekomen over de aanwezigheid en verspreiding van otter en muskusrat in het betreffende gebied. Verder kunnen inzichten in de samenstellingen van de visgemeenschappen op elk van deze locaties meer vertellen over het voedselaanbod voor de otter en de mogelijke aan- of afwezigheid van deze laatste zou kunnen verklaren. Vandaar werd voor elk van de bemonsterde waterlichamen eveneens de visgemeenschap in kaart gebracht via eDNA-metabarcoding.

Het gebruik van eDNA-onderzoek vermijdt hoge kosten of grote tijdsinvesteringen die vaak nodig zijn om hetzelfde resultaat te bekomen via conventionele detectietechnieken (gebruik van cameravallen, sporenonderzoek, afvangsten, etc.). Een ander groot pluspunt is dat via eDNA-onderzoek het studiegebied en de opgespoorde soorten slechts minimaal verstoord worden. Sinds enkele jaren heeft het INBO een erg efficiënt en goed werkend protocol ontwikkeld om de aanwezigheid van een groot aantal soorten via eDNA in het water op te sporen (zie details in Brys et al., 2021a; Van Driessche et al., 2024a).



Figuur 1. Otter, muskusrat en andere semi-aquatische zoogdieren die via eDNA-barcoding efficiënt en gebiedsdekkend in hun natuurlijke habitat gedetecteerd kunnen worden. Tekening: ARK Rewilding Nederland.

2. BESCHRIJVING VAN DE SOORTEN

I. OTTER

De Europese otter (*Lutra lutra*) is een semi-aquatisch zoogdier, wereldwijd bedreigd en zeldzaam in het zuidwesten van Nederland (Fig. 2). De soort staat op de IUCN Rode Lijst geclassificeerd als ‘bijna bedreigd/kwetsbaar’, waarbij vooral nauwkeurig inzicht in de huidige verspreiding van de soort ontbreekt. Het onderzoeken van de verspreiding van de otter in het studiegebied is dus uiterst belangrijk om passende beheer- en instandhoudingscampagnes te kunnen opmaken en uitvoeren.

Rond de jaren 1900 was de otter een algemene soort in Nederland (de Vos, 2021). Echter werd de soort in Nederland in 1988 als uitgestorven beschouwd ten gevolge van jacht, habitatfragmentatie onder invloed van industrie en landbouw, en vervuiling van de oppervlaktewateren. Dit laatste had een rechtstreeks effect op de aanwezige visgemeenschappen en bijgevolg op het voedselaanbod van de otter (de Vos, 2021). De soort werd daarom in 2002 geherintroduceerd op verschillende locaties in Friesland (Weerribben/Wieden, Rottige Meenthe, Lindevallei en Oldematen), waarna nog bijkomende uitzettingen volgden (de Vos, 2021). Dit zorgde voor een opmars van de otter in Nederland.



Figuur 2. Europese otter (*Lutra lutra*). Foto: Peter Trimming.

II. MUSKUSRAT

De muskusrat (*Ondatra zibethicus*) is, net als de otter, een semi-aquatisch zoogdier (Fig. 3). Deze soort is inheems in Noord-Amerika, maar werd door menselijk handelen geïntroduceerd in Europa en Noord-Azië en is in deze regio's gekend als een invasieve uitheemse soort (IUS). Door het feit dat deze soort ziekteverwekkers verspreid en aanzienlijke schade veroorzaakt aan landbouwgewassen, dijken en oevers, wordt er veel moeite gedaan om deze soort te bestrijden. Bovendien kan de hoge fecunditeit, in combinatie met het ontbreken van natuurlijke vijanden, leiden tot een explosieve populatiegroei, waardoor het ecologische evenwicht verstoord kan raken. De muskusrat staat daarom sedert 2017 op de Europese Unielijst voor invasieve soorten (EU-verordening 1143/2014). Dit houdt in dat de soort niet verhandeld, gekweekt, getransporteerd of geïmporteerd mag worden, en men ook niet in het bezit mag zijn van deze soort. Bovendien hebben Europese lidstaten verplichtingen om de verspreiding van de muskusrat actief tegen te gaan en de ecologische schade te beperken.

In het Waterschap Brabantse Delta komt de muskusrat regelmatig voor en vindt actieve eradicatie frequent en vaak intensief plaats. Hierdoor loopt men in uitzonderlijke gevallen het risico op bijvangst, zoals bijvoorbeeld de zeldzame otter. Het is dan ook uitermate belangrijk dat bestrijdings- en eradicatiemaatregelen tegen deze IUS geen bijkomende negatieve invloed hebben op eventuele nieuwe kolonisaties in hetzelfde gebied door otter. Vandaar de vraag vanuit het Waterschap Brabantse Delta aan het INBO om via eDNA-analyses de aanwezigheid van de muskusrat in parallel met otter in het studiegebied in kaart te brengen. Op basis hiervan kunnen bestrijdingsmethodes worden afgestemd op de aanwezigheid van otter. Op locaties waar beide soorten gedetecteerd werden, kan het type vangtuig bijvoorbeeld worden aangepast, met als doel muskusrat zoveel als mogelijk en op een efficiënte manier te bestrijden, zonder hierbij de mogelijk aanwezige otter schade te berokkenen.

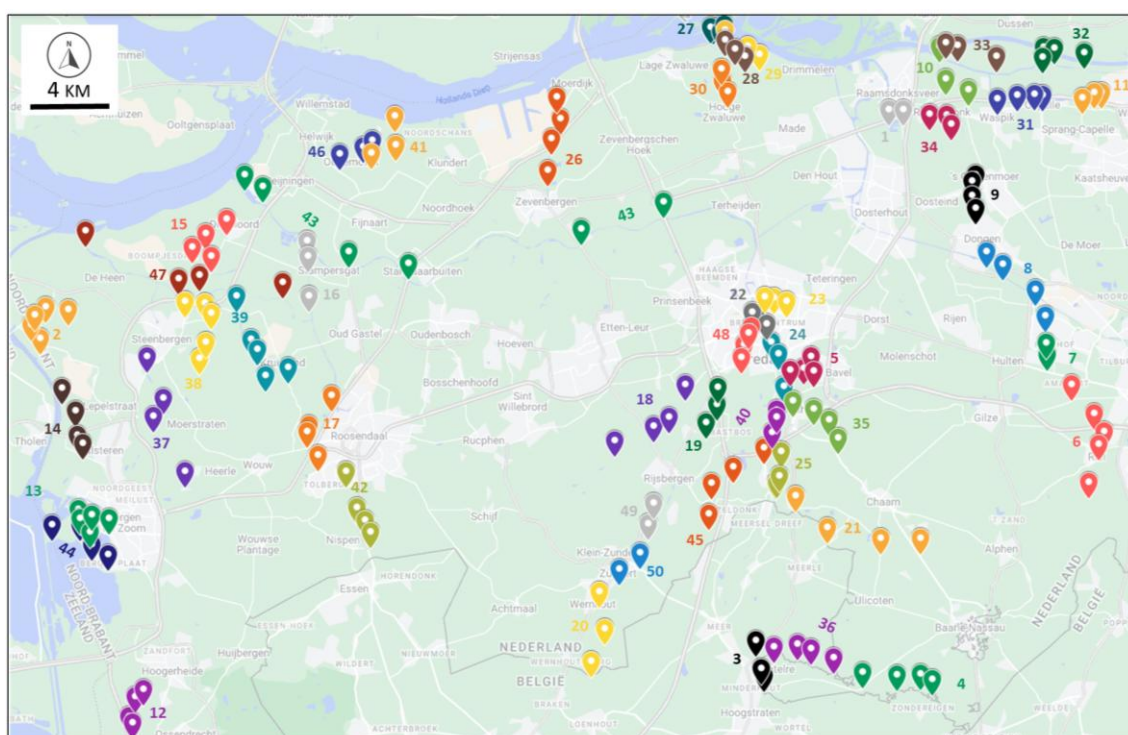


Figuur 3. Muskusrat (*Ondatra zibethicus*). Foto: USO

3. TECHNISCHE DETAILS

1. STAALNAME IN HET VELD

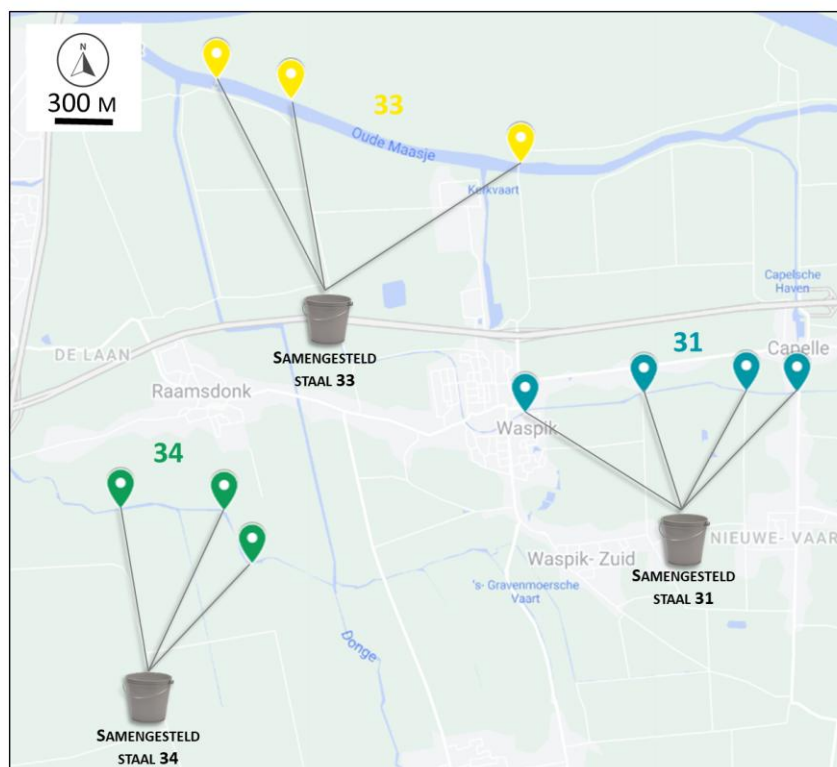
De eDNA-staalnames werden in 2024 uitgevoerd tussen 19 juli en 12 augustus in 50 riviertransecten van het Waterschap Brabantse Delta. Voorafgaand aan de bemonstering werd voor elk waterlichaam een aantal transecten geselecteerd, die vervolgens werden opgedeeld in meerdere staalnamelocaties om een gebiedsdekkende staalname te realiseren. Op deze wijze werden 182 locaties bezocht waar water werd verzameld. Zo bekwamen we een representatief beeld van de huidige verspreiding van zowel otter als muskusrat, alsook de aanwezige visgemeenschappen in het studiegebied (Fig. 4).



Figuur 4. Overzicht van de 50 riviertransecten in het Waterschap Brabantse Delta, waarbinnen in totaal op 182 staalnamelocaties water werd bemonsterd in de zomer van 2024 om via eDNA-analyses de aanwezigheid van otter, muskusrat, en de aanwezige visgemeenschappen in kaart te brengen. De staalnamelocaties binnen eenzelfde transect worden weergegeven in dezelfde kleur.

Alle waterstalen genomen binnen eenzelfde riviertransect werden samengevoegd om zo een samengesteld waterstaal te bekomen (Fig. 5 en 6). Door te werken met samengestelde stalen kan er snel en op een efficiënte manier een overzicht bekomen worden van de aanwezigheid van de betreffende soorten in een groter deel van het studiegebied in vergelijking met enkelvoudige stalen (één eDNA-filter per staalnamelocatie). Daarnaast heeft het werken met mengstalen weinig tot geen impact op de detectieresolutie van de doelsoorten (Brys et al., 2021a). In totaal werden in het Waterschap Brabantse Delta 50 riviertransecten geselecteerd op basis van hun toegankelijkheid en de gebiedskennis van het Waterschap Brabantse Delta om een representatief beeld van het studiegebied te verkrijgen. In totaal werden 182 staalnamelocaties binnen die 50 riviertransecten bemonsterd, wat finaal resulteerde in 50 eDNA-stalen waarin de aanwezigheid van otter, muskusrat en de aanwezige visgemeenschappen werd onderzocht (Fig. 4).

Figuur 5. Enkele staalnamelocaties in het Waterschap Brabantse Delta, a) Aa of Weerij, b) Boven Mark, c) zijstroom van de Mark, en d) hoogwatergeul van de Boven Mark. Elk van deze locaties werd bemonsterd in het kader van het eDNA-onderzoek voor de detectie van otter, muskusrat en de aanwezige visgemeenschappen in de zomer van 2024.



Figuur 6. Voorbeeld van verschillende staalnamelocaties gesitueerd binnen drie verschillende riviertransecten in het Waterschap Brabantse Delta. Stalen genomen op de staalnamelocaties binnen een transect werden samengevoegd tot een mengstaal wat na filtratie resulteerde in één eDNA-staal dat onderworpen werd aan de verschillende DNA-analyses om de aanwezigheid van otter en muskusrat in kaart te brengen, en de samenstelling van de aanwezige visgemeenschappen te onderzoeken.

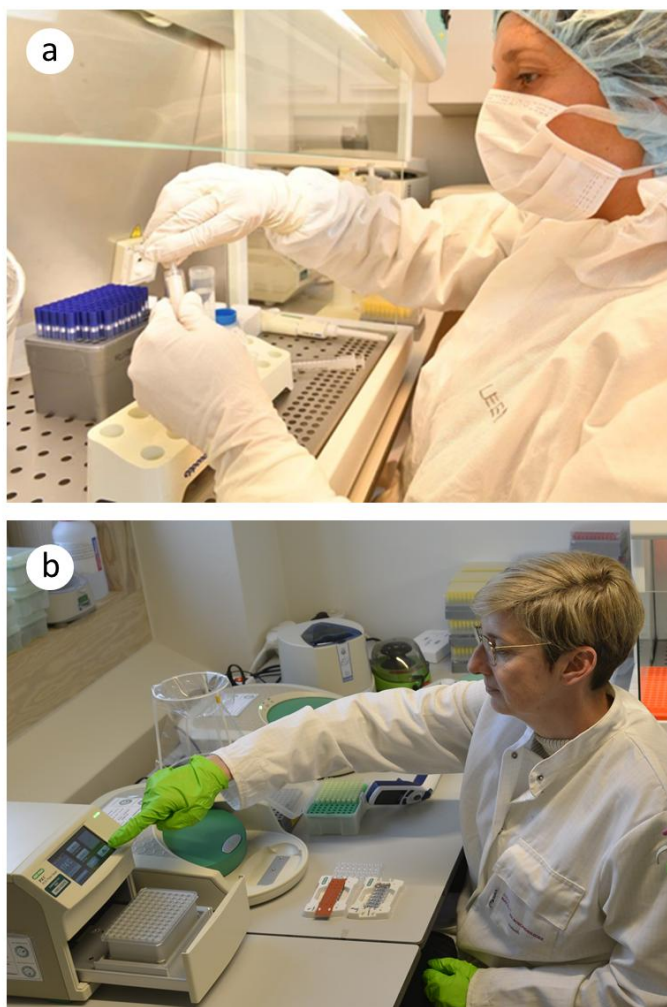
Waar vissen en amfibieën het grootste deel van, of zelfs geheel hun levensloop doorbrengen in het water, zijn semi-aquatische zoogdieren zoals otter en muskusrat slechts gering terug te vinden in de waterlopen. Hierdoor worden slechts hele lage DNA-concentraties in het water afgegeven (Harper et al., 2019). Dit zorgt ervoor dat opsporing via eDNA in het water een uitdaging vormt. De grote reikwijdte van het eDNA-signaal in waterlopen, in combinatie met de fijngevoeligheid van de gebruikte methodiek (barcoding via ddPCR-analyses voor otter en muskusrat, en metabarcoding voor de visgemeenschappen, zie verder) en het gebruik van mengstalen, zorgt er alsnog voor dat we met grote zekerheid de soorten kunnen lokaliseren in de onderzochte riviertransecten, en dit zelfs bij erg lage dichtheden van de betreffende soorten. In een latere fase kan bijkomend onderzoek binnen de riviertransecten extra inzichten bieden over gedetailleerder habitatgebruik van de doelsoorten.

Op elk van de staalnamelocaties werd langsheen de oever van de rivier telkens meerdere malen een halve liter oppervlaktewater geschept (Fig. 7a-b) dat vervolgens in een steriele (d.w.z. vrij van DNA) emmer werd gedeponed (Fig. 7c). Voor het nemen van de waterstalen werd een uitschuifbare staalnamestok gebruikt, waar aan het uiteinde een steriel zakje bevestigd werd om zo het water vanaf de oever te kunnen opscheppen. Het water van de verschillende staalnamelocaties per riviertransect werd vervolgens in de emmer gehomogeniseerd. Dit samengestelde staal werd dan met behulp van een peristaltische pomp door een gesloten filtercapsule met geïntegreerde prefilter (Sterlitech, 50 mm diameter spuitfilter, een geïntegreerde 5 µm glasvezel voorfilter en een 0,8 µm PES-membraan) gepompt (Fig. 7d). Er werd gefilterd tot de filter verzadigd was, waarna het resterende water in de filter werd verwijderd door, met dezelfde peristaltische pomp, lucht door de capsule te persen. Vervolgens werden het gefilterde watervolume alsook de precieze staalnamelocatie en het nummer van elke filter genoteerd. Met deze gegevens kan nadien het aantal eDNA-kopieën/µl per liter gefilterd water (de gecorrigeerde DNA-concentratie) berekend worden. Tot slot werden de filters meteen in een vriesbox (-18°C) opgeslagen tot ze op het einde van de staalnamedag in een diepvries (-20°C) konden worden bewaard. Dit is noodzakelijk om de afbraak van het eDNA op de filter door enerzijds ultraviolette straling en anderzijds microbiële activiteit te vermijden in afwachting van de verdere verwerking in het labo.

Bij het nemen van de waterstalen in het veld werd steeds een strikt en gestandaardiseerd stappenplan gevolgd om contaminatie van de uiteindelijke eDNA-stalen met systeemvreemd DNA te vermijden. Deze procedure dient er eveneens toe te voorkomen dat ziektekiemen, schimmels of invasieve uitheemse soorten door de staalname van het ene waterlichaam naar het andere zouden worden overgebracht. Daarvoor werd steeds met steriel voorverpakt materiaal gewerkt (zoals zakjes, handschoenen, etc.). Herbruikbaar staalnamemateriaal (zoals de uitschuifbare staalnamestok, maatbeker en emmer) werd steeds na elke staalname grondig gereinigd en ontsmet met 2 % Virkon S (Antec –Dupont Suffolk, UK).

II. LABO ANALYSES EN KWALITEITSCONTROLE

Het eDNA dat op de filters werd gecapteerd, werd met behulp van een extractiekit (Qiagen Blood & Tissue) geëxtraheerd volgens het protocol van de fabrikant (Fig. 8). Het gebruikte protocol voor het extraheren van het DNA uit de filters staat ook beschreven in Everts et al. (2021). Nadien werd het eDNA-extract onderworpen aan enerzijds de ddPCR-methode (barcoding) om de aanwezigheid van otter en muskusrat op te sporen, en anderzijds aan metabarcoding om de aanwezige visgemeenschappen in kaart te brengen.

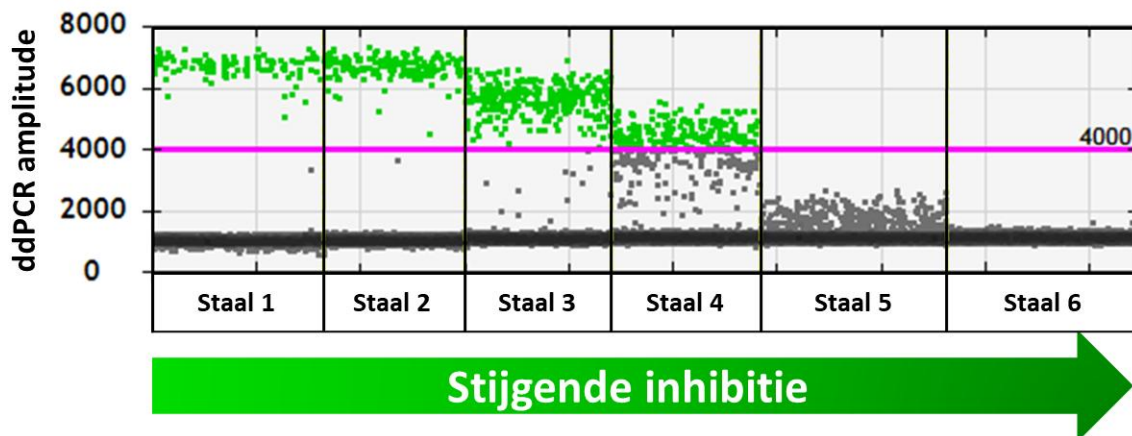


Figuur 8. Laboprotocol dat werd gevolgd met a) DNA-extractie van de filters en, indien nodig, reiniging van de DNA-extracten, uitgevoerd in een DNA-vrije laboratoriuminfrastructuur bij het INBO, en b) voorbereiding van een 96-well plaat voor de uiteindelijke meting van de DNA-concentraties van de doelsoort in de ddPCR-machine.

Tijdens de laboprocedure werden steeds een reeks controlestappen ingebouwd die toelaten de kwaliteit van de eDNA-stalen en de efficiëntie van zowel de DNA-extractie als de PCR-reacties te beoordelen. Dit geeft ons inzichten over de kwaliteit van de gegenereerde data voordat tot effectieve interpretatie van de resultaten wordt overgegaan. Om vals negatieve detecties (d.w.z. foutief vaststellen dat de doelsoort afwezig is) uit te sluiten, werden positieve controles in de workflow opgenomen en onderzocht. Dit gebeurde zowel op het niveau van de extractie (door toevoeging van systeemvreemd DNA aan elk staal), als op het niveau van de PCR-amplificatie (door analyses van een referentieweefselstaal van de doelsoort). Bijkomend werden ook laboblanco's ingebouwd. Dit zijn stalen zonder DNA die identiek worden behandeld als de eDNA-stalen. Met deze controle kunnen we nagaan of doorheen het laboproces geen vals positieve detectie plaatsvindt (d.w.z. foutief vaststellen dat de doelsoort aanwezig is), wat een gevolg zou kunnen zijn van genetische contaminatie, zowel op het niveau van de DNA-extractie als op het niveau van de soort-specifieke PCR-amplificatie van het DNA-extract. In totaal werden dus drie controlestappen ingebouwd:

- (1) Interne positieve extractie controle (IPEC): toevoeging van systeemvreemd DNA aan elk staal. Dit is DNA van een soort die hier met absolute zekerheid niet voorkomt (Dengue virus DNA in dit geval, zie ook Brys et al., 2021b). Deze controle sluit *vals negatieve* PCR-resultaten uit, die veroorzaakt kunnen worden door problemen tijdens DNA-extractie en/of PCR-reactie (Fig. 9).
- (2) Positieve PCR-controle (RF): toevoeging van referentie ("target") DNA van de doelsoort aan de PCR-mix. Deze controle sluit *vals negatieve* PCR-resultaten uit, die veroorzaakt kunnen worden door mogelijke fouten tijdens het PCR-amplificatieproces.
- (3) Negatieve PCR controles (NTC): laboblanco's (stalen zonder DNA) ter controle van eventuele contaminatie met systeemvreemd DNA tijdens het analyseproces, die dienen om *vals positieve* PCR-resultaten te kunnen uitsluiten.

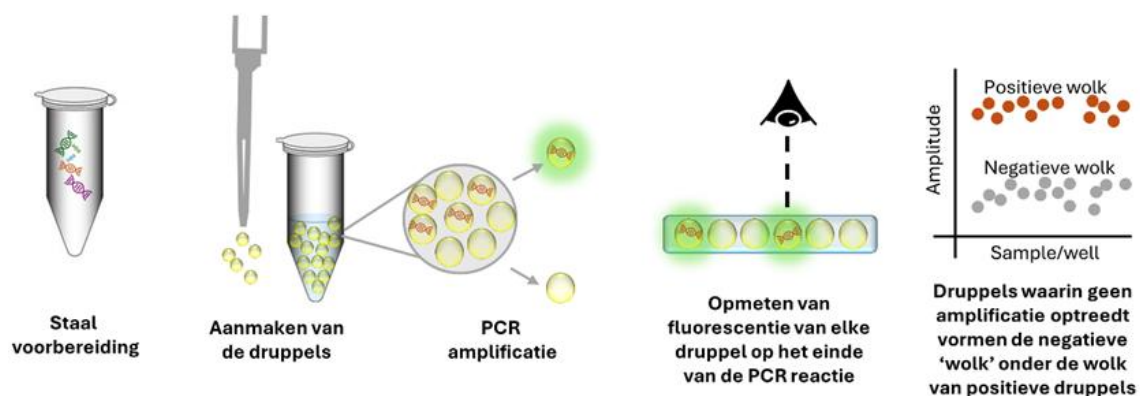
Als de positieve druppels van de IPEC optreden bij de verwachte amplitude, kan men er zeker van zijn dat een optimale amplificatie heeft plaatsgevonden in dat staal, zonder enig risico op inhibitie van het PCR-proces of indicatie dat het extractieprotocol mogelijk mislukt is (Fig. 9). In dat geval kunnen verdere routine-analyses via de ddPCR-methode en/of via metabarcoding worden uitgevoerd. Indien er toch sprake is van inhibitie van het PCR-proces, zal een verdunning of reiniging (met de DNeasy Powerclean Cleanup kit) van de DNA-extracten nodig zijn alvorens verdere ddPCR-analyses kunnen plaatsvinden.



Figuur 9. In deze illustratie wordt het effect van inhibitie op de amplificatie van een interne positieve controle onderzocht. De stalen werden hiervoor aangerijkt met een positieve controle (IPEC, een plasmide) in de eerste stap van het extractieprotocol, om te testen op succesvolle extractie en/of de aanwezigheid van mogelijke inhibitie van het PCR-proces. Wanneer bij het uitlezen van de labo-resultaten positieve druppels rond een amplitude van 7.000 gevonden worden, vindt optimale amplificatie plaats (zie stalen 1 en 2). Vanaf staal 3 beïnvloedt inhibitie duidelijk de amplificatie, en vanaf staal 4 beïnvloedt het de gemeten concentratie. In het meest extreme scenario (stalen 5 en 6) is de amplificatie volledig geblokkeerd. Stalen met een gemiddelde positieve IPEC-wolk boven de amplitudedrempel van 4.000 (stalen 1, 2 en 3) worden verondersteld optimaal te reageren en kunnen zonder verdunning of reiniging met de doelassay(s) worden getest. Stalen 5 en 6 hebben duidelijk een verdunning of reiniging nodig alvorens verdere analyses kunnen plaatsvinden (aangepast van Brys et al., 2022).

Eens het eDNA dat aanwezig was op de filters correct geëxtraheerd werd, en een grondige kwaliteitscontrole van de eDNA-extracten werd uitgevoerd, kan het ddPCR-proces voor de detectie van de betreffende doelsoorten opgestart worden. Binnen dit onderzoek zijn we in de eerste plaats geïnteresseerd in de aanwezigheid van welbepaalde soorten, namelijk Europese otter en muskusrat. In dit geval spreken we van 'eDNA barcoding'. In dit proces wordt een DNA-fragment op de genetische blauwdruk van een doelsoort afgebakend waarvan de samenstelling uniek is voor de betreffende doelsoort. Dit fragment, ook wel barcode genoemd, is dus uniek voor een soort en kan nooit met een andere soort verward worden. Deze barcode werd vervolgens vermeerderd via de PCR-techniek, en wanneer na droplet digital PCR (of kortweg ddPCR) analyse succesvolle vermeerdering van deze barcode wordt gemeten, duidt dit op de aanwezigheid van de doelsoort.

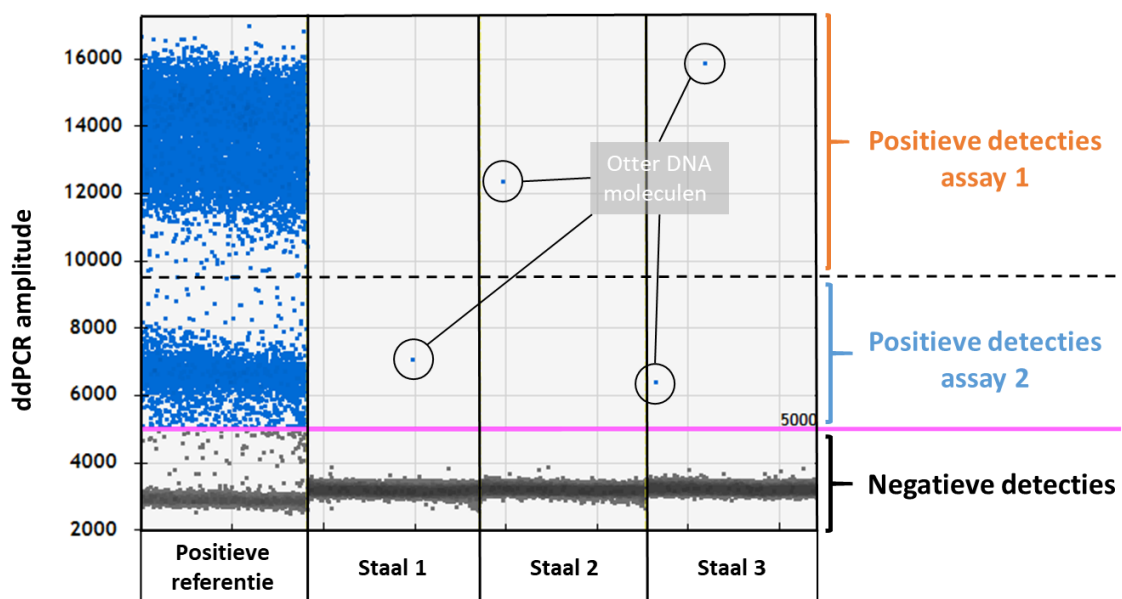
Het INBO zet sterk in op de ontwikkeling en verfijning van soort-specifieke eDNA-detectiemethoden en monitort op deze manier een breed assortiment van soorten, gaande van kikkers tot vissen en zoogdieren. Hierbij wordt gebruik gemaakt van de ddPCR-methode (Fig. 10). Dit is een specifieke variant op de eerder vermelde PCR-reacties. Tijdens het proces van de ddPCR-analyses wordt het mengsel van het geëxtraheerde DNA en reagentia verneveld en gecapteerd in een groot aantal druppels ($> 20\,000$). In elk van deze druppels vinden individuele, onafhankelijke PCR-reacties plaats. Het voordeel van deze methode is dat ook substanties die de PCR-reactie kunnen blokkeren op deze manier worden verdeeld en worden verdund over al deze druppels, waardoor ze niet langer de gehele PCR-reactie kunnen verstoren (in tegenstelling tot klassieke PCR-methoden, zoals qPCR). Op deze manier kan op een uiterst nauwkeurige wijze nagegaan worden of een soort al dan niet aanwezig is. Bovendien kan de concentratie van het eDNA van een doelsoort in een staal zeer precies gemeten worden, wat bijkomende informatie oplevert over de abundantie of dichtheid van de soort op de locatie waar het staal werd genomen. Een bijkomend pluspunt van eDNA is dat de aanwezigheid van een soort binnen een tijdsbestek van een aantal dagen nog kan worden waargenomen. De soort moet met andere woorden niet noodzakelijk aanwezig zijn op het moment dat het staal wordt genomen.



Figuur 10. Overzicht van de verschillende stappen die worden doorlopen bij een droplet digital PCR (ddPCR) analyse zoals uitgevoerd binnen deze studie voor de detectie van otter- en muskusrat-eDNA in verschillende waterlopen in het Waterschap Brabantse Delta in de zomer van 2024. Figuur uit Van Driessche et al., 2024b.

• Detectie van otter

Voor de detectie van otter-DNA in de eDNA-waterstalen, werd gebruik gemaakt van twee gevalideerde en nauwkeurig geteste primer/probe assays. Deze protocollen maken gebruik van een 116 bp lang fragment dat gelegen is op het mitochondriaal cytochroom b (Cytb) locus (assay 1) en een 159 bp lang fragment dat gelegen is op het mitochondriaal cytochroom C oxidase subunit 1 (COI) locus (assay 2). Deze protocollen werden binnen het INBO geoptimaliseerd voor gebruik op het ddPCR-platform voor otterdetectie, en genereren bij positieve stalen druppels in twee afzonderlijke ‘wolken’, één die zich grofweg situeert rond een amplitude van 7.000 (assay 2) en de andere rond 14.000 (assay 1) (Fig. 11).



Positieve detecties van Europese otter DNA

Figuur 11. Illustratie van de ddPCR-output verkregen met de QuantaSoft software. Uiterst links staat het positieve referentiestaal (met otterweefsel) weergegeven. Verder worden er drie eDNA-stalen weergegeven. In elk van deze stalen kunnen de positieve detecties door assay 1 en assay 2 onderscheiden worden door het verschil in overeenkomstige ddPCR-amplitude, namelijk rond 14.000 voor assay 1 en rond 7.000 voor assay 2. De roze lijn stelt de drempelamplitude voor op een amplitude van 5.000. Boven deze amplitude worden druppels als positieve detecties beschouwd, terwijl druppels onder deze amplitude als negatieve (niet-) detecties worden beschouwd (aangepast van Brys et al., 2022).

Het voordeel van het gebruik van twee verschillende en onafhankelijke otter-specifieke assays die zich op twee verschillende loci bevinden, is dat het resulteert in betrouwbaardere positieve detecties, aangezien het een dubbele bevestiging geeft dat otter aanwezig is wanneer beide assays resulteren in een positieve amplificatie binnen een bepaald staal (Brys et al., 2023).

Door gebruik te maken van dit protocol werd ieder staal uiteindelijk in zes replicaten onderzocht op de aanwezigheid van otter. Tegelijkertijd werd nagegaan of in elk staal de toegevoegde positieve controle onder de verwachte concentratie kon worden gedetecteerd. Dit stelt ons in staat om na te gaan of er eventuele PCR-inhibitie optreedt, en of dit verdwijnt door de stalen te verdunnen. In totaal werden op deze manier 312 ddPCR-metingen uitgevoerd (300 voor de stalen, zes NTC's en zes RF's).

- Detectie van muskusrat

Voor de detectie van muskusrat-DNA, werd gebruik gemaakt van twee beschreven primer/probe protocollen die door de universiteit van Amsterdam werden ontwikkeld. Deze protocollen werden oorspronkelijk ontwikkeld voor de *quantitative PCR* (qPCR) methodiek, en maken gebruik van een 107 bp lang fragment dat gelegen is op het mitochondriaal cytochroom C oxidase subunit 1 (COI) locus (Onzi COI genaamd) en van een 99 bp lang fragment dat gelegen is op het mitochondriaal cytochroom b (Cytb) locus (Onzi Cytb genaamd). Deze protocollen werden binnen het INBO geoptimaliseerd en aangepast voor gebruik op het ddPCR-platform en genereren bij positieve stalen druppels die zich voor beide assays grofweg situeren rond een amplitude van 12.000. Wanneer beide assays gecombineerd worden gebruikt, worden daarbovenop ook positieve druppels bij een amplitude van 18.000 gegenereerd indien beide fragmenten zich in dezelfde druppel bevinden.

Ook hier geeft het gebruik van een dubbel primer/probe assay voor het detecteren van muskusrat een verdubbeling in de detectieresolutie en betrouwbaarheid van de analyses, zoals eerder ook beschreven voor het gebruikte otter protocol (zie ook Brys et al., 2023).

Ook bij deze analyses, werd elk staal uiteindelijk zesmaal onderzocht op de aanwezigheid van muskusrat, waardoor op deze manier 312 ddPCR-metingen werden uitgevoerd (300 voor de stalen, zes NTC's en zes RF's).

- In kaart brengen van de visgemeenschappen

Naast de eDNA-barcoding via ddPCR-analyses voor het opsporen van otter en/of muskusrat in de eDNA-stalen, werden de eDNA-extracten ook onderworpen aan een tweede type analyse, genaamd metabarcoding. Deze analyse werd ingezet om de aanwezige visgemeenschappen in elk van de stalen te onderzoeken.

Voor deze metabarcoding-techniek, heeft INBO een betrouwbaar en fijngevoelig protocol ontwikkeld en beschreven, waarin verschillende herhalingen worden opgenomen en controlestappen vervat zitten (zie Brys et al. 2021b; Van Driessche et al., 2024a). Hierbij wordt gebruik gemaakt van een generalistische vertebraat primer (Riaz-primer), gelegen op het mitochondriaal 12S locus, waarvoor INBO een eigen referentiedatabank heeft uitgebouwd (Halfmaerten et al., 2023). Deze referentiedatabank laat toe om alle inheemse, West-Europese zoogdieren, amfibieën en zoetwatervissen accuraat te detecteren en op naam te brengen. Het ontwikkelde protocol maakt gebruik van een DNA-fragment dat ~142 bp lang is en wordt geamplificeerd door middel van de Riaz-primers (12S_F1, 5'-ACTGGGATTAGATACCCC-3'; 12S_R1, 5'-TAGAACAGGCTCCTCTAG-3') (Riaz et al., 2011). Per staal worden hiervoor standaard drie onafhankelijke herhalingen uitgevoerd, waarvan, na opschonen van de ruwe data, verder wordt gewerkt met het gemiddelde resultaat van deze drie technische replicaten. Het gebruikte labo- en bio-informatica protocol staat in detail beschreven in Brys et al. (2021b) alsook verder uitgelegd en toegepast in Van Driessche et al. (2023 & 2024a). Finaal worden enkel de sequenties weerhouden die een 100% match vertonen met één van de soorten in de referentiedatabank. Deze opgeschoonde data, de zogenaamde gesommeerde sequenties per soort voor elk staal, worden in een volgende stap getransformeerd naar de relatieve eDNA-abundantie van elke soort t.o.v. alle andere vissoorten die voorkomen binnen dat betreffende staal. Dit maakt dat het eindproduct van metabarcoding-data steeds een proportioneel aandeel van de betreffende soorten weergeeft t.o.v. alle andere soorten binnen elk genomen eDNA-staal, en dus niet als absolute eDNA-meting kan worden aanzien (in tegenstelling tot de resultaten van de ddPCR-analyses).

www.vlaanderen.be/inbo doi.org/10.21436/inbor.121391450 Pagina 29 van 60

4. RESULTATEN

I. ALGEMEEN

In totaal werden 50 mengstalen genomen voor de detectie van zowel otter, muskusrat als de aanwezige visgemeenschappen in waterlopen gelegen binnen het Waterschap Brabantse Delta. Over alle stalen heen werd gemiddeld $1,77 \pm 0,74$ L water gefilterd per filter, gaande van 0,6 tot 4,0 L per filter (Tabel 1). Verder bedroeg de totale DNA-concentratie van de stalen voor reiniging gemiddeld $83,84 \pm 51,01$ ng/ μ L per filter (variërend van 20 tot 264 ng/ μ L per filter) (Tabel 1). Alle laboblanco's die tijdens de workflow werden ingebouwd, bleken op het einde van het proces negatief. Na de kwaliteitscontrole zoals hierboven beschreven, vertoonden vijftien van de 50 stalen na DNA-extractie tekenen van inhibitie. Dit wil zeggen dat de gemiddelde ddPCR-amplitude van de toegevoegde positieve interne positieve controle (IPEC) druppels buiten de optimale waarden viel. Daarom werden deze stalen eerst onderworpen aan een reinigingsstap alvorens verdere labo-analyses uit te voeren. Er werd geoordeeld dat de resultaten betrouwbaar en herhaalbaar zijn.

eDNA-barcoding van de 50 stalen toonde de aanwezigheid van otter-DNA aan in twee van de 50 stalen (Tabel 1). Bijkomend bleken veertien stalen positief voor de aanwezigheid van muskusrat-DNA, en 35 bleken negatief voor de aanwezigheid van beide soorten (Tabel 1). Dezelfde 50 eDNA-extracten werden eveneens succesvol onderworpen aan metabarcoding-analyses om de aanwezige visgemeenschappen in kaart te brengen.

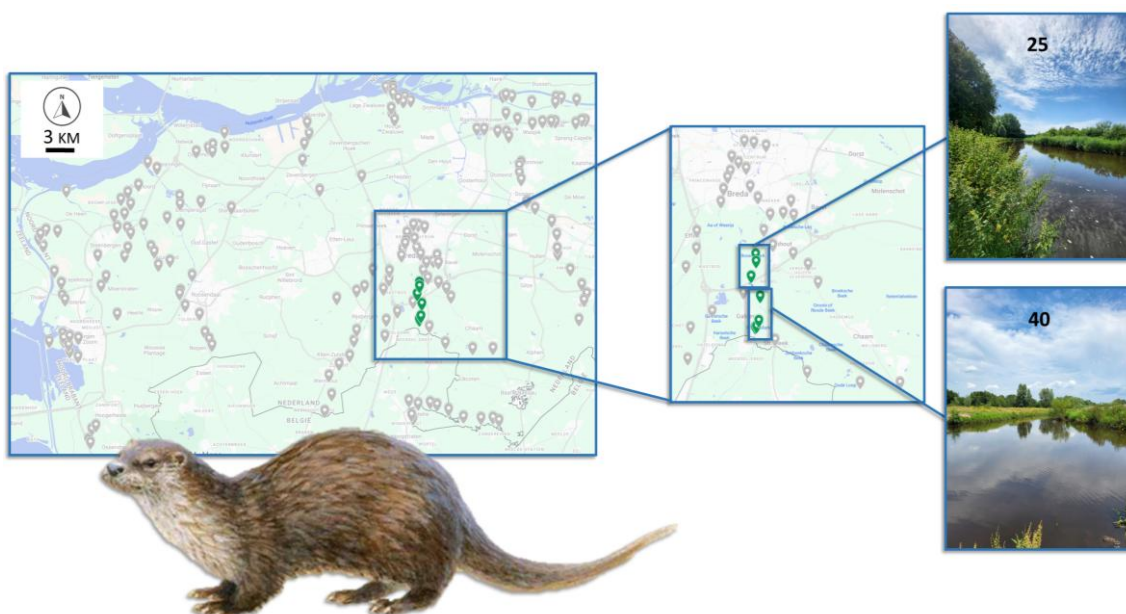
28	Vloedspui	E2024STF737	2000	151
29	Gat van den Ham	E2024STF736	4000	126
30	Gat van den Ham	E2024STF718	2800	71**
31	Zuiderafwateringskanaal	E2024STF716	1000	76**
32	Zuiderkanaal	E2024STF720	3000	75
33	Oude Maasje	E2024STF719	3500	80
34	Donge	E2024STF711	2900	66**
35	Chaamsche Beek	E2024STF742	1000	32
36	Het Merkske	E2024STF692	1400	24**
37	Ligne of Bergsche Water	E2024STF725	800	41
38	Cruislandse Kreken	E2024STF744	1500	61
39	Cruislandse Kreken	E2024STF743	1400	45
40*	Boven Mark	E2024STF722	1750	60
41	Tonnekreek complex	E2024STF695	1000	126
42	Kleine Aa/Watermolen Beek	E2024STF697	2000	49
43	Dintel	E2024STF698	2000	33
44	Plaatvliet	E2024STF728	1500	77
45	Hazeldonksche Beek/Galderse Beek	E2024STF724	2000	29
46	Tonnekreek complex	E2024STF696	1000	151
47	Steenbergsche Vliet	E2024STF746	1300	62
48	Aa of Weerijis	E2024STF749	2400	63
49	Aa of Weerijis	E2024STF732	1600	59
50	Aa of Weerijis	E2024STF731	1800	58

** In transect 40 van de Boven Mark, werden zowel otter- als muskusrat-DNA gedetecteerd, vandaar staat dit transect in het groen gemarkeerd en staat de tekst in het vet en rood gedrukt.*

*** Geeft de totale DNA-concentratie in ng/μl weer na reiniging van het DNA-extract.*

II. OTTER DETECTIES

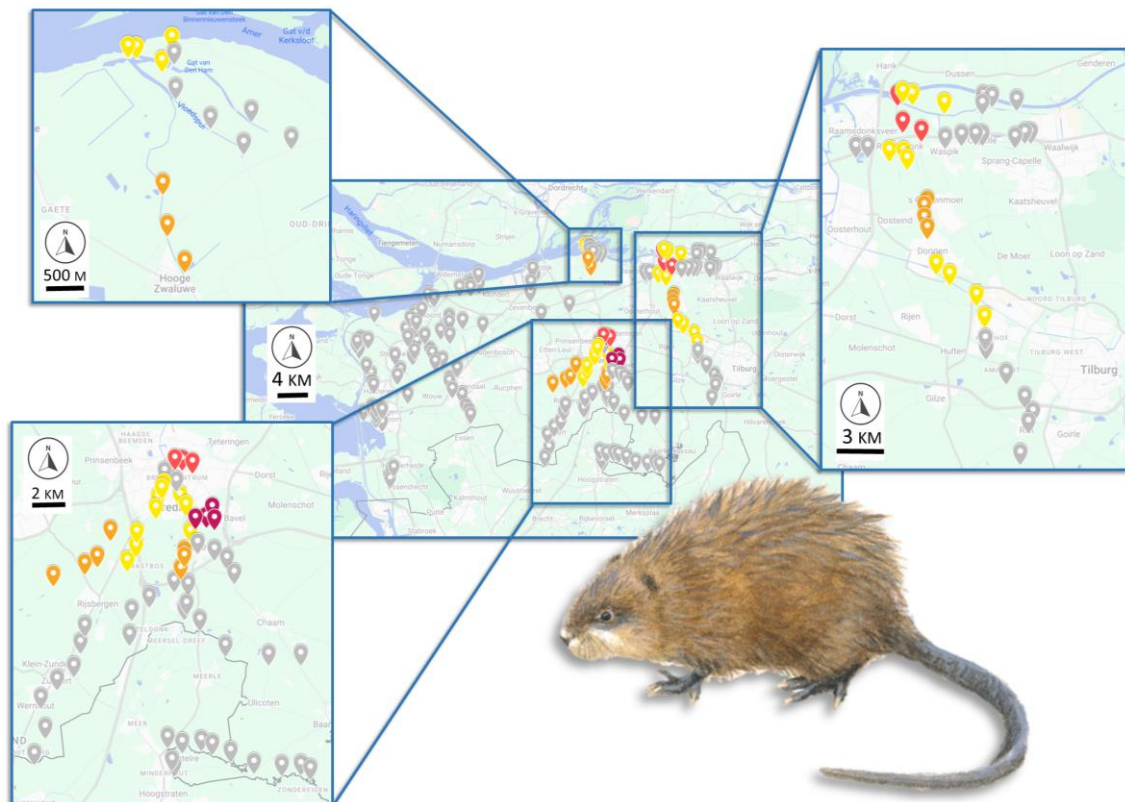
Alle positieve referentiestalen en laboblanco's die aan elke ddPCR-run werden toegevoegd, toonden respectievelijk optimale en geen amplificatie. Dit toont aan dat er tijdens elke ddPCR-run een optimale amplificatie kon plaatsvinden en dat er geen kruiscontaminatie heeft plaatsgevonden tijdens de volledige ddPCR-procedure. Hieruit kan worden geconcludeerd dat er geen risico op vals positieve of vals negatieve detecties aanwezig is, en bijgevolg dat de data betrouwbaar is. In een volgende stap werden elk van de eDNA-waterstalen komende van de 50 riviertransecten gescreend op de aanwezigheid van otter-DNA. Hierbij werden in twee van de 50 stalen DNA-sporen van otter gedetecteerd in lage concentraties (0,02 kopieën/ μ L, gecorrigeerd voor het gefilterde watervolume, groene punten in Fig. 12). Beide riviertransecten (25 en 40) zijn rechtstreeks verbonden met elkaar en zijn gelegen in de Boven Mark tussen Strijbeek en Ulvenhout. In de 48 overige riviertransecten werd geen otter-DNA gedetecteerd, wat aangeeft dat de otter in deze waterlichamen afwezig was op het moment van de staalname en enkele dagen ervoor (grijze punten in Fig. 12).



Figuur 12. Geografisch overzicht van alle staalnamelocaties binnen de 50 verschillende riviertransecten verspreid in het Waterschap Brabantse Delta waar waterstalen werden genomen in kader van het gevoerde eDNA-onderzoek naar de mogelijke aanwezigheid van de Europese otter (*Lutra lutra*). Grijze punten tonen de locaties waar otter niet gedetecteerd kon worden en groene punten geven de locaties weer waar otter (weliswaar met lage concentraties van 0,02 kopieën/ μ L, gecorrigeerd voor het gefilterde watervolume) wel gedetecteerd werd.

III. MUSKUSRAT DETECTIES

Alle positieve referentiestalen en laboblanco's die aan elke ddPCR-run werden toegevoegd, toonden respectievelijk optimale en geen amplificatie. Dit toont aan dat er tijdens elke ddPCR-run een optimale amplificatie kon plaatsvinden en dat er geen kruiscontaminatie heeft plaatsgevonden tijdens de volledige ddPCR-procedure. Hieruit kan worden geconcludeerd dat er geen risico op vals positieve of vals negatieve detecties aanwezig is, en bijgevolg dat de data betrouwbaar is. In een volgende stap werden elk van de eDNA-waterstalen afkomstig van de 50 riviertransecten gescreend op de aanwezigheid van muskusrat-DNA. Hierbij werd in veertien (28%) van de 50 stalen DNA-sporen van muskusrat gedetecteerd (Fig. 13 en Tabel 2). De laagste concentraties ($< 0,02$ kopieën/ μL , gecorrigeerd voor het gefilterde watervolume) werden gedetecteerd in de volgende zeven transecten: 8, 19, 24, 27, 33, 34 en 48 (gele punten in Fig. 13, Tabel 2). In vier transecten (9, 18, 30 en 40) werd muskusrat-DNA in matige concentraties (tussen $0,02$ en $0,04$ kopieën/ μL , gecorrigeerd voor het gefilterde watervolume) gedetecteerd (oranje punten in Fig. 13, Tabel 2). Aanzienlijke muskusrat-DNA concentraties (tussen $0,05$ en $0,10$ kopieën/ μL , gecorrigeerd voor het gefilterde watervolume) werden in transecten 10 (in het Zuiderafwateringskanaal) en 23 (in de Mark ten noorden van Breda binnenstad) gedetecteerd (rode punten in Fig. 13, Tabel 2). Veruit de hoogste concentratie van muskusrat-DNA ($0,72$ kopieën/ μL , gecorrigeerd voor het gefilterde watervolume) werd gedetecteerd in het staal afkomstig van transect 5 in de Bavelse Leij ten noorden van Ulvenhout (paarse punten in Fig. 13, Tabel 2). In de 36 overige transecten kon geen muskusrat-DNA worden gedetecteerd, wat aangeeft dat muskusrat in deze waterlichamen afwezig was op het moment van de staalname en enkele dagen ervoor (grijze punten in Fig. 13).

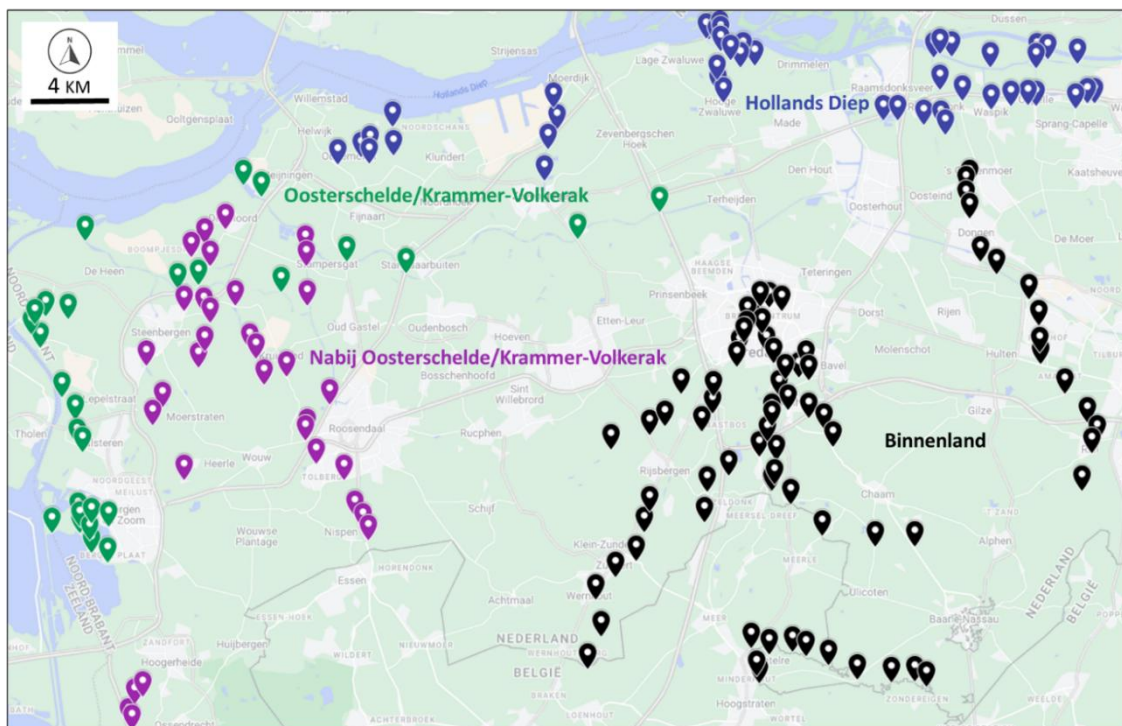


Figuur 13. Geografisch overzicht van alle staalnamelocaties binnen de 50 verschillende riviertransecten verspreid in het Waterschap Brabantse Delta waar waterstalen werden genomen in kader van het gevoerde eDNA-onderzoek naar de mogelijke aanwezigheid van de muskusrat (*Ondatra zibethicus*). Grijs punten geven de locaties weer waar muskusrat niet gedetecteerd kon worden, gele punten geven de locaties weer waar muskusrat met erg lage DNA-concentraties ($< 0,02$ kopieën/ μL) werd gedetecteerd, oranje punten geven de locaties weer waar muskusrat met matige DNA-concentraties (tussen $0,02$ en $0,04$ kopieën/ μL) werd gedetecteerd en rode punten geven de locaties weer waar muskusrat met aanzienlijke DNA-concentraties (tussen $0,05$ en $0,10$ kopieën/ μL) werd gedetecteerd. Tot slot geven de paarse punten de locaties weer waar muskusrat met de hoogste DNA-concentraties werd gedetecteerd ($> 0,70$ kopieën/ μL). Alle bovengenoemde concentraties zijn weergegeven in kopieën/ μL , gecorrigeerd voor het gefilterde watervolume.

IV. AANWEZIGE VISGEMEENSCHAPPEN

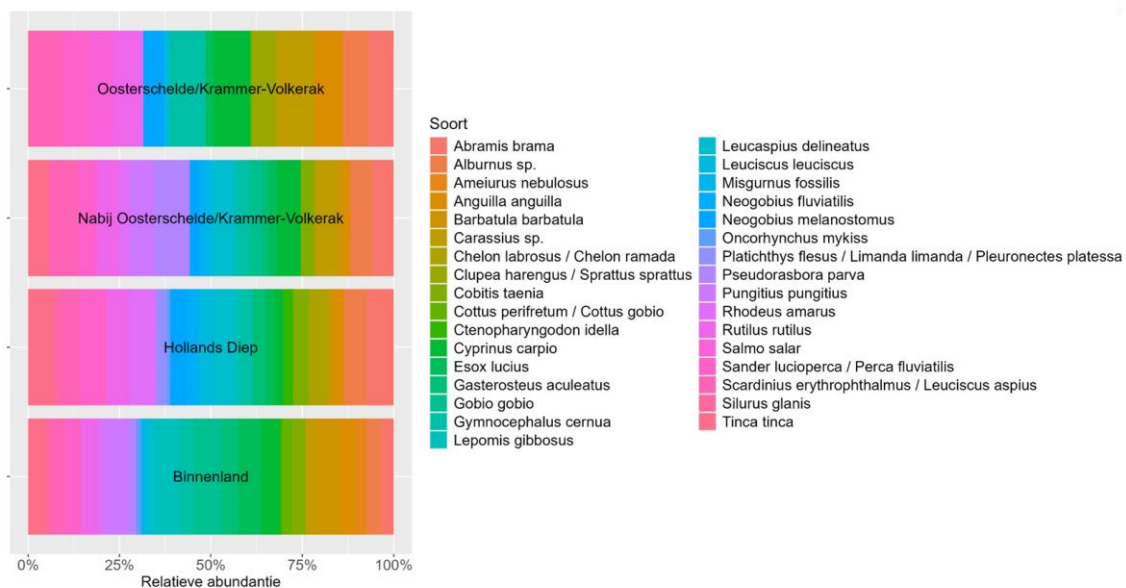
- Algemeen

Om de aanwezige visgemeenschappen binnen de onderzochte watersystemen in kaart te brengen, werden dezelfde 50 eDNA-stalen onderworpen aan een metabarcoding-analyse. Om de resultaten overzichtelijk te presenteren werd het onderzochte studiegebied geografisch onderverdeeld in vier regio's (Fig. 14). De veertien riviertransecten aangeduid met blauwe punten in Fig. 14 werden samen genomen onder de regio 'Hollands Diep' aangezien deze transecten vlakbij de rivierarm Hollands Diep gelegen zijn of er mee in verbinding staan. De zes transecten aangeduid met groene punten in Fig. 14 werden samen genomen onder de regio 'Oosterschelde/Krammer-Volkerak' aangezien deze vlakbij de Oosterschelde of het gebied Krammer-Volkerak gelegen zijn of hier rechtstreeks mee in contact staan. De voorheen genoemde regio's worden verwacht onder invloed te staan van water gekenmerkt door een hogere saliniteit. De 22 transecten het verst gelegen van de rivierarm en de Oosterschelde werden samen genomen in de regio 'Binnenland' en aangeduid met de zwarte punten in Fig. 14. Tot slot werden de overige acht transecten (paarse punten in Fig. 14) samen genomen onder de regio 'Nabij Oosterschelde/Krammer-Volkerak', aangezien deze geen directe invloed van het water uit het Hollands Diep, de Oosterschelde noch uit het gebied Krammer-Volkerak ondervinden, ondanks de geografische nabijheid.



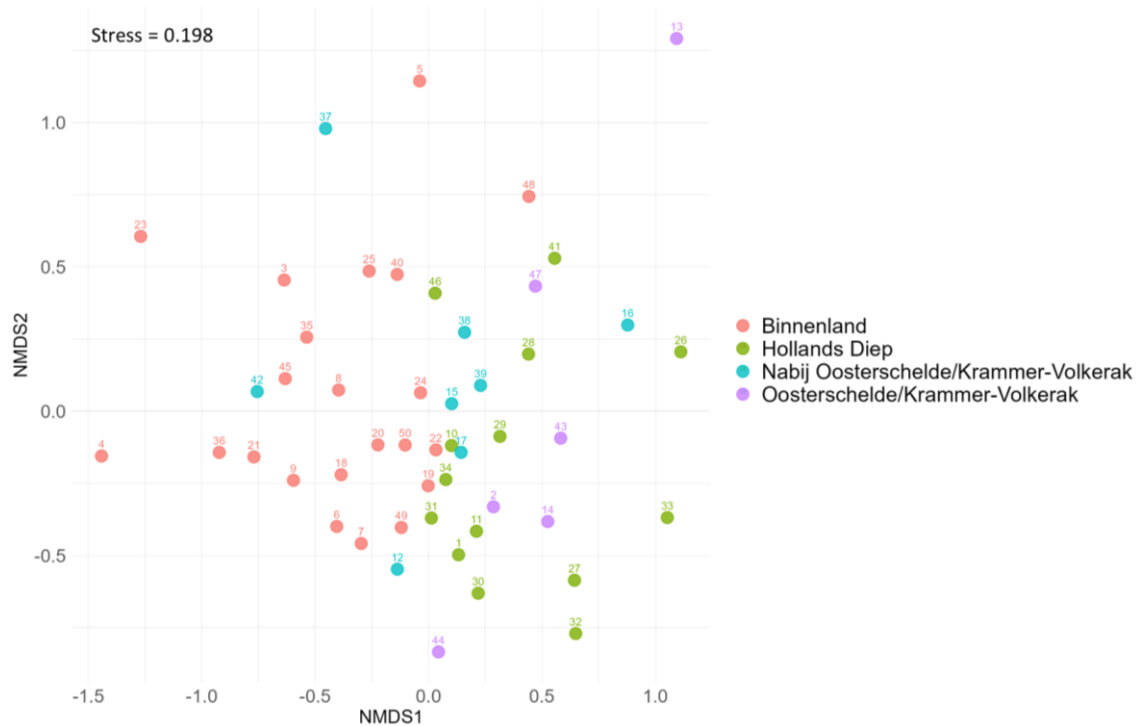
Figuur 14. Geografisch overzicht van alle staalnamelocaties binnen de vier regio's verspreid in het Waterschap Brabantse Delta zoals onderzocht binnen deze studie. De zwarte punten zijn de staalnamelocaties binnen de regio 'Binnenland', de paarse punten zijn de staalnamelocaties binnen de regio 'Nabij Oosterschelde/Krammer-Volkerak', de blauwe punten geven de staalnamelocaties weer binnen de regio 'Hollands Diep', terwijl de groene punten de staalnamelocaties binnen de regio 'Oosterschelde/Krammer-Volkerak' aanduiden.

Visueel valt in geen van de vier regio's een specifieke vissoort op als meest of minst abundant (Fig. 15). Wel werden sommige soorten slechts in één regio aangetroffen. Zo werd de bruine (Amerikaanse) dwergmeerval, die de voorkeur geeft aan traag stromende watersystemen, uitsluitend in 'Binnenland' gedetecteerd, terwijl bot/schar/schol (*Platichthys flesus/Limanda limanda/Pleuronectes platessa*) en de Pontische stroomgrondel enkel in 'Hollands Diep' voorkwamen. In 'Oosterschelde/Krammer-Volkerak' werden sporadisch zalm (*Salmo salar*) en haring/sprot (*Clupea harengus/Sprattus sprattus*) aangetroffen. Hoewel de detectie van zalm deels kan voortkomen uit menselijke consumptie, wijst de ecologie van de soort op een geschikt habitat in de nabijheid van het studiegebied, wat de detectie via eDNA kan verklaren. Na terugkoppeling met het Waterschap Brabantse Delta valt de detectie van zalm echter niet als eenduidig te interpreteren. Bijkomend onderzoek zou hierover uitsluitsel kunnen geven. Momenteel onderzoekt het INBO in diverse waterlopen in welke mate menselijke consumptie van een reeks vissoorten de detectie van deze soorten in een natuurlijke omgeving beïnvloedt.

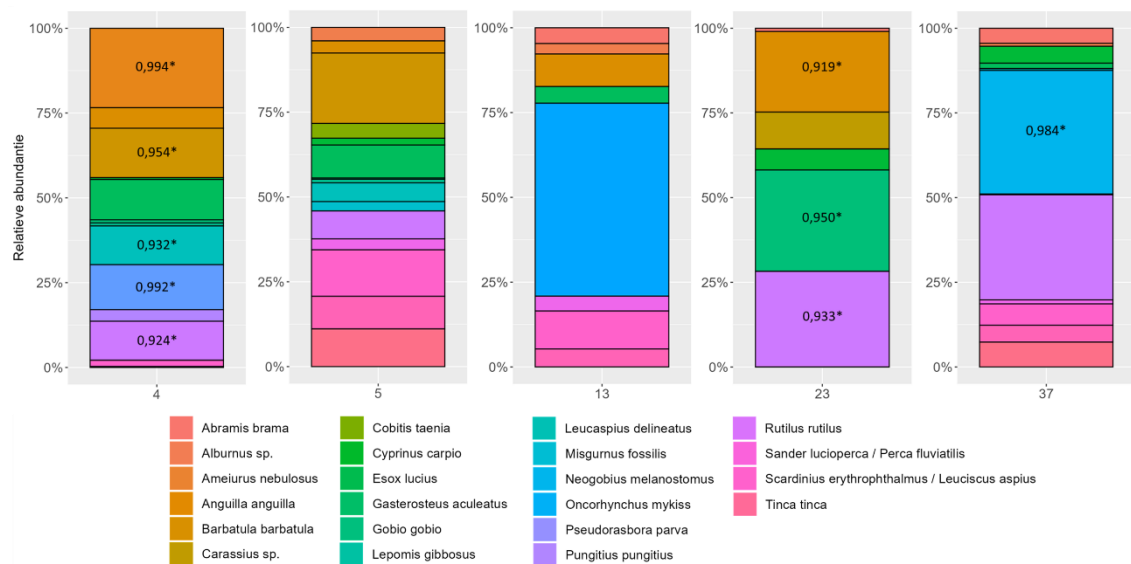


Figuur 15. Relatieve eDNA-abundantie van alle gedetecteerde vissoorten in alle stalen genomen in de verschillende regio's in het Waterschap Brabantse Delta.

Visueel toont de NMDS-plot (Fig. 16) aan dat de visgemeenschappen in enkele riviertransecten sterk afwijken (nl. 4, 5, 13, 23 en 37). Bij nader onderzoek via een 'indicator species analysis' vonden we dat steeds één of enkele indicatorsoort(en) bijdragen aan deze verschillen in transecten 4, 23 en 37 (Fig. 17 en Tabel 3). Via dezelfde analyse kon geen indicatorsoort bepaald worden voor de transecten 5 en 13 (Fig. 17 en Tabel 3).



Figuur 16. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot van alle stalen genomen tijdens dit onderzoek. De stalen werden onderverdeeld in verschillende regio's en worden weergegeven in verschillende kleuren.



Figuur 17. Relatieve eDNA-abundanties van de gedetecteerde vissoorten in de afwijkende riviertransecten 4, 5, 13, 23 en 37. Elke kleur geeft een andere vissoort weer en per riviertransect staan de indicatorsoorten weergegeven met hun stat-waarde. De asterisken geven de niveaus van significantie weer: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabel 3. Resultaten van de ‘indicator species analysis’ voor de vijf afwijkende stalen uit de NMDS-plot (Fig. 16). De vissoorten die significant geassocieerd zijn met een riviertransect staan weergegeven, met de bijhorende indicatorwaarde tussen haakjes. De asterisken geven de niveaus van significantie weer: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Riviertransecten waarvoor geen indicatiesoort gedetecteerd kon worden, staan aangeduid met een /.

Riviertransecten	Soort
4	<i>Ameiurus nebulus</i> * (0.994) <i>Oncorhynchus mykiss</i> * (0.992) <i>Barbatula barbatula</i> * (0.954) <i>Lepomis gibbosus</i> * (0.932) <i>Pungitius pungitius</i> * (0.924)
5	/
13	/
23	<i>Gasterosteus aculeatus</i> * (0.950) <i>Pungitius pungitius</i> * (0.933) <i>Anguilla anguilla</i> * (0.919)
37	<i>Misgurnus fossilis</i> * (0.984)

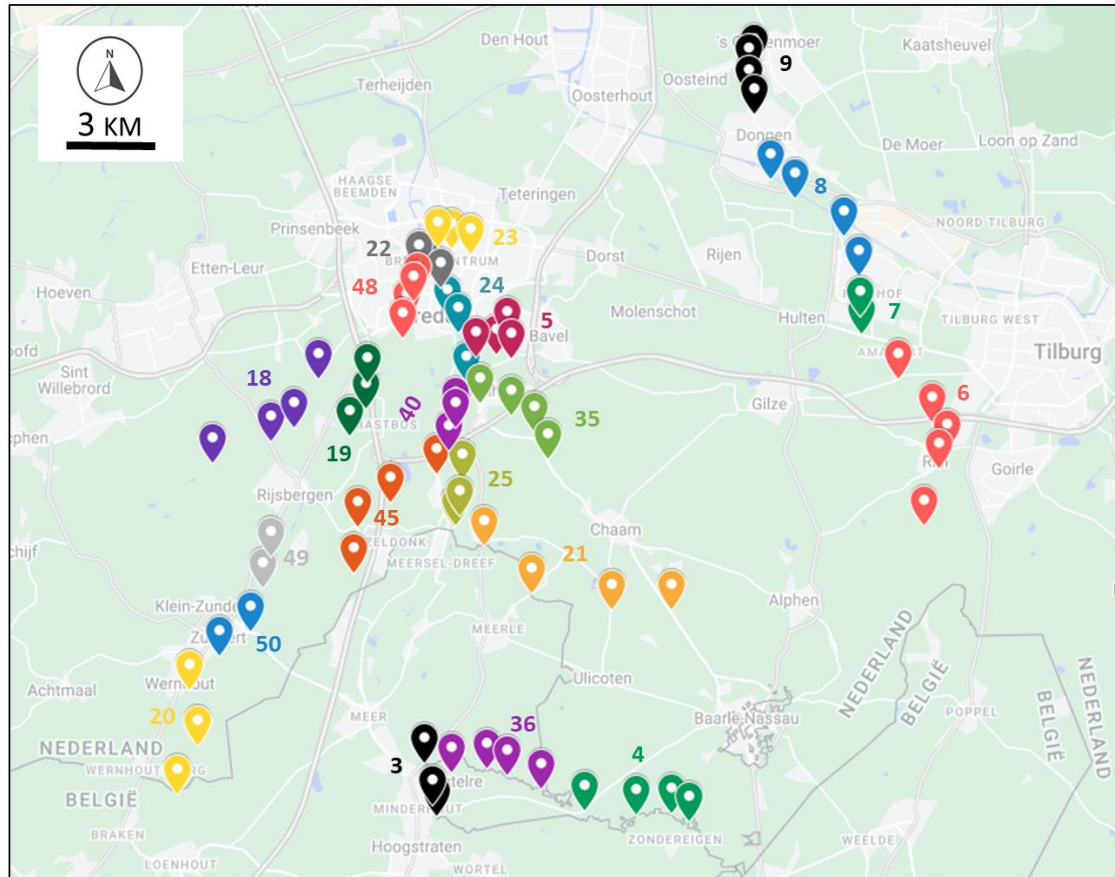
De indicator species analyse toont verder ook aan dat er bepaalde indicatiesoorten zijn voor combinaties van regio's (Tabel 4).

Tabel 4. Resultaten van de ‘indicator species analysis’ voor de weergegeven combinaties van regio’s. De vissoorten die significant geassocieerd zijn met een combinatie van regio’s staan weergegeven, met de bijhorende indicatorwaarde tussen haakjes. De asterisken geven de niveaus van significantie weer: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Regio's	Soort
Binnenland & Nabij Oosterschelde/Krammer-Volkerak	<i>Barbatula barbatula</i> *** (0.906) <i>Gobio gobio</i> *** (0.874) <i>Pseudorasbora parva</i> * (0.632)
Binnenland & Hollands Diep & Nabij Oosterschelde/Krammer-Volkerak	<i>Pungitius pungitius</i> ** (0.939) <i>Tinca tinca</i> *** (0.937) <i>Gasterosteus aculeatus</i> * (0.810) <i>Lepomis gibbosus</i> * (0.798)
Hollands Diep & Nabij Oosterschelde/Krammer-Volkerak & Oosterschelde/Krammer-Volkerak	<i>Neogobius melanostomus</i> * (0.68)

• Regio Binnenland

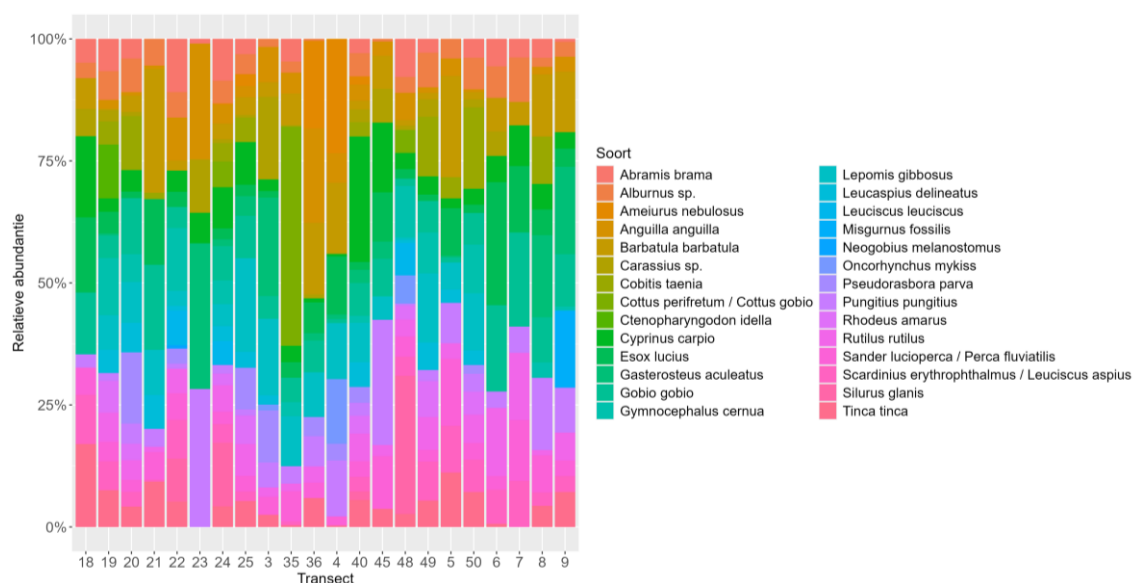
Binnen de regio 'Binnenland' werden 22 transecten bemonsterd in beeksystemen niet in de nabijheid van de Oosterschelde/Krammer-Volkerak en het Hollands Diep (Fig. 18).



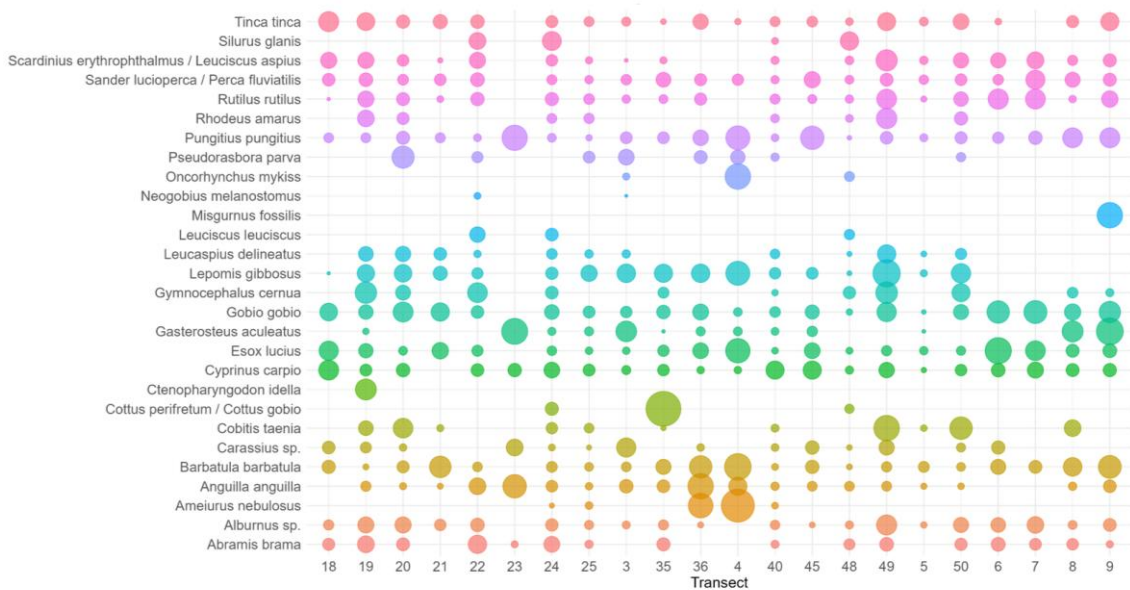
Figuur 18. Alle staalnamelocaties binnen de regio 'Binnenland'. De verschillende riviertransecten worden aangeduid met verschillende kleuren.

Deze regio is de meest soortenrijke, met een totaal van 28 soorten. Alle genomen stalen binnen deze regio zijn gelijkaardig qua soortenrijkdom (Fig. 19). Slechts enkele stalen bevatten unieke soorten, zoals de grote modderkruiper (*Misgurnus fossilis*) in riviertransect 9 (Fig. 20). Verder omvat deze regio drie van de vijf afwijkende stalen uit de NMDS-plot (riviertransecten 4, 5 en 23, Fig. 16). Tabel 3 toont vijf indicatiesoorten (bruine (Amerikaanse) dwergmeerval, regenboogforel, biermpje (*Barbatula Barbatula*), tiendoornige stekelbaars, en zonnebaars) die de afwijking in de samenstelling van de visgemeenschap van transect 4 grotendeels kunnen verklaren. Ook in transect 23 konden drie indicatiesoorten (drie- en tiendoornige stekelbaars en Europese paling) bepaald worden, terwijl dit in transect 5 niet mogelijk was (Tabel 3).

Visueel valt in figuur 20 op dat transect 4 een hoge relatieve eDNA-abundantie aan bruine (Amerikaanse) dwergmeerval en regenboogforel bevat, maar geen brasem. Belangrijk om hierbij op te merken is dat de detectie van regenboogforel mogelijks gelinkt kan worden met kweekdieren voor menselijke consumptie of onzuivere uitzet in (de nabijheid van) het studiegebied. Hierover beschikken we echter over onvoldoende informatie om deze detectie als eenduidig te interpreteren. Bijkomend onderzoek kan hier eventueel uitsluitsel over geven. Transect 5 mist ook brasem, en is kenmerkend door de lage abundantie van alle andere soorten (Fig. 20). Transect 23 in de Mark daarentegen, is vrij soortenarm met slechts zes vissoorten (Fig. 20).



Figuur 19. Relatieve eDNA-abundantie per soort (kleuren) weergegeven van alle stalen genomen in de regio 'Binnenland'. De x-as geeft de bemonsterde riviertransecten weer.



Figuur 20. Relatieve eDNA-abundantie per soort (kleuren) van alle stalen in de regio 'Binnenland'. De x-as geeft de bemonsterde riviertransecten weer, en de grootte van de bollen weerspiegelt het relatieve aandeel van de soort binnen de visgemeenschap van dat staal.

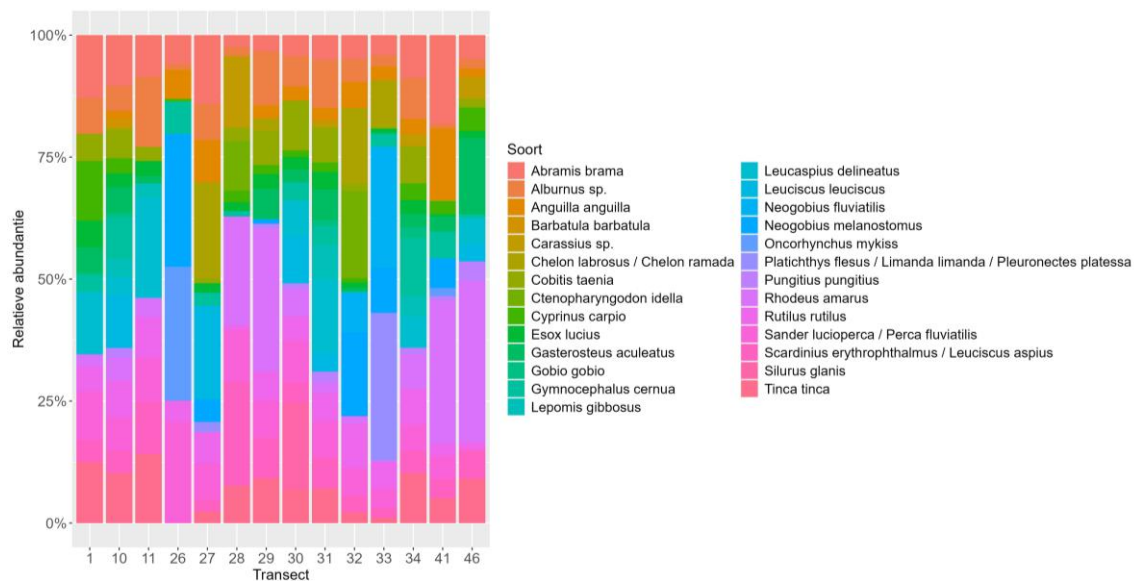
• Regio Hollands Diep

Binnen de regio 'Hollands Diep' werden veertien riviertransecten bemonsterd, die vlakbij de rivierarm Hollands Diep gelegen zijn of er mee in verbinding staan (Fig. 21).



Figuur 21 Alle staalnamelocaties binnen de regio 'Hollands Diep'. De verschillende riviertransecten worden aangeduid met verschillende kleuren.

In deze regio konden in totaal 27 verschillende soorten gedetecteerd worden (Fig. 22 en 23). De genomen stalen binnen deze regio zijn vrij verschillend wat betreft soortenrijkdom (Fig. 22). Zo werden tien soorten in transect 26 gedetecteerd, terwijl dit aantal oploopt tot 20 soorten in transect 10 (Fig. 23). Figuur 23 toont verder ook dat de meeste vissoorten slechts in enkele stalen te vinden zijn, en daarmee dus een voorkeur voor een bepaalde locatie binnen de regio hebben. Soorten als rietvoorn/roofblei, snoekbaars/baars, blankvoorn, (gestippelde) alver en brasem zijn dan weer in meerdere locaties binnen deze regio terug te vinden (Fig. 23).



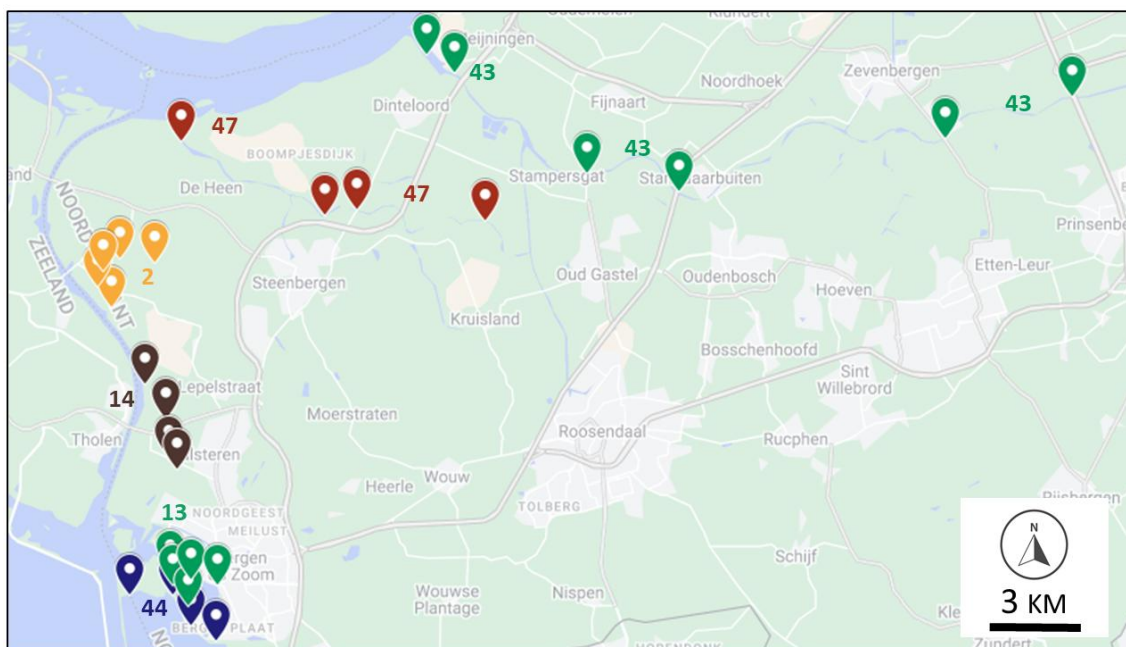
Figuur 22. Relatieve eDNA-abundantie per soort (kleuren) weergegeven van alle stalen genomen in de regio 'Hollands Diep'. De x-as geeft de bemonsterde riviertransecten weer.



Figuur 23. Relatieve eDNA-abundantie per soort (kleuren) van alle stalen in de regio 'Hollands Diep'. De x-as geeft de riviertransecten weer, en de grootte van de bollen weerspiegelt het relatieve aandeel van de soort binnen de visgemeenschap van dat staal.

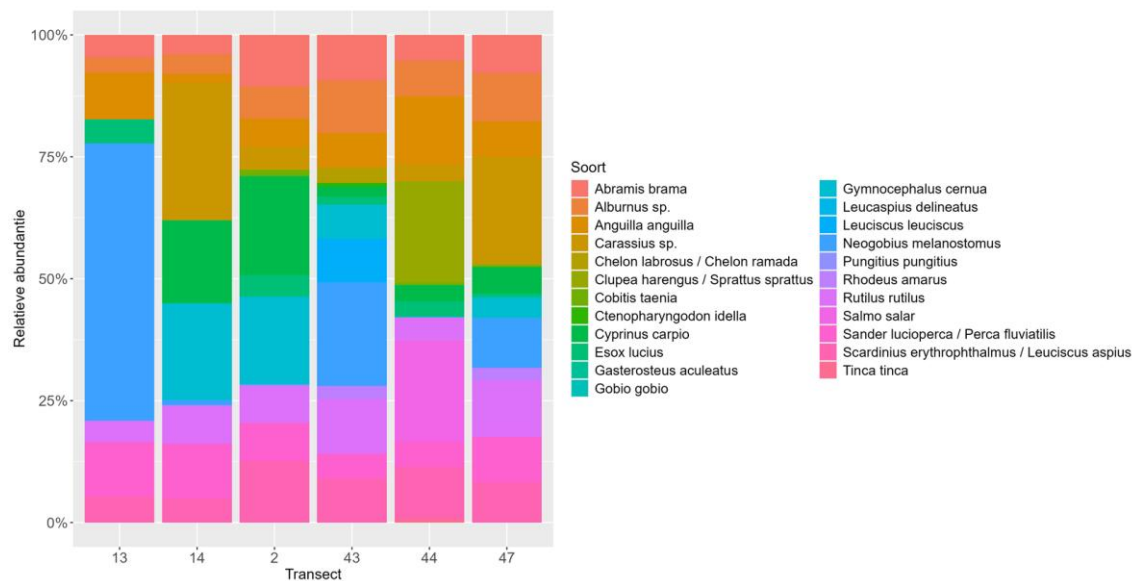
• Regio Oosterschelde/Krammer-Volkerak

Binnen de regio 'Oosterschelde/Krammer-Volkerak' werden zes riviertransecten bemonsterd die vlakbij de Oosterschelde of het gebied Krammer-Volkerak gelegen zijn of hier rechtstreeks mee in contact staan (Fig. 24).



Figuur 24. Alle staalnamelocaties binnen de regio 'Oosterschelde/Krammer-Volkerak'. De verschillende riviertransecten worden aangeduid met verschillende kleuren.

De stalen binnen deze regio verschillen sterk in soortenrijkdom (gaande van acht tot zestien soorten, Fig. 25). Uit Figuur 26 blijkt dat de meeste vissoorten zoals de tiendoornige en driedoornige stekelbaars slechts sporadisch voorkomen binnen de regio. Deze regio bevat één van de vijf afwijkende stalen uit de NMDS-plot (transect 13, Fig. 16). Met de indicator species analysis kon in dit transect geen indicatiesoort bepaald worden (Tabel 3). Wel konden er slechts acht vissoorten (rietvoorn/roofblei, snoekbaars/baars, blankvoorn, zwartbekgrondel, snoek, Europese paling, (gestippelde) alver en brasem) in transect 13 gedetecteerd worden, waarvan enkel zwartbekgrondel in hogere relatieve eDNA-abundanties kon worden aangetroffen (Fig. 26).



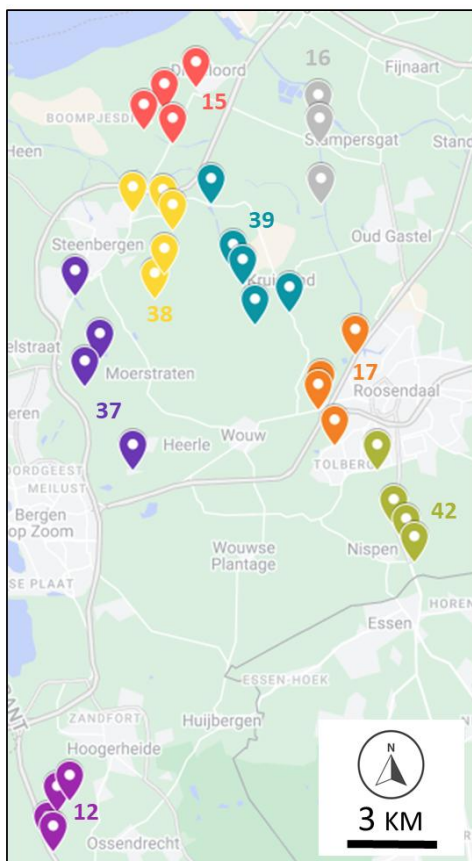
Figuur 25. Relatieve eDNA-abundantie per soort (kleuren) weergegeven van alle stalen genomen in de regio 'Oosterschelde/Krammer-Volkerak'. De x-as geeft de bemonsterde riviertransecten weer.



Figuur 26. Relatieve eDNA-abundantie per soort (kleuren) van alle stalen in de regio 'Oosterschelde/Krammer-Volkerak'. De x-as geeft de riviertransecten weer, en de grootte van de bollen weerspiegelt het relatieve aandeel van de soort binnen de visgemeenschap van dat staal.

• Regio Nabij Oosterschelde/Krammer-Volkerak

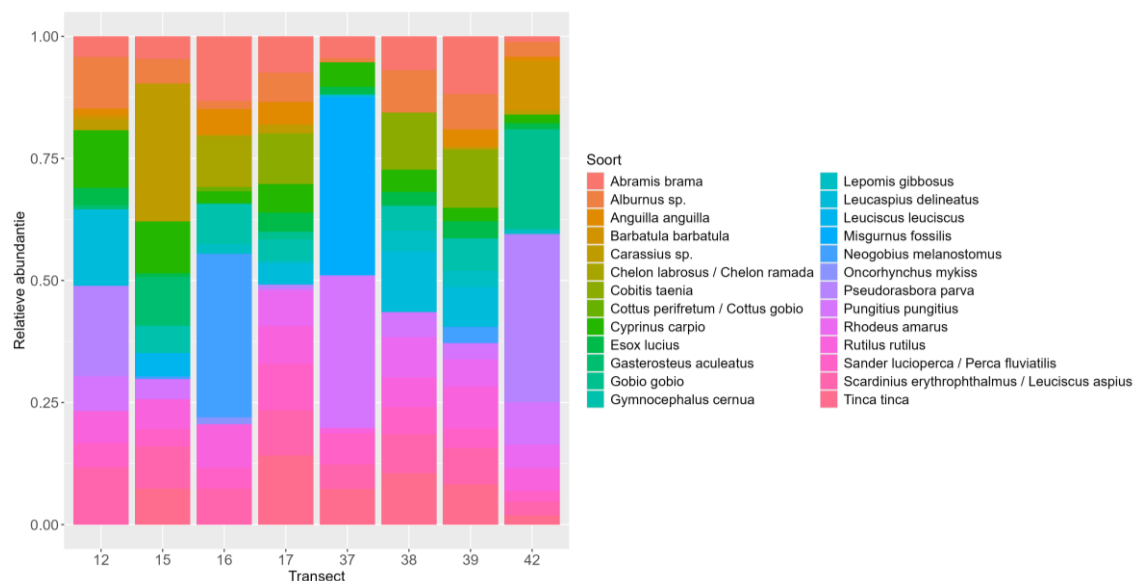
Binnen de regio 'Nabij Oosterschelde/Krammer-Volkerak' werden acht riviervansecten bemonsterd die geen directe invloed van het Hollands Diep, de Oosterschelde noch uit het gebied Krammer-Volkerak ondervinden, hoewel ze hier toch relatief dichtbij gelegen zijn (Fig. 27).



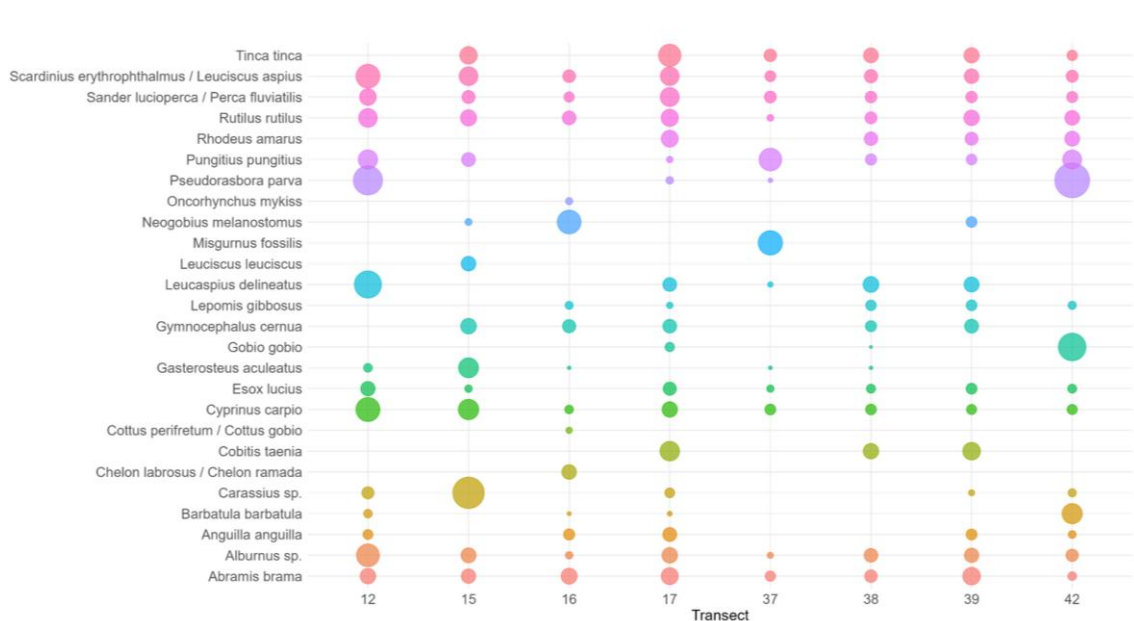
Figuur 27. Alle staalnamelocaties binnen de regio 'Nabij Oosterschelde/Krammer-Volkerak'. De verschillende riviervansecten worden aangeduid met verschillende kleuren.

Deze regio is de minst soortenrijke, met een totaal van 23 soorten. In deze regio vertonen de stalen opnieuw sterke variatie in soortenrijkdom (gaande van veertien tot negentien soorten, Fig. 28). Figuur 29 toont dat de meeste vissoorten slechts sporadisch voorkomen en dat slechts enkelen (rietvoorn/roofblei, snoekbaars/baars, blankvoorn, karper, (gestippelde) alver en brasem) in alle stalen binnen de regio werden aangetroffen. Deze regio bevat één van de vijf afwijkende stalen uit de NMDS-plot (transect 37, Fig. 16), wat voornamelijk te wijten is aan de aanwezigheid van de indicatiesoort grote modderkuiper (Tabel 3) en de tiendoornige stekelbaars in hoge

relatieve eDNA-abundanties, terwijl de andere soorten in opmerkelijk lagere relatieve eDNA-abundanties voorkomen in dit transect (Fig. 29).



Figuur 28. Relatieve eDNA-abundantie per soort (kleuren) van alle stalen genomen in de regio 'Nabij Oosterschelde/Krammer-Volkerak'. De x-as geeft de bemonsterde riviertransecten weer.



Figuur 29. Relatieve eDNA-abundantie per soort (kleuren) van alle stalen in de regio 'Nabij Oosterschelde/Krammer-Volkerak'. De x-as geeft de bemonsterde riviertransecten weer, en de grootte van de bollen weerspiegelt het relatieve aandeel van de soort binnen de visgemeenschap van dat staal.

- **Relatie tussen visdiversiteit en otteraanwezigheid**

Tot slot zijn de visgemeenschappen op de twee locaties (riviertransecten 25 en 40) in de Boven Mark waar otter werd gedetecteerd erg gelijkaardig, wat niet verrassend is aangezien ze aan elkaar grenzen. Op beide locaties werd een hoge soortenrijkdom gedetecteerd. In transect 25 werden 20 soorten gedetecteerd, namelijk zeelt, rietvoorn/roofblei, snoekbaars/baars, blankvoorn, bittervoorn, tiendoornige stekelbaars, blauwbandgrondel, vetje, zonnebaars, riviergrondel, snoek, driedoornige stekelbaars, karper, kleine modderkruiper, gibel/goudvis/kroeskarper, bermpje, Europese paling, bruine (Amerikaanse) dwergmeerval, (gestippelde) alver en brasem (Fig. 20). In transect 40 werden naast deze 20 soorten bijkomend ook de pos en Europese meerval gedetecteerd, resulterend in 22 soorten in dit transect (Fig. 20). Deze mix aan bodemsoorten, predatoren, filtervoeders, etc. wijst op een ecologisch gebalanceerd systeem. Zo zijn soorten als bittervoorn en bermpje soorten die helder en zuurstofrijk water vereisen. De aanwezigheid van vetje wijst daarbij op natuurlijke, goed ontwikkelde oeverzones. Soorten als blauwbandgrondel en zonnebaars wijzen dan weer op verstoring of uitheemse druk. Onderzoek van de Wolf (2018) in de Gelderse Poort, een natuurgebied in Nederland gelegen tussen Nijmegen, Kleve, Arnhem en Emmerik, en omstreken toonde aan dat het dieet van otter in dit gebied vooral bestond uit baars, blankvoorn en brasem. De detectie van deze typische prooi-soorten in de betreffende transecten van de Boven Mark ondersteunen de verdere geschiktheid van deze waterloop als foerageergebied voor de otter.

5. CONCLUSIE

Otter-eDNA werd gedetecteerd in twee riviertransecten van de Boven Mark. De waargenomen concentraties zijn eerder laag, maar zijn gelijkaardig aan geïsoleerde eDNA-detecties die we reeds hebben waargenomen in andere regio's waar otter eveneens in lage dichtheden of als passant voorkomt. Bovendien worden otters gekenmerkt door het feit dat ze weinig DNA-sporen in het water achterlaten. Dit is deels te verklaren doordat ze i) slechts tijdelijk gebruik maken van de aquatische omgeving, ii) een dikke, goed geïsoleerde en dense pels hebben, iii) hun uitwerpselen meestal op het land deponeren (bv. in latrines die geassocieerd zijn met grotten en holen), en iv) ook meestal op land eten, wat de kans dat eDNA-sporen in het water terecht komen erg beperkt. Ook kunnen hoge waterstanden, zoals deze zich voordeden in de lente en zomer van 2024, bijkomend leiden tot verdunning van het eDNA-sigitaal. Van Driessche et al. (2022) toonden experimenteel namelijk aan dat het debiet van de waterloop een grote invloed kan hebben op eDNA-concentraties en bijgevolg op de detectiekans van een zeldzame semi-aquatische soort. Echter, dankzij de twee onafhankelijke otter-specifieke assays die we in onze analyses gebruikten en de strenge drempelwaarden die we bijkomend hanteerden tijdens dit onderzoek, kunnen de resultaten als robuust beschouwd worden. De gedetecteerde concentraties in dit onderzoek zijn vergelijkbaar met concentraties aan otter-DNA die we vonden in dertien Waalse rivieren in de lente en zomer van 2023, en wijzen op de aanwezigheid van één of enkele individuen. Aangezien otter-DNA in deze studie in twee aaneengesloten riviertransecten werd aangetroffen, zouden deze signalen afkomstig kunnen zijn van hetzelfde individu dat er kort voor de staalname zou hebben gefoerageerd. Aangezien eDNA-sporen in water slechts beperkt detecteerbaar zijn in de tijd en dit degradatieproces in stromende systemen versnelt (Van Driessche et al., 2024a; Van Driessche et al., 2022), kan er met zekerheid worden geconcludeerd dat er in de uren tot enkele dagen voor de staalname minstens één otter in de Boven Mark aanwezig was.

Tijdens dit onderzoek werd de aanwezigheid van **muskusrat** vastgesteld in veertien van de 50 onderzochte riviertransecten. In deze positieve stalen werden erg variabele concentraties opgemeten, waarbij een maximale muskusrat-DNA concentratie van 0,72 kopieën/ μ L per liter gefilterd water werd opgemeten in riviertransect 5, in de Bavelse Leij ten noorden van Ulvenhout. In riviertransecten 10 en 23 (in het Zuiderafwateringskanaal en in de Mark ten noorden van Breda) werden aanzienlijke concentraties aangetroffen, terwijl andere positieve detecties voor muskusrat-DNA eerder resulteerden in matige tot lage concentraties. Ook hier heeft het gebruik van twee onafhankelijke muskusrat-specifieke assays en de strenge drempelwaarden die gehanteerd werden tijdens dit onderzoek, tot gevolg dat de resultaten als robuust kunnen worden beschouwd. De daardoor duidelijk aangetoonde aanwezigheid van meerdere individuen van muskusrat met name in transecten 5, 10 en 23 duiden op een snelle en gerichte eradicatie-noodzaak van deze lokale populaties.

Door het feit dat in riviertransect 40 (in de Boven Mark ten zuidwesten van Ulvenhout) zowel otter- als muskusrat-DNA werden aangetroffen, wordt sterk aangeraden om bij de bestrijding van muskusrat, zeker in deze regio, uiterst zorgvuldig om te springen met de kennis dat ook otter zich in deze watersystemen ophoudt. Zo kunnen muskusrattenvallen worden uitgerust met een 9 cm grote otterring (te klein voor otters om door te zwemmen) of algeheel worden vervangen door levend-vangkooien om eventuele bijvangst een grotere overlevingskans te bieden (de Vos, 2021). Ook aangepaste fuiken met een 'stopgrid' of ontsnappingspleet bieden verdere bescherming voor de otter tijdens dergelijke eradicatiecampagnes ter bestrijding van de uitheemse muskusrat.

Tot slot werden in totaal over alle bemonsterde waterlichamen in het Waterschap Brabantse Delta 33 verschillende **vissoorten** gedetecteerd, met 28 verschillende vissoorten in de regio 'Binnenland' en 23 soorten in de regio 'Oosterschelde/Krammer-Volkerak'. Negentien soorten kwamen in alle vier de regio's voor, terwijl enkele andere soorten eerder regio-specifiek waren. Zo werd de bruine (Amerikaanse) dwergmeerval enkel in de regio 'Binnenland', de bot/schar/schol en de Pontische stroomgrondel enkel in de regio 'Hollands Diep' gedetecteerd, terwijl zalm en haring/sprot uitsluitend in de regio 'Oosterschelde/Krammer-Volkerak' werden gedetecteerd. Belangrijk hierbij is dat de detectie van zalm en regenboogforel mogelijk gelinkt kan worden aan onnatuurlijke afkomst, afkomstig van bijvoorbeeld kweek van deze soorten in de nabije omgeving, uitzet van onzuivere broed, contaminatie via consumptie door de mens of watervogels, etc. Hierover beschikken we echter over onvoldoende informatie om deze detecties als eenduidig te interpreteren.

6. REFERENCES

Brys, R., Haegeman, A., Halfmaerten, D., Neyrinck, S., Staelens, A., Auwerx, J., en Ruttink, T. (2021a). Monitoring of spatiotemporal occupancy patterns of fish and amphibian species in a lentic aquatic system using environmental DNA. *Molecular ecology* 30(13): 3097-3110. <https://doi.org/10.1111/mec.15742>

Brys, R., Halfmaerten, D., Everts, T., Van Driessche, C., en Neyrinck, S. (2023). Combining multiple markers significantly increases the sensitivity and precision of eDNA-based single-species analyses. *Environmental DNA* 5(5): 1065-1077. <https://doi.org/10.1002/edn3.420>

Brys, R., Halfmaerten, D., Neyrinck, S., Mauvisseau, Q., Auwerx, J., Sweet, M., en Mergeay, J. (2021b). Reliable eDNA detection and quantification of the European weather loach (*Misgurnus fossilis*). *Journal of Fish Biology* 98: 399-414. <https://doi.org/10.1111/jfb.14315>

Brys, R., Neyrinck, S., Everts, T. en Halfmaerten, D. (2022). *Using eDNA to investigate the presence of European otter (Lutra lutra) in the Semois valley*. INBO rapport.

de Vos, M. (2021). *De terugkeer van de otter (Lutra lutra) in Nederland: een review*. ARK Natuurontwikkeling & HAS Hogeschool.

de Wolf, T. (2018). *Dieet van de Otter (Lutra lutra). Een onderzoeksrapport naar het dieet van de otter in de Gelderse Poort en omstreken*. ARK Natuurontwikkeling & Hogeschool Van Hall Larenstein.

Everts, T., Halfmaerten, D., Neyrinck, S., De Regge, N., Jacquemyn, H., en Brys, R. (2021). Accurate detection and quantification of seasonal abundance of American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) using ddPCR eDNA assays. *Scientific Reports* 11(1): 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90771-w>

Halfmaerten, D., Verschelde, P., Haegeman, A., Neyrinck, S., Verschaeve, L., Van Breusegem, A., Van Liefferinge, N., Geeraerts, C., Van Driessche, C. en Brys, R. (2023). 12S metabarcoding reference data from the Research Institute for Nature and Forest (INBO) (Versie 20230906) [Dataset]. *Zenodo*. <https://doi.org/10.5281/zenodo.10422227>

Harper, L.R., Handley, L.L., Carpenter, A.I., Ghazali, M., Di Muri, C., Macgregor, C.J., Logan, T.W., Law, A., Breithaupt, T., Read, D.S., McDevitt, A.D. en Hänfling, B. (2019). Environmental DNA (eDNA) metabarcoding of pond water as a tool to survey conservation and management priority mammals. *Biological Conservation* 238. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.108225>

Riaz, T., Shehzad, W., Viari, A., Pompanon, F., Taberlet, P. en Coissac, E. (2011). ecoPrimers: inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. *Nucleic acids research* 39(21): e145-e145. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr732>

Sideleva, V., Kesminas, V., en Zhidkov, Z. (2022). A new species of the genus *Cottus* (Scorpaeniformes, Cottidae) from the Baltic Sea Basin and its phylogenetic placement. *European Journal of Taxonomy* 834: 38-57. <https://doi.org/10.5852/ejt.2022.834.1897>

Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P. F., ... en Dejean, T. (2016). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular ecology* 25(4): 929-942. <https://doi.org/10.1111/mec.13428>

Van Driessche, C., Everts, T., Neyrinck, S. en Brys, R. (2022) Experimental assessment of downstream environmental DNA patterns under variable fish biomass and river discharge rates. *Environmental DNA* 5(1): 102-116. <https://doi.org/10.1002/edn3.361>

Van Driessche, C., Everts, T., Neyrinck, S., Halfmaerten, D., Haegeman, A., Rutting, T., Bonte, D. en Brys, R. (2023). Using environmental DNA metabarcoding to monitor fish communities in small rivers and large brooks: insights on the spatial scale of information. *Environmental Research* 115857. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115857>

Van Driessche, C., Everts, T., Neyrinck, S., Halfmaerten, D., Verschelde, P., Breine, J., Bonte, D. en Brys, R. (2024a). Environmental DNA metabarcoding reflects spatiotemporal fish community shifts in the Scheldt estuary. *Science of the Total Environment* 934: 173242. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.173242>

Van Driessche, C., Kerckhofs, K., Neyrinck, S., De Beer, B. en Brys, R. (2024b) eDNA onderzoek naar de aanwezigheid van kamsalamander (*Triturus cristatus*) in het Provinciaal Domein Het Leen. INBO rapport.