



# Analyse maaginhouden ten behoeve van helder-troebel plan KIMA

-

**Deltares**

18 februari 2020

Project Analyse maaginhouden ten behoeve van helder-troebel plan KIMA  
Opdrachtgever Deltares

Document -  
Status Definitief  
Datum 18 februari 2020  
Referentie 117775/20-002.328

Projectcode 106206  
Projectleider K.C.G.J. Princen MSc  
Projectdirecteur drs. M. Klinge

Auteur(s) I. van der Haas  
Gecontroleerd door drs. M. Klinge  
Goedgekeurd door K.C.G.J. Princen MSc

Paraaf



Adres Witteveen+Bos Raadgevende ingenieurs B.V.  
Leeuwenbrug 8  
Postbus 233  
7400 AE Deventer  
+31 (0)570 69 79 11  
www.witteveenbos.com  
KvK 38020751

Het kwaliteitsmanagementsysteem van Witteveen+Bos is gecertificeerd op basis van ISO 9001.

© Witteveen+Bos

Niets uit dit document mag worden veeelvoudigd en/of openbaar gemaakt in enige vorm zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Witteveen+Bos noch mag het zonder dergelijke toestemming worden gebruikt voor enig ander werk dan waarvoor het is vervaardigd, behoudens schriftelijk anders overeengekomen. Witteveen+Bos aanvaardt geen aansprakelijkheid voor enigerlei schade die voortvloeit uit of verband houdt met het wijzigen van de inhoud van het door Witteveen+Bos geleverde document.

# INHOUDSOPGAVE

<b>1</b>	<b>INLEIDING</b>	<b>5</b>
1.1	Marker Wadden	5
1.2	Bodemmonsters	5
1.3	Achtergrond bacteriën	6
1.4	Bioturbatie	8
1.5	Huidig onderzoek	8
<b>2</b>	<b>MATERIAAL EN METHODEN</b>	<b>9</b>
2.1	Onderzoekslocaties	9
2.2	Maagdarmstelsels vissen	10
2.3	Visuele analyse maaginhoud	10
2.4	DNA-mengmonsters	10
<b>3</b>	<b>RESULTATEN</b>	<b>12</b>
3.1	Visuele analyse	12
3.1.1	Brasem ( <i>Abramis brama</i> )	12
3.1.2	Blankvoorn ( <i>Rutilus rutilus</i> )	12
3.1.3	Pos ( <i>Gymnocephalus cernua</i> )	13
3.1.4	Zwartbekgrondel ( <i>Neogobius melanostomus</i> )	13
3.2	DNA-analyse	13
3.2.1	Eukaryoten primer	13
3.2.2	Bacteriële primer	14
3.2.3	Vissen primer	14
3.2.4	MAV-primer	15
<b>4</b>	<b>DISCUSSIE</b>	<b>17</b>
4.1	Visuele analyse	17
4.2	DNA-analyse	18
4.3	Alternatieve hypothese	18
<b>5</b>	<b>CONCLUSIE EN AANBEVELINGEN</b>	<b>19</b>

Laatste pagina

20

**Bijlage(n)****Aantal pagina's**

I	Foto's maaginhoud brasem petrischaal (20 december 2019, NIOO)	2
II	Foto's binoculair brasem (5 november 2019, IMARES)	3
III	Foto's microscoop brasem (20 december 2019, NIOO, 100x)	2
IV	Foto's maaginhoud blankvoorn petrischaal (5 november 2019, Imares en 10 januari 2020, NIOO)	2
V	Foto's binoculair blankvoorn (5 november 2019, IMARES en 10 januari 2020, NIOO)	3
VI	Foto's blankvoorn microscoop (10 januari 2020, NIOO, 100x)	2
VII	Foto's maaginhoud pos petrischaal (10 januari 2020, NIOO)	2
VIII	Foto's pos binoculair (10 januari 2020, NIOO)	3
IX	Foto's pos microscoop (100x, 10 januari 2020, NIOO)	2
X	Foto's maaginhoud z.b. grondel petrischaal (9 december 2019, NIOO)	2
XI	Foto's z.b. grondel binoculair (9 december 2019, NIOO)	2
XII	Foto's z.b. grondel microscoop (100x, 9 december 2019, NIOO)	2
XIII	Meetresultaten vismagen	5
XIV	DNA-analyse maaginhoud vissen	13

# 1

## INLEIDING

Het Markermeer, gevormd in 1976, is een waterlichaam in de voormalige Zuiderzee. Het meer heeft veel problemen met de waterkwaliteit waardoor de biodiversiteit in de afgelopen jaren is afgenomen. Door het vele in het water zwevende slib is het water troebel; als dit niet goed bezinkt bemoeilijkt dit lichtdoorgang en daarmee de groei van verscheidene in het water levende organismen (STOWA, 2014; Markermeer-IJmeer, 2019). Om het meer aan de Natura 2000-doelen te laten voldoen, moesten er maatregelen getroffen worden voor de verbetering van de waterkwaliteit (Rijksoverheid, 2019).

### 1.1 Marker Wadden

Een van deze maatregelen betreft de aanleg van de Marker Wadden; dit is een groep van nu nog 5 eilanden in het Markermeer welke sinds 2016 in aanleg zijn. Ze worden opgebouwd met bodemmateriaal uit het meer. Deze eilanden bevatten luwtedammen om de stroming en wind tegen te houden, zodat in de luwten achter de dammen moerasgebied kan ontwikkelen en slib kan bezinken. Deze eilandenformatie zorgt door gradiënten in de waterdiepte voor een betere ontwikkeling van land-waterovergangen in het Markermeer en daardoor een vergroting van habitat- en soortdiversiteit. De eilanden moeten een belangrijke bijdrage leveren aan de Natura 2000-doelen (voor vogels) en aan de KRW doelen (algen, waterplanten, macrofauna en vissen).

### 1.2 Bodemmonsters

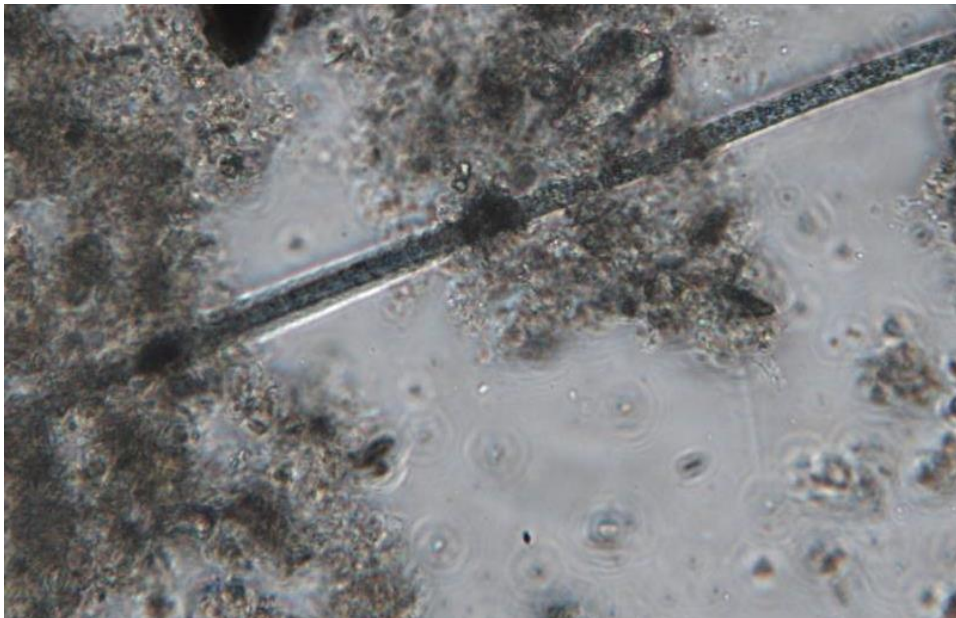
In 2015 en opnieuw in 2019 zijn er 30 bodemmonsters genomen rondom de Marker Wadden om de invloed van de Marker Wadden op de slibdynamiek in beeld te brengen (Roskam, 2019; Roskam, 2016; Van Herk, 2019). Deze monsters zijn geanalyseerd op dikte, samenstelling, kritische schuifspanning en de aanwezigheid van organismen. Uit dit onderzoek kwam naar voren dat de dikte van de sliblaag grofweg afnam ten westen en toenam ten oosten van de Marker Wadden. Er waren geen duidelijke verschillen gevonden in slibsamenvorming tussen de twee bemonsteringen. Ook waren er geen overeenkomsten gevonden in opgewerveld materiaal en samenstelling van het slib tijdens het opwervelingsexperiment. Wel zijn er in de meting van 2019 verschillende organismen in de monsters aangetroffen, waaronder diatomeën, groenalgen, blauwalgen en verschillende soorten zwavelbacteriën. Dergelijke bacteriën zijn al eerder aangetroffen in het IJsselmeer (Vaate & Jansen, 2008). Deze kluwen bacteriën bleken bestand tegen opwerveling tot hoge rotorsnelheden, wat een mogelijke factor kan zijn in het vastleggingsproces van de bodem (Roskam, 2019).

In september 2019 zijn er opnieuw monsters uit het Markermeer genomen om de biomassaverdeling van deze zwavelbacteriën te bepalen. Er werd gekeken naar het voorkomen van *Thioploca* en *Beggiatoa* en er werden een aantal chemische analyses uitgevoerd. Hieruit bleek dat in alle 29 monsters zwavelbacteriën zaten, waarvan *Beggiatoa* in alle monsters en *Thioploca* in 25 monsters. Ook was de chemische samenstelling in het gebied met de grootste biomassa anders, met relatief hogere opgeloste stoffen als fosfor, calcium, zwavel en silicium. Daarnaast werden hogere dichtheden van de bacteriën samen gezien met lagere mosseldichtheden (Noordhuis, 2019).

### 1.3 Achtergrond bacteriën

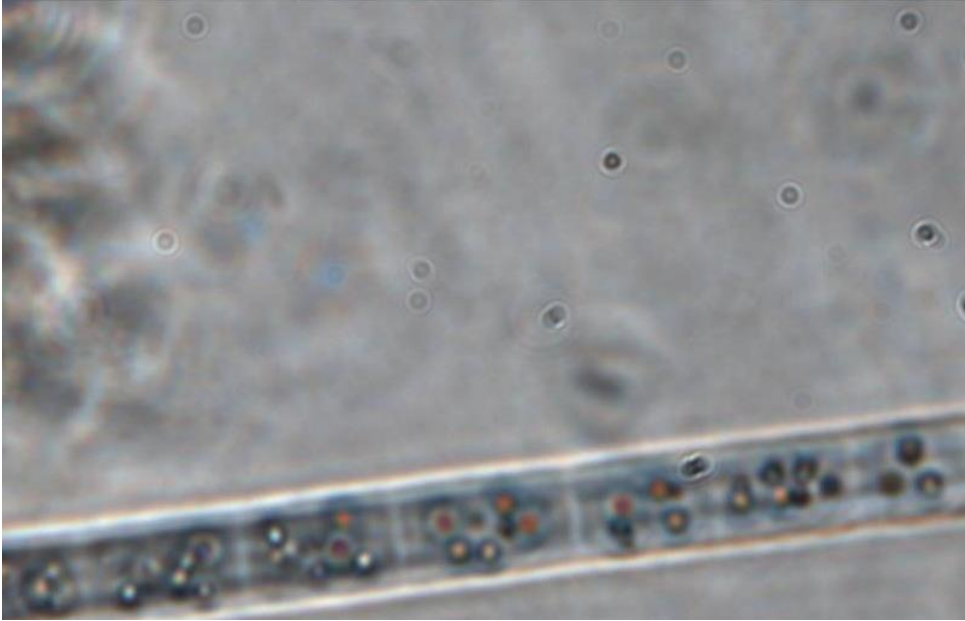
De aangetroffen bacteriën rondom de Marker Wadden zijn zwavel-oxiderende gammaproteobacteriën, mogelijk uit de genera *Beggiatoa*, *Thioploca* en/of *Thiothrix* (Roskam, 2019). Deze bacteriën komen meestal voor in zoet- en zoutwatersedimenten, in actief slib en bij hydrothermale bronnen (Teske, Ramsing, Küver, & Fossing, 1995). *Beggiatoa* hebben lange filamenten bestaande uit een aaneenschakeling van korte cellen. Deze filamenten vormen complexe clusters en bevatten vaste sulfide granulen (S<sup>0</sup>, ook wel zwavel in elementaire vorm), waardoor ze wit kunnen kleuren (afbeelding 1.1 en 1.2). Hoewel sommige *Beggiatoa* soorten volledig *chemolithotroof* zijn (energie halend uit oxidatie van anorganische chemicaliën), is de meerderheid van de soorten *mixotroof*; zij gebruiken gereduceerde zwavelverbindingen als elektron donor en organische verbindingen als koolstofbron (Madigan, Martinko, Stahl, & Clark, 2012). Ze behoren tot een van de grootste prokaryoten (McKay, MacGregor, Biddle, Albert, & Mendlovitz, 2012). Vergelijkbaar is het genus *Thiothrix*; ook bij deze bacteriën zijn de filamenten bedekt door een beschermende schede (Kawasaki, et al., 2017). Deze bacteriën zijn veelal *aerobisch mixotroof* (vergelijkbaar met *Beggiatoa*) en hebben filamenten gegroepeerd in een rozet (Madigan, Martinko, Stahl, & Clark, 2012). Ze zijn een bekend verschijnsel in waterzuiveringen (Wu, et al., 2019).

Afbeelding 1.1 Foto van mogelijke *Beggiatoa/Thiothrix* soort, aangetroffen in monsters van het Markermeer (Roskam, 2019)





Afbeelding 1.2 Foto van mogelijke *Beggiatoa*/*Thiothrix* soort, aangetroffen in monsters van het Markermeer (Roskam, 2019)



*Thioploca* heeft ook filamenten, alleen zijn deze gebundeld en omsloten door een beschermende schede, bestaand uit polysacchariden. Losse filamenten zijn met lichtmicroscopie nauwelijks van *Beggiatoa* filamenten te onderscheiden (Teske, Ramsing, Küver, & Fossing, 1995). *Thioploca* kan dikke matten op (zee)bodems vormen en is verantwoordelijk voor de anoxische oxidatie van H<sub>2</sub>S en de reductie van nitraat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) naar ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). Het is zeer waarschijnlijk dat *Thioploca* matten grote hoeveelheden CO<sub>2</sub> fixeren en een belangrijke rol spelen in de zwavel- en waterstofcyclus in waterlichamen. De kluwen van filamenten zijn vaak met het blote oog te zien (afbeelding 1.3).

Afbeelding 1.3 Foto van mogelijke *Thioploca* kluwen (Roskam, 2019)



De lange ketens aan filamenten van deze bacteriën kunnen fysieke veranderingen aanbrengen in de reologische eigenschappen (ook wel vloeigedrag) van geactiveerd slib, zoals het verhogen van de viscositeit (Wu, et al., 2019). De verwachting is dat deze *benthische biota* de toplaag van het dunne slib daardoor mogelijk vastleggen en daarmee de opwervelbaarheid sterk kunnen reduceren. Het is echter nog niet duidelijk op welke schaal dit gebeurt, hoe dit proces van vastlegging precies werkt en welke factoren hier invloed op hebben.

## 1.4 Bioturbatie

Naast de wind zijn er meer factoren die meespelen in de vertroebeling van het water, waaronder bodemwoelende vissen. Een bekend voorbeeld hiervan is de brasem (*Abramis brama*). Het foerageerpatroon van deze vis kan slordig zijn; delen bodemmateriaal worden gegeten, gefilterd op voedseldeeltjes en overtollig materiaal wordt uitgespuwd (Emmerik W. v., 2008; STOWA, 2014). De vissen ploegen hiermee effectief de bodem om wat zorgt voor bioturbatie. Er wordt verwacht dat een hoge dichtheid van *A. brama* in het Markermeer het proces van vastlegging van de bodem door zwavelbacteriën kan verstoren. Als gevolg hiervan neemt de kritische schuifspanning af en wervelt het slib als gevolg van wind makkelijker op. Er is nog geen studie gedaan waarbij er is gezocht naar een relatie tussen deze factoren. Ook is nog niet aangetoond dat *A. brama* daadwerkelijk deze bacterie verstoort door foerageren. Een eerste stap om dit te onderzoeken is het bepalen van de aanwezigheid van deze zwavelbacteriesoorten in de maag-darmstelsels van de vissen.

## 1.5 Huidig onderzoek

Dit onderzoek heeft zich gericht op de genoemde eerste stap. Er is gezocht naar de aanwezigheid van de zwavelbacteriën in de maag-darmstelsel van een aantal vissoorten waarvan bekend is dat ze bodemvoedsel zoeken en eten. De belangrijkste soort is *A. brama*. Andere soorten die bodemvoedsel eten, maar een minder bodemwoelend gedrag vertonen, zijn blankvoorn (*Rutilus rutilus*), pos (*Gymnocephalus cernua*) en zwartbekgrondel (*Neogobius melanostomus*). Deze vissen komen samen met elkaar voor in het Markermeer, hebben uiteenlopende foerageerpatronen en hebben affiniteit met de bodem. *N. melanostomus* is een echte bodemvis en een bekende exoot die de laatste jaren in opmars is (RAVON, 2019). *R. rutilus* komt in veel verschillende soorten water voor en foerageert ook in bodemmateriaal (Laak, 2010). *G. cernua* eet vooral veel kleine kreeftachtigen en muggenlarven en is ook vlakbij de bodem te vinden (Emmerik W. v., 2004). De kans bestaat dat deze vissen zwavelbacteriën eten of sporadisch binnenkrijgen met het foerageren in bodemmateriaal. Het eetpatroon van de vissen kan daarom mogelijk iets vertellen over het proces van bodemvastlegging door de zwavelbacteriën.

De onderzoeksvraag luidt daarom: kan de aanwezigheid van zwavelbacteriën (genera *Thioploca*, *Thiotrix* en/of *Beggiatoa*) aangetoond worden in het maag-darmstelsel van de bodemvoedselende vissoorten *Abramis brama*, *Rutilus rutilus*, *Gymnocephalus cernua* en *Neogobius melanostomus*?



# 2

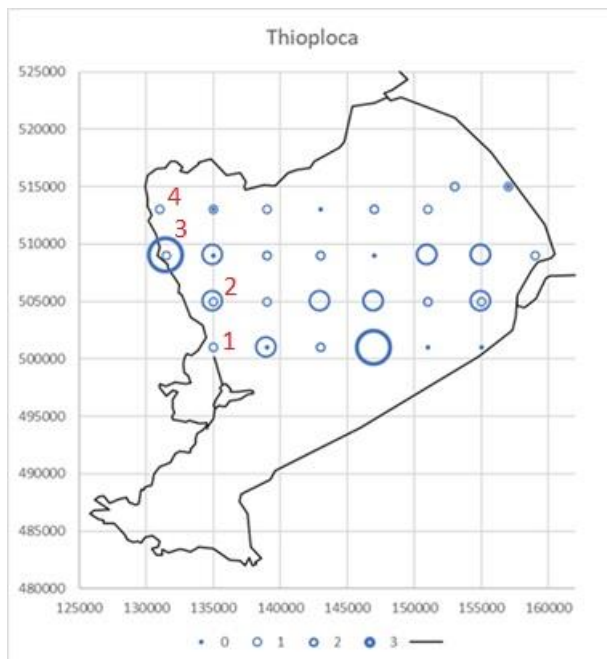
## MATERIAAL EN METHODEN

In dit hoofdstuk wordt toegelicht hoe er te werk is gegaan met het verzamelen van de vissoorten in het Markermeer. Ook wordt er nader beschreven welke methoden zijn toegepast in het laboratorium.

### 2.1 Onderzoekslocaties

De vissen zijn verzameld in de nacht van 22 oktober 2019 tussen 18.00 uur en 6.00 uur, op vier locaties in het Markermeer, een visstandbemonstering die uitgevoerd is door bureau ATKB in samenwerking met IJsselmeervissers.

Afbeelding 2.1 De vier locaties (linksonder de nummers) waar de vissen zijn gevangen op een recente kaart van aanwezigheid Thioploca bacterie in het Markermeer. Hoe groter de blauwe cirkel hoe meer van de bacterie op de plaats is aangetroffen (Noordhuis, 2019)



Hiervoor werd gebruik gemaakt van twee vissersboten en een visnet. Er werd beschermende waterdichte kleding gedragen en rubberen wegwerphandschoenen. Er werden 25 exemplaren van elke soort verzameld, namelijk brasem, blankvoorn, pos en zwartbekgrondel (tabel 2.1). Dit werd gedaan op locaties waar al eerder zwavelbacteriën zijn aangetroffen, om meer zekerheid te hebben dat deze vissen in contact kunnen zijn geweest met de bacteriën (figuur 5).

Tabel 2.1 Locatie en hoeveelheid gevangen vissen

Locatie	<i>Abramis brama</i>	<i>Rutilus rutilus</i>	<i>Gymnocephalus cernua</i>	<i>Neogobius melanostomus</i>
1	3	2	0	11
2	4	6	7	5
3	4	4	9	0
4	14	13	9	9
totaal	25	25	25	25

## 2.2 Maagdarmstelsels vissen

Het maagdarmstelsel van de vissen werd aan boord verwijderd met een scherp mes op een snijplank; van elk maagdarmstelsel werd per soort een klein monster van de maaginhoud genomen. Deze monsters werden samengevoegd in een kleine container en ingevroren in een vriezer ten behoeve van DNA-analyse (zie hoofdstuk 2.4). De rest van het maagdarmstelsel werd ook per soort bewaard in een container gevuld met formaline ten behoeve van analyse met een binoculair/microscoop (zie hoofdstuk 2.3).

## 2.3 Visuele analyse maaginhoud

Gedurende 6 dagen in totaal in de maanden november, december (2019) en januari (2020) zijn de maagdarmstelsels, bewaard in formaline, onderzocht op de aanwezigheid van zwavelbacteriën, in een laboratorium met voldoende afzuiging voor formalinedampen. Hiervoor werd een binoculair gebruikt met een vergroting van 0.8 tot 11,6 keer. Er werd gebruik gemaakt van een protocol met kleine aanpassingen (Pennock, 2011). De magen werden uit de container in een zeef gefilterd en de formaline werd opgevangen in een formaline-afvalvat. Het maagdarmstelsel werd opengesneden en de inhoud werd achter elkaar neergelegd op een petrischaal en bekeken onder de binoculair met goed werkende punt-afzuiging. De maaginhoud werd gewogen (in grammen), de mate van gevuldheid werd genoteerd (in procenten) en de mate van vertering werd genoteerd in categorieën van 0='pristine', 1='affected by digestion', 2='skelettal remains', 9='unknown'. Bijzonderheden en andere gevonden organismen/algen werden gedetermineerd tot minimaal op soortgroep en waar mogelijk in percentages uitgedrukt. Waar mogelijk werd er een foto gemaakt door de binoculair. Daarna werd er van drie plaatsen (het voorste, middenstuk en achterste gedeelte van de maaginhoud) één druppel naast elkaar op één preparaat gelegd en dit werd onder een microscoop bekeken met 100 en 200 keer vergroting. Opnieuw werden bijzonderheden genoteerd en gevonden organismen gedetermineerd en in percentages uitgedrukt.

## 2.4 DNA-mengmonsters

Naast een visuele analyse was het belangrijk om ook een DNA-analyse uit te voeren. Als de maagdarmstelsels moeilijk op het oog te identificeren zijn, kan een DNA-monster een nauwkeuriger uitsluitsel geven over wat de vis voor soorten organismen gegeten heeft. Voor deze analyse zijn van alle vier vissoorten mengmonsters ingevroren. De ingevroren monsters zijn 20 november naar het laboratorium van Datura in Wageningen gebracht voor DNA-analyse. Daar zijn DNA-mengmonsters van elke soort gemaakt. De mengmonsters zijn fijn gemaald met een stamper en zoveel mogelijk gehomogeniseerd. Dit is gedaan door medewerkers van Datura en de stagiair van Witteveen+Bos. Daarna is het DNA geëxtraheerd. Hier werd een afzonderlijk rapport van gemaakt door Himbeec & Bochhove (2019). Er werd gebruikgemaakt van DNA-metabarcoding. Hierdoor kan, aan de hand van één of meerdere stukken DNA (i.e. markers), een lijst van de voorkomende taxa worden gegenereerd. De focus lag vooral op het bepalen van het algemene dieet en aanwezigheid van bacteriën van het geslacht *Thioploca*. Er zijn vier verschillende soorten primers/markers gebruikt:

- 1 eukaryoten primer (18S): deze primer vermenigvuldigt het DNA van eukaryote organismen;

- 2 bacteriële primer (16S): deze primer vermenigvuldigt het DNA van bacteriën;
- 3 vissen primer (12S + 16S): deze primer vermenigvuldigt het DNA van vissen.;
- 4 MAV-primer (16S): deze primer vermenigvuldigt het DNA van een specifiekere set eukaryote organismen: weekdieren, geleedpotigen en vertebraten (Himbeek & Bochove, 2019).

# 3

## RESULTATEN

In dit hoofdstuk worden de resultaten van zowel DNA als laboratoriumonderzoek per vissoort toegelicht. Foto's van de binoculair zijn gegroepeerd en in de bijlagen verwerkt. Specifieke data van de vissen staan in bijlage XII.

### 3.1 Visuele analyse

In dit hoofdstuk wordt de visuele analyse van de vismagen besproken per vissoort.

#### 3.1.1 Brasem (*Abramis brama*)

Alle 25 brasems zijn onderzocht, waarvan twee gebruikt zijn als proef om te oefenen. Dit resulteerde in 23 brasems in de tabel. Hiervan waren vier magen leeg en één maag was dusdanig kapot dat deze niet meer gebruikt kon worden. De magen liepen qua formaat en vulling erg uiteen; de kleinste maag had een gewicht van 0,85 g met 60 % gevuld en de grootste 13,75 g met 70 % gevuld. Hoewel sommige magen leeg waren, was het overgrote deel van de magen voor meer dan de helft gevuld met bodemmateriaal en een groot gedeelte beige-kleurig slijm, mogelijk biofilm (bijlage I). In een groot gedeelte van de magen zaten wel degelijk haarachtige substanties, zoals te zien op de foto's (bijlage II en III). Deze draden waren gevuld met materiaal, of ongevuld en doorzichtig. Het was niet duidelijk te zien of dit ging om chloroplasten, elementair sulfide of ander materiaal. Er waren niet altijd duidelijke schotten te zien, dus aparte cellen waren lastig te onderscheiden. In vijf magen zijn draden gevonden welke mogelijk potentiële zwavelbacteriën zijn. Het voorkomen hiervan is sporadisch; per vondst zijn er slechts enkele draden gevonden in één preparaat en ze zijn alleen gevonden bij vergrotingen van 100 of 200 keer. Van één maag zijn op het gehele preparaat (alle drie de monsters) draden aangetroffen in kluwen bij elkaar (bijlage III). In enkelen waren wattige slijmvlokken met stukken schelp te zien, mogelijk driehoeks-/quaggamosselen. In de kleinere magen werden andere organismen aangetroffen, zoals invertebraatresten van *Chironomidae* (muggenlarven) en *Chydoridae* (zooplankton, mogelijk *Alona sp.*) en opvallend weinig bodemmateriaal. In de magen van brasems werden de meeste kleine eencellige organismen aangetroffen, zoals groenalgen (*Pediastrum sp.*) en diatomeeën (*Flagilaria sp.*, *Diploneis sp.*) tot soms wel 5 % van de maaginhoud.

#### 3.1.2 Blankvoorn (*Rutilus rutilus*)

Ook hier was een gedeelte van de magen leeg; twee van de zeven onderzochte magen had geen inhoud. De kleinste maag woog 1,04 g met 30 % gevuld en de grootste 3,97 g met 80 % gevuld. De magen met inhoud waren grotendeels gevuld met vlokken, wattig wit tot beige-kleurig slijm en restanten van schelpen en slakkenhuizen (bijlage IV en V). In sommige waren de slakkenhuisjes en mosselen erg goed te herkennen, zoals driehoeks-/quaggamossel, oester en zoetwaterslakken zoals watertorentje en mogelijk *Valvata piscinalis* (bijlage IV). Ook waren er afgeplatte slierten te zien met onduidelijk te onderscheiden cellen. Andere draadvormige structuren waren doorzichtig en bruinkleurig zonder duidelijke cellen of schotten. Onder de microscoop zijn geen duidelijke algen of diatomeeën gevonden. Er zijn geen duidelijke draadvormige structuren gevonden welke op zwavelbacteriën kunnen duiden (bijlage VI).

### 3.1.3 Pos (*Gymnocephalus cernua*)

Alle zes onderzochte magen van de pos bleven onder de 1 g en waren allemaal met 50 % of meer gevuld. Organismen in deze magen bestonden o.a. uit invertebraatresten van *Corophium sp.* (wadkreeftjes), *Chironomidae* (muggenlarven) en andere iets grotere kreeftachtigen, enkele driehoeks-/quagamosselen en zoetwaterslakken (bijlage VII en VIII). Onder de microscoop werden plantenresten gezien. Ook werden er kleinere organismen op gezien, zoals groenalgen en diatomeeën (bijlage IX). Er werden opvallend veel haren van invertebraten gezien en gruis wat mogelijk schelpenresten zijn. Er zijn geen duidelijke draadvormige structuren gevonden welke op zwavelbacteriën kunnen duiden.

### 3.1.4 Zwartbekgrondel (*Neogobius melanostomus*)

Bij de zeven onderzochte magen van zwartbekgrondel werden vooral resten van driehoeks-/quagamosselen aangetroffen, met invertebraatresten van vooral *Corophium sp.* (wadkreeftjes) in iets mindere mate (bijlage X en XI). Ook deze magen waren over het algemeen niet groot; de kleinste woog 0,6 g met 60 % gevuld en de grootste 2 g met 80 % gevuld. Ook hier werden er opvallend veel haren van invertebraten gezien onder de microscoop (bijlage XII). Ook werden er kleine eencelligen organismen gevonden, zoals groenalgen en diatomeeën. Er zijn geen duidelijke draadvormige structuren gevonden welke op zwavelbacteriën kunnen duiden.

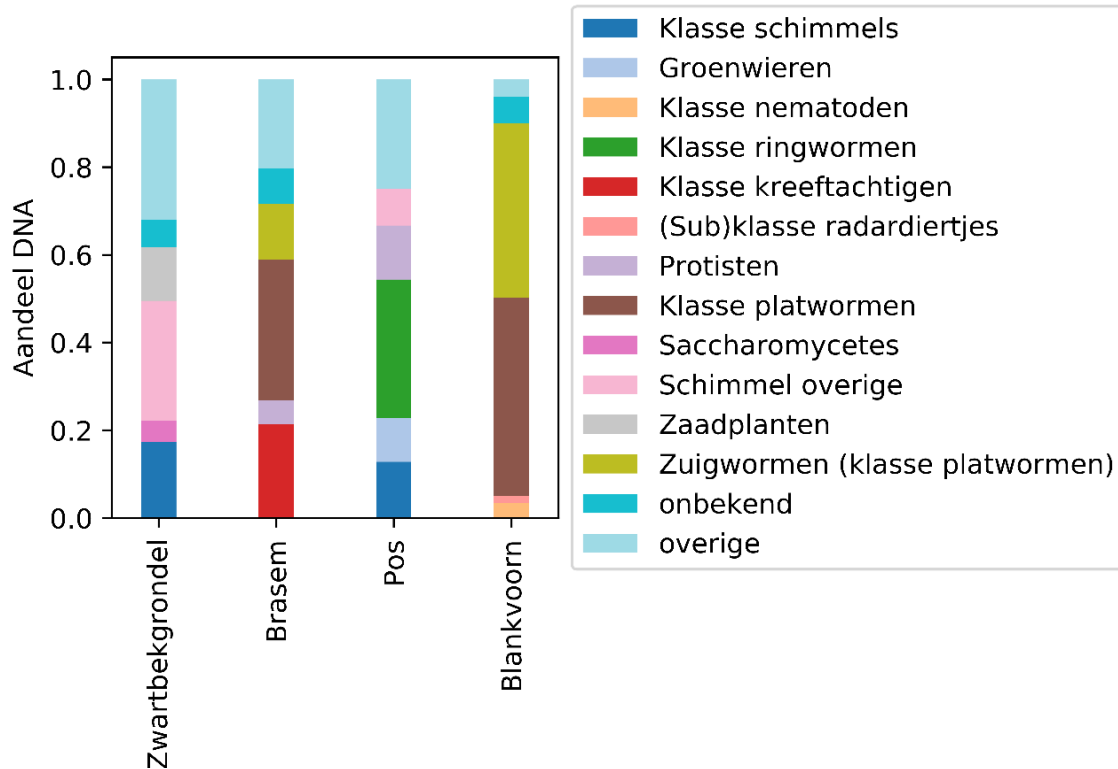
## 3.2 DNA-analyse

In dit hoofdstuk wordt de DNA-analyse besproken. Deze analyse komt geheel uit het rapport van Himbeek & Bochhove (2019). Sommige sequenties hebben label 'onbekend' gekregen. Dit treedt op als er voor deze gevonden sequentie geen onderscheid gemaakt kan worden tussen verschillende klassen of als er geen taxonomische klasse bekend is voor die groep organismen.

### 3.2.1 Eukaryoten primer

De onderstaande tabel geeft weer welke verschillende groepen eukaryoten in de vismagen zijn gevonden. Deze primer laat een groot verschil in dieet zien tussen de verschillende vissoorten (afbeelding 3.1). Zoogdieren, vissen en geslacht *Malassezia* (een schimmel) zijn hieruit weggelaten, omdat dit hoogstwaarschijnlijk contaminaties betreffen door mensen, schimmels van buitenaf en DNA van de betreffende vis zelf.

Afbeelding 3.1 Relatieve aandeel DNA van de meest voorkomende klassen (y-as) per vissoort (x-as) op basis van de eukaryoten primer. De labels 'Protisten' en 'schimmel overige' zijn geen klassen, maar voor deze sequenties was er aanvankelijk geen 'klasse' gegeven (i.e. onbekend). Ter verduidelijking van de figuur zijn deze labels handmatig aan deze sequenties toegevoegd (zie geel gearceerde cellen in ruwe data) (Himbeek & Bochove, 2019)



### 3.2.2 Bacteriële primer

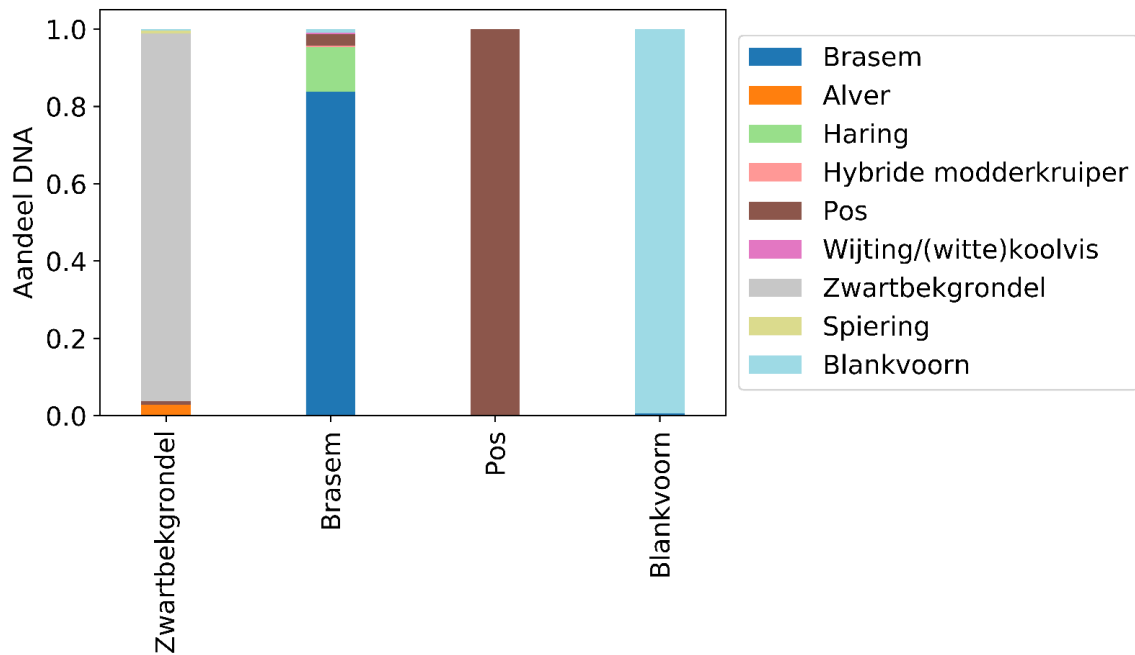
Met deze primer is er in geen van de magen een DNA-sequentie van *Thioploca*, *Thiotrichaceae*, of *Thiotrichales* geïdentificeerd.

### 3.2.3 Vissen primer

Bij vrijwel alle bestudeerde vissoorten bestond het percentage vis DNA geheel (pos: 100 %) of voornamelijk (zwartbekgrondel: 95,06 %; brasem: 83,80 %; blankvoorn: 99,48 %) uit vis DNA van de betreffende soort (afbeelding 3.2). Bij zwartbekgrondel werden daarnaast nog hoeveelheden van brasem, alver, pos, spiering, en blankvoorn gevonden. In brasem is er ook nog haring (11,53 %) en kleine hoeveelheden van een hybride modderkruiper, wijting/koolvis, en blankvoorn gedetecteerd. Bij blankvoorn is nog een zeer lage hoeveelheid brasem DNA te zien.



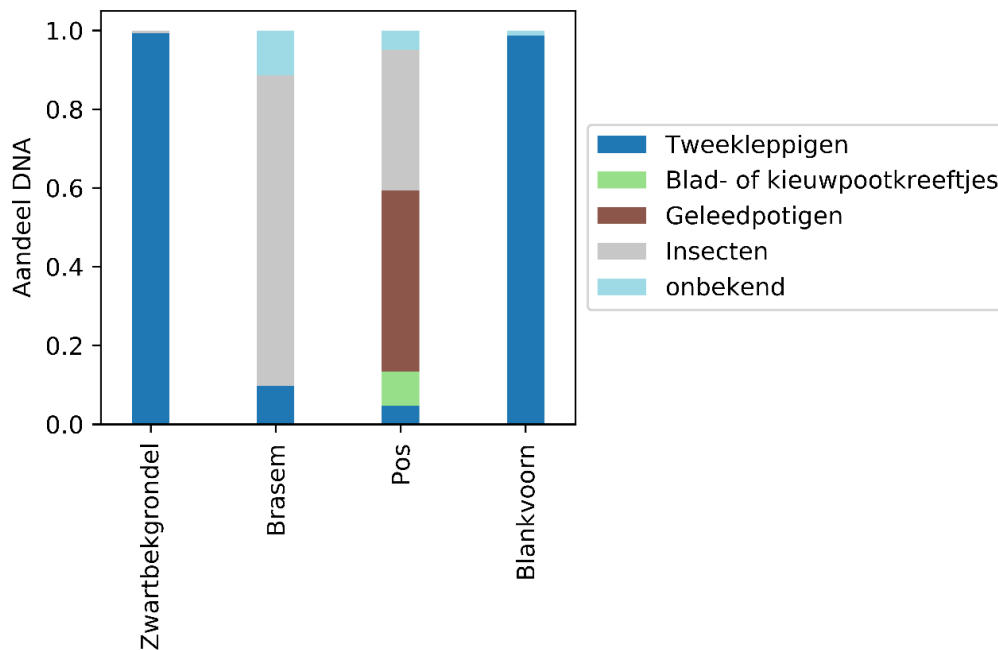
Afbeelding 3.2 Relatieve aandeel DNA van vissoorten (y-as) in de maag van de 4 onderzochte vissen (x-as), op basis van de vissen primer



### 3.2.4 MAV-primer

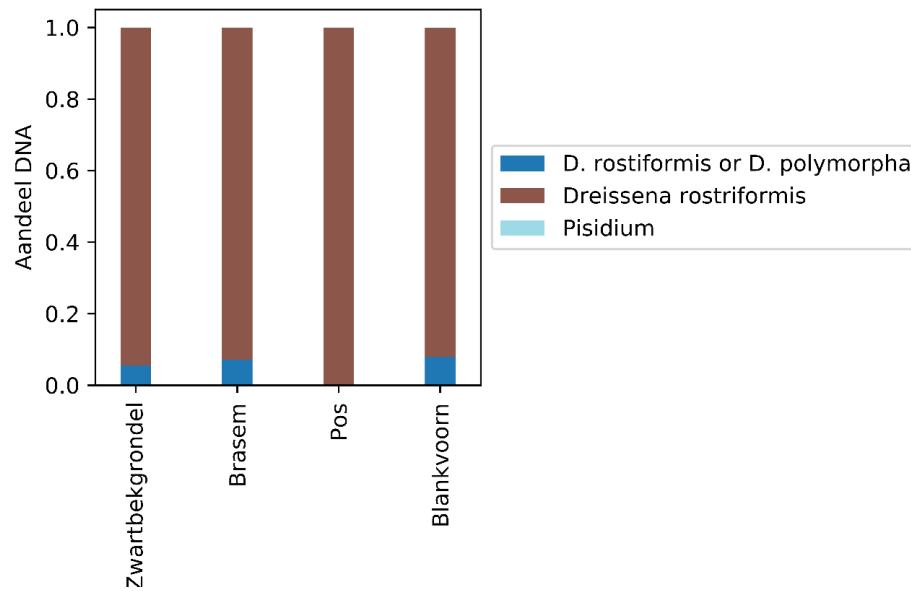
Met de MAV-primer is bij zwartbekgrondel en blankvoorn voornamelijk DNA van tweekleppigen gedetecteerd. Voor brasem was dit voornamelijk insecten (afbeelding 3.3). Vissen zijn uit deze analyse verwijderd, omdat het vooral DNA van de gastheer zelf betrof. Daarnaast zijn zoogdieren verwijderd, aangezien dit niet onderdeel is van het dieet van deze vissen en het waarschijnlijk gaat om contaminatie van mensen.

Afbeelding 3.3 Relatieve aandeel DNA van de meest voorkomende groepen (y-as) voor iedere vissoort (x-as) op basis van de MAV-primer, exclusief vissen en zoogdieren



Deze drie hoofdgroepen zijn erna verder in detail bekeken. Het DNA van blad- of kieuwpootkreeftjes in pos is afkomstig van *Daphnia*. Voor al de vier vissoorten bestond het dieet van tweekleppigen voornamelijk uit *Dreissena rostriformis* (quaggamossel). In de maag van blankvoorn zijn er nog relatief zeer lage hoeveelheden (niet zichtbaar op de afbeelding) DNA van het geslacht *Pisidium* aangetroffen (afbeelding 3.4).

Afbeelding 3.4 Relatieve aandeel DNA van soorten tweekleppigen (y-as) voor iedere vissoort (x-as) op basis van de MAV-primer.



# 4

## DISCUSSIE

### 4.1 Visuele analyse

#### Methode

Er is halverwege het onderzoek overgegaan op een ander lab, het NIOO in Wageningen, welke meer faciliteiten tot zijn beschikking had. Het lab beschikte onder andere over een microscoop met 100 en 200 keer vergroting, waardoor individuele cellen beter zichtbaar werden. Er werd ook een andere methode toegepast, waarbij het wegen van de maaginhoud en mate van vertering meegenomen zijn. Aangezien er vanaf het begin geen vast protocol was, is er dus een verschil in methode.

Het uitzoeken van vismagen is een erg tijdrovend werk; de afgesproken 100 vismagen onderzoeken werd niet gehaald. Per vis was er een halfuur tot soms een uur nodig om te onderzoeken, afhankelijk van de beschikbaarheid van de microscopen en van de grootte van de maaginhoud. Het lab was een beperkte tijd beschikbaar; in zes dagen tijd is het niet mogelijk om alle vismagen te onderzoeken. De brasemmagen hadden prioriteit en deze zijn dan ook afgerond. Omdat het vermoeden dat de andere vissoorten de bacterie niet in de maag zouden hebben langzaam werd bevestigd, is er gestopt met zoeken na 6 of 7 vismagen bestuderen.

De vergroting van de binoculair was soms niet groot genoeg om aparte cellen goed genoeg te kunnen observeren. Met de microscoop tot 200 keer vergroting was dit beter te zien, maar ook niet goed genoeg om uitsluitsel te geven. Waarschijnlijk is deze methode daarom niet zo heel geschikt voor het vinden van zwavelbacteriën.

#### Betrouwbaarheid

Het kan zo zijn dat de cellen van de zwavelbacteriën dusdanig verteerd waren dat ze onherkenbaar zijn onder de binoculair of microscoop. Ook zou het mogelijk kunnen zijn dat ze over het hoofd zijn gezien; de monsters van de magen zijn groot en niet alle maaginhoud kon even nauwkeurig bekeken worden. Daarnaast is de expertise misschien niet toereikend genoeg geweest om de zwavelbacteriën te kunnen herkennen.

#### Maaginhoud vissen

In de magen van *A. brama* is duidelijk bodemmateriaal gevonden en grote delen draadachtig (organisch) materiaal. In kleinere magen (van jongere vissen) wordt opvallend weinig bodemmateriaal en draadvormige structuren gevonden. Het lijkt erop dat kleinere vissen meer gericht een prooi zoeken dan grotere vissen, waardoor zij minder bodemmateriaal binnenkrijgen en daardoor waarschijnlijk ook weinig of geen zwavelbacteriën. Hoewel er wel degelijk haarachtige substanties in de magen van *A. brama* is aangetroffen, is het onduidelijk om precies te zeggen om welke soorten dit gaat. Het kunnen mogelijk kluwen van zwavelbacteriën zijn, maar draden van bijvoorbeeld algen kunnen zo op het blote oog niet uitgesloten worden.

Er zijn geen draadachtige structuren gevonden in de maaginhoud van *R. rutilus*, anders dan (soms afgeplatte) slierten zonder duidelijk te onderscheiden cellen of schotten. Mogelijk zijn dit algen, plantaardig materiaal of draden waarmee schelpdieren, zoals mosselsoorten, zich verankeren aan de ondergrond.

Er zijn geen draadachtige structuren gevonden in de maaginhoud van *G. cernua* en *N. melanostomus*. Deze vissoorten lijken erg gericht te zoeken naar bepaalde prooien van significante grootte, zoals invertebraten en schelpdieren.

## 4.2 DNA-analyse

### Contaminatie

De DNA-resultaten geven aan dat er verschillende percentages aan vis DNA in de vismagen terecht is gekomen. De DNA-mengmonsters kunnen 'vervuild' zijn met ander genetisch materiaal wat niet afkomstig is uit uitsluitend maaginhoud. De containers waar deze inhoud in werd opgeslagen, hebben open gestaan op een vissersboot welke actief bezig was met de verwerking en de bemonstering van vis. Er werden handschoenen gedragen, maar deze zouden 'besmet' kunnen zijn met genetisch materiaal van andere vismagen, slijm en schubben van vishuiden en oppervlakken van voorwerpen. Dit kan van invloed zijn geweest op de resultaten van de DNA-mengmonsters.

### Betrouwbaarheid

Er is maar een heel klein gedeelte van elke maaginhoud van de vissen gebruikt voor een DNA-mengmonster. Dit monster bevat dus niet een duidelijk beeld van het gehele maag-darmstelsel van de vis op dat moment. Dit kan betekenen dat er alleen gedeeltes van de maaginhoud zijn gebruikt waar deze bacterie niet inzat. Ook is er bij de analyse van *Datura* alleen gebruik gemaakt van de primer voor *Thioploca* (genus), *Thiotrichaceae* (familie), of *Thiotrichales* (orde). *Datura* was niet in het bezit van een primer voor *Thiothrix* of *Beggiatoa*. Dit zijn wel soortgroepen die erg nauw aan elkaar verwant zijn. Toch blijft de mogelijkheid bestaan dat van deze laatste soortgroepen geen DNA kon worden gevonden door onvoldoende primers. Als een vis gericht zwavelbacteriën zou eten, dan zou er verwacht worden dat met deze methode in ieder geval iets van DNA van zwavelbacteriën naar boven zou komen. Dit is niet het geval. Het kan zijn dat  $n=25$  voor één vissoort voor dit onderzoek simpelweg te weinig is om hier uitsluitel over te geven. Er zou een vervolgonderzoek plaats kunnen vinden wat zich meer richt op alleen *A. brama* waarbij meer vissen worden onderzocht en een groter mengmonster wordt genomen, van bijvoorbeeld  $n=100$ .

De resultaten van de DNA-analyse komt in grote lijnen overeen met wat er is gevonden in de visuele analyse. *R. rutilus* en *N. melanostomus* blijken het meest te leven van schelpdieren en met name van tweekleppigen. In de visuele analyse is dit duidelijk terug te lezen. Ook was het opvallend dat *G. cernua* de meeste resultaten genereerde bij de WAV primer, namelijk geleedpotigen, insecten en blad- of rieuwpootkreeftjes.

### Volledigheid

DNA-analyses geven een zeer gedetailleerd beeld van het dieet. Het beeld is véél gedetailleerder dan met binoc/microscop kan worden verkregen. Het verdient aanbeveling om voor verdere analyse gebruik te maken van DNA-analyses.

## 4.3 Alternatieve hypothese

Omdat er met de DNA-analyse en vismagenonderzoek geen zwavelbacteriën zijn aangetroffen, bestaat er een mogelijkheid dat deze vissen zwavelbacteriën actief mijden. Dit is opvallend: de vissen krijgen van alles binnen maar geen zwavelbacteriën. Zou er sprake kunnen zijn van actieve mijding? Dit schreeuwt om nader onderzoek!

# 5

## CONCLUSIE EN AANBEVELINGEN

Er zijn draadvormige structuren aangetroffen in de maagdarmsels van minimaal *A. brama*, maar er kan op het oog niet worden uitgesloten dat het gaat om andere organismen, zoals draadalgen. De gebruikte methode is hoogstwaarschijnlijk niet ideaal voor het aantonen van zwavelbacteriën. Ook zijn er zo weinig draden aangetroffen dat er niet met zekerheid gezegd kan worden of deze draden bewust worden gegeten; er is meer sprake van een sporadische inname samen met bodemmateriaal.

Er zijn geen draadachtige structuren gevonden in de maaginhoud van *R. rutilus*, *G. cernua* en *N. melanostomus* welke overeenkomsten hebben met zwavelbacteriën. Het is onwaarschijnlijk dat deze vissoorten deze bacterie eten. Dit wordt ook ondersteund door de DNA-analyse.

In de DNA-analyse zijn er geen zwavelbacteriën in de vismagen aangetoond. Aangezien *A. brama* bodemmateriaal eet, zou dit wel als sporadische inname naar voren kunnen komen. Dit is niet het geval. Er is geen duidelijk aantoonbaar bewijs gevonden dat bodemwoelende vissen (*Abramis brama*, *Rutilus rutilus*, *Gymnocephalus cernua* en *Neogobius melanostomus*) zwavelbacteriën (genera *Thioploca*, *Thiotrix* en/of *Beggiatoa*) eten.

Er bestaat een mogelijkheid dat deze vis zwavelbacteriën mijdt als voedselbron. Hiervoor zal opnieuw onderzoek voor moeten worden gedaan om dit te bevestigen. Er kan worden gekeken naar maaginhoud (wat komt samen met elkaar voor) in relatie tot locatie van waar dit is gegeten en de locatie van de zwavelbacteriën in het Markermeer. Ook kan er worden gekeken naar een volgende DNA-analyse met meer individuele vissen, welke zich richt op *A. brama*.

# 6

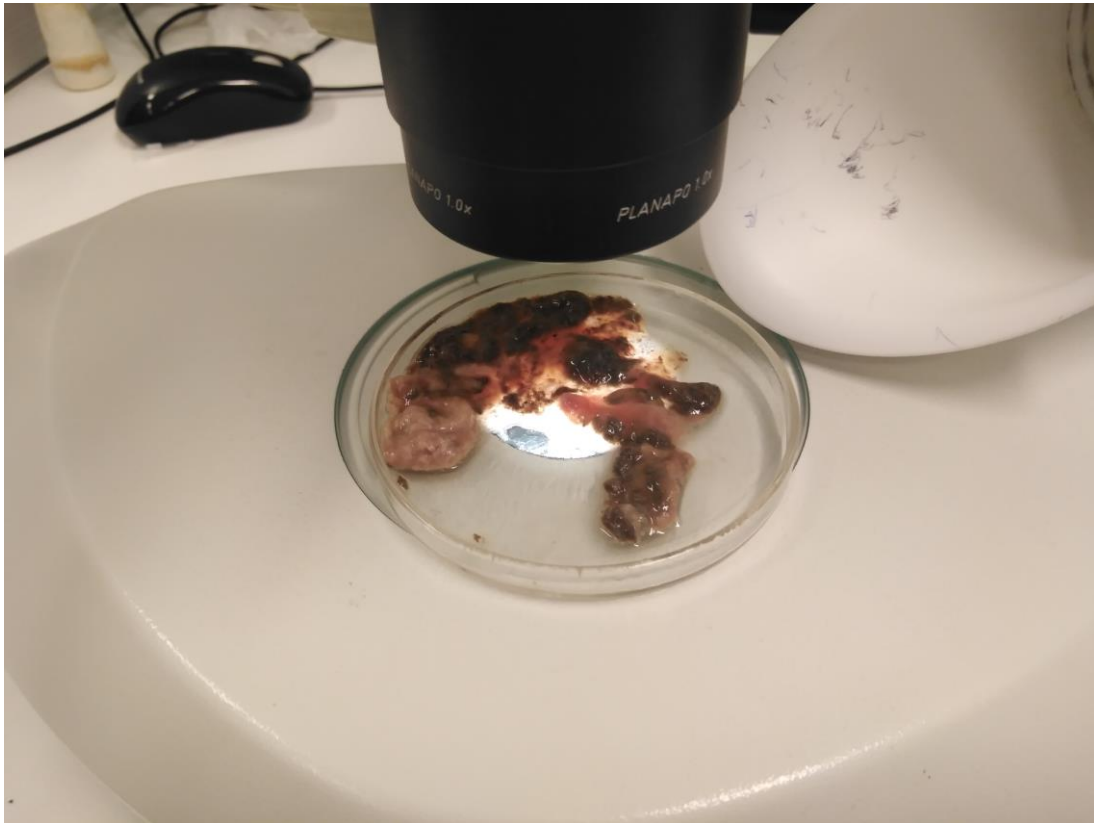
## LITERATUUR

- 1 Emmerik, W. v. (2004). Kennisdocument pos, *Gymnocephalus cernuus* (Linnaeus, 1758). Bilthoven: Sportvisserij Nederland.
- 2 Emmerik, W. v. (2008). Kennisdocument brasem, *Abramis brama* (Linnaeus, 1758). Bilthoven: Sportvisserij Nederland.
- 3 Himbeek, R. v., & Bochove, K. v. (2019). DNA-analyse maaginhoud vissen. Wageningen: Datura Molecular Solutions.
- 4 Kawasaki, Y., Endo, T., Fujiwara, A., Kondo, K., Katahira, M., Nittami, T., Takeda, M. (2017). Elongation pattern and fine structure of the sheaths formed by *Thiothrix nivea* and *Thiothrix fructosivorans*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1280 - 1288.
- 5 Laak, G. d. (2010). Kennisdocument blankvoorn, *Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758). Bilthoven: Sportvisserij Nederland.
- 6 Madigan, M., Martinko, J., Stahl, D., & Clark, D. (2012). *Biology of Microorganisms* (13 ed.). San Francisco: Pearson Education Inc.
- 7 Markermeer-IJmeer, S. (2019). Wie zijn wij. Retrieved from Markermeer - IJsselmeer. Natuurlijk ontwikkelen: <https://www.markermeerijmeer.nl/Wie+zijn+wij/default.aspx>.
- 8 McKay, L. J., MacGregor, B. J., Biddle, J. F., Albert, D. B., & Mendlovitz, P. H. (2012). Spatial heterogeneity and underlying geochemistry of phylogenetically diverse orange and white *Beggiatoa* mats in Guaymas Basin hydrothermal sediments. *Deep-Sea Research I*, 67, 21 - 31.
- 9 Noordhuis, R. (2019). Survey draadvormige zwavelbacteriën Markermeer. *Deltares*.
- 10 Pennock, I. (2011). Protocol Maaginhouden van vis verwerken op het lab.
- 11 RAVON. (2019). Zwartbekgrondel (exoot). Retrieved from RAVON. <https://www.ravon.nl/Soorten/Soortinformatie/zwartbekgrondel-exoot>.
- 12 Rijksoverheid. (2019). Natura 2000. Retrieved from Rijksoverheid: <https://www.rijksoverheid.nl/onderwerpen/natuur-en-biodiversiteit/natura-2000>.
- 13 Roskam, G. D. (2016). Resultaten 0-monitoring slibbodem Marker Wadden. Delft: Deltares.
- 14 Roskam, G. D. (2019). Monitoring slibbodem rondom Marker Wadden - 2019. Delft: Deltares.
- 15 STOWA. (2014). *Het Onderste Boven*. Amersfoort: STOWA.
- 16 Teske, A., Ramsing, N. B., Küver, J., & Fossing, H. (1995). Phylogeny of *Thioploca* and Related Filamentous Sulfide-Oxidizing Bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 18, 517 - 526.
- 17 Vaate, b. d., & Jansen, E. (2008). Onderzoek naar de groei en voorplanting van driehoeks- en quaggamosselen in het IJsselmeergebied: resultaten van onderzoek uitgevoerd in 2008. Lelystad: Waterfauna Hydrobiologisch Adviesbureau.
- 18 Van Herk, M. (2019). Onderzoek bodem Markermeer 2019. *Euglena Aquatische Ecologie*.
- 19 Wu, X., Huang, J., Lu, Z., Chen, G., Wang, J., & Liu, G. (2019). *Thiothrix eikelboomii* interferes oxygen transfer in activated sludge. *Water Research*, 151, 134 - 143.



Bijlage(n)

BIJLAGE: FOTO'S MAAGINHOUD BRASEM PETRISCHAAL (20 DECEMBER 2019, NIOO)

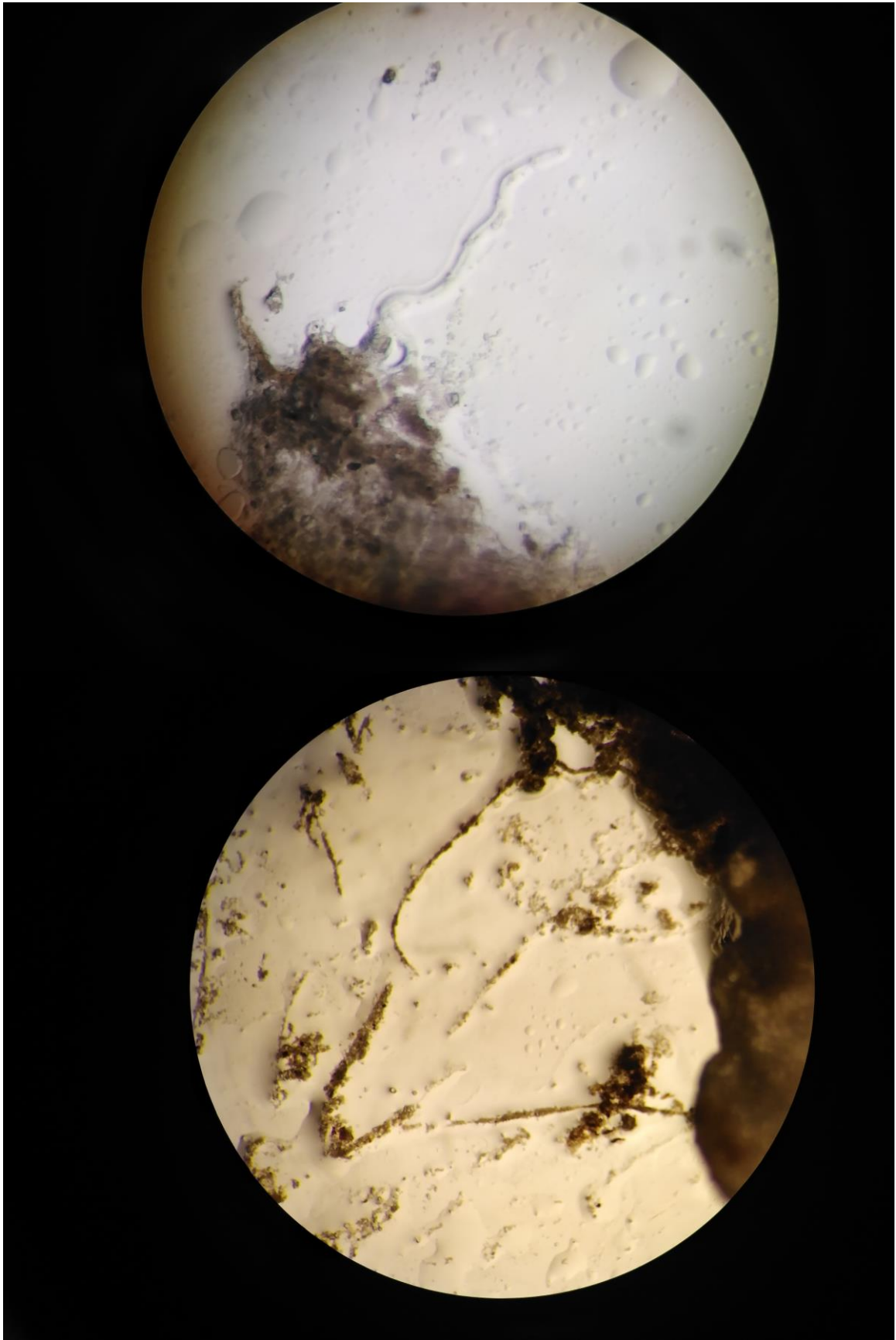


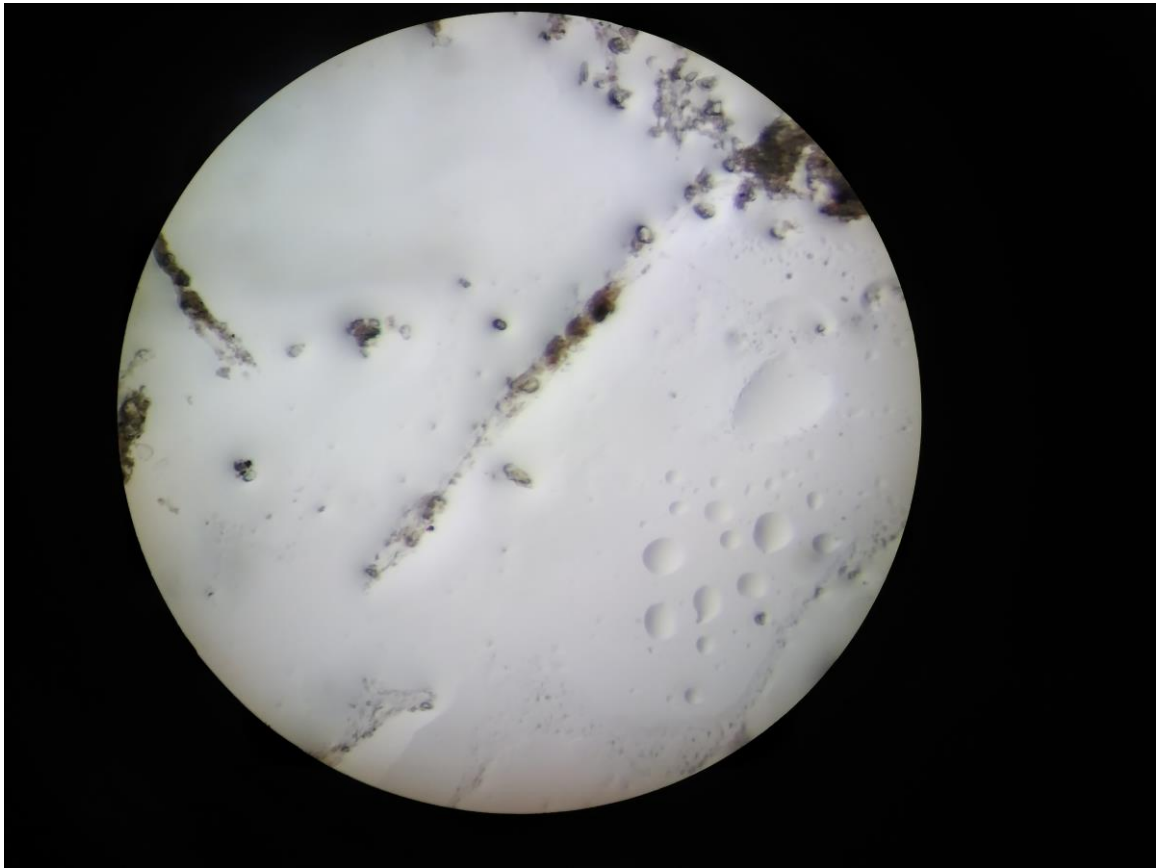




BIJLAGE: FOTO'S BINOCULAIR BRASEM (5 NOVEMBER 2019, IMARES)





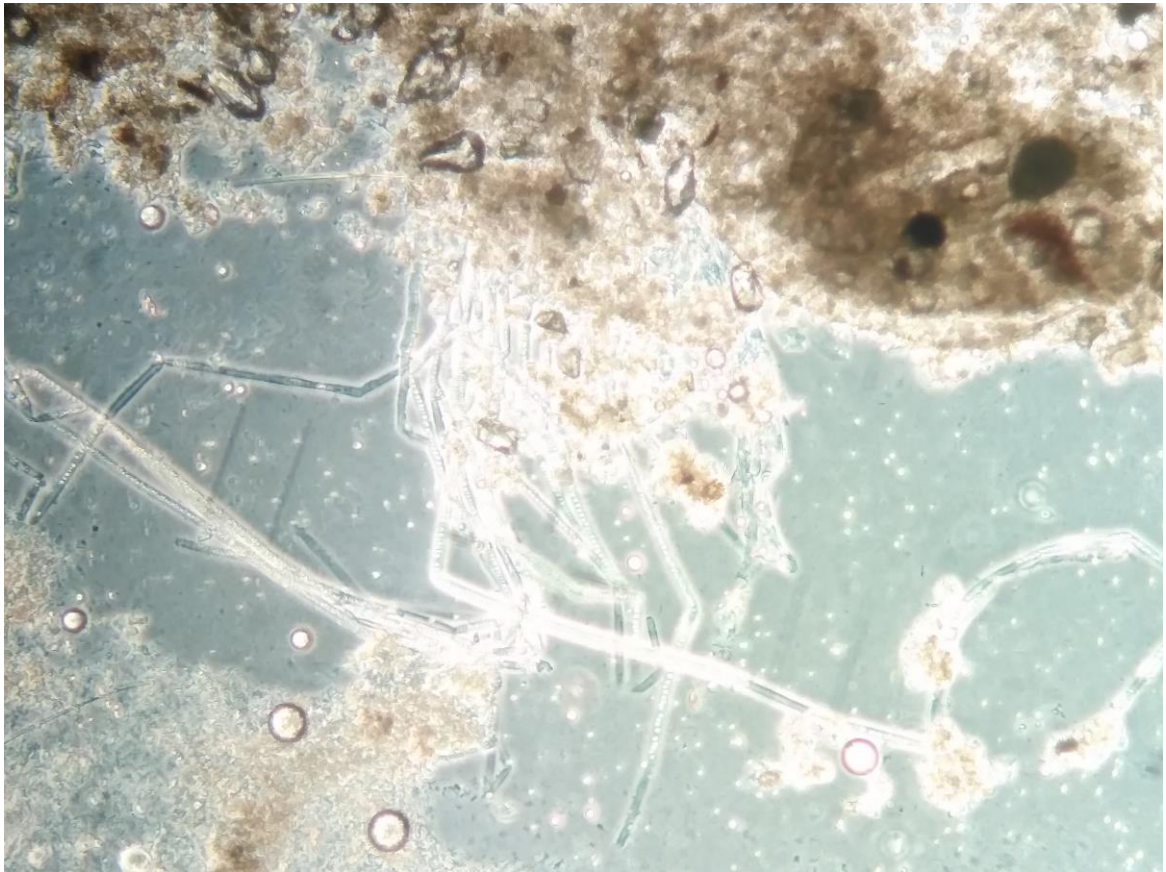






BIJLAGE: FOTO'S MICROSCOOP BRASEM (20 DECEMBER 2019, NIOO, 100X)





# IV

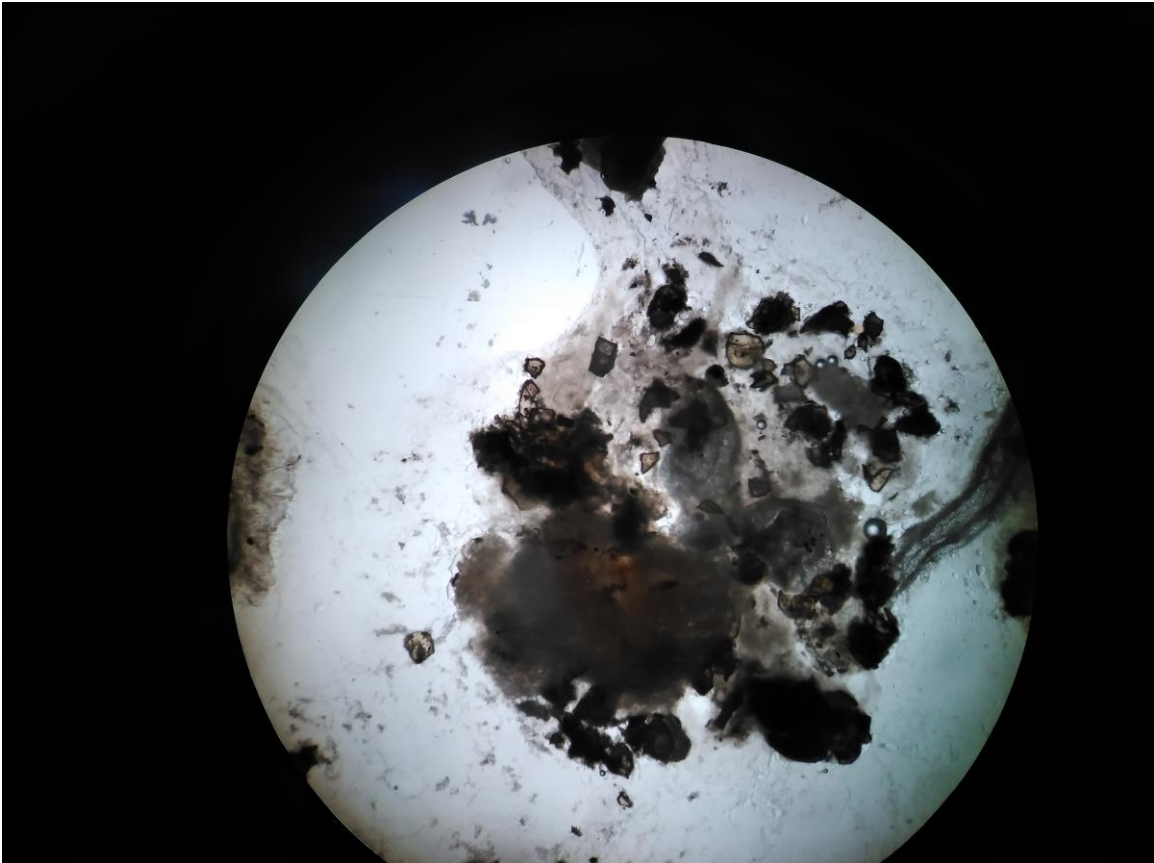
BIJLAGE: FOTO'S MAAGINHOUD BLANKVOORN PETRISCHAAL (5 NOVEMBER 2019, IMARES EN 10 JANUARI 2020, NIOO)



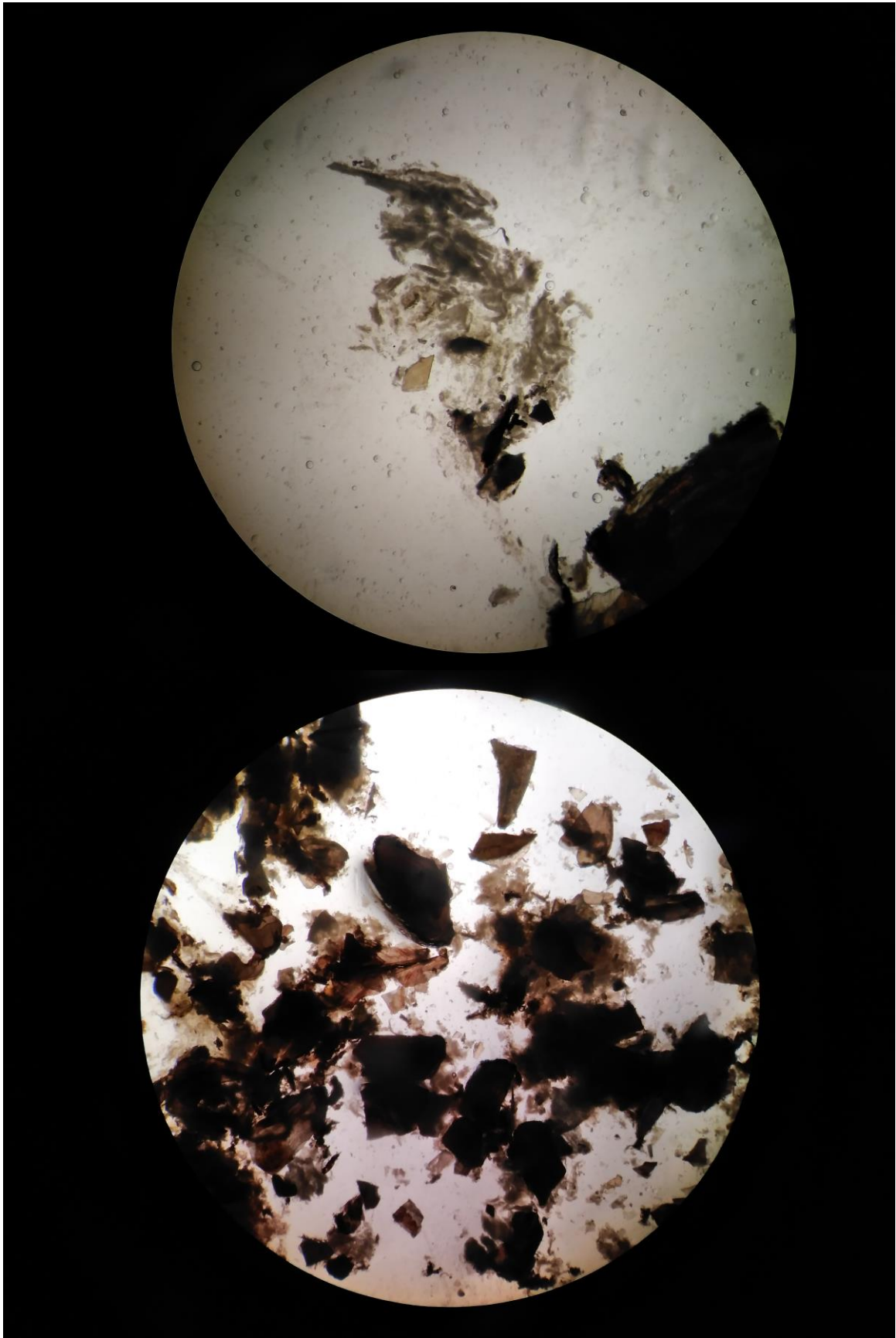


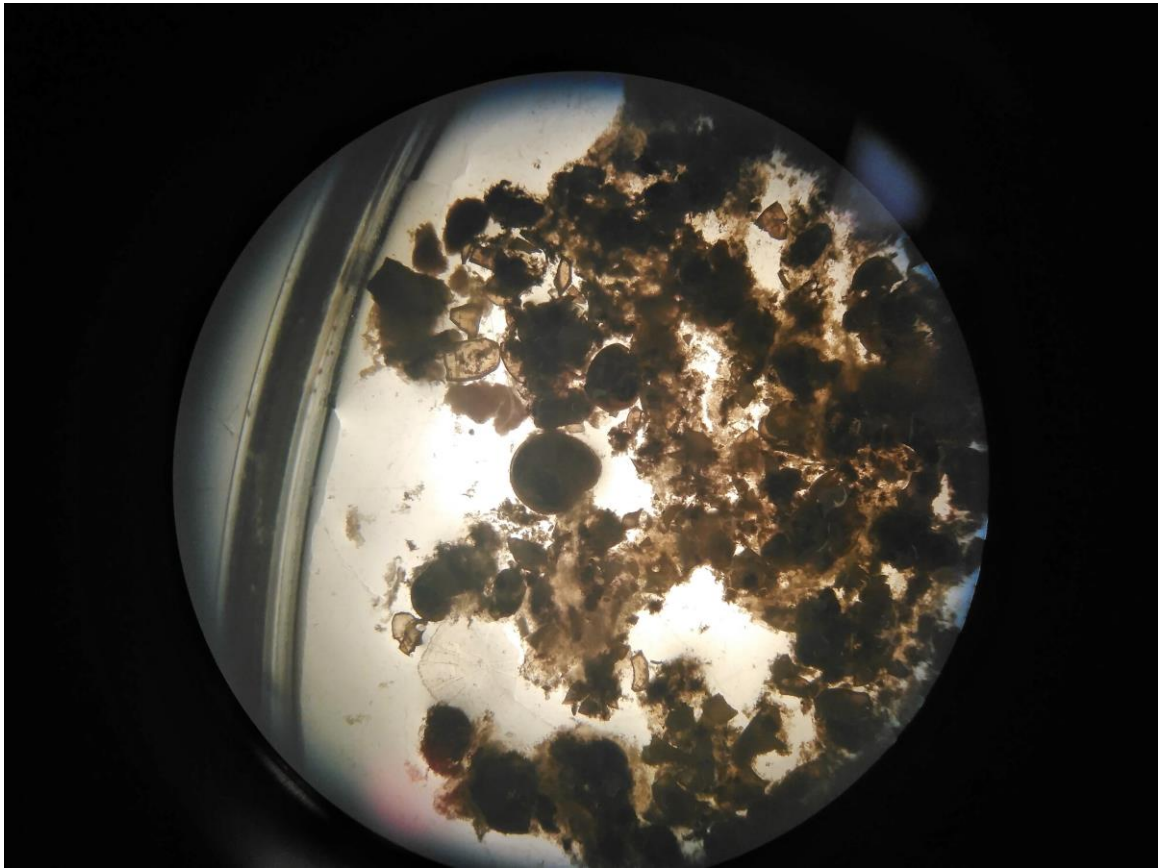
# V

BIJLAGE: FOTO'S BINOCULAIR BLANKVOORN (5 NOVEMBER 2019, IMARES EN 10 JANUARI 2020, NIOO)



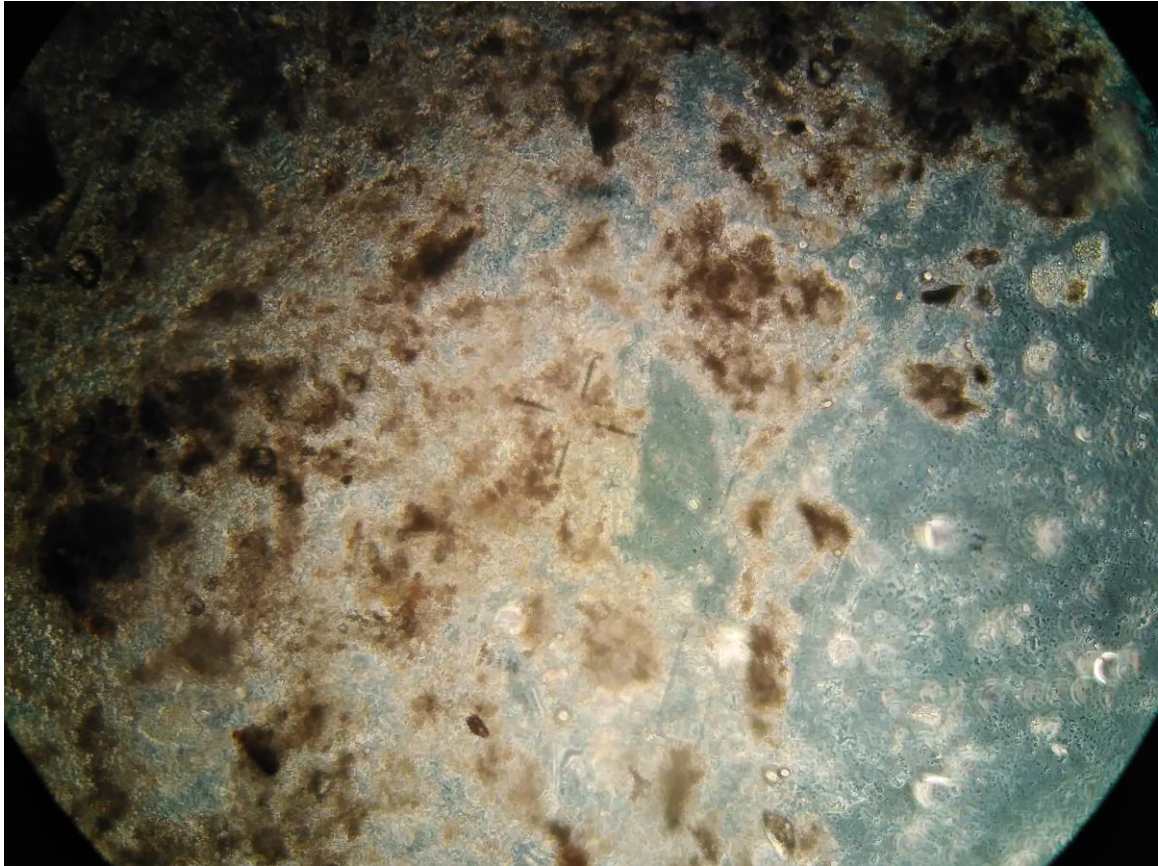




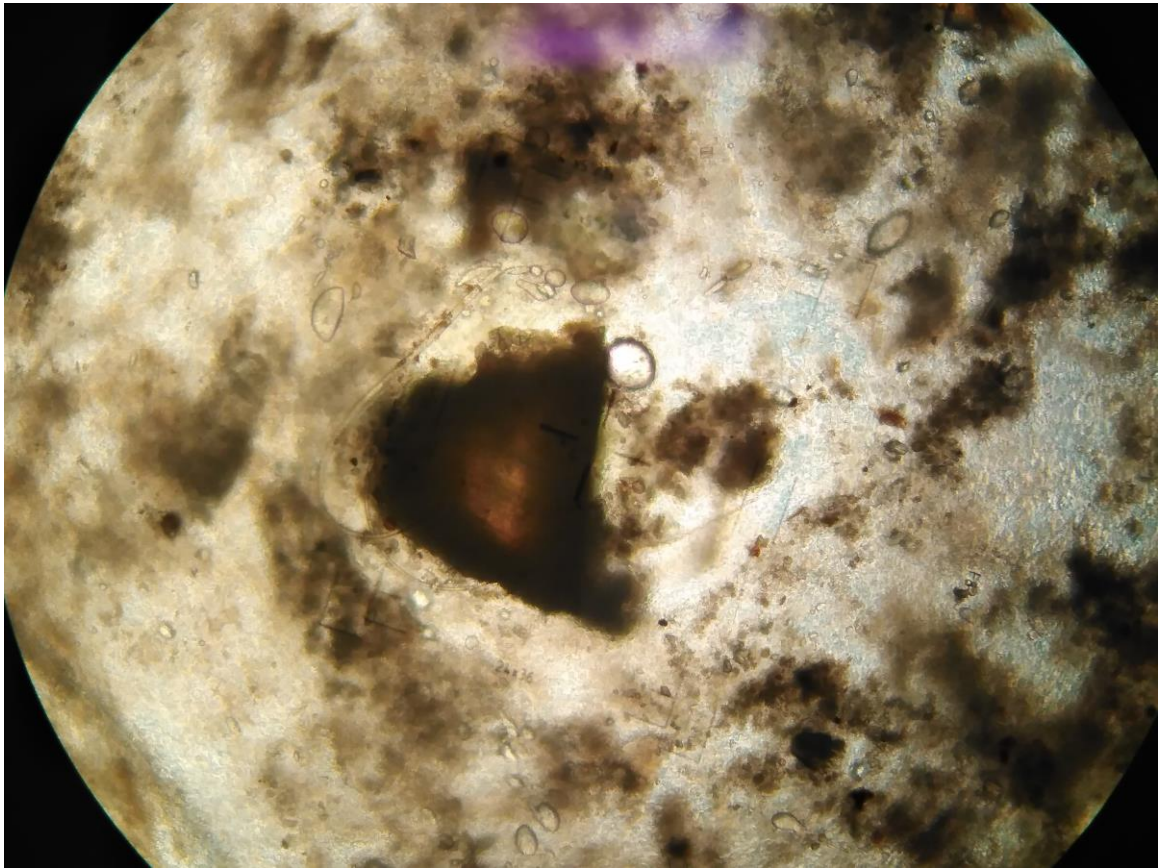


# VI

BIJLAGE: FOTO'S BLANKVOORN MICROSCOOP (10 JANUARI 2020, NIOO, 100X)







# VII

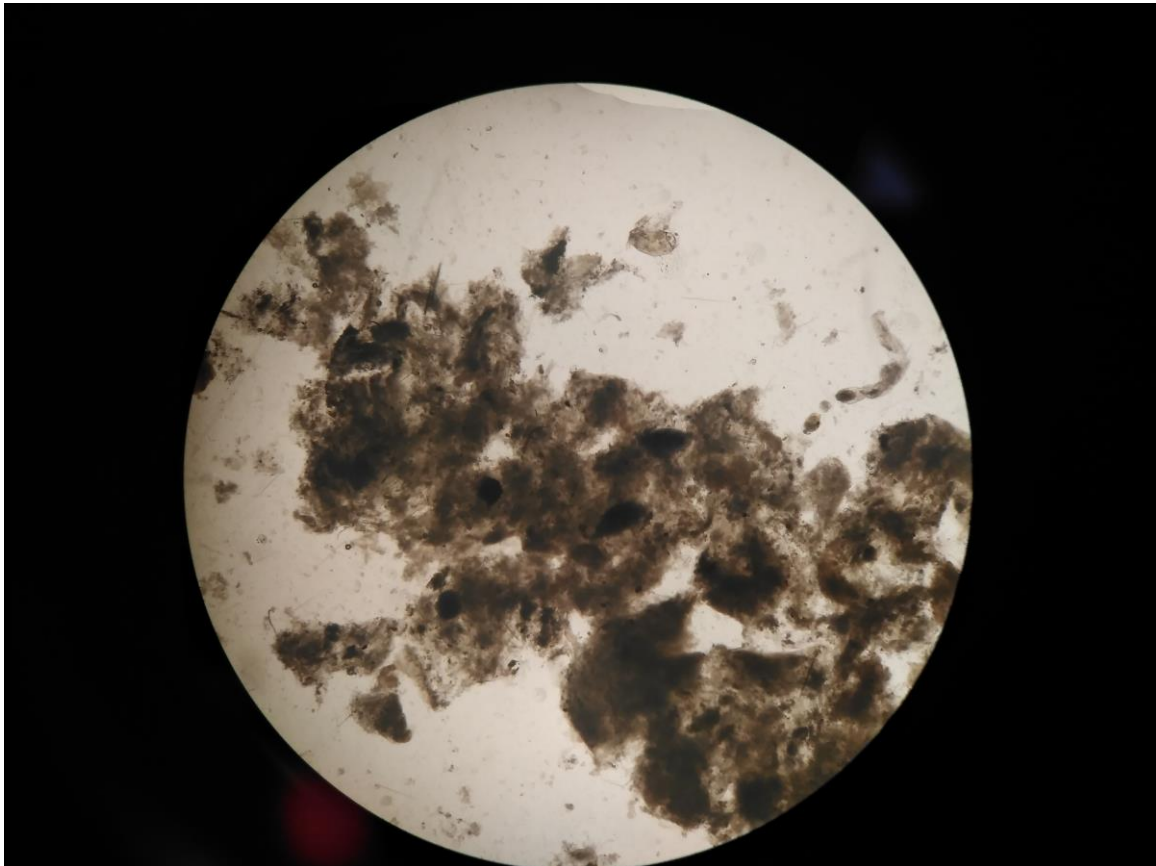
BIJLAGE: FOTO'S MAAGINHOUD POS PETRISCHAAL (10 JANUARI 2020, NIOO)

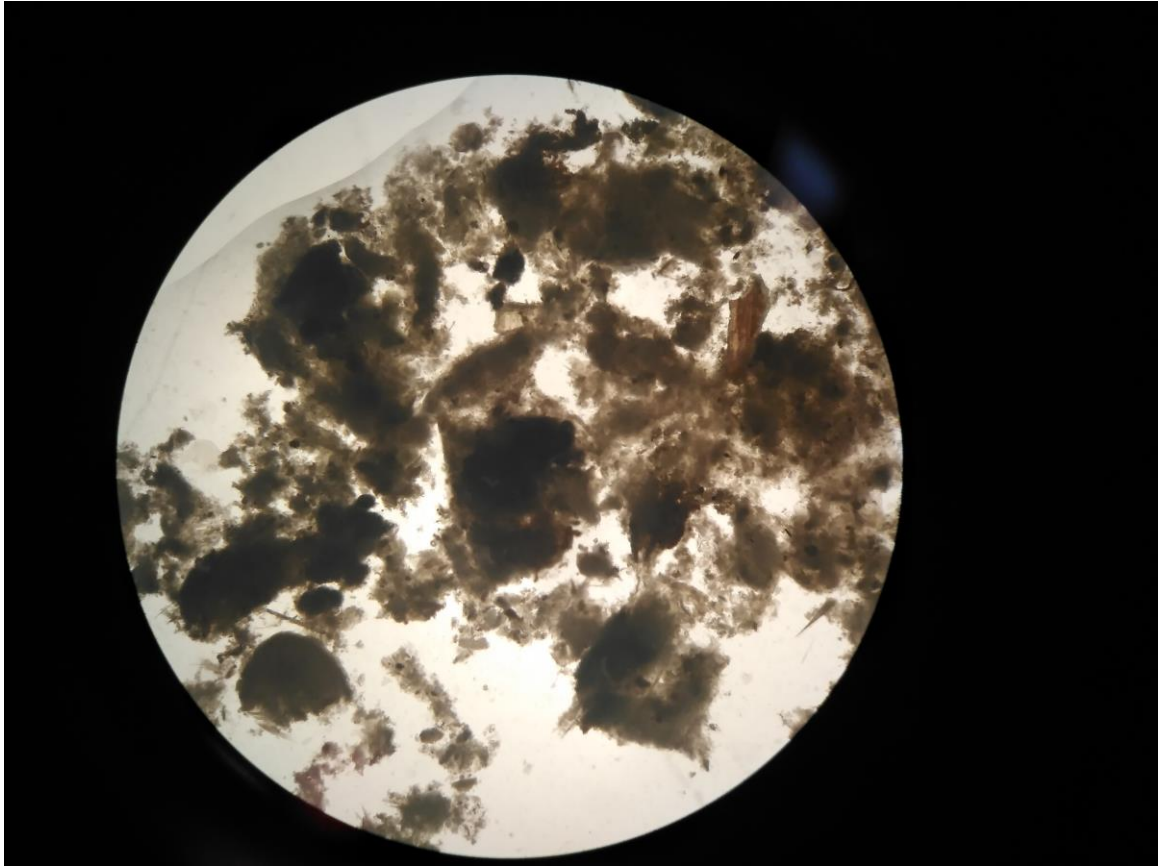




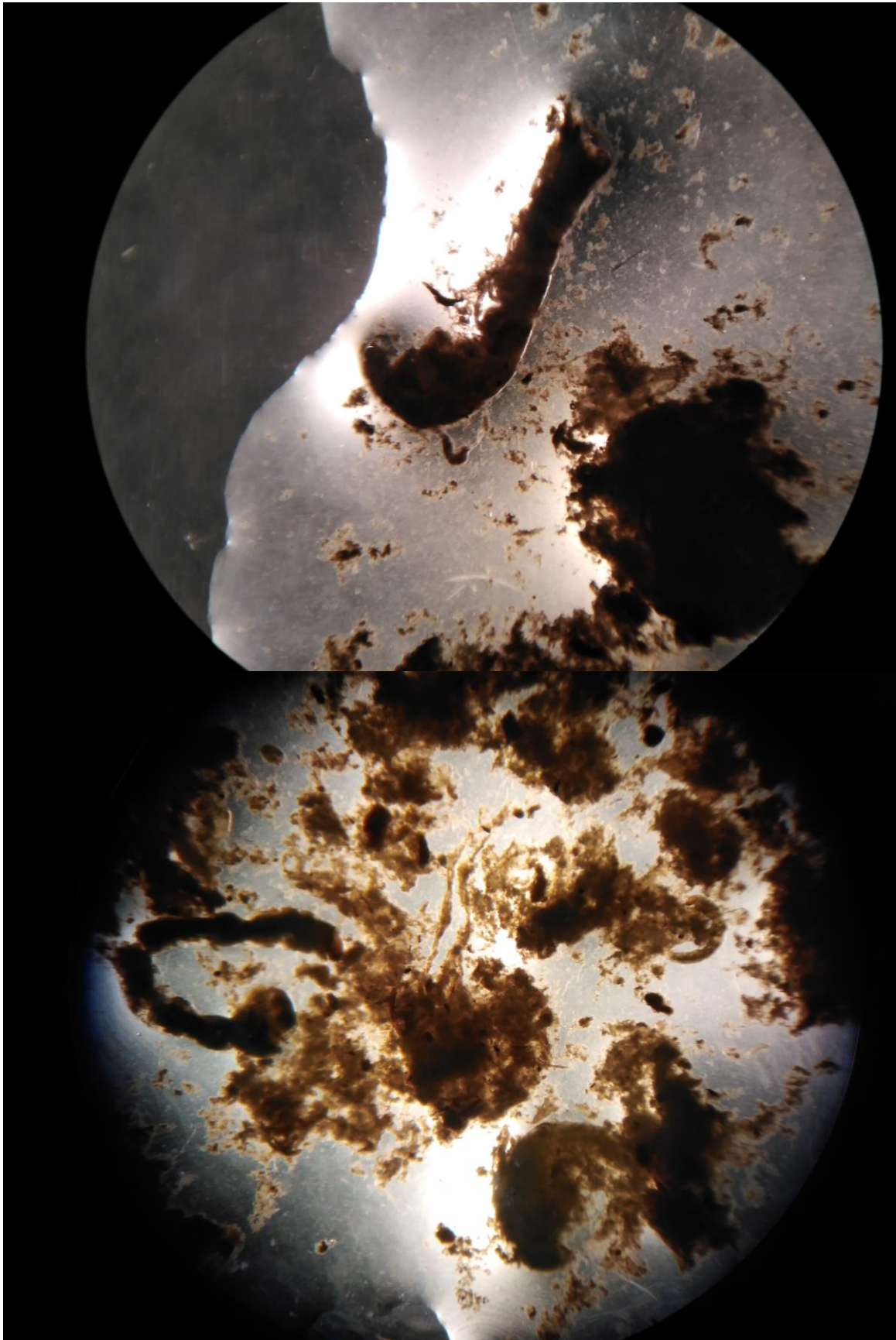
# VIII

BIJLAGE: FOTO'S POS BINOCULAIR (10 JANUARI 2020, NIOO)



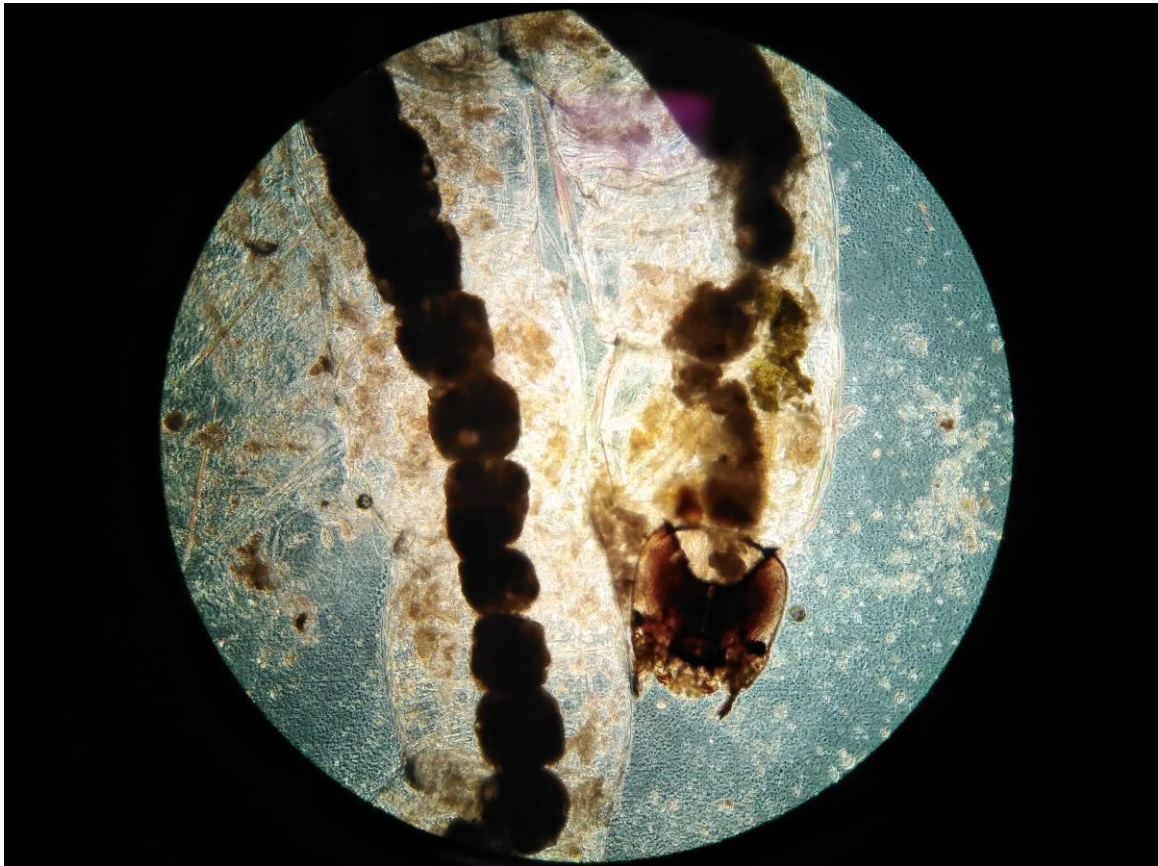


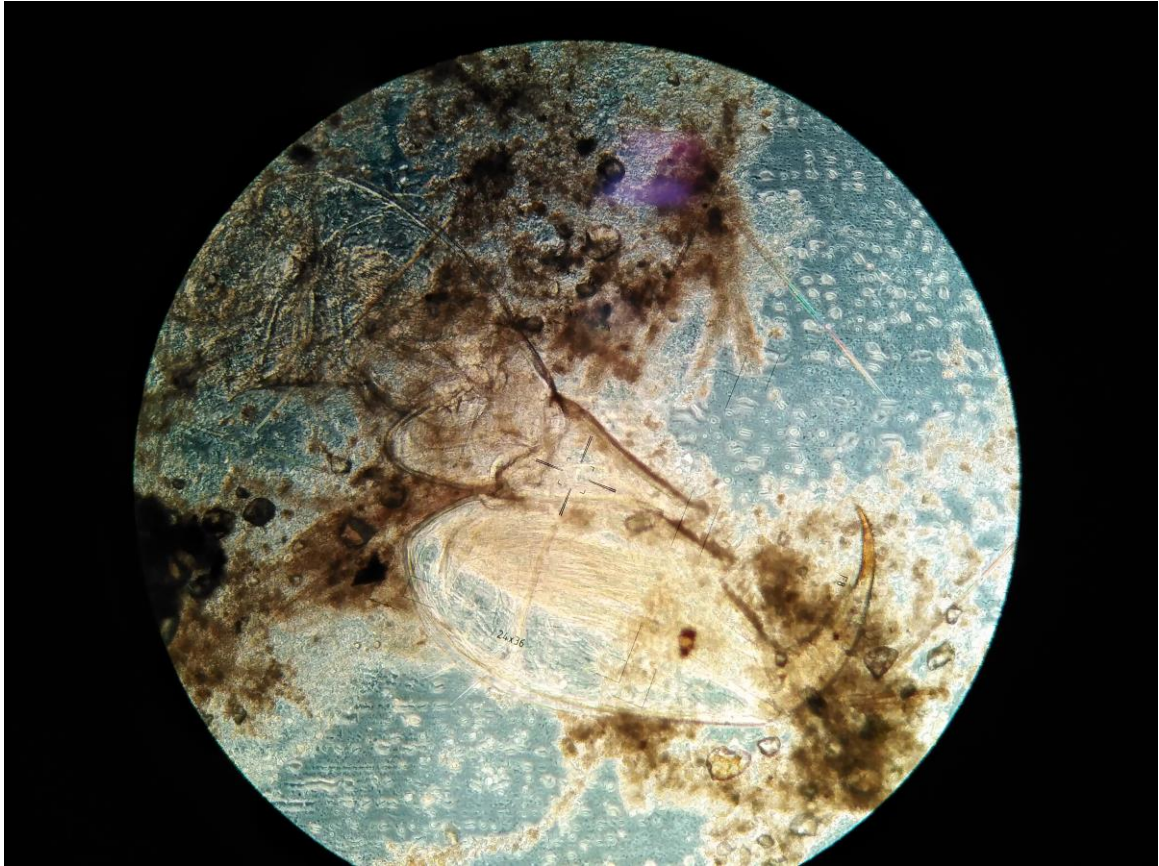




# IX

BIJLAGE: FOTO'S POS MICROSCOOP (100X, 10 JANUARI 2020, NIOO)

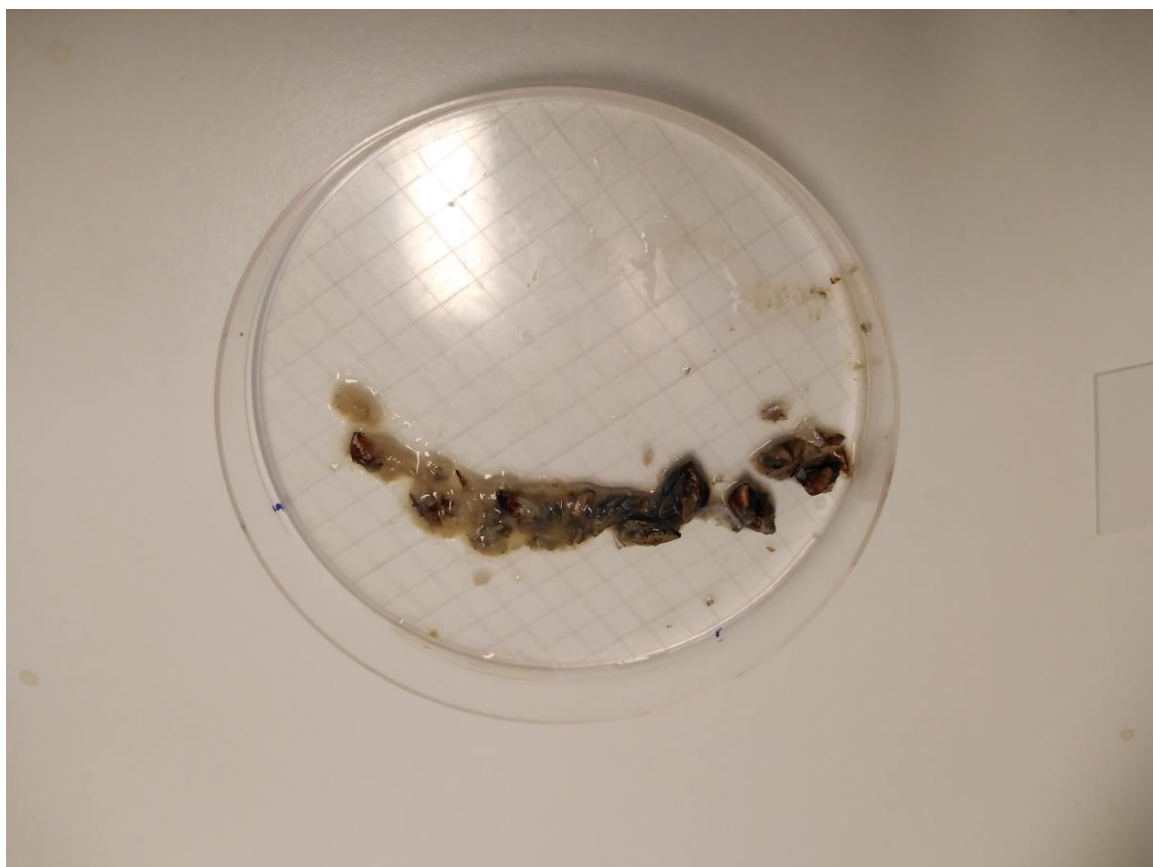


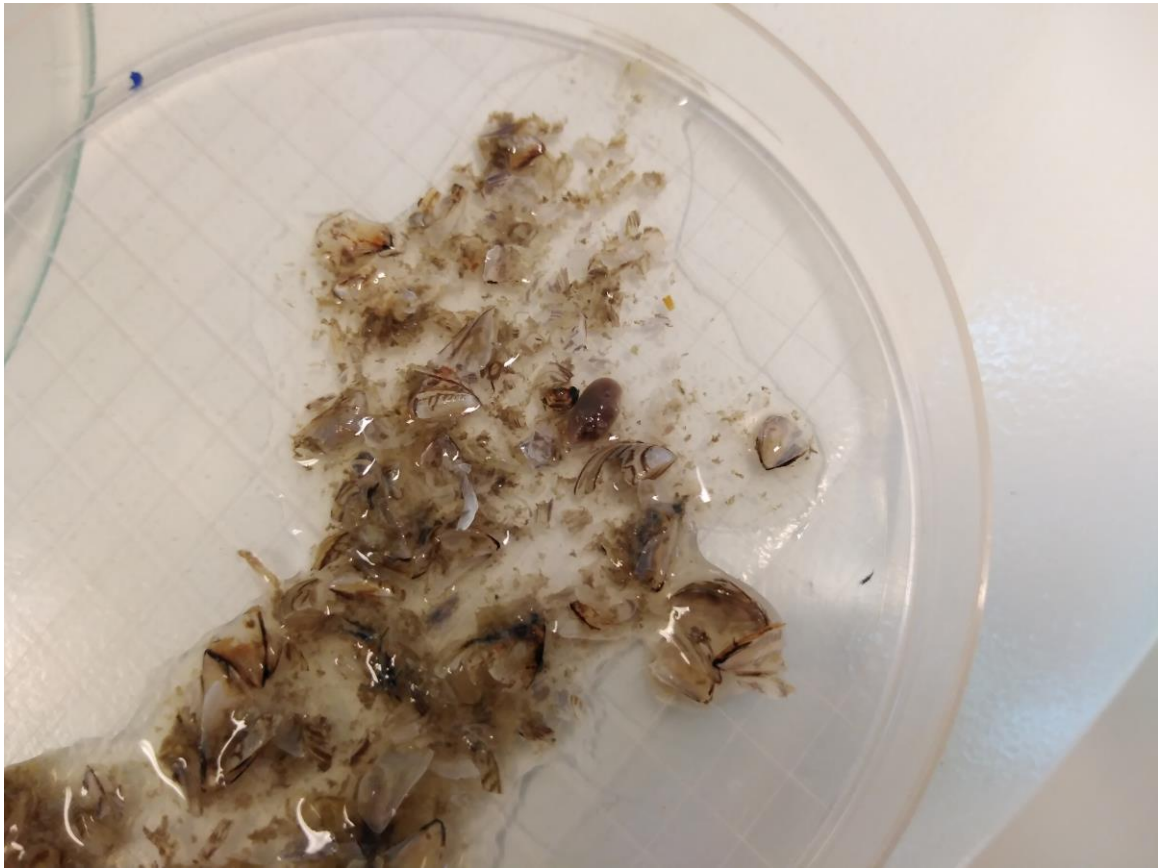




X

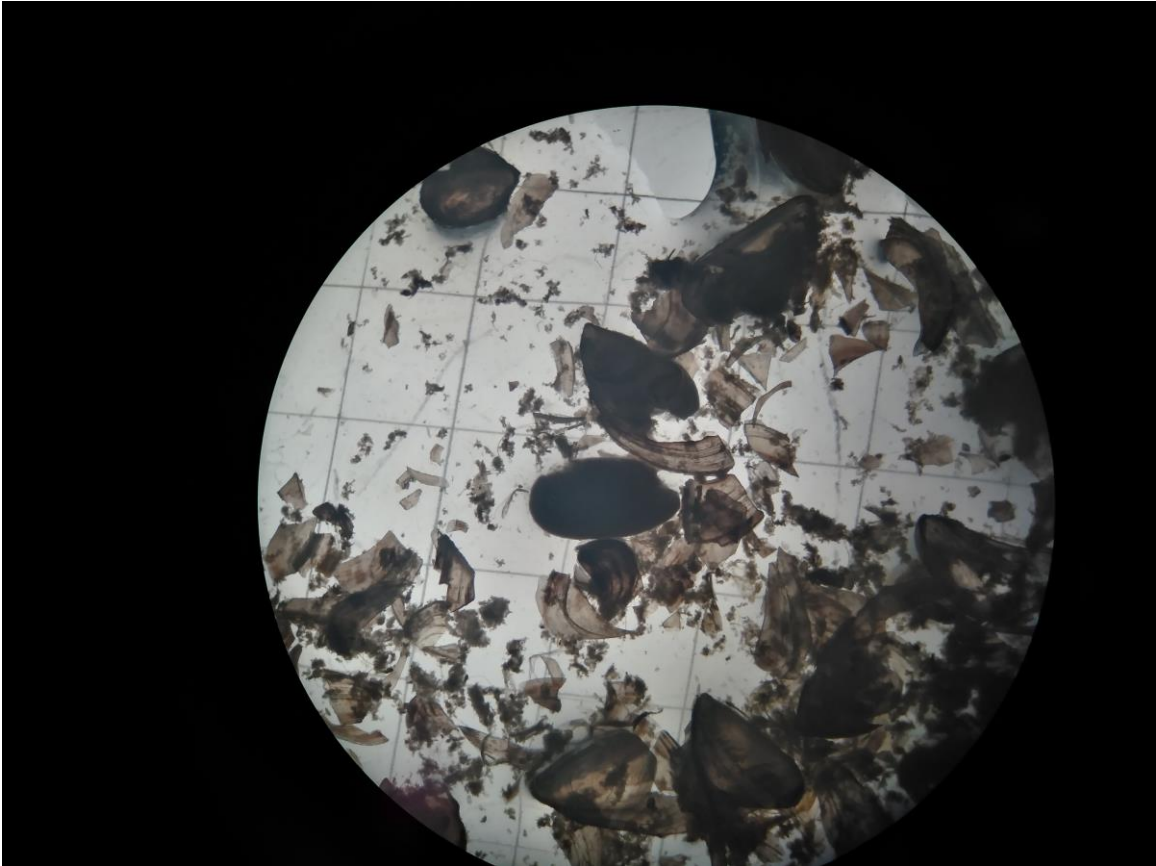
BIJLAGE: FOTO'S MAAGINHOUD Z.B. GRONDEL PETRISCHAAL (9 DECEMBER 2019, NIOO)

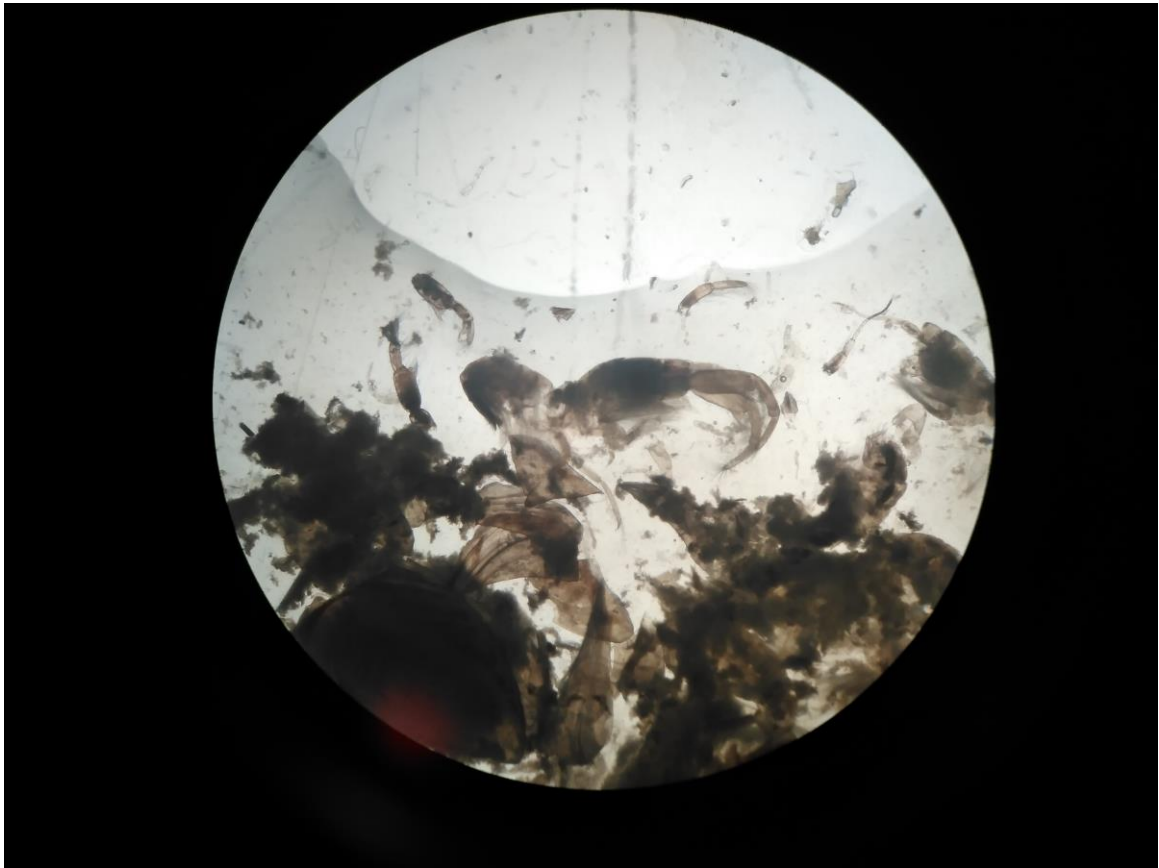




# XI

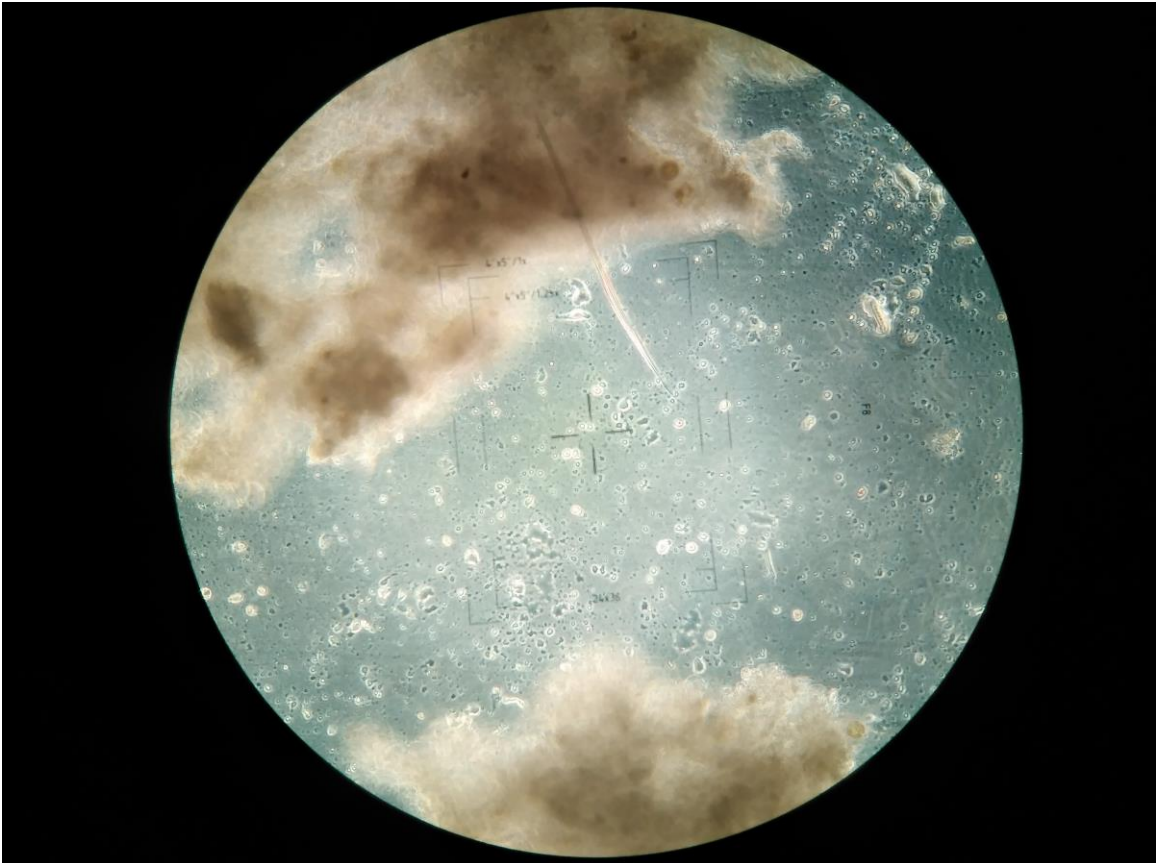
BIJLAGE: FOTO'S Z.B. GRONDEL BINOCULAIR (9 DECEMBER 2019, NIOO)





# XII

BIJLAGE: FOTO'S Z.B. GRONDEL MICROSCOOP (100X, 9 DECEMBER 2019, NIOO)







# XIII

## BIJLAGE: MEETRESULTATEN VISMAGEN

Tabel XIII.1 Meetresultaten vismagen

Datum	Soort	Maag gevuld (%)	Verteringsgraad (0,1,2,9)	Gewicht (g)	Binoculair notities (0,8 - 11,6 keer)	Microscoop notities (100 - 200 keer)
5 november 2019	<i>Abramis brama</i>	50	1	-	veel slijm, draadachtige structuren zichtbaar, gevuld en ongevuld, geen duidelijke schotten	-
5 november 2019	<i>Abramis brama</i>	0	-	-	-	-
5 november 2019	<i>Abramis brama</i>	0	-	-	-	-
5 november 2019	<i>Abramis brama</i>	60	1	-	Veel slijm, draadachtige structuren zichtbaar, een dikke langwerpige vorm met vlokken, mogelijk slakkenresten	-
5 november 2019	<i>Abramis brama</i>	30	1	-	veel slijm, soort biofilm, veel plantaardige resten, geen draden	-
5 november 2019	<i>Abramis brama</i>	15	1	-	kokerjuffersoort, veel slijm/biofilm, zand zichtbaar	-
5 november 2019	<i>Abramis brama</i>	15	1	-	Veel biofilm, mogelijke vraadalgen	-
5 november 2019	<i>Abramis brama</i>	20	1	-	veel biofilm, lange draden	-
5 november 2019	<i>Abramis brama</i>	15	1	-	weinig draden, biofilm	-
20 december 2019	<i>Abramis brama</i>	80	1	1,75	veel, grote inhoud, eerste keer resten van invertebraten (bino 3,2 keer vergroot), mogelijk biofilm, draadachtige structuren (foto vóór 13.45), bodemmateriaal met duidelijke korrels zand/steen te voelen/horen	vergroting 100/200 keer: diatomeeën (kiezelwieren) staafvormig en groenalgen (mogelijk <i>Pediastrum</i> sp., <i>Flagilaria</i> sp., <i>Diploneis</i> sp., draadvormig) 1 % (foto's vóór 13.45)
20 december 2019	<i>Abramis brama</i>	90	1	4,5	grote volle maag, veel biofilm/slijm, veel draadvormige structuren zonder moeite meteen zichtbaar, antenne van invertebraat, muggenlarfresten, plantaardig materiaal (bino 6,3 keer vergroot)	vergroting 100 keer: zowel voor als achter duidelijk potentie voor zwavelbacteriën <i>Thiothrix/Beggiatoa</i> sp. 1 %, kiezelwieren (diatomeeën) en groenalgen <1 % mogelijk <i>Pediastrum</i> sp., plantenresten, achter vee meer verteerd, veel

Datum	Soort	Maag gevuld (%)	Verteringsgraad (0,1,2,9)	Gewicht (g)	Binoculair notities (0,8 - 11,6 keer)	Microscop notities (100 - 200 keer)
						muggenlarvenresten en haren van invertebraten 40 %, bodemmateriaal (foto's van 13.45-15.00)
20 december 2019	<i>Abramis brama</i>	90	1	8,49	grote volle maag, enorm veel bodemmateriaal, draadvormige structuren, plantardig materiaal, weinig biofilm, verder niet veel te zien op bino	vergroting 100 keer: veel gruis, diatomeeën staafvormig, groenalgen 'blob' vormig, veel muggenlarfresten en haren van invertebraten, 1 bacterieachtige sliert, iets wat lijkt op een schede met lege sliertjes eruit, weer een 'pinda' vormige algensoort met sliert eraan (foto's van 15.00-15.58)
20 december 2019	<i>Abramis brama</i>	70	1	13,75	bijna teveel inhoud voor petrishaal, schelpenresten mogelijk driehoeks-/ quaggamossel, veel slijm/biofilm, muggenlarvenresten	vergroting 100 keer: veel resten van invertebraten grotendeels muggenlarven 40 %, veel ondefinieerbaar slijm 30 %, weinig plantaardig: resten 10 %, heel weinig (groen)algen <1 %, twee slierten mogelijk Beggiatoa sp. in middel monster, stukken schelp in achter monster, gruis (foto's vanaf 16.29)
20 december 2019	<i>Abramis brama</i>	0	-	-	-	-
6 januari 2020	<i>Abramis brama</i>	60	1	0,85	veel slijm, veel Chydoridae (50 %), plantenresten 10 %, sporadische muggenlarve (foto's 16.04 - 16.26)	vergroting 100 keer: veel Chydoridae (minimaal 30 %), veel slijm/vlokken (60 %), minimale plantenresten (5 %), sporadische bolvormige groenalg <1 %
6 januari 2020	<i>Abramis brama</i>	60	2	1,08	Driehoeks-/ quaggamosselen onder de 1 cm, muggenlarven, Chydoridae (zooplankton) mogelijk Alona sp. (11,5 keer foto's 14.33 - 14.45)	vergroting 100 keer: vrijwel uitsluitend Chydoridae en invertebraatresten (40 %) en mosselresten met slijm (50 %)
6 januari 2020	<i>Abramis brama</i>	70	1	3,01	50 % slijm, 10 % plantaardig materiaal, draadvormige structuren, zandkorrels/gruis duidelijk voelbaar/hoorbaar met pincet (11.43 - 13.18)	vergroting 200 keer: voorin monster: drie draden mogelijk zwavelbacteriën, drie verschillende soorten algen/diatomeeën (Pediastrum sp, donutshape in vier partjes verdeeld en bal met drie schotten erin met aan weerszijden een rondje), resten van muggenlarven 5 %,



Datum	Soort	Maag gevuld (%)	Verteringsgraad (0,1,2,9)	Gewicht (g)	Binoculair notities (0,8 - 11,6 keer)	Microscop notities (100 - 200 keer)
						invertebraatharen 1 %, gruis 40 %, midden: mogelijk één draad zwavelbacterie, watervlo 11.54, 5 % plantaardig materiaal, achterin: veel gruis, weinig tot geen algen
6 januari 2020	<i>Abramis brama</i>	30	1	3,25	maag = leeg, alleen darmen zijn gevuld, slijm/vloken in maag, veel plantaardig materiaal 50 %, veel draadvormige structuren (13.18 - 13.45)	vergroting 100 keer: resten muggenlarven 50 %, plantaardige rester 30 %, achterin veel gruis 25 %
6 januari 2020	<i>Abramis brama</i>	20	1	3,57	maag = leeg, alleen darmen zijn gevuld, heel veel slijm (13.45 - 14.33)	vergroting 100 keer: veel grote slierten plantaardig materiaal 30 %, voorin twee mogelijke zwavelbacterieresten, diatomeeën + groenalgen 2 %, gruis 20 %, achterin: invertebraatresten mogelijk poot van <i>Corophium</i> sp., resten muggenlarven 30 %
6 januari 2020	<i>Abramis brama</i>	80	1	4,97	maag had perforatie en tekenen van ontbinding, veel slijm en weinig maaginhoud, draadvormige structuren te zien (foto's 16.26 - 16.40)	vergroting 100 keer: heel veel gruis minimaal 50 % resten van muggenlarver 10 %, plantaardige rester 5 %, kapotte slierten met kapot einde mogelijk schede? Wormpjes met verdikking
6 januari 2020	<i>Abramis brama</i>	90	1	11,75	beel slijm minimaal 50 %, overall draadvormige structuren zichtbaar, bijna teveel inhoud voor petrischaal (foto's 10.41 - 11.43)	vergroting 100 keer: 10 % plantaardig materiaal, 10 % resten van muggenlarven, veel haren van invertebraten, 40 % gruis, 1-5 % groenalgen, 1 % diatomeeën, wormpje met duidelijke verdikking, achterste monster darmen mogelijk twee slierten zwavel bacteriën
6 januari 2020	<i>Abramis brama</i>	0	-	-	maag kapot	-
6 januari 2020	<i>Abramis brama</i>	0	-	-	-	-
9 december 2019	<i>Gymnocephalus cernuus</i>	80	1	0,7	veel muggenlarven en resten daarvan 80 %	vergroting 200 keer: veel algensoorten 5 % bol- er staafvormig mogelijk diatomeeën, vlokken mogelijk van schelpen 5 %, minimaal plantaardige resten <1 %

Datum	Soort	Maag gevuld (%)	Verteringsgraad (0,1,2,9)	Gewicht (g)	Binoculair notities (0,8 - 11,6 keer)	Microscop notities (100 - 200 keer)
10 januari 2020	<i>Gymnocephalus cernuus</i>	50	1	0,19	weinig maaginhoud, geen schelpen (14.53)	vergroting 100 keer: bijna alles invertebraatresten, versnipperde plantenresten
10 januari 2020	<i>Gymnocephalus cernuus</i>	60	1	0,32	slijm zonder schelpresten, invertebraatresten muggenlarven + wadkreeftjes <i>Corophium</i> sp. (15.25)	vergroting 100 keer: enkele groenalgen, alleen maar ondefinieerbaar slijm, invertebraatharen, gruis 15.27: duidelijke rest muggenlarve ( <i>Chironomidae</i> )
10 januari 2020	<i>Gymnocephalus cernuus</i>	60	1	0,32	veel slijm, enkele mossel, wadkreeftresten (15.13)	vergroting 100 keer: diatomee <i>Pediastrum</i> sp., invertebraatharen, slijm, gruis
10 januari 2020	<i>Gymnocephalus cernuus</i>	80	1	0,34	veel slijm met veel invertebraatharen, sommige mossel-/slakkenresten, wadkreeftresten <i>Corophium</i> sp. (14.10)	vergroting 100 keer: lange invertebraatharen 20 %, gruis, slijm van schelpen/slakken 70 %. Vergroting 200 keer: 14.28: wormachtig figuur met mogelijk beschermende buitenkant 1.432: mogelijk plantaardig materiaal <1 %
10 januari 2020	<i>Gymnocephalus cernuus</i>	100	1	0,34	volle maag, invertebraatresten, één kreeftachtige groter dan anderen (15.46)	-
9 december 2019	<i>Neogobius melanostomus</i>	60	1	0,6	pootjes met haakjes, resten van invertebraten 45 % (mogelijk wadkreeftjes <i>Corophium</i> sp., vergroting 1,6 keer bino), duidelijk lange gestrekte armen zichtbaar, schelpenresten en slijm 55 % in meerdere mate verteerd, veel mogelijke haren van invertebraten en/of borstelwormen	vergroting 100 keer: groenalgen <1 %
9 december 2019	<i>Neogobius melanostomus</i>	60	2	0,6	veel grote schelpen 80 % en vrijwel niets anders, <i>Corophium</i> sp. resten 10 %, 5 % slijm	-
9 december 2019	<i>Neogobius melanostomus</i>	60	2	1	in verhouding erg veel slijm 60 %, weinig schelpen 30 %, slijmerige propjes met mogelijke haren van invertebraten, een enkele <i>Corophium</i> sp. 2 %, één intacte driehoeks-/quaggamossel (vergroting 8 keer bino)	vergroting 100 keer: veel schelpengruis, mogelijk plantaardig materiaal, platte donkere ronde schelpensoort tussen mosselresten, heel weinig groenalgen <1 %
9 december 2019	<i>Neogobius melanostomus</i>	90	2	1,3	vrijwel alleen mosselresten (driehoeks- of quaggamossel) onder de	vergroting 100/200 keer: groenalgen (bolvormig) en staafvormige figuren

Datum	Soort	Maag gevuld (%)	Verteringsgraad (0,1,2,9)	Gewicht (g)	Binoculair notities (0,8 - 11,6 keer)	Microscop notities (100 - 200 keer)
					1 cm (bino, maximaal 11,6 keer vergroot)	(mogelijk diatomeën) in verschillende grootten 1 %, 80 % slakkenresten, 15 % schelpenresten
9 december 2019	<i>Neogobius melanostomus</i>	90	1	1,4	<i>Corophium</i> sp. resten 2 % ver verteerd, veel schelpenresten 80 % met 10 % slijm, wormvormige slijmerige draden met mogelijk haren van invertebraten maximaal 1,5 cm	-
9 december 2019	<i>Neogobius melanostomus</i>	70	2	1,8	veel schelpenresten 80 % met weinig slijm ertussen, <i>Corophium</i> sp. resten 10 %, mogelijk plantaardig materiaal 5 %	-
9 december 2019	<i>Neogobius melanostomus</i>	80	1	2	grotere maag, meer slijm zichtbaar, vrijwel alleen quagga-/driehoeksmossel van maximaal 1 cm (bino)	vergroting 100 keer: groenalgen 1 %
5 november 2019	<i>Rutilus rutilus</i>	50	1	-	vrijwel geheel gevuld met slakken-/mosselresten en doorzichtige vlokken, geen draden	-
5 november 2019	<i>Rutilus rutilus</i>	80	1	-	vrijwel geheel gevuld met slakken-/mosselresten en doorzichtige vlokken, wattige slijmstukken met slierten, geen draden	-
10 januari 2020	<i>Rutilus rutilus</i>	30	2	1,04	veel slijm 60 %, weinig schelpresten 30 % mosselen oesters en mogelijk watertorentje, darmen vrijwel leeg en maag wel gevuld (11.17 - 11.55)	vergroting 100 keer: draadvormige staaf ongevuld met schotten kapot, veel slijm en klein beetje schelpenresten, nul algen, alle draadvormige structuren zijn mogelijk ankers van mosselen
10 januari 2020	<i>Rutilus rutilus</i>	90	2	3,94	voarin de maag slijmerig met veel verschillende soorten schelpdieren driehoeks-/quaggamossel en oesters allemaal onder de 1 cm, 1 zoetwaterslak mogelijk <i>Valvata piscinalis</i> (10.32 - 11.16)	vergroting 100 keer: slakken en schelpenresten 30 %, veel slijm mogelijk ook van mollusken 60 %, haarachtige structuren mogelijks ankers van mosselen (bruin, doorzichtig, schotloos, leeg), vrijwel geen algen
10 januari 2020	<i>Rutilus rutilus</i>	80	2	3,97	in maag veel slijm, in darmen veel schelpenresten, mosselen, oesters, enkele <i>Valvata</i> sp. (13.56)	-
10 januari 2020	<i>Rutilus rutilus</i>	0	-	-	-	-
10 januari 2020	<i>Rutilus rutilus</i>	0	-	-	-	-

# XIV

## BIJLAGE: DNA-ANALYSE MAAGINHOUD VISSER



## DNA analyse maaginhoud vissen

## Colofon

Titel	DNA analyse maaginhoud vissen
Tekst, foto's en samenstelling	Robbert van Himbeek, Kees van Bochove
In opdracht van	Witteveen + Bos
Naam opdrachtgever	Marcel Klinge
Rapportnummer	RA19148
Datum oplevering rapportage	29-01-2020
Aantal pagina's	13
Wijze van citeren	Van Himbeek, R., van Bochove, K. 2019 DNA analyse maaginhoud vissen. Datura Molecular Solutions, Wageningen.
Laboratorium analist	J. Rook & R. van Himbeek



### **Datura Molecular Solutions BV**

*Gevestigd te:*

Agro Business Park 10  
6708 PW Wageningen

0031(0)618441781

[www.datura.nl](http://www.datura.nl)

[robert.vanhimbeek@datura.nl](mailto:robert.vanhimbeek@datura.nl)

# Inhoudsopgave

1. Doelstelling.....	4
2. Methode .....	4
2.1 Bemonstering .....	4
2.2 Markers en primers .....	4
2.3 Laboratorium analyse .....	4
2.4 Data-analyse .....	5
3. Resultaten & discussie.....	7
3.1 Vissen primer .....	7
3.2 Eukaryoten primer .....	8
3.3 Bacteriële primer.....	9
3.4 MAV primer .....	9
3.5 Ruwe resultaten .....	11
4. Conclusies.....	12
5. Bijlage .....	13

# 1. Doelstelling

Het doel van onderhavig onderzoek was om de maaginhoud van zwartbekgrondel, brasem, pos, en blankvoorn te analyseren met behulp van DNA metabarcoding. Met behulp van metabarcoding is het mogelijk om aan de hand van één of meerdere stukken DNA (i.e. markers) een lijst van de voorkomende taxa te genereren. De focus van het onderzoek ligt op 1) bepalen van het algemene dieet en 2) de aanwezigheid van bacteriën van het geslacht *Thioploca*.

## 2. Methode

### 2.1 Bemonstering

De bemonstering is uitgevoerd door Witteveen + Bos en de 4 mengmonsters (bestaand uit 25 magen per vissoort) zijn vervolgens in bevroren toestand geleverd aan Datura.

### 2.2 Markers en primers

De maaginhouden zijn geanalyseerd met behulp van metabarcoding waarbij 4 primers/markers gebruikt zijn:

- 1) **Eukaryoten primer (18S)**: deze primer vermenigvuldigt het DNA van eukaryote organismen.
- 2) **Bacteriële primer (16S)**: deze primer vermenigvuldigt het DNA van bacteriën.
- 3) **Vissen primer (12S + 16S)**: deze primer vermenigvuldigt het DNA van vissen.
- 4) **MAV primer (16S)**: deze primer vermenigvuldigt het DNA van een specifiekere set eukaryote organismen: weekdieren, geleedpotigen en vertebraten.

### 2.3 Laboratorium analyse

Bij aankomst van de monsters zijn eerst zo goed mogelijk stukken maag van de betreffende vissoort verwijderd en daarna is de maaginhoud geprakt en gemengd. Deze verwerkingsstappen zijn uitgevoerd door een medewerker van Datura en een stagiaire van Witteveen + Bos.

Het analyseren van een dergelijk DNA-monster vindt plaats in een aantal stappen. Eerst wordt het DNA uit een monster geconcentreerd en gezuiverd. Vervolgens wordt DNA geamplificeerd (i.e. vermeerderd) met behulp van PCR. De PCR-fragmenten zijn gezuiverd en een DNA library is voorbereid. De library is gesequenced met behulp van Next Generation Sequencing (Novaseq 6000).

1. Het DNA is uit de monsters geëxtraheerd middels de QIAamp® PowerFecal® Kit inclusief bead-beating.
2. Het DNA is geamplificeerd middels PCR waarbij bovengenoemde primers/markers (zie sectie 2.2 Markers en primers) zijn gebruikt. De primers bevatten ieder een unieke tag (7 nucleotiden). Gedurende de bioinformatica analyse kunnen de reads aan de hand van deze tags toegewezen worden aan het juiste sample. De PCR is uitgevoerd met behulp van de TaqMan® Environmental Mastermix 2.0 (Life Technologies®). De PCR is uitgevoerd met vier replica's. De PCR-producten van de vier replica's zijn samengevoegd.
3. Voor iedere marker is door middel van gelelektroforese vastgesteld of de PCR geresulteerd heeft in PCR-producten van de juiste lengte. Middels van een tweede PCR zijn Illumina Nextera XT adapters aan de PCR-producten gezet. Vervolgens zijn de PCR-producten samengevoegd. De pool van PCR-producten van



verschillende samples is gezuiverd. Deze pool van PCR-producten vormen de zogenaamde DNA library, wat gebruikt wordt om het DNA te sequencen.

4. De PCR-producten zijn gesequenced met behulp van Next Generation Sequencing (Novaseq 6000 platform, 150 bp paired-end). Hierbij worden miljoenen stukjes DNA (zogenaamde reads) uitgelezen. In deze stap wordt het fysieke DNA in het buisje dus vertaald in digitale reads.

## 2.4 Data-analyse

Eerst is een standaard verwerking van Illumina paired-end data uitgevoerd. Deze omvat de volgende stappen:

1. FASTQ sequence files zijn gegenereerd met behulp van de Illumina Casava pipeline.
2. Een eerste kwaliteitscheck is uitgevoerd door middel van Illumina Chastity filtering.
3. Vervolgens zijn reads welke PhiX controle bevatten verwijderd.
4. (Restanten van) de sequencing adapters zijn uit de reads geknipt.
5. De kwaliteit van de overgebleven reads is getest met de FastQC tool.

Vervolgens zijn de sequenties geanalyseerd met behulp van het software package OBITools. Deze pipeline resulteert uiteindelijk in een tabel waarin voor elk sample aangegeven is hoeveel reads er van elke soort gedetecteerd zijn. Omdat er behoorlijke rekenkracht nodig is voor het verwerken van de sequencing data wordt een workstation gebruikt welke beschikt over 2 six core processoren met hyper-threading en 48 Gb Ram-geheugen. De volgende stappen zijn doorlopen:

1. **Illuminapairedend:** Genereren van een consensus sequentie op basis van de forward en reverse read.
2. **Obigrep:** sequenties die niet alligned werden zijn verwijderd.
3. **NGSfilter:** Op basis van de gebruikte primers en de tags die toegevoegd zijn in de eerste stappen, zijn alle sequenties toegewezen aan het corresponderende sample.
4. **Obiuniq:** Om de dataset die nu nog bestaat uit miljoenen reads hanteerbaarder te maken zijn alle identieke sequenties binnen een sample samengevoegd.
5. **Obigrep:** Sequenties die minder dan 10 keer voorkomen en korter zijn dan 25 basen worden verwijderd omdat dit sequencing fouten betreffen.
6. **Obiuniq:** Alle sequenties (ook van de verschillende monsters) worden samengevoegd.
7. **Ecotag:** De Ecotag tool wordt gebruikt om de sequenties te matchen met de referentie database. Deze database is opgebouwd op basis van referentie monsters die verzameld zijn door Datura, en aangevuld met DNA-sequenties afkomstig van museumvouchers.
8. **Obiclean:** Vervolgens is obiclean tool gebruikt om sequencingfouten en PCR-fouten als zodanig te labelen.

In de basis wordt elke waarneming het label 'singleton' (=op zichzelf staand) meegegeven. Sequentie A wordt vervolgens als 'internal' (=fout) aangemerkt als sequentie A slechts beperkt afwijkt van sequentie B, en als sequentie A aanzienlijk minder voorkomt dan sequentie B. Sequentie B wordt vervolgens aanmerkt als 'head' (correcte sequentie).

Obiclean is 4 maal uitgevoerd, met de volgende instellingen:

1.  $r=0,05$  en  $d=1$
2.  $r=0,005$  en  $d=2$
3.  $r=0,001$  en  $d=3$
4.  $r=0,0005$  en  $d=4$

Hierbij staat 'r' voor het percentage dat sequentie A maximaal mag voorkomen ten opzichte van B. En 'd' staat voor het aantal verschillen tussen sequentie A en B.

9. **Obitab:** Tenslotte worden de resultaten geëxporteerd naar een .tab file.

Het vervolg van de pipeline is geprogrammeerd in Python waarin de .tab files worden samengevoegd met als resultaat de voorkomende taxa per monster.

De pipeline voor het verwerken van de vissen bevat nog verschillende thresholds. Deze thresholds zijn nog niet correct afgesteld, wat resulteert in vals positieve en vals negatieve waarnemingen. Finetuning van de thresholds gebeurt op basis van de totale dataset:

1. Threshold op the identity (mate waarmee een sequentie overeenkomst met de meest gelijkende sequentie in de referentie database). De volgende thresholds zijn gehanteerd: vissen 12S: 100%; vissen 16S: 98%.
2. Alle detecties die in één van de 4 runs met behulp van obiclean zijn aangemerkt als 'internal' of als 'singleton' in één van de obiclean runs zijn verwijderd.
3. Per detectie wordt een threshold berekend. Deze threshold wordt hoger indien een monster relatief weinig DNA van de doelsoortgroep bevat. De threshold is als volgt gedefinieerd =  $A / Nw / Nv / Nt / X$

Waarbij:

A = de som van het totaal aantal reads van een genetische variant van een soort in de watermonsters van één batch

Nw = aantal watersamples in de batch van monsters

Nt = totaal aan reads in het betreffende monster (inclusief niet vissen, PCR- en sequencingfouten enz.)

Nv = totaal aantal vissenreads van het betreffende monster; op basis van de output van stap hierboven.

X16S = 9000

X12S = 9000

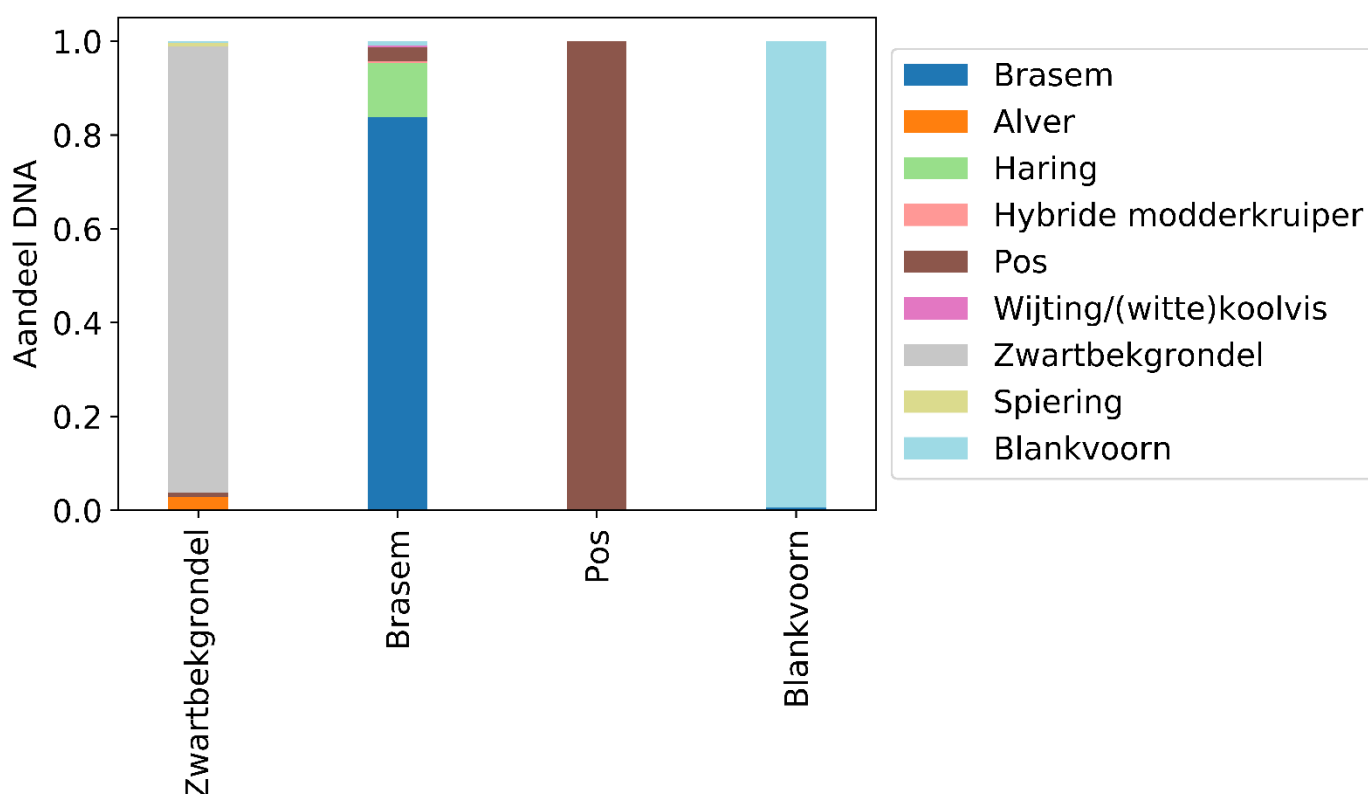
4. Detecties die onder deze threshold vallen worden verwijderd.
5. Tenslotte is een laatste threshold toegepast. Als een soort uiteindelijk minder dan 0,001 voorkomt dan wordt deze verwijderd uit de dataset waarbij de data van de 16S en 12S primer gecombineerd worden.

Deze analyses resulteren in meerdere datasets met het absoluut aantal reads en fracties (12S+16S) van vissoorten per sample.

### 3. Resultaten & discussie

#### 3.1 Vissen primer

Bij alle bestudeerde vissoorten bestond het gedetecteerde vis DNA in de magen geheel (pos: 100%) of voornamelijk (zwartbekgrondel: 95,06%; brasem: 83,80%; blankvoorn: 99,48%) uit de betreffende soort (figuur 1). In de maag van zwartbekgrondel zijn er nog relatief kleine hoeveelheden van brasem, alver, pos, spiering, en blankvoorn gevonden. In de maaginhoud van brasem is er ook nog een relatief grote hoeveelheid DNA van haring (11,53%) en relatief kleine hoeveelheden van een hybride modderkruiper, wijting/koolvis, en blankvoorn gedetecteerd. In de maag van blankvoorn is nog een relatief zeer lage hoeveelheid brasem DNA gedetecteerd.



Figuur 1: Relatieve aandeel DNA van vissoorten (y-as) in de maag van de 4 onderzochte vissen (x-as), op basis van de vissen primer.

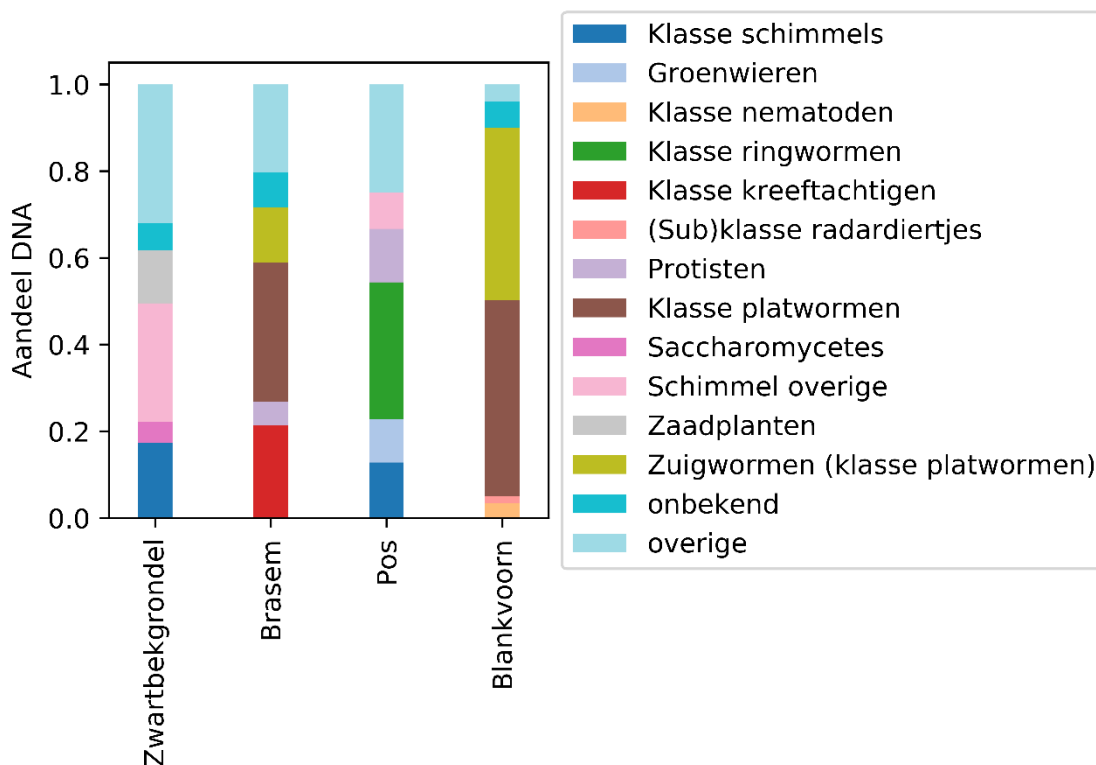
De relatief grote hoeveelheid haring in de maag van brasem betreft waarschijnlijk een contaminatie die tot stand is gekomen door de (mogelijk) lage concentraties vis DNA in het monster van brasem. Indien er weinig vissen DNA aanwezig is, wordt de analyse gevoeliger voor contaminatie in het veld of in het laboratorium. In de maag van brasem is relatief gezien nagenoeg geen vissen DNA gevonden met de eukaryoten primer (zie bijlage figuur 1A) en is er dus waarschijnlijk relatief weinig vissen DNA aanwezig. Een mogelijke oorzaak hiervan is de efficiëntie waarmee stukken vissenmaag verwijderd konden worden in het brasem mengmonster. Grote vlezige stukken maag van brasem waren makkelijker te verwijderen dan vliesachtige maagdelen van de andere soorten. Het detecteren van voornamelijk het 'gastheer' DNA in de vissenmagen is hoogstwaarschijnlijk te wijten aan het feit dat het zeer moeilijk is om al het gastheer weefsel te verwijderen, zeker bij soorten met een vliesachtig maag-darmstelsel. Relatief ten opzichte van gastheer weefsel, was er

dus waarschijnlijk weinig weefsel van prooivissen aanwezig.

### 3.2 Eukaryoten primer

Figuur 2 beschrijft per onderzochte vissoort de 5 meest voorkomende klassen op basis van de eukaryoten primer. De overige klassen zijn samengevoegd in de groep “overige”. Sommige sequenties hebben als klasse label “onbekend” gekregen. Dit treedt op als er voor deze gevonden sequentie geen onderscheid gemaakt kan worden tussen verschillende klassen of als er geen taxonomische klasse bekend is voor die groep organismen. In deze analyse zijn klasse Mammalia en geslacht *Malassezia* (een schimmel) verwijderd omdat dit contaminaties betreft. Ook zijn de vissen uit deze analyse verwijderd aangezien het voornamelijk DNA van de gastheer soort zelf betreft (sectie 3.1). Zie bijlage figuur 2A met de gedetailleerde Latijnse namen.

De eukaryoten primer laat een groot verschil in dieet zien tussen de verschillende vissoorten. Voor een meer gedetailleerd overzicht of welke klassen zich in “overige” bevinden, kan de meegeleverde dataset geraadpleegd worden.



Figuur 2: Relatieve aandeel DNA van de meest voorkomende klassen (y-as) per vissoort (x-as) op basis van de eukaryoten primer. De labels “Protisten” en “schimmel overige” zijn geen klassen, maar voor deze sequenties was er aanvankelijk geen “klasse” gegeven (i.e. onbekend). Ter verduidelijking van de figuur zijn deze labels handmatig aan deze sequenties toegevoegd (zie geel gearceerde cellen in ruwe data).

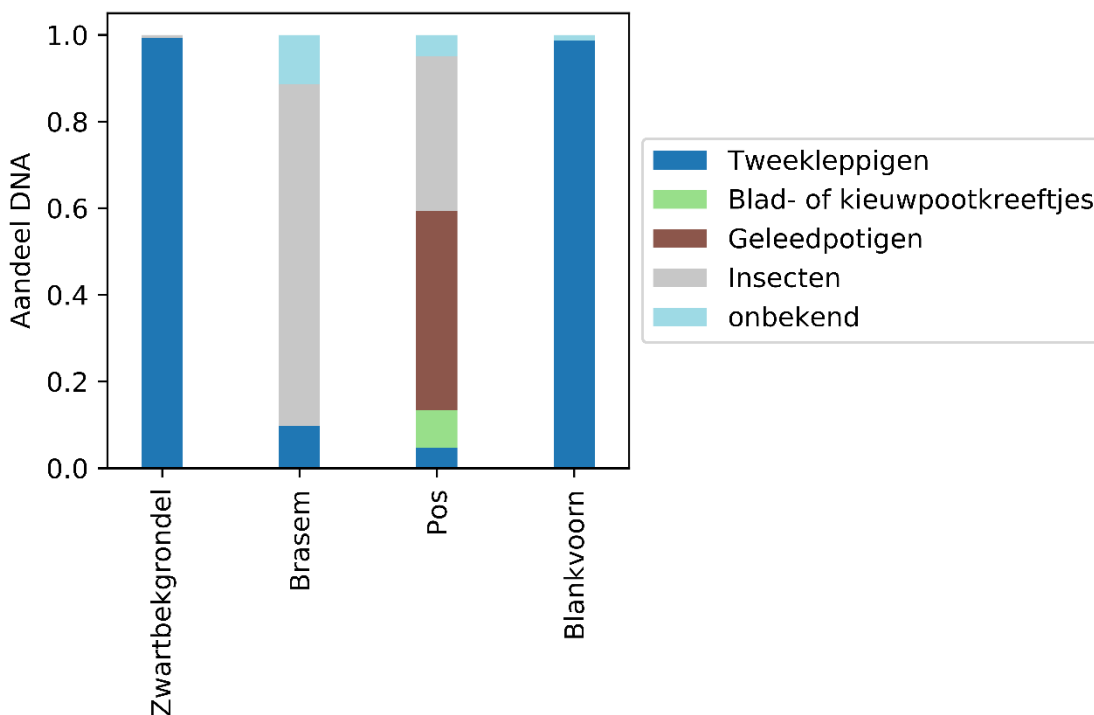
### 3.3 Bacteriële primer

Deze primer werd toegevoegd om te onderzoeken of bacteriën van het geslacht *Thioploca* (familie: Thiotrichaceae; orde: Thiotrichales) terug te vinden zijn in de maag van de vissen. Deze bacteriën zijn aangetroffen in het Markermeer en er zijn vermoedens dat deze bacteriën door bepaalde vissen geconsumeerd worden. DNA sequenties van het betreffende geslacht bacteriën zijn aanwezig in de referentie database van Datura.

Met deze primer zijn er in geen van de magen DNA sequenties geïdentificeerd van *Thioploca*, Thiotrichaceae, of Thiotrichales.

### 3.4 MAV primer

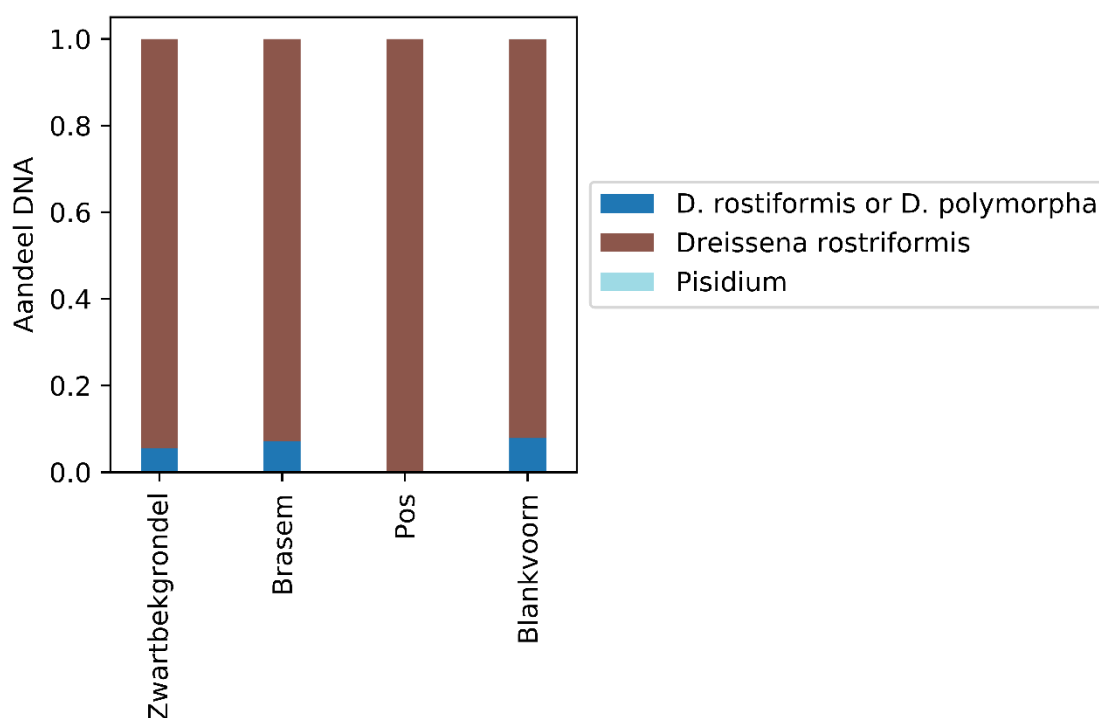
Met de MAV primer is voor zwartbekgrondel en blankvoorn voornamelijk DNA van tweekleppigen gedetecteerd en voor brasem voornamelijk insecten (figuur 3). Omdat het vis DNA voornamelijk de gastheer soort zelf betrof (sectie 3.1), zijn de vissen uit deze analyse verwijderd. Verder zijn ook zoogdieren verwijderd omdat dit hoofdzakelijk contaminatie van mensen betreft.



Figuur 3: Relatieve aandeel DNA van de meest voorkomende groepen (y-as) voor iedere vissoort (x-as) op basis van de MAV primer, exclusief vissen en zoogdieren.

Het verschil tussen de eukaryoten primer en de MAV primer is het gevolg van het verschil in efficiëntie waarmee deze primers bepaalde groepen amplificeren. De eukaryoten primer amplificeert het DNA van al de eukaryoten waardoor er de kans is dat DNA dat in relatief lage concentraties voorkomt, weggedrukt wordt door DNA dat in hoge concentraties aanwezig is. De MAV primer is zo ontworpen dat deze (voornamelijk) het DNA van weekdieren (e.g. tweekleppigen), geleedpotigen (e.g. insecten), en vertebraten (e.g. vissen) efficiënt amplificeert.

Daaropvolgend zijn de hoofdgroepen (tweekleppigen, blad- of kieuwpootkreeftjes, geleedpotigen en insecten) verder in detail bekeken. De sequenties van geleedpotigen en insecten waren met deze marker in het algemeen niet geïdentificeerd op een lager en informatiever taxonomisch niveau. Het DNA van blad- of kieuwpootkreeftjes in pos is afkomstig van *Daphnia*. Voor al de 4 vissoorten bestond het dieet van tweekleppigen voornamelijk uit *Dreissena rostriformis* (quaggamossel) en in de maag van blankvoorn zijn er nog relatief zeer lage hoeveelheden (niet zichtbaar op figuur) DNA van het geslacht *Pisidium* aangetroffen (figuur 4).



Figuur 4: Relatieve aandeel DNA van soorten tweekleppigen (y-as) voor iedere vissoort (x-as) op basis van de MAV primer.

### 3.5 Ruwe resultaten

De ruwe resultaten zijn opgeleverd als excel files. Voor de eukaryoten, bacterie en MAV primers geven deze files het aantal DNA uitlezingen en taxonomische informatie per OTU<sup>1</sup> (=rijen) voor iedere bestudeerde vissoort weer. Met andere woorden: iedere rij is een uniek gedetecteerde sequentie met bijhorende (taxonomische) informatie en de hoeveelheid DNA uitlezingen in ieder monster (laatste 4 kolommen). Per monster is het aantal DNA uitlezingen een relatieve maat voor het aandeel van een gedetecteerde sequentie in het totaal aantal gedetecteerde DNA. Tabel 1 beschrijft hoe de verschillende kolommen geïnterpreteerd moeten worden.

Tabel 1: Uitleg van de kolommen voor de eukaryoten, bacterie en MAV ruwe dataset.

<b>Kolom</b>	<b>Uitleg</b>
<b>best_identity</b>	De gelijkheid tussen de gevonden DNA sequenties (i.e. de OTUs) en de meest gelijkende sequentie(s) in de referentie database.
<b>class-, family-, genus-, infraclass-, kingdom-, order-, phylum-, species-, subclass-, subfamily-, suborder-, subphylum-, superfamily-, superkingdom-, tribe_name</b>	De naam van het betreffende taxonomisch niveau. Indien er geen naam is gegeven, betekent dit dat de OTU niet op het betreffende niveau geïdentificeerd kon worden of dat het betreffende taxonomisch niveau niet bekend is in de taxonomie van die OTU.
<b>scientific_name</b>	De taxonomische naam van het laagst bepaalde taxonomisch niveau.
<b>species_list</b>	De soorten met een sequentie identiek aan de gedetecteerde sequentie.
<b>Zwartbekgrondel, Brasem, Pos, Blankvoorn</b>	Het aantal DNA uitlezingen (i.e. reads) voor iedere OTU in de betreffende bestudeerde vissoort.

De ruwe data van de vissen primer zijn verwerkt met een andere pipeline, waardoor deze resultaten anders weergegeven zijn. Voor de vissen resultaten is iedere rij één van de bestudeerde soorten en geeft elke kolom (van Alver tot Blankvoorn) het relatieve aandeel van de betreffende vissoort in de bestudeerde soorten weer.

---

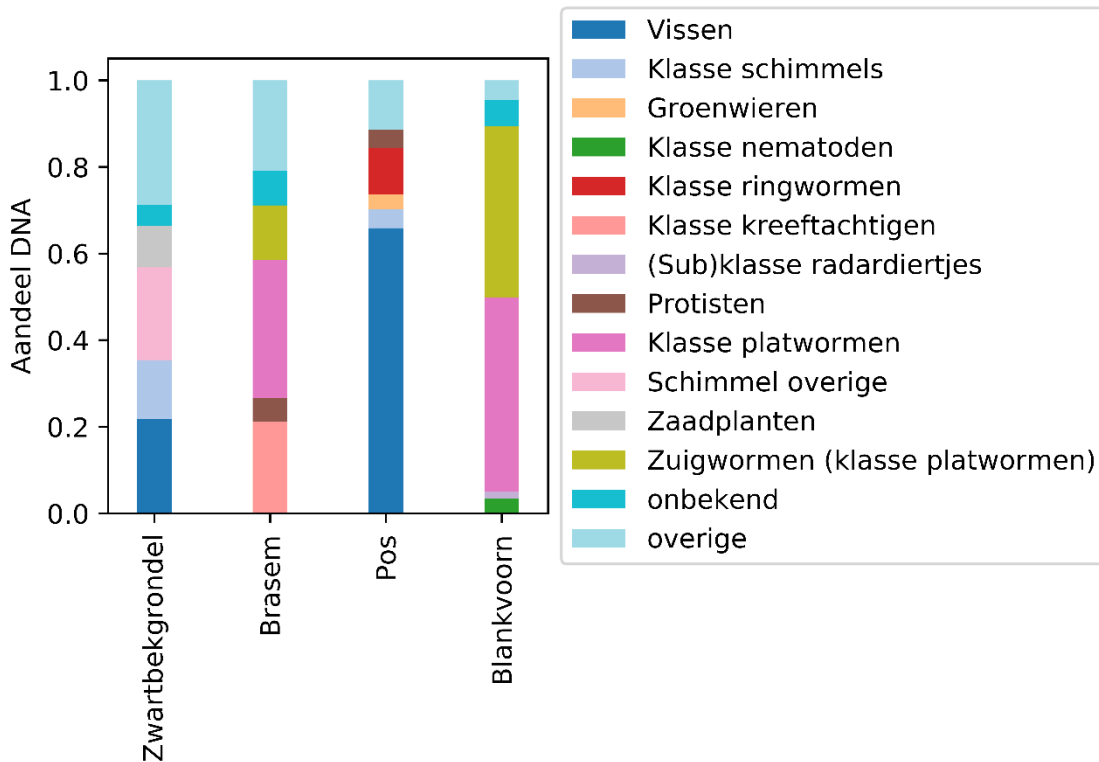
<sup>1</sup> OTU is de afkorting van Operational Taxonomic Unit. In deze dataset is elke OTU een unieke sequentie en kunnen OTUs gezien worden als aparte soorten of groepen.



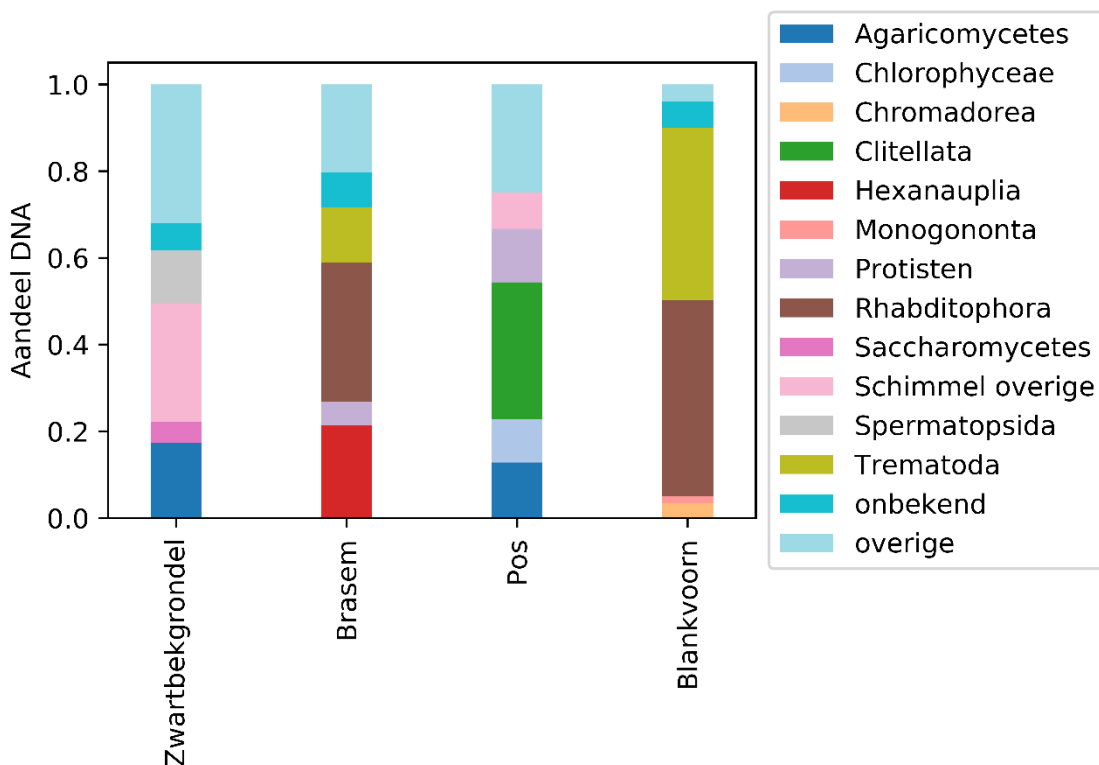
## 4. Conclusies

- Het gedetecteerde vissen DNA bestond voornamelijk of geheel uit het DNA van de betreffende bestudeerde vissen.
- De eukaryoten primer laat een groot verschil in dieet zien tussen de verschillende vissoorten.
- Er is geen DNA van *Thioploca*, Thiotrichaceae of Thiotrichales aangetroffen.
- Met betrekking tot tweekleppigen werd voornamelijk DNA van quaggamossel (*Dreissena rostriformis*) aangetroffen in de magen van de 4 bestudeerde vissoorten.

## 5. Bijlage



Figuur 1A: Relatieve aandeel DNA van de 5 meest voorkomende klassen op basis van de eukaryoten primer, inclusief vissen.



Figuur 2A: Relatieve aandeel DNA van de 5 meest voorkomende klassen op basis van de eukaryoten primer, exclusief vissen.

