



howest
BIOMEDISCHE
LABORATORIUM-
TECHNOLOGIE

Bachelorproef

Studiegebied	Gezondheidszorg
Bachelor	Biomedische Laboratoriumtechnologie
Afstudeerrichting	Farmaceutische en biologische laboratoriumtechnologie
Academiejaar	2022-2023
Student	Kaat Janssens

Thema

Detectie en kwantificatie van tong (*Solea solea*) in de Noordzee via eDNA en dPCR

Stageplaats

Instituut voor Landbouw-, Visserij- en Voedingsonderzoek (ILVO), Oostende

ILVO
Instituut voor Landbouw-,
Visserij- en Voedingsonderzoek



howest
BIOMEDISCHE
LABORATORIUM-
TECHNOLOGIE

Bachelorproef

Studiegebied Gezondheidszorg

Bachelor Biomedische Laboratoriumtechnologie

Afstudeerrichting Farmaceutische en biologische laboratoriumtechnologie

Academiejaar 2022-2023

Student Kaat Janssens

Thema

Detectie en kwantificatie van tong (*Solea solea*) in de Noordzee via eDNA en dPCR

Stageplaats

Instituut voor Landbouw-, Visserij- en Voedingsonderzoek (ILVO), Oostende

ILVO
Instituut voor Landbouw-,
Visserij- en Voedingsonderzoek

Voor akkoordverklaring

De stageplaats biedt modaliteiten aan om de bachelorproef uit te voeren en doet aan procesbegeleiding, maar neemt geen eindverantwoordelijkheid bij het uiteindelijke product.

Handtekening stagegever
Sofie Derycke

Handtekening externe stagebegeleider
Sarah Maes

Handtekening interne stagebegeleider
Stefanie Salliau

Handtekening student
Kaat Janssens

Woord vooraf

Ter afsluiting van de opleiding Bachelor in de Biomedische laboratoriumtechnologie, met als afstudeerrichting Farmaceutische en biologische laboratoriumtechnologie, kreeg ik, Kaat Janssens, de kans om mijn stageperiode te volbrengen aan het Instituut voor Landbouw-, Visserij- en Voedingsonderzoek (ILVO) te Oostende, waaraan deze bachelorproef is gekoppeld. Het was een ongelofelijke ervaring waarvan ik dankbaar ben dat ik deze mij rijker kon maken.

In het eindproduct van deze periode, dat u dadelijk zal lezen, zijn verschillende mensen betrokken die het verdienen een woord van dank te krijgen. Allereerst wil ik graag mijn stagegever Sofie Derycke maar ook Sara Maes bedanken om mij bij aanvang van de stageperiode te willen opvangen en begeleiden in het drukbezette labo. Het willen helpen van een student in nood waardeert ik enorm. Mijn oprechte dank gaat ook uit naar mijn mentor Joran Vanhollebeke, die alle tijd nam om mij de praktische zaken in het labo uit te leggen, mijn vele vragen te willen beantwoorden en samen te zoeken naar oplossingen. Verder mag Sarah Maes, mijn externe stagebegeleider, niet ontbreken. Bedankt Sarah, voor het vele nalezen van de tussentijdse versies, al je gefundeerde feedback, maar bovenal de vlotte samenwerking! Jouw duwtjes in de rug hielpen mij enorm om een eindresultaat te creëren waar ik trots op durf te zijn. Bovenal wil ik graag ook mijn interne stagebegeleider Stefanie Salliau bedanken, voor de aanzienlijke ondersteuning al van bij het begin van de stageperiode, maar zeker ook de gezellige stagebezoekjes en feedbackmomenten. Zij maakt deel uit van een fantastisch lectorenteam dat onder begeleiding staat van Opleidingscoördinator Mieke Demeyere. Eén voor één verdienen zij een applaus voor het werk dat zij doen in het opleiden, maar vooral ondersteunen van talloze jonge talenten.

Daarnaast zijn er nog enkele personen waarvan ik veel heb mogen leren en die ik niet ga vergeten. Sta mij dus toe enkele mensen van het Vlaams Instituut voor de Zee (VLIZ) aan te halen. Hanneloor Heynderickx, Julie Muyle en de gehele bemanning van de RV Simon Stevin, bedankt om me mijn passie te laten ontdekken. De ervaring die ik opdeed tijdens mijn campagnedeelnames zal ik nog lang met evenveel enthousiasme vertellen aan iedereen die het horen wil. Ook thuis werd ik geweldig goed ondersteund. Mama, papa, bedankt om mij de kansen te geven om dit te verwezenlijken, voor jullie geloof in mij en mijn capaciteiten. 'Ge zè goe bezig!', is iets wat mij doorheen mijn studiejaren ontelbare keren werd verteld. Jullie gaven mij moed om steeds het beste uit mezelf te halen. Felien, mijn zus, bedankt om altijd voor mij klaar te staan vooral tijdens moeilijkere momenten afgelopen jaren, en daarboven heel mijn leven. Dan zijn er nog enkelen die ik nog wil bedanken. Glenn Roman, een vrijwillige externe lezer, aan wie ik mijn verhaal kwijt kon en mij de ganse periode heeft bijgestaan in het lezen en herlezen van elke versie. Matthijs Gielen, mijn beste vriend, die mij steeds een hart onder de riem steekt. Mijn honden Cartouche, Dimi en Odieltje voor de stevige knuffels. Kortom, iedereen die mij op een of andere manier heeft gesteund.

Opgedragen aan Noah. Liefje, ik mis je. †04/06/2023

Kaat Janssens
5 juni 2023

Abstract

Fisheries targeting common sole (*Solea solea*) have been facing decreasing total allowable catches (TACs) in certain areas in recent years. These quota reductions, advised by the International Council for the Exploration of the Sea (ICES), are caused by a lack of data and resulting uncertainty about the stock structure and biomass. As a result, these TACs may be based on an underestimation of the fish stocks. This research investigates the use of environmental DNA (eDNA) of common sole as an alternative, non-invasive method of reliable detection and biomass estimation using digital PCR (dPCR). eDNA concentrations obtained from a total of 65 seawater samples, collected at 13 stations in the North Sea in 2022, was compared to the abundance and biomass of sole as observed in the trawl at the same station. First, the eDNA, derived from scales and secretions, is extracted from the water samples using water filtration with Sterivex™-HV filters. Then, the eDNA is extracted using the DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen®). Prior to quantifying the concentration of the eDNA extract through dPCR, an estimation is made using the Quantus™ Fluorometer (Promega®). Finally, the dPCR quantification is compared to the biomass data to determine whether this method can become an efficient alternative. The results were subject to the determined LOD and LOQ of 0,99 c/μL to rule out unreliable detection and quantification. The negative controls showed negligible contamination of the samples. The correlation between eDNA concentrations (c/L) and biomass (kg) as well as the abundance of sole, showed a Pearson correlation coefficient of 0,402 and 0,378 and a p-value of 0,023 and 0,025, respectively. The observed, weak positive and significant correlations demonstrate the potential of using eDNA for biomass as well abundance estimation of common sole in the North Sea. Yet, the influence of several environmental, biological and hydrological processes on eDNA needs further research. This study shows that eDNA detection can best be applied as a complementary method to enable more efficient and sustainable management of data-poor stocks by providing better support for quota negotiations and fisheries management.

Lijst met afkortingen en symbolen

AL	<i>Animal Lysis</i>
ATL	<i>Animal Tissue Lysis</i>
BPNS	<i>Belgian Part of the North Sea</i> , Belgisch deel van de Noordzee
BTS	<i>Beam Trawl Survey</i>
COI	Cytochroom c gen
CV	Variantiecoëfficiënt
DNA	Desoxyribonucleïnezuur
dPCR	<i>Digital PCR</i>
dsDNA	<i>Double stranded DNA</i>
eDNA	<i>Environmental DNA</i>
EEZ	Exclusieve Economische Zones
F	<i>Forward primer</i>
FAM	6-carboxylfluoresceïne
FF	Filterfractie
HEX	Hexachlorofluoresceïne
ICES	<i>International Council for the Exploration of the Sea</i>
ILVO	Instituut voor Landbouw-, Visserij- en Voedingsonderzoek
IPC	<i>Internal Positive Controle</i> , Interne positieve controle
LOD	<i>Limit Of Detection</i> , detectielimiet
LOQ	<i>Limit Of Quantification</i> , kwantificatielimiet
MSY	<i>Maximum Sustainable Yield</i> , Maximale duurzame opbrengst
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i>
P	Probe
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerasekettingreactie
PVDF	Polyvinylideenfluoride
qPCR	<i>Quantitative PCR</i>
R	<i>Reverse primer</i>
R	Pearson-correlatiecoëfficiënt
RT-PCR	<i>Real time PCR</i>

SD	Standaarddeviatie
SDS	Natriumdodecylsulfaat
TAC(s)	<i>Total Allowable Catch(es)</i> , Totale toegestane vangst(en)
TE	Tris-EDTA
UV	Ultraviolet
VF	Verdunningsfactor

Verklarende woordenlijst

Abundantie	De frequentie van een soort.
Amfidromisch punt	Vast knooppunt op zee dat geen getijden kent.
Benthos	Verzameling van organismen die in of op de bodem van de zee, oceaan, rivieren of meren leven.
Biomassa	Het totaalgewicht aan biologisch materiaal van een (groep) organisme(n), dat wordt uitgedrukt in ton of kg per km ² .
Corioliseffect	Dit effect wordt veroorzaakt door de richtingsveranderingen van de wind. De wind waait over het oceaanoppervlak en zorgt voor oppervlaktestroming. Omdat de wind in het Noordelijk halfrond tegenovergesteld waait aan de wind in het Zuidelijk halfrond, beweegt de stroming op het Noordelijk halfrond met de klok mee, en op het Zuidelijk halfrond tegen de klok in.
Cyclonaal	Cirkelvormige stroom tegen de wijzers van de klok in.
Demersaal	Levend op de bodem van de zee, oceaan, rivieren of meren.
Endonuclease	Nuclease die een fosfodiësterbinding in de polynucleotideketen van een DNA-molecuul verbreekt. Resterende fragmenten bestaan uit meerdere nucleotiden.
Exonuclease	Nuclease die een nucleïnezuurmonomeer aan het eind van het DNA- en/of RNA-molecuul afsplitst, waarbij een nucleïnezuur en een monomeer gevormd worden.
Exploitatie	Iets gebruiken om voordeel (winst) te behalen.
Fluorofoor	Een molecuul met fluorescentie-eigenschappen, dat licht kan absorberen en uitstralen binnen een bereik van golflengten.
Gyre	Een grote cirkelvormige beweging of werveling van oceaanwater die ontstaat door de oostenwinden aan de evenaar, die oceanisch oppervlaktewater westwaarts blaast, in combinatie met de westenwinden die dicht bij de polen opnieuw het water oostwaarts voeren.
Kinderkamer	Gebieden in de Noordzee - Waddenzee en Noordzeekust - met warmer zeewater, een rijk voedselaanbod en afwezigheid van predatoren; de ideale omstandigheden om op te groeien.
Mesokosmos	Een experimenteel systeem in open lucht waarbij de natuurlijke omgeving onder gecontroleerde omstandigheden wordt onderzocht.

Metabarcoding	De barcoding van (e)DNA/(e)RNA op een wijze die de gelijktijdige identificatie van vele taxa binnen hetzelfde staal mogelijk maakt.
Monitoring	Een proces binnen een gedistribueerd systeem voor het verzamelen en opslaan van toestandsgegevens.
Paaigebied	Plaats waar vissen komen om hun eieren af te zetten.
Paaiperiode	Tijd van het jaar dat vissen zich voortplanten.
Partitie	Elk van de delen die door onderverdeling ontstaat.
Pelagisch	In open water, zee, meren, vrij van de bodem levend.
Quencher	Een molecuul gebonden aan een probe dat fluorescerend signaal absorbeert en onderdrukt.
Raming	Schatting, prognose.
Saliniteit	Zoutgehalte van water in meren, oceanen, zeeën of de bodem.
Sigmoïdaal	Wiskundige functie met een S-vormige grafiek.
Stratificatie	Gelaagdheid van een waterkolom als gevolg van verschillen in temperatuur en/of saliniteit.
Taxa	Meervoud van taxon, taxonomische eenheid of groep.
Vissersvloot	Het totale schepenbestand.

Lijst van figuren

Figuur 2.1: Geografie en stromingen van de Noordzee	3
Figuur 2.2: Intensiteit van de boomkorvisserij in de Noordzee	6
Figuur 2.3: De Noordzeetong (Solea solea) of kortweg tong	7
Figuur 2.4: Paaigebieden van tong	8
Figuur 2.5: Totale aanvoer van tong (ton) per jaar in België	9
Figuur 2.6: Belang van verschillende vissoorten voor Belgische havens	10
Figuur 3.1: Principe van hydrolyseprobe-detectie.....	14
Figuur 3.2: Principe van digital PCR	15
Figuur 3.3: Workflow analyse waterstalen.....	16
Figuur 4.1: Concentratiebepaling eDNA met Quantus™ Fluorometer (Promega®).....	18
Figuur 4.2: Kaart BTS2022 eDNA sampling stations	20
Figuur 4.3: Waterfiltratie met Masterflex-L/S pomp (Masterflex®)	21
Figuur 4.4: eDNA-extractie	22
Figuur 5.1: Gemiddelde eDNA-concentratie van tong (c/L) per BTS-station	28
Figuur 5.2: Gemiddelde eDNA-concentratie van tong (c/L) in functie van de biomassa (kg) ...	29
Figuur 5.3: Gemiddelde eDNA-concentratie van tong (c/L) in functie van het aantal tong	30

Lijst van tabellen

Tabel 2.1: Vergelijking ICES-gebieden 7h-k met 4c op tong visbestanden	9
Tabel 4.1: Soortspecifieke primers en probes voor tong (<i>Solea solea</i>) en IPC	19
Tabel 5.1: Bepaling LOD en LOQ voor tong op de dPCR	25
Tabel 5.2: Kwantificatie tong eDNA in stalen via dPCR.....	26
Tabel 5.3: Kwantificatie tong eDNA in negatieve controlestalen via dPCR	27

Inhoudsopgave

Voor akkoordverklaring	I
Woord vooraf	II
Abstract	III
Lijst met afkortingen en symbolen.....	IV
Verklarende woordenlijst.....	VI
Lijst van figuren.....	VIII
Lijst van tabellen	IX
Inhoudsopgave	X
1 Inleiding.....	1
2 Visserij op tong (<i>Solea solea</i>) in de Noordzee	2
2.1 <i>De Noordzee</i>	2
2.1.1 Geografie	2
2.1.2 Oceanografie.....	2
2.2 <i>Visserij</i>	4
2.2.1 Quota	4
2.2.2 Belgische vissersvloot	5
2.2.3 Boomkorvisserij.....	5
2.3 <i>Noordzeetong (<i>Solea solea</i>)</i>	7
2.3.1 De biologie van <i>Solea solea</i>	7
2.3.2 Economische waarde.....	8
3 Detectie van eDNA in waterstalen	11
3.1 <i>Environmental DNA (eDNA)</i>	11
3.1.1 Wat is eDNA?	11
3.1.2 Biomassabepaling via eDNA	12
3.2 <i>Moleculaire detectiemethoden</i>	13
3.2.1 De <i>polymerase chain reaction</i> (PCR).....	13
3.2.2 <i>Quantitative</i> (qPCR) versus <i>digital</i> PCR (dPCR).....	14

3.3	<i>Workflow voor analyse van waterstalen</i>	16
4	Materialen en methode	17
4.1	<i>Bepaling LOD en LOQ van assay</i>	17
4.1.1	Stalen	17
4.1.2	Concentratiebepaling eDNA met Quantus™ Fluorometer.....	17
4.1.3	Kwantificatie met dPCR.....	18
4.2	<i>Kwantificatie van tong eDNA met dPCR</i>	20
4.2.1	Staalname	20
4.2.2	Filtratie	20
4.2.3	eDNA-extractie.....	21
4.2.4	Concentratiebepaling eDNA met Quantus™ Fluorometer.....	22
4.2.5	Kwantificatie met dPCR.....	22
4.3	<i>Data-analyse</i>	23
5	Resultaten en discussie	24
5.1	<i>Bepaling LOD en LOQ van assay</i>	24
5.1.1	Concentratiebepaling eDNA.....	24
5.1.2	Kwantificatie met dPCR.....	24
5.2	<i>Kwantificatie van tong eDNA met dPCR</i>	25
5.2.1	Concentratiebepaling eDNA.....	25
5.2.2	Kwantificatie met dPCR.....	25
5.3	<i>Data-analyse</i>	27
5.3.1	eDNA-concentraties in veld- en controlestalen	27
5.3.2	Vergelijking eDNA-concentraties met biomassa en aantal tong op basis van boomkor data	29
6	Conclusie	32
	Referentielijst	33
	Bijlagen	38

1 Inleiding

Het Instituut voor Landbouw-, Visserij- en Voedingsonderzoek (ILVO) is een onafhankelijk wetenschappelijk onderzoekscentrum van de Vlaamse overheid. ILVO werkt mee aan de verduurzaming van de landbouw, visserij en agrovoedingssector. Dier, één van de onderzoekseenheden, groepeerd onderzoek te land en ter zee. Hier wordt ingezet op onderzoek naar aquacultuur, vispopulaties, visserijtechniek en de impactstudies van menselijk handelen op het mariene milieu om de bescherming en duurzame exploitatie van mariene gebieden te versterken. De Noordzeetong (*Solea solea*) is één van de meest intensief beviste platvissen in de Noordzee. Samen met schol (*Pleuronectes platessa*) vertegenwoordigt deze vissoort bijna 50 % van de totale commerciële visvangst in België. De visserij gericht op het tongbestand wordt de laatste jaren geconfronteerd met steeds dalende toegestane vangsten, of *total allowable catches* (TACs), in bepaalde gebieden. Deze quotaverlaging, geadviseerd door de *International Council for the Exploration of the Sea* (ICES), wordt veroorzaakt door een tekort aan data en de daaruit volgende onduidelijkheid over de bestandsgrootte (biomassa) en genetische identiteit van de stock. Hierdoor worden deze TACs mogelijks opgesteld op basis van een onderschatting van de visbestanden. Data-arme gebieden gaan gepaard met een tweevoudig probleem met betrekking tot het beheren van de visbestanden. Enerzijds is er enige onduidelijkheid over de stock-identiteit van tong. In de ICES-gebieden 27.7h-k bijvoorbeeld, gelegen ter hoogte van de zuidelijke Keltische Zee en het zuidwesten van Ierland, kan er niet met zekerheid worden bevestigd dat de opgevisste vis in deze gebieden behoren tot diegene die worden gevangen aan de noordelijke grens van het 7h-gebied. Anderzijds blijft de monitoring van deze tongbestanden een uitdaging, wegens het arbeidsintensieve karakter. Daarenboven blijft het verzamelen van data op basis van de biomassa, gemeten via *beam trawl* vangsten, een invasieve methode voor de mariene ecosystemen (*Meer over de Belgische visserij | Vis, z.d.; Meeste Noordzeebestanden gezond, maar sterke daling quota-advies voor tong, haring, tarbot en griet, 2022; Te weinig data over tong, 2022*).

Dit onderzoek tracht een efficiënter en duurzamer beheer van data-arme visbestanden mogelijk te maken door een betere onderbouwing bij de quota-onderhandelingen en bij het dagelijks beheer van visserij op deze bestanden aan te reiken. Gebaseerd op het *environmental DNA* (eDNA) van tong in de Noordzee, waarvan de biomassa reeds gekend is, wordt een alternatieve methode van detectie en biomassabepaling voorgesteld om op een betrouwbare, niet-invasieve manier data te verzamelen om het beheer van de visbestanden te versterken. Het eDNA van tong in het zeewater, afkomstig van schubben en secreties, wordt gekwantificeerd met een DNA-gebaseerde detectiemethode, namelijk *digital PCR* (dPCR). Eerst wordt het eDNA uit de waterstalen gehaald door middel van waterfiltratie met Sterivex™-HV filters. Daarna wordt het eDNA geëxtraheerd met de *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Qiagen®). Alvorens de concentratie van het eDNA-extract wordt gekwantificeerd via dPCR, wordt een schatting gemaakt met behulp van de *Quantus™ Fluorometer* (Promega®). De uiteindelijke dPCR-kwantificatie wordt tot slot vergeleken met de biomassadata om te bepalen of deze methode een efficiënt alternatief kan worden.

2 Visserij op tong (*Solea solea*) in de Noordzee

Het doel van dit onderzoek is het voorstellen van een alternatief voor de traditionele biomassabepaling via boomkorvisserij om data te verzamelen voor het beheer van visbestanden. Dit onderzoek richt zich op het tongbestand in de Noordzee. De Noordzee is een gebied waarvan veel data reeds verzameld en gekend is via boomkorvisserij (ICES, 2022c). Het bestudeerde organisme is tong (*Solea solea*), wegens de grote economische waarde van deze vissoort (Statbel, 2023b).

2.1 De Noordzee

Het studiegebied van dit onderzoek omvat de centrale Noordzeegebieden. In deze gebieden worden aan verschillende soorten visserij gedaan, waaronder boomkorvisserij (ICES, 2020).

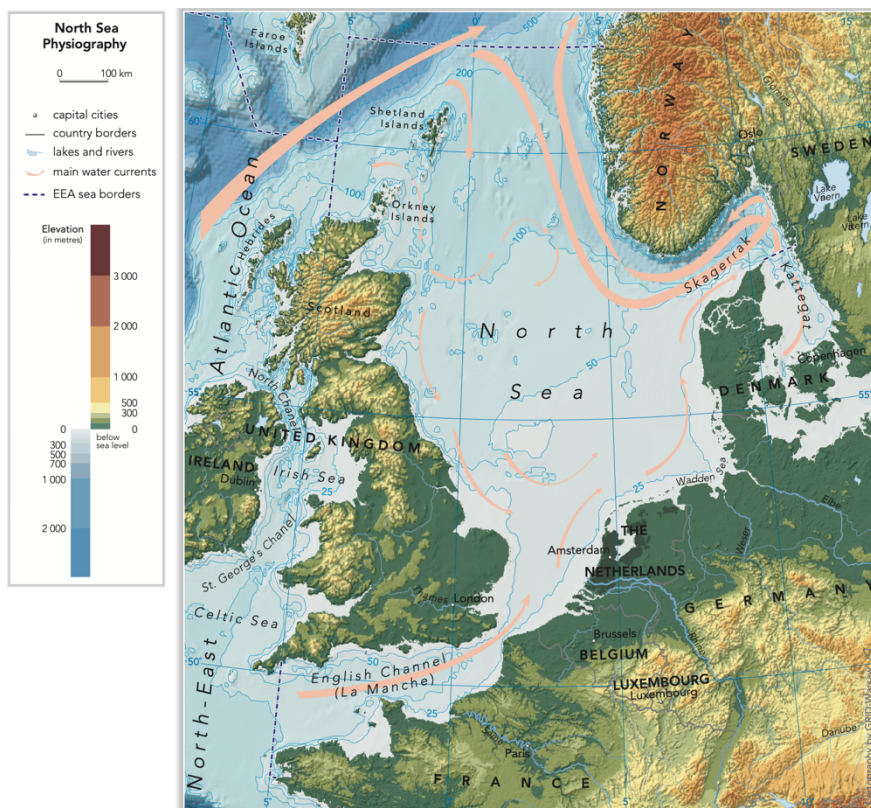
2.1.1 Geografie

De Noordzee is gelokaliseerd op het continentaal plat van Noordwest-Europa tussen Noorwegen, Groot-Brittannië, Frankrijk, België, Nederland, Duitsland en Denemarken. De Noordzee is onderverdeeld in zeven deelgebieden op basis van de diepte die toeneemt in noordwestelijke richting. Deze onderverdeling bestaat uit de relatief ondiepe zuidelijke Noordzee, de centrale Noordzee, de noordelijke Noordzee, de Noorse Bocht, het Skagerrak, het ondiepe Kattegat als overgang naar de Oostzee en het Kanaal als overgangszone naar de noordoostelijke Atlantische Oceaan. De ondiepe zuidelijke Noordzee omvat het grote getijdengebied van de Waddenzee, de Duitse Bocht en de zuidelijke Bocht. De grenzen met de Atlantische Oceaan liggen in het noorden en in het zuidwesten in het Kanaal tussen Calais en Dover. In het oosten grenst de Noordzee aan de Oostzee (Figuur 2.1). De Noordzee heeft een oppervlakte van ongeveer 750 000 km² en een volume van ongeveer 94 000 km³ (EEA, 2001). Het is een natuurgebied met een enorme biodiversiteit, maar biedt ook een groot belang voor de visserij, scheepvaart en de energiesector (EEA, 2001; 'Noordzee | Ecomare Texel', z.d.; OPSAR Commission, 2000).

2.1.2 Oceanografie

In de Noordzee worden de stromingen aangedreven door getijden, wind en dichtheidsgradiënten, die sterk variëren afhankelijk van de ruimtelijke en temporele schaal. Ondanks de variatie van het watertransport wordt op lange termijn een gemiddelde restcirculatie waargenomen, waarbij de variabiliteit van de circulatie wordt geregistreerd als een mengeffect (Blaas et al., 2001). Tijdens deze circulatie stroomt het meeste water vanuit het noordoostelijke deel van de Atlantische Oceaan via de Noord-Atlantische stroom naar de Noordzee, terwijl minder dan 10 % via het Kanaal aankomt (EEA, 2001; OPSAR Commission, 2000). De gemiddelde stromingen in de Noordzee vormen een cyclonale circulatie, waarbij de meeste watermassa's naar de noordelijke Noordzee en verder langs de Noorse kust naar de Noorse Zee worden getransporteerd (Figuur 2.1). De watermassa beweegt rond een amfidromisch middelpunt als gevolg van het corioliseffect, waarbij de getijdenbeweging minimaal is (VLIZ, 2020). De spoeltijd voor de Noordzee wordt geschat tussen 365 en 500 dagen (OPSAR Commission, 2000).

Getijdenstromingen zijn het meest energieke kenmerk van de Noordzee, die vooral bijdragen tot de menging van het ondiepe deel van de Noordzee. In de zomer blijft het gebied gemengd, waardoor stratificatie ontbreekt (EEA, 2001). Dit wijst erop dat het ondiepe milieu van het Belgisch deel van de Noordzee (BPNS) een dynamisch en *well-mixed* systeem is (EMoSEM, z.d.; OPSAR Commission, 2000). Het getijdenverschil bij Oostende bedraagt bijna 4 m (VLIZ, 2020). De reststroom langs de Belgische kust wordt gevormd door de zuidelijke kuststroom, die ter hoogte van Oostende ruwweg naar het westen afbuigt naar de rivierafvoer van de Schelde, en samenvloeit met de noordelijke stroming van de Noord-Atlantische Oceaan (Nihoul & Hecq, 1984). De rivierafvoer van de Schelde vormt een kleine gyre dicht bij de Belgische kust en heeft een invloed op het zoutgehalte, de troebelheid, het nutriënteniveau en de zandafzetting in dit kustgebied (Nihoul & Hecq, 1984).



Figuur 2.1: Geografie en stromingen van de Noordzee

– Onderverdelingen volgens waterdiepte en stromingen in de Noordzee worden vermeld op de kaart, te volgen met de legende (EEA, 2012).

2.2 Visserij

De visserij in de Noordzee kan worden onderverdeeld in commerciële en industriële visserij. De industriële visserij gebruikt de aanvoer van vis voor indirecte menselijke of dierlijke consumptie van bijvoorbeeld vismeel of -olie (Cashion et al., 2017). De industriële visserij is historisch gezien verantwoordelijk voor het grootste deel van de vangst in de Noordzee, hoewel deze minder prominent is geworden (ICES, 2022d). De commerciële visserij past de visaanvoer voor directe menselijke consumptie toe. De totale demersale aanvoer uit de Noordzee piekte boven de 1,5 miljoen ton in de jaren tachtig, terwijl in de jaren negentig een sterke daling optrad. Momenteel ligt het aantal onder de 500 000 ton (Cashion et al., 2017; ICES, 2022a).

2.2.1 Quota

The International Council for the Exploration of the Sea (ICES) is een intergouvernementele organisatie voor mariene wetenschap, die beoogt objectieve gegevens over de toestand en het duurzame gebruik van zeeën en oceanen te voorzien. Dit om het wetenschappelijk inzicht in mariene ecosystemen te versterken en te delen. Niet alleen brengt ICES up-to-date adviezen voort voor het behoud, beheer en duurzaamheid, maar ook verzorgt ICES een wereldwijd overzicht over de ecosystemen, visserij en aquacultuur om op basis hiervan adviezen over de status en het gebruik van mariene ecosystemen aan te leveren (ICES, z.d.). Een belangrijk advies voor dit onderzoek is de quotabepaling voor de visserij op basis van de visbestanden. Een visquotum is een jaarlijks voorgeschreven hoeveelheid per soort vis die mag worden gevangen en aangeland, de *total allowable catch* (TAC). Deze hoeveelheid varieert voor elk visbestand en wordt gewoonlijk geraamd in ton (biomassa) of in aantal vissen (abundantie). Wanneer de TACs toch worden overschreden, mag er niet meer worden gevestigd op de soort waarvan de quota niet werden gerespecteerd. Dergelijke uitsluiting van visserij beoogt het voorkomen van overbevissing en het bijgevolg uitsterven van vissoorten (ICES, z.d., 2022a; Tengvall, 2022; *Total Allowable Catches (TACs)*, z.d.; *Visquota - Visserij - Rijksoverheid.nl*, 2018).

Om accuraat advies over duurzame bevissingsniveaus te kunnen uitbrengen, worden ramingen over de toestand van de visbestanden gemaakt. Deze zijn gebaseerd op de jaarlijkse vangstgegevens van de vissers en op wetenschappelijke gegevens verzameld door instellingen als ILVO. Relevante data is onder meer de actuele en historische informatie over lengte, gewicht, leeftijd en reproductie van de betrokken soort en het betrokken bestand (Tengvall, 2022). Vervolgens analyseren wetenschappers deze data met behulp van computermodellen en stellen zij de maximale duurzame opbrengst, of *maximum sustainable yield* (MSY) vast (*MSY objective - FishSec*, z.d.). Dit is de hoogste opbrengst aan vis die op duurzame wijze kan worden gevangen zonder de toekomstige visbestanden uit te putten. Door een gebrek aan informatie over vis(bestanden), bijvangst en illegale visserij zijn de ramingen van de bestanden echter niet altijd accuraat en in sommige gevallen niet meer dan ruwe veronderstellingen. Het verzamelen van data om de visbestanden te volgen blijft dus een uitdaging. Daarnaast is het een arbeidsintensief proces dat eveneens een negatieve impact heeft op de mariene ecosystemen. Hierdoor blijven sommige gebieden een tekort aan data hebben, waardoor (adviezen voor) TACs soms lager worden ingesteld omdat ze gebaseerd zijn

op onderschattingen van de visbestanden (*MSY objective – FishSec, z.d.; Te weinig data over tong, 2022; Tengvall, 2022*).

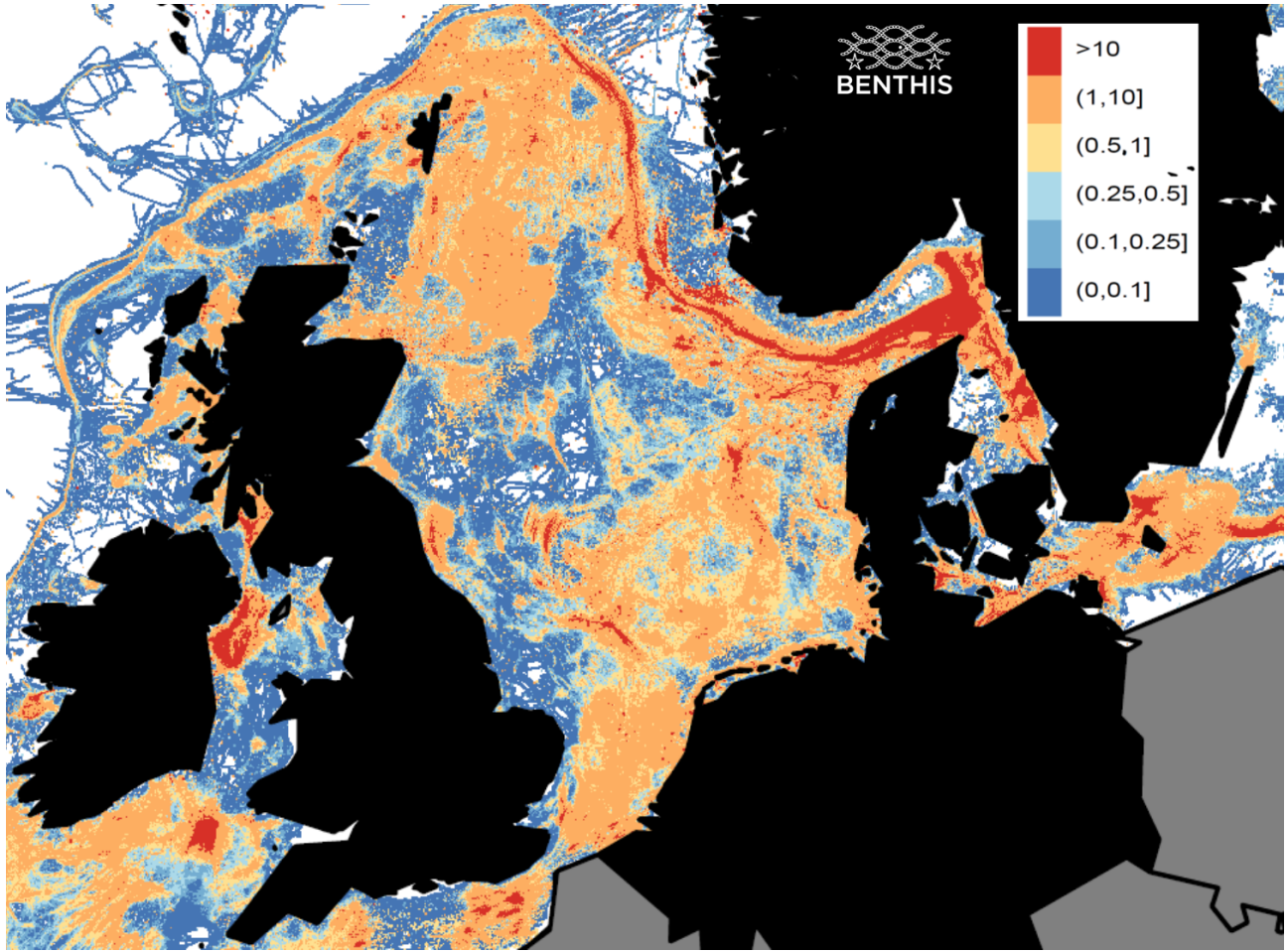
2.2.2 Belgische vissersvloot

De Belgische vissersvloot is in de loop der jaren drastisch afgenomen. In 2000 waren er nog 127 vaartuigen, wat tegen 2023 werd gereduceerd tot 64. Deze vloot omvat minder dan 0,1 % van de totale Europese vloot (*Fleet Register, 2023; Vissersvloot, 2023*). De belangrijkste visgronden voor de Belgische visserij, met 58 % van de aanvoer in 2022, zijn de centrale Noordzee en het oostelijke deel van het Kanaal, terwijl de vangsten uit de zuidelijke Noordzee ongeveer 10 % uitmaken (*Scherrens, 2020*). Het demersale visbestand vormt de grootste fractie van de Belgische visaanvoer, met tong en schol als de belangrijkste commerciële soorten (*ICES, 2022d; Scherrens, 2020; Statbel, 2023a, 2023b*). Voor 2022 bedroeg de totale visaanvoer door de Belgische visserij 13 217 ton, waarvan 72 % demersale vis, 27 % schaal- en weekdieren en slechts 1 % pelagische vis. De drie belangrijkste aangelande demersale vissoorten in 2022 zijn tong (24 %), schol (16 %) en rog (15 %) (*Statbel, 2023a, 2023b*).

2.2.3 Boomkorvisserij

De boomkorvisserij of *beam trawl fishery* is de vistechiek die in de Noordzee het meest wordt gehanteerd. In de periode 2010-2012 werden gebieden in het BPNS gemiddeld 1 tot >10 keer per jaar bevist met boomkorvisserij (*Figuur 2.2*). De boomkor bestaat uit een visnet dat wordt opgehouden door een stalen balk met twee stalen platen aan zijn uiteinden. Achter de balk hangt het visnet als een zak om de vis in op te vangen. De boomkor wordt in zijn geheel over de zeebodem voortgetrokken door een vissersboot of onderzoeksschip. De vangst met deze techniek bestaat voornamelijk uit garnalen, platvissen of vissen die dicht bij de zeebodem leven. Om de platvissen van de bodem te halen worden wekkerkettingen door de zeebodem geploegd met een snelheid tot zeven knopen. Hierdoor schrikken de vissen op en zwemmen ze op het net af. Door het omwoelen en omploegen van de zeebodem wordt al het leven in de bodem verstoord en komen alle dieren in het net terecht, waaronder een groot deel ongewenste bijvangst die vaak dood overboord wordt gezet. Kortom, de boomkorvisserij heeft een negatieve impact op het mariene ecosysteem (*Boomkor, z.d.; EEA, 2016; ICES, 2020; van Rodijnen, 2015*).

Een eerder veronderstelde aanpak om de impact op de zeebodem en ongewenste vangsten te verminderen, was de toepassing van elektrische pulskorvisserij (*ICES, 2021*). De techniek was populair bij vissers omdat het onder meer het brandstofverbruik tot 46 % verminderde (*Infographic on Pulse Fishing - Brochure - Pulse Fishing, 2017*). Het bleek echter een negatieve invloed te hebben op de aanvoer van BPNS en waarschijnlijk op het hele ecosysteem (*VLIZ, 2014*). Bijgevolg verbood de wetgeving van de Europese Unie (2019/1241) het langs de Belgische kust sinds 2019 en in alle Europese lidstaten sinds 2021 (*ICES, 2021; Regulation (EU) 2019/1241, 2019; VLIZ, 2014*).



*Figuur 2.2: **Intensiteit van de boomkorvisserij in de Noordzee**
– Gemiddeld aantal keren per jaar dat een gebied is bevestigd tussen 2010-2012 (EEA, 2016).*

2.3 Noordzeetong (*Solea solea*)

Dit onderzoek focust zich op de Noordzeetong (*Solea solea*), één van de meest intensief beviste platvissen in de Noordzee. Net daarom is het van belang dat het beheer van deze visbestanden zo efficiënt en duurzaam mogelijk verloopt (*Meer over de Belgische visserij* | Vis, z.d.).

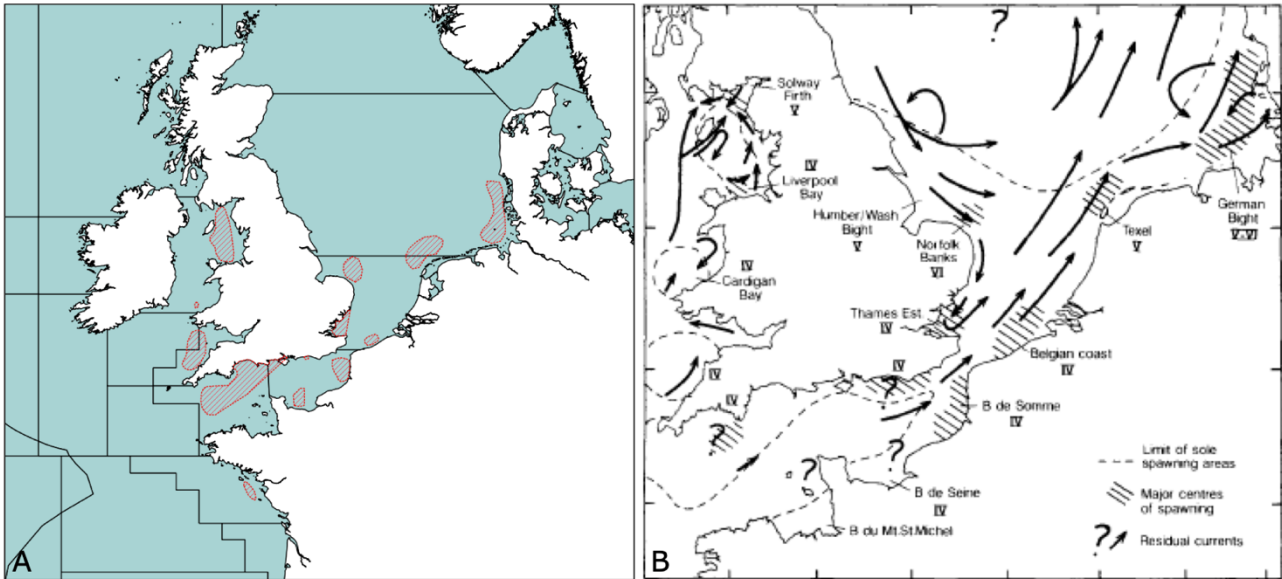
2.3.1 De biologie van *Solea solea*

Tong is een platvis die zijn naam te danken heeft aan zijn ovaalvormige en platte bouw (Figuur 2.3). Tong leeft grotendeels op de bodem en behoort tot het benthos van de zee. Hij is gemiddeld 30 cm groot, maar kan tot 70 cm worden in volwassen toestand. De buikzijde wordt bedekt door een witte laag tastharen die bewegingen in het zand kunnen waarnemen. Tong wordt echter niet geboren als een platvis. Een larvale rondvis verlaat het ei en zwemt enkele weken passief rond met aan iedere kant een oog. Na twee weken ondergaat de vis een transformatie en migreert naar de zeebodem. Deze transformatie bestaat uit het verschuiven van het schedelbot waardoor het linkeroog naast het rechter komt te liggen en een verandering van de kleur van schubben. De onderkant wordt bleker terwijl de kant met de ogen donker wordt, aangepast aan de kleur van het zand voor camouflage. Ook het voedsel voor de tong wijzigt. Terwijl de larven zich voeden met plankton, bestaat het eten van de volwassen tong voornamelijk uit kleine schaaldieren en kreeftjes, die hij opspoot via de geur. De vissen komen uit het ei in dieper gelegen zeegebieden en trekken als larve naar de kustgebieden, om na transformatie terug te keren naar de diepere zeebodem (Delbare, z.d.; *Noordzeetong* | *Vissoorten* | *Mowi Belgium*, z.d.; 'Platvissen', z.d.; Renders & Sas, 2014).



Figuur 2.3: De Noordzeetong (Solea solea) of kortweg tong (Moreau et al., 2016).

Tong leeft voornamelijk in ondiepe, bij voorkeur warmere, kustwateren met een zand- of slijkbodem in het oosten van de Atlantische Oceaan, de Noordzee en de Middellandse Zee. Het paaigebied en de paaiperiode van tong hangen af van waar hij verblijft. De gebieden met de grootste kans om paaierende adulten, eieren en/of larven te vinden zijn de Zuidelijke Noordzee, het Kanaal, de Ierse Zee, Keltische Zee en de Golf van Biskaje (Figuur 2.4a) (Pecceu & Van Hoey, 2020). In de zuidelijke kustgebieden van de Noordzee kunnen er vijf belangrijke paaiplaatsen worden onderscheiden: de Duitse Bocht, Offshore ter hoogte van Texel, de Belgische kustwateren, de monding van de Thames en de Norfolk zandbanken (Figuur 2.4b) (Pecceu & Van Hoey, 2020). Recent onderzoek toont een steeds noordelijkere migratie van tong aan, wat kan wijzen op een vertraging van het groeiproces (Delbare, z.d.).



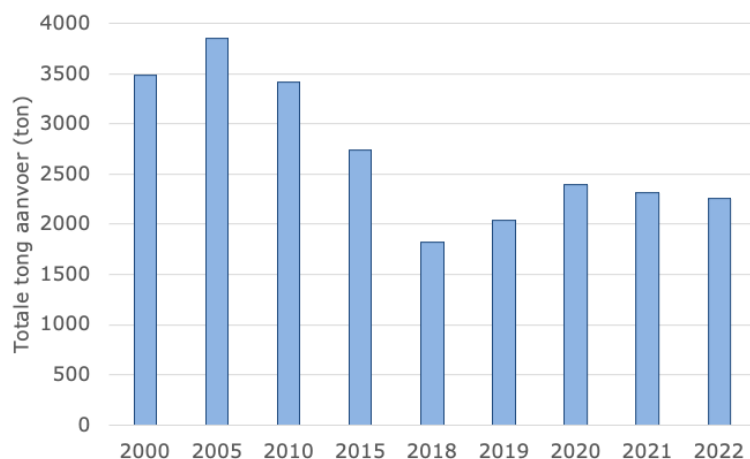
Figuur 2.4: Paaigebieden van tong

– A: Overzicht van het centrum van paaigebieden; op basis van beschikbare data; opm. Aanduidingen zijn geen exacte grenzen maar gebieden met hoogste aangetroffen concentraties en larven. B: Paaigebieden van tong in de zuidelijke Noordzee en plaatselijke stromingen (Pecceu & Van Hoey, 2020).

Noordelijke vissen in onder andere de Noordzee hebben een paaiseizoen dat loopt van april tot augustus. In het zuiden is dit echter vier maanden vroeger door hogere temperaturen van het zeewater (Delbare, z.d.). Tijdens het paaien benadert het mannetje het vrouwtje, zwemmen ze synchroon onder het wateroppervlak en bevrucht het mannetje de eitjes die het vrouwtje uitstoot (Delbare, z.d.). Nadat de eieren uitkomen trekken de jonge vislarven in het vroege voorjaar de Waddenzee en de Noordzeekust binnen. Het ondiepe, warmere zeewater, het grote voedselaanbod en de afwezigheid van roofdieren bieden de ideale omstandigheden om op te groeien (van Leeuwe, 2010). Deze gebieden worden de 'kinderkamers' van de tong, en andere platvissen zoals schol, genoemd (Delbare, z.d.; *Noordzeetong | Vissoorten | Mowi Belgium*, z.d.; 'Platvissen', z.d.).

2.3.2 Economische waarde

Tong is één van de meest gegeten Noordzeevissoorten (*Noordzeetong | Vissoorten | Mowi Belgium*, z.d.). Door zijn hoge handelswaarde is tong een belangrijke bron van inkomsten voor vissers. In België wordt jaarlijks ongeveer 3000 ton aan tong gevestigd, wat 17 % van de totale aanvoer voor Belgische visveilingen omvat. Hoewel deze vissoort niet de grootste aanvoer bevat, wordt tong door de hogere prijs per kilo een interessante commerciële vissoort voor de Belgische visserij. De laatste drie jaar neemt de aanvoer echter af. In 2022 telde de totale hoeveelheid aanvoer van tong in België 2261 ton, terwijl deze in 2020 nog 2399 ton bedroeg. Dit is een daling van 6 %. (Figuur 2.5) Dit is mogelijks een gevolg van het dalen van de TACs, wat op zijn beurt een gevolg kan zijn van data-arme gebieden (*Noordzeetong | Vissoorten | Mowi Belgium*, z.d.; Statbel, 2023a).



Figuur 2.5: Totale aanvoer van tong (ton) per jaar in België
– Data gehaald uit (Statbel, 2023a).

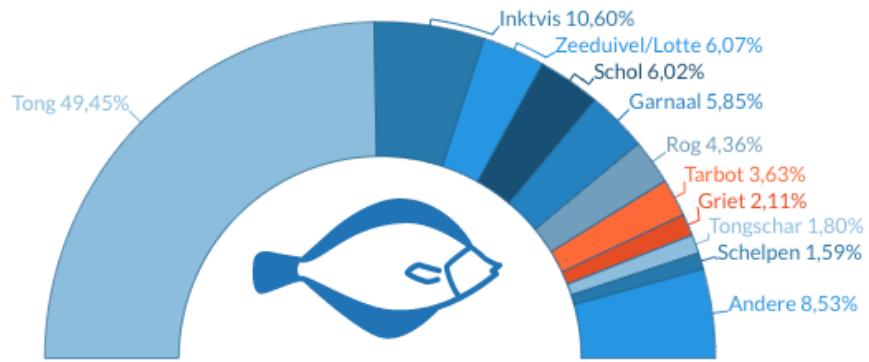
In de ICES-gebieden 27.7h-k bijvoorbeeld, gelegen ter hoogte van de zuidelijke Keltische Zee en het zuidwesten van Ierland, worden sinds 2016 TACs voor tong aanzienlijk lager geadviseerd uit voorzorgsprincipe als gevolg van een tekort aan data. Sinds 2020 wordt jaarlijks dezelfde hoeveelheid van 213 ton vis geadviseerd. De TACs voor de datarijke Noordzeegebieden (ICES-gebied 4c) daarentegen liggen veel hoger. Deze adviezen worden gebaseerd op het MSY-principe of het Management plan, met het oog op duurzame visvangst (Tabel 2.1) (ICES, 2022b, 2022c).

Tabel 2.1: Vergelijking ICES-gebieden 7h-k met 4c op tong visbestanden

– Met ICES-advies, TAC (ton) en effectieve visaanvoer (ton) van de laatste vier jaar; data gehaald uit (ICES, 2022b, 2022c).

Jaar	De Keltische Zee, zuidwesten van Ierland ICES-gebieden 7h-k			De Noordzee ICES-gebied 4c		
	ICES-advies	TAC (ton)	Effectieve visaanvoer (ton)	ICES-advies	TAC (ton)	Effectieve visaanvoer (ton)
2020	Voorzorgsmaatregel	≤ 213	299	Management plan	17 545	8863
2021	Voorzorgsmaatregel	≤ 213	336	Management plan	21 361	8185
2022	Voorzorgsmaatregel	≤ 213	/	MSY-aanpak	15 330	/
2023	Voorzorgsmaatregel	≤ 213	/	MSY-aanpak	9152	/

Desondanks blijft tong de voornaamste doelsoort in de Belgische visserijsector. De Belgische veilingen kunnen ondanks de verminderde aanvoer van tong toch een goede markt realiseren. Tong kende in 2022 een prijsstijging met 32,2 % ten opzichte van het jaar voordien (Statbel, 2023b). De vis blijft zo goed voor de helft van de gerealiseerde omzet in de Belgische zeevisserij en is bijgevolg de bestverkochte vis (Figuur 2.6). De tweede en derde plaats gaan respectievelijk naar inktvis (10,60 %) en zeeduivel (6,07 %) (Statbel, 2023b).



Figuur 2.6: Belang van verschillende vissoorten voor Belgische havens
 – Berekend volgens de waarde van aangevoerde en verkochte vis (Statbel, 2023b).

3 Detectie van eDNA in waterstalen

De kwantificatie van *environmental* DNA (eDNA) in waterstalen kan een alternatief voor de traditionele biomassa-bepaling betekenen. Het water waarin organismen zwemmen bevat eDNA afkomstig van secreties (USGS, 2018). Het detecteren en kwantificeren van dit eDNA kan worden benaderd met twee DNA-gebaseerde detectiemethoden: *quantitative* PCR (qPCR) en *digital* PCR (dPCR) (Quan et al., 2018). Een vergelijkende studie moedigt het gebruik van dPCR aan. Deze methode wordt bijgevolg gehanteerd binnen dit onderzoek. Het potentieel en het gebruik van eDNA wordt hier uitgelegd.

3.1 *Environmental* DNA (eDNA)

De datacollectie en het monitoren van de vangsten, nodig voor het beheer van de visbestanden, gebeurt onder meer aan de hand van de biomassa (uitgedrukt in ton of kg per km²). Het bepalen van de biomassa van visbestanden heeft door het eerder aangehaald destructief karakter van de boomkor een negatieve impact op het mariene ecosysteem en het geassocieerde benthos (Tengvall, 2022). *Environmental* DNA (eDNA) kan een alternatieve methode voor het monitoren van vis zijn. Naast het detecteren van de aanwezigheid van soorten, toont recent onderzoek aan dat eDNA een alternatief kan zijn voor het bepalen van de biomassa van bepaalde vissoorten (Knudsen et al., 2019; Maes et al., 2023; Salter et al., 2019; *Te weinig data over tong*, 2022; Tengvall, 2022).

3.1.1 Wat is eDNA?

Desoxyribonucleïnezuur (DNA) is het erfelijk materiaal in organismen dat de biologische instructies bevat voor de opbouw en instandhouding ervan. De chemische structuur van DNA is voor alle organismen gelijk, maar de volgorde van de baseparen verschilt. Unieke sequenties van deze basenparen bieden een middel om soorten, populaties en zelfs individuen te identificeren (USGS, 2018). eDNA is nucleair of mitochondriaal DNA dat uit een organisme in het milieu zoals water, sediment of de bodem terechtkomt in de vorm van uitwerpselen, slijm, gameten, huid en schubben (USGS, 2018). Deze cellen, afgegeven aan het water waarin de vis zwemt, bevatten dus dezelfde genetische code als weefsel- of bloedcellen. In dynamische, aquatische milieus blijft eDNA niet op de locatie van vrijlating, maar wordt het verdund, verspreid en afgebroken door stromingen en andere hydrologische processen (Maes et al., 2023). Volgens verschillende studies varieert de grens van de detecteerbaarheid tussen 1 uur (Murakami et al., 2019) en 10 uur (Dell'Anno & Corinaldesi, 2004) tot maximaal 48 uur (Collins et al., 2018). Blootstelling aan ultraviolet (UV) B-straling, hoge zuurgraad, hitte en endo- en exonucleasen kunnen het eDNA degenereren (Dejean et al., 2011; USGS, 2018).

Detectie van eDNA in het milieu kan toepassingen opleveren die waardevol kunnen zijn voor visserijbeheer en instandhouding. Zo kan eDNA informatie opleveren over de aan- of afwezigheid van bepaalde soorten (waaronder bedreigde of invasieve soorten), abundantie en biomassa van soorten en genetische patronen van populaties (Salter et al., 2019; Takahara et al., 2012; Thomsen et al., 2016). Populatiegemeenschappen kunnen worden geïdentificeerd dankzij eDNA-metabarcoding, waarbij een korte regio van het genoom van meerdere soorten gelijktijdig wordt gesequentieerd en vervolgens wordt vergeleken met een referentiedatabase

(Hansen et al., 2018). Een andere toepassing is het in kaart brengen van verspreidingspatronen van doelsoorten, wat van belang is voor een succesvol beheer van commerciële visbestanden (Hansen et al., 2018). Bijgevolg heeft eDNA het potentieel om bij te dragen als een waardevolle vervanging van of aanvulling op de commerciële beoordeling van visbestanden (Hansen et al., 2018).

3.1.2 Biomassabepaling via eDNA

Het nagaan van eDNA in het water biedt een non-invasieve detectiemethode die op meerdere vlakken kan worden ingezet voor het visserijbeheer. Een aantal voordelen van deze methode zijn kostenefficiëntie, een bredere geografische dekking van de habitatbezetting, vroege opsporing van invasieve soorten, niet-dodelijke bestandsevaluaties, verkenning van voorheen ontoegankelijke aquatische milieus en ontdekking van nieuwe soorten die onder het wateroppervlak verborgen liggen (Jerde, 2021; Knudsen et al., 2019; USGS, 2018).

Als relatief nieuwe methode ondergaan technologieën zoals eDNA dankzij onderzoek een snelle evolutie die de betrouwbaarheid vergroten. Zo toonde Pawlowski et al. (2022) aan dat eDNA-metabarcoding van sediment gelijkaardige resultaten oplevert als de morfologische identificatie van het benthos. Niet alleen sediment, maar ook waterstalen bevatten een detecteerbare hoeveelheid eDNA (Salter et al., 2019). Tot nu toe zijn er al heel wat succesvolle toepassingen in water gericht op kwalitatieve beschrijvingen van soorten inventarisaties. Bovendien toont onderzoek aan dat eDNA ook kan instaan voor kwantitatief onderzoek. Salter et al. (2019) vond een significant positieve correlatie tussen de biomassa en eDNA-concentratie van Atlantische kabeljauw (*Gadus morhua*). Dit onderzoek toont het potentieel van eDNA voor biomassabepalingen van commercieel belangrijke visbestanden aan (Salter et al., 2019). Knudsen et al. (2019) vond bij gelijkaardig onderzoek op verschillende soorten (waaronder haring, schol, makreel, kabeljauw en bot) eveneens positieve correlaties tussen de eDNA-concentraties en de door traditionele benthische *trawl* gedocumenteerde biomassa. De resultaten van dit onderzoek wijzen er wel op dat eDNA-concentraties niet rechtstreeks vergelijkbaar zijn met resultaten van bestaande methoden, wellicht omdat de concentraties van aquatisch eDNA niet door dezelfde combinaties van factoren worden beheerst als bijvoorbeeld de vangst van biomassa met sleepnetten. Daarom beperkt Knudsen et al. (2019) er zich toe om te stellen dat eDNA in de toekomst een nuttige aanvulling kan vormen voor de monitoring van visbestanden. Maes et al. (2023) toont echter aan dat eDNA-concentraties van zowel tong als schol afkomstig uit de Noordzee positief correleren met de vastgestelde abundantie en biomassa via de boomkormethode. Deze resultaten illustreren het potentieel van eDNA voor het schatten van parameters voor de abundantie en biomassa voor bestandsevaluaties van platvissen in de Noordzee.

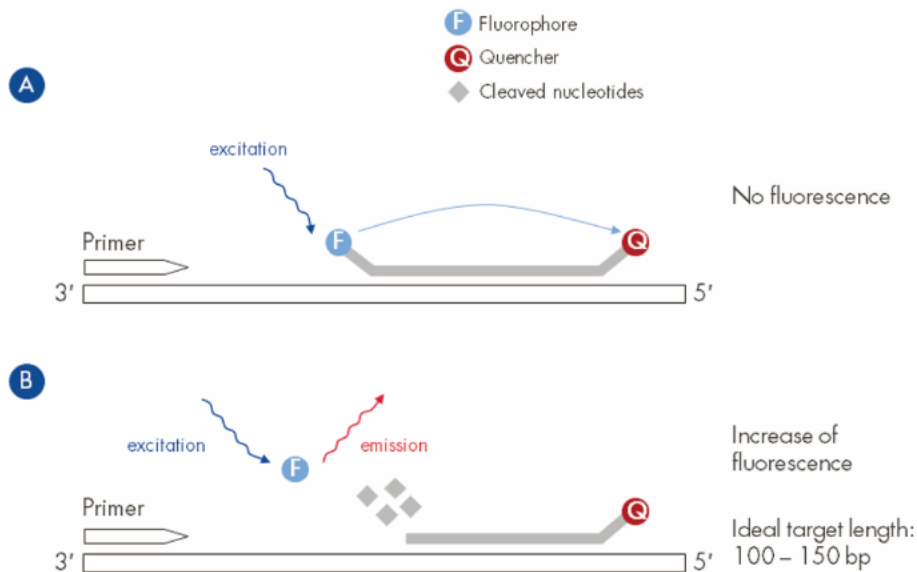
3.2 Moleculaire detectiemethoden

Er zijn twee meest gebruikelijke benaderingen voor het detecteren van eDNA in waterstalen. De eerste is gebaseerd op de detectie van één soort door het kwantificeren via de polymerasekettingreactie (PCR) met soort-specifieke primers en probes. De tweede is gebaseerd op multi-soorten detectie door *Next-Generation Sequencing* (NGS) na PCR-amplificatie van eDNA met behulp van universele primers die gericht zijn op korte mitochondriale DNA-barcodeerregio's (eDNA metabarcoding) (Knudsen et al., 2019). Deze bachelorproef is gericht op het kwantificeren van soort-specifiek eDNA door PCR met behulp van primers en probes.

3.2.1 De *polymerase chain reaction* (PCR)

PCR is een *in vitro* techniek waarmee DNA wordt geamplificeerd. De specificiteit berust op sequentiehybridisatie en de gevoeligheid op enzymatische amplificatie. PCR bestaat uit een reeks temperatuurcycli die 20 tot 40 keer worden herhaald. Elke cyclus omvat in de eerste plaats denaturatie van DNA-duplexen, gevolgd door de hybridisatie van twee korte DNA-oligonucleotiden ofwel primers, die de doelsequentie flankeren, en ten slotte de elongatie van die primers door een DNA-polymerase. Elke cyclus resulteert in een verdubbeling van het aantal DNA-doelmoleculen. Deze exponentiële amplificatie kan in theorie na n cycli 2^n kopieën produceren. In de praktijk verzadigt het amplificatieproces en bereikt het een plateau wanneer de PCR-reagentia uitgeput raken en/of de geaccumuleerde PCR-producten aan *self-annealing* doen, waardoor verdere amplificatie onmogelijk wordt (Quan et al., 2018).

Hydrolyseprobes, ook bekend als TaqMan-probes, zijn sequentiespecifieke oligonucleotiden waaraan een fluorofoor en een quenchedeelte zijn gekoppeld (Figuur 3.1). De fluorofoor bevindt zich aan het 5'-uiteinde van de probe, en het quenchedeelte bevindt zich gewoonlijk aan het 3'-uiteinde of inwendig. Tijdens de elongatiefase van PCR wordt de probe gesplitst door de 5'→3' exonuclease-activiteit van Taq DNA-polymerase, waardoor de fluorofoor van het quenchedeelte wordt gescheiden. Dit resulteert in een detecteerbare fluorescentie die evenredig is met de hoeveelheid geaccumuleerd PCR-product (Qiagen, 2020).



Figuur 3.1: Principe van hydrolyseprobe-detectie

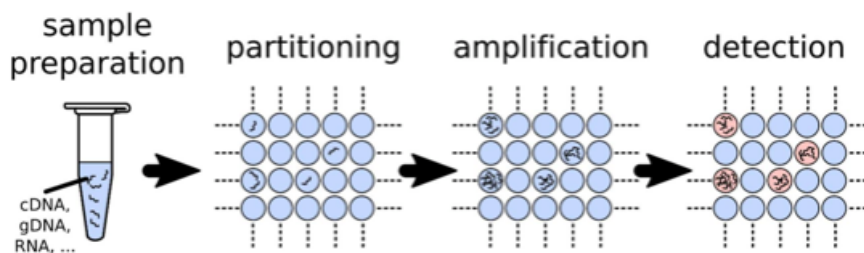
– Zowel de hydrolyseprobe als de PCR-primers hechten aan de doelsequentie tijdens de PCR-annealing/elongatiestap. De nabijheid van de fluorofoor met de quencher voorkomt dat de fluorofoor fluoresceert. Tijdens de PCR-extensiestap verlengt Taq DNA-polymerase de primer. Wanneer het enzym de TaqMan probe bereikt, splitst zijn 5'→3' exonuclease-activiteit de fluorofoor van de probe. Het fluorescentiesignaal van de vrije fluorofoor wordt gemeten. Dit signaal is evenredig met de hoeveelheid geaccumuleerd PCR-product (Qiagen, 2020).

3.2.2 Quantitative (qPCR) versus digital PCR (dPCR)

Real-time PCR (RT-PCR) is gebaseerd op PCR en meet de hoeveelheid PCR-product na elke amplificatieronde met behulp van een fluorescent signaal afkomstig van de op de sequentie gebonden probes. De RT-PCR amplificatieplot toont een sigmoïdaal gevormde curve en bestaat uit een basislijnfase, gevolgd door een exponentiële fase die vervolgens via een lineaire fase een plateau bereikt. De exponentiële fase vertegenwoordigt de meest efficiënte fase van de amplificatie en de hoeveelheid PCR-producten verdubbelt bij elke cyclus als de amplificatie-efficiëntie maximaal is. De methode is kwantitatief (qPCR) wanneer een kalibratie met een standaardcurve gebeurt op basis van de gegevens van de exponentiële fase. De absolute hoeveelheid doelsequentie wordt bij qPCR gemeten ten opzichte van een standaardcurve die is gegenereerd is uit een staal met een bekende hoeveelheid of een bekend aantal kopieën. Deze methode houdt in dat de amplificatie-efficiëntie van het monster en de standaard gelijkwaardig moeten zijn (Quan et al., 2018).

Een tweede mogelijkheid voor de kwantificering van het aanwezige (e)DNA is *digital* PCR (dPCR). Bij dPCR wordt het staal willekeurig verdeeld in PCR-subreacties zodat elke partitie enkele of geen doelsequenties bevat (Figuur 3.2). Na de PCR wordt voor de amplificatie-positieve partities de concentratie van de doelsequentie statistisch benaderd met de Poisson-statistiek. Het belangrijkste verschil tussen dPCR en qPCR ligt in hun strategie om de hoeveelheid doelsequentie te meten. Bij qPCR wordt de reactie gedurende het hele amplificatieproces gevolgd en is de kwantificering gebaseerd op de analyse van het fluorescentiesignaal in de exponentiële fase. dPCR daarentegen verzamelt fluorescentiesignalen via eindpuntmeting en gebruikt de verhouding positieve partities over het

totaal om de doelconcentratie terug te rekenen. In tegenstelling tot qPCR is dPCR niet afhankelijk van kalibratie via een standaardcurve voor de kwantificering. Hierdoor worden valkuilen in verband met variaties in reactie-efficiëntie vermeden. Kortom is dPCR een methode voor absolute nucleïnezuur-kwantificatie die berust op de detectie van fluorescentiesignalen op het eindpunt en de telling van aan- of afwezigheid van fluorescentie in een partitie. Deze statistische basis maakt het mogelijk de parameters te identificeren die de prestatiekenmerken van deze analysemethode beperken. dPCR is theoretisch voordeliger dan qPCR gezien de efficiëntie van de staalverdeling en amplificatie van de doelsequentie. In de praktijk kan qPCR dPCR voor specifieke toepassingen nog steeds overtreffen dankzij een hogere gevoeligheid, een lagere arbeidsintensiteit en een lagere kans op contaminatie door omgeving (Morley, 2014; Qiagen, 2020; Quan et al., 2018).

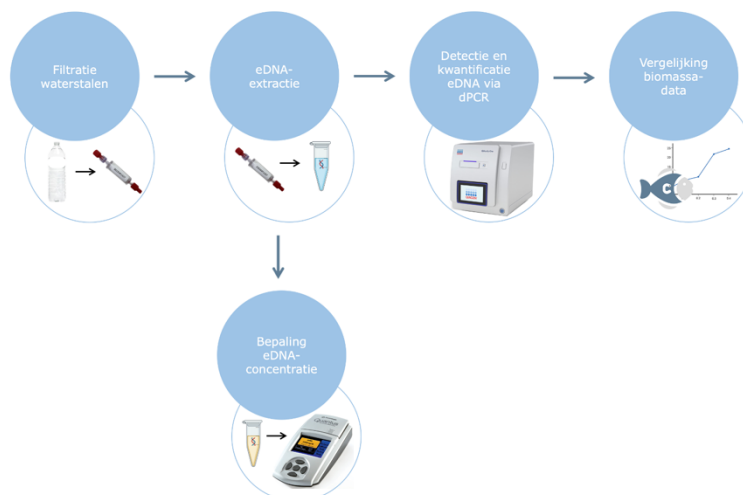


Figuur 3.2: Principe van digital PCR

– Verdeling van het staal in vele willekeurige partities die elk weinig of geen doelsequenties bevatten. Dit kan worden benaderd met een Poisson-verdeling. Elke partitie fungeert als een individuele PCR-microreactie en partities met geamplificeerde doelsequenties worden gedetecteerd via uitzending van fluorescent licht afkomstig van de op de sequentie gebonden probes. De verhouding van positieve partities tot het totale aantal maakt het mogelijk de concentratie van de doelsequentie in het staal te bepalen (Quan et al., 2018).

3.3 Workflow voor analyse van waterstalen

Het waterstaal wordt gefilterd met behulp van een peristaltisch *Masterflex-L/S*® pompsysteem. Aan deze pomp wordt een Sterivex™-HV (Millipore®) filter gehangen, bestaande uit een polyvinylideenfluoride (PVDF-) membraan met een poriëgrootte van 0,45 µm om het eDNA vast te houden. Dit duurzaam membraan is bestendig tegen extreme temperaturen, UV-straling en chemicaliën. Hierdoor vergroot het toepassingsgebied van de filter omdat het eDNA niet wordt aangetast. Na het filteren wordt de hoeveelheid filtraat genoteerd, wordt de filter afgesloten met steriele *luer locks* om contaminatie te verhinderen en bewaard bij een temperatuur van -21 °C. Nadien kan het eDNA worden geëxtraheerd uit de filter tot een werkbaar eDNA-staal. Dit gebeurt met de Qiagen® *DNeasy® Blood & Tissue Kit*. Hoewel eDNA niet rechtstreeks van bloed noch weefsel afkomstig is, wordt deze kit, na optimalisatie en aangepaste volumes gebruikt omdat deze gunstige resultaten vertoont. De extractie wordt gezien als een tijdrovende maar belangrijke stap. Het doel is zo goed als mogelijk alle eDNA te extraheren, om later in het proces een representatief beeld te krijgen van de concentratie eDNA in het water(staal). Alvorens de concentratie van het eDNA-extract wordt gekwantificeerd via dPCR, wordt een schatting van de totale DNA-concentratie gemaakt met behulp van de Quantus™ Fluorometer (Promega®). Aan de hand van een éénpuntskalibratie met een gekende standaard van 200 ng/µL kan de hoeveelheid DNA in het staal worden ingeschat. Aangezien dit een kwantificering is van al het aanwezige (e)DNA, zijn verdere analysestappen vereist. De uiteindelijke kwantificatie van het eDNA van tong wordt bepaald via dPCR. Bij deze uiterst gevoelige methode wordt de PCR-reactie willekeurig verdeeld over de beschikbare partities. Na PCR wordt het doeldNA gedetecteerd via de uitzending van fluorescent licht door fluoroforen, gebonden aan de probes. Door de willekeurige verdeling over de partities wordt de Poisson-statistiek gehanteerd om de uiteindelijke concentratie doeldNA in het staal weer te geven. Dit maakt het gebruik van standaardcurves overbodig. Tot slot worden de verkregen concentraties vergeleken met de biomassadata van dezelfde gebieden als de herkomst van de waterstalen, om te besluiten of deze methode een efficiënt alternatief kan worden. Deze databestanden worden verzameld en geëxtraheerd in een datamanagement softwareprogramma, genaamd SmartFish. Een workflow van de analyse van de waterstalen is te vinden in Figuur 3.3.



Figuur 3.3: **Workflow analyse waterstalen**

4 Materialen en methode

In dit onderzoek wordt er nagegaan of het kwantificeren van tong eDNA een alternatieve manier van detectie en biomassabepaling kan zijn om op een betrouwbare, non-invasieve manier data te verzamelen nodig voor het beheer van de tongbestanden. Hiervoor wordt er gebruik gemaakt van een DNA-gebaseerde detectiemethode, namelijk *digital* PCR (dPCR). Allereerst worden de *limit of detection* (LOD) en *limit of quantification* (LOQ) voor het gebruikte *assay* bepaald. Nadien wordt het eDNA van tong in de stalen gekwantificeerd. De waterstalen genomen in de Noordzee worden gefilterd, om nadien het eDNA uit het staal te extraheren. Dit extract wordt eerst gekwantificeerd via de Quantus™ Fluorometer (Promega®) om nadien te worden geamplificeerd en gekwantificeerd met de dPCR. In dit hoofdstuk worden deze methoden stap voor stap uitgewerkt.

4.1 Bepaling LOD en LOQ van *assay*

Op basis van een verdunningsreeks van een positief staal voor tong, zal voor dit *assay* de *limit of detection* (LOD) en de *limit of quantification* (LOQ) van de dPCR worden bepaald. De LOD wordt gedefinieerd als de laagste concentratie die in alle replicaten aantoonbaar is (Klymus et al., 2019). De LOQ is de laagste concentratie waarbij de variantiecoëfficiënt (CV), gedefinieerd als de verhouding tussen de standaarddeviatie (SD) en het gemiddelde, lager is dan 0,35 (Klymus et al., 2019). Deze limieten zijn nodig om de dPCR-resultaten betrouwbaar te kunnen interpreteren.

4.1.1 Stalen

Voor de bepaling van de LOD en de LOQ van het gebruikte *assay* worden eDNA-stalen gebruikt met een hoge concentratie aan tong. Deze geëxtraheerde waterstalen zijn afkomstig van een eerder gevoerd experiment genaamd *Shedding Sole*. Hierbij werden tonnen van 40 L water gevuld met een variërend aantal tong en werd het staal genomen op verschillende tijdstippen. De stalen voor deze bepaling zijn genomen van tonnen waarin 5 of 9 vissen zaten en na een periode van 1 of 24 uur.

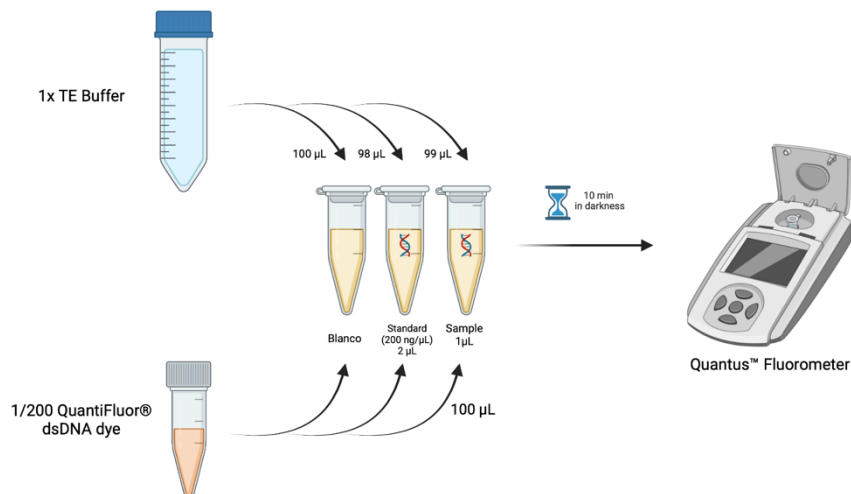
4.1.2 Concentratiebepaling eDNA met Quantus™ Fluorometer

Om te weten welk staal de hoogste eDNA-concentratie heeft wordt een concentratiebepaling uitgevoerd met de Quantus™ Fluorometer (Promega®) met het QuantiFLuor® *double stranded DNA (dsDNA) dye* (Promega®) systeem, volgens de instructies in de gebruiksaanwijzing. Het QuantiFLuor® dsDNA dye systeem bevat een fluorescerende DNA-bindende kleurstof die gevoelige en specifieke kwantificatie van kleine hoeveelheden dsDNA mogelijk maakt. Het staal met de hoogste gemeten concentratie zal worden gebruikt in de verdere kwantificering.

Principe

De Quantus™ Fluorometer is een *dual-channel* fluorometer voor het kwantificeren van nucleïnezuren en eiwitten. Het principe is gebaseerd op fluorometrische analyse. Het staal/fluorofoorcomplex wordt door een lichtbron met een gespecificeerde excitatiegolflengte verlicht. De fluorofoor zendt licht uit over een karakteristiek spectrum en de hoeveelheid

uitgezonden licht is evenredig met de hoeveelheid analyt in het monster. De kwantificering is gebaseerd op een éénpuntskalibratie met een standaard met een gekende concentratie van 200 ng/μL (Figuur 4.1) (Promega, 2022). Het doel is om een ruime schatting van de totale hoeveelheid eDNA in het staal te maken. Aangezien hier al het aanwezige eDNA wordt gemeten, is een specifiekere kwantificatie nodig.



Figuur 4.1: Concentratiebepaling eDNA met Quantus™ Fluorometer (Promega®)
 – Workflow met exacte concentraties, volumes en incubatietijd; gemaakt met BioRender.

Benodigheden en protocol

Zie Bijlage 1: Quantus™ Fluorometer concentratiebepaling eDNA.

4.1.3 Kwantificatie met dPCR

Het staal met de hoogste gemeten eDNA-concentratie wordt via dPCR geanalyseerd. Dit staal wordt in een verdunningsreeks per tien replicaten geladen op de dPCR-plaat. dPCR is een methode voor absolute nucleïnezuurkwantificatie die berust op de detectie van fluorescentiesignalen op het eindpunt en de telling van aan- of afwezigheid van fluorescentie in een partitie, zonder behoefte aan een standaardcurve.

Principe

eDNA-concentraties worden gekwantificeerd met de *QIAcuity One Digital PCR-systeem* (Qiagen®) met de *QIAcuity Nanoplate 26k 24-well* (Qiagen®). Bij dPCR wordt het staal willekeurig verdeeld over ongeveer 26 000 subreacties zodat elke partitie enkele of geen doelsequenties bevat. Na partitionering worden alle gevulde partities onderworpen aan PCR. Iedere partitie bevat dezelfde primers en probes en zal een fluorescerend signaal genereren, afkomstig van de op de sequentie gebonden probe, als reactie op de aanwezigheid van de doelsequentie. Een positieve partitie vertoont een verhoogde fluorescentie-intensiteit, een negatieve partitie toont echter enkel een achtergrondsignaal. Dankzij zijn willekeurigheid kan de verdeling worden benaderd met de Poisson-statistiek. De verhouding positieve partities op het totale aantal partities maakt het mogelijk de concentratie van de doelsequentie in het staal te bepalen (Qiagen, 2021; Quan et al., 2018).

Elke dPCR-reactie wordt bereid in een eindvolume van 40 µL bestaande uit 5 µL template DNA, 10 µL 4x Probe PCR Master Mix, 750 nM doelspecifieke *forward* (F) en *reverse* (R) primer, 375 nM doelprobe, 750 nM *internal positive control* (IPC-) primer en 375 nM IPC-probe, aangevuld tot het eindvolume met RNase-vrij water. Volgende amplificatiecondities worden gehanteerd: activatie bij 95 °C, gevolgd door 40 cycli van denaturatie bij 95 °C en elongatie bij 56 °C. De gebruikte primers voor de soortspecifieke detectie van *Solea solea* zijn gericht tegen het Cytochroom c (COI) gen in het mitochondriaal DNA (Tabel 4.1). Wanneer deze sequentie wordt gedetecteerd zal door het aanwezige 6-carboxylfluoresceïne (FAM-) fluorofoor een fluorescent signaal optreden. Daarnaast wordt ook de IPC gedetecteerd met primer-probe set gericht tegen een plasmide *insert* sequentie van Dengue virus type 2 (GenBank M29095.1) met een hexachlorofluoresceïne (HEX-) fluorofoor (Figuur 3.1) (Maes et al., 2023). Het doelfluorescentiesignaal van deze vrije fluoroforen wordt gemeten met de *QIAcuity Software Suite* (Qiagen®) en is evenredig met de hoeveelheid PCR-product (Qiagen, 2021). Elke plaat bevat een negatieve controle.

Tabel 4.1: Soortspecifieke primers en probes voor tong (*Solea solea*) en IPC
 – Forward primer (F), reverse primer (R), probe (P) sequenties, target gen en fragmentgrootte in baseparen (bp) worden gegeven. De tong primer-probe set is ontworpen door Maes et al., 2023. Een plasmide insert sequentie van Dengue virus type 2 (GenBank M29095.1) werd gebruikt als interne positieve controle.

Target	Primers (F, R), probe (P)	Sequentie (5' → 3')	Target gen	Fragment-grootte (bp)
<i>Solea solea</i>	Ss-COI-F	CCCCTGCTTTCCTGCTACTT	COI	100
	Ss-COI-R	GCATGGGCGAGGTTACTTGA		
	Ss-COI-P	FAM-ACCTCATCCGTTGTTGAAGC-BHQ1		
IPC	IPC-D2-F	ATGACAGCCACTCCTCCG	Plasmide	149
	IPC-D2-R	GGAACGAACCAAACAGTCTTC		
	IPC-D2-P	HEX-AGCAGAGACCCATTCCCTCAGAGC-BHQ1		

Benodigdheden en protocol

Zie Bijlage 2: eDNA-kwantificatie met *QIAcuity One Digital* PCR (Qiagen®).

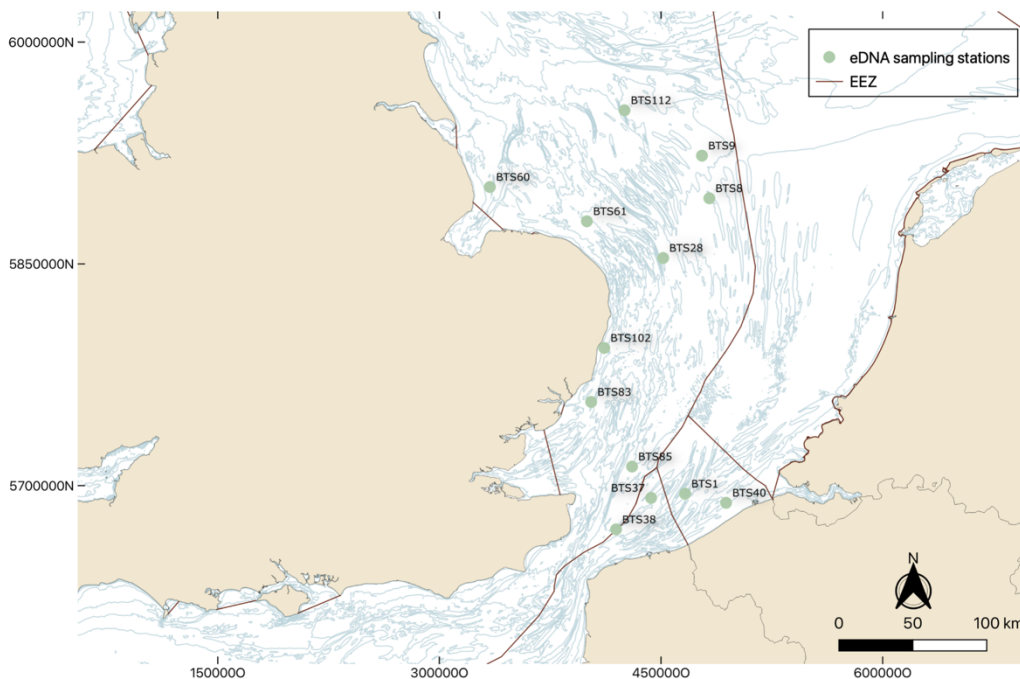
Wijzigingen of aanvullingen aan het protocol

- De mastermix en strips werden gedurende het hele proces op ijs bewaard.
- Bij het verdelen van de mastermix werd telkens een nieuwe tip gebruikt.
- Bij het laden van de plaat werd de 40 µL niet tot de tweede positie van de pipet gepipetteerd.
- Bij deze kwantificatie is het analyseren van de IPC niet nodig. Door de hoge verdunningsfactor wordt de IPC mee verdund en zal deze dus niet meer detecteerbaar zijn.

4.2 Kwantificatie van tong eDNA met dPCR

4.2.1 Staalname

Waterstalen zijn genomen van eind-augustus tot begin-september 2022 tijdens de *Beam Trawl Survey* (BTS) in dertien stations in het Belgische, Franse en centrale deel van de Noordzee (Figuur 4.2, Bijlage 3). In elk station werden vijf biologische replicaten genomen. Waterstalen worden genomen met een carrousel die automatisch Niskin™ flessen vult en sluit. Dit water wordt vervolgens verzameld in steriele drinkwaterflessen, getransporteerd naar het labo en bewaard bij -21 °C tot verdere analyse. Als negatieve controle werden vijf *field* controles genomen op vijf willekeurige momenten tijdens de campagne. Als negatieve controle wordt de inhoud van een steriele waterfles in de Niskin™ flessen gegoten waarna dit water terug wordt opgevangen in dezelfde waterfles. Op deze manier wordt contaminatie in de Niskin™ flessen gecontroleerd.



Figuur 4.2: Kaart BTS2022 eDNA sampling stations

– eDNA sampling stations en de Exclusieve Economische Zones (EEZ) weergegeven; gemaakt met QGIS.

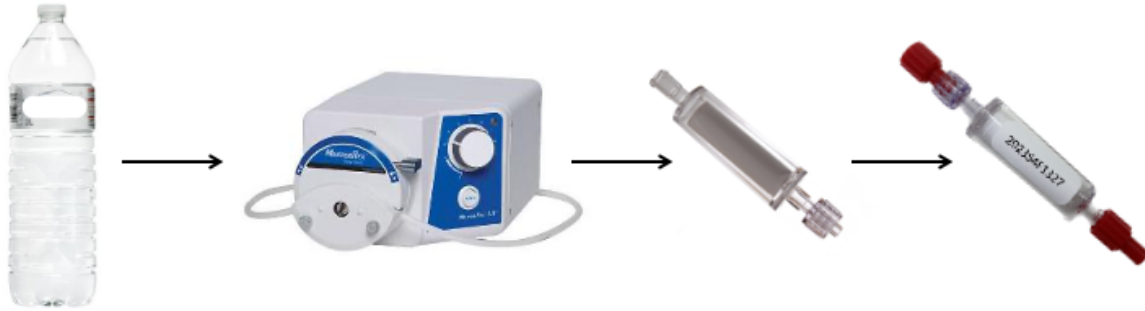
4.2.2 Filtratie

Voorafgaand aan de filtratie moeten de waterflessen overnacht ontdooien, afgeschermd van de zon. UV-straling heeft namelijk een degeneratieve werking op DNA.

Principe

De waterstalen worden gefilterd met behulp van een peristaltisch Masterflex-L/S® pompsysteem (Masterflex®) met Sterivex™-HV filter (Millipore®), bestaande uit een PVDF-membraan met een poriegrootte van 0,45 µm. Na het filteren wordt de hoeveelheid filtraat genoteerd om later de verdunning in rekening te kunnen brengen. De filter wordt afgesloten

met steriele *luer locks* om contaminatie te verhinderen en nadien bewaard bij een temperatuur van -21 °C tot aan de eDNA-extractie (Figuur 4.3).



Figuur 4.3: **Waterfiltratie met Masterflex-L/S pomp (Masterflex®)**

– Met als resultaat een met eDNA verzadigd Sterivex™-HV filter (Millipore®) met luer locks en filtercode.

Benodigheden en protocol

Zie Bijlage 4: Filtratie waterstalen protocol.

Wijzigingen of aanvullingen aan het protocol

- Gefilterd bleekwater gaat terug in de bleekwaterfles.
- Houd de slang altijd onder water om luchttonderbreking te vermijden.
- Tijdens het filteren kan de filtercode al op de filter worden gekleefd, om tijd te besparen.
- Zet de pomp altijd uit vooraleer de slangen uit te flessen worden verwijderd.

4.2.3 eDNA-extractie

De extractie gebeurt wegens praktische redenen telkens in *batches* van maximum 24 stalen. Tijdens het gehele extractieproces wordt één negatieve extractiecontrole meegenomen. Dit is een steriele lege Sterivex™-HV filter die alle stappen van het protocol ondergaat.

Principe

Het eDNA gebonden op het filtermembraan wordt geëxtraheerd met behulp van de *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Qiagen®), met een aangepast protocol specifiek voor eDNA. De kit maakt gebruik van de spinkolom methode om het eDNA uit het staal te extraheren. De stalen worden gelyseerd met een lysebuffer bestaande uit 718 µL *Animal Tissue Lysis* (ATL-) buffer, 80 µL Proteïnase K en 2 µL exogeen *internal positive control* (IPC). De natriumdodecylsulfaat (SDS) bevattende ATL-buffer verstoort het cel- en kernmembraan om het DNA vrij te stellen aan de omgeving. Proteïnase K degenereert eiwitten die kunnen interfereren met de extractie, en breekt nucleasen af die nucleïnezuren kunnen aantasten (Qiagen, 2020). De IPC bestaat uit een 149 bp plasmide *insert* van het Dengue-virus type 2 (GenBank M29095.1) met een concentratie van 30 000 kopieën/µL (c/µL) en wordt toegevoegd om de extractie-efficiëntie in rekening te brengen en PCR-inhibitie af te leiden. De hoeveelheid overgebleven IPC, gemeten via dPCR, wordt in rekening gebracht en fungeert als corrigerende factor bij het berekenen van de uiteindelijke eDNA-concentratie in het staal (Maes et al., 2023). Na overnacht incuberen bij 56 °C wordt het lysaat met *Animal Lysis* (AL-) buffer en ijskoude ethanol in gelijke verhouding,

op de spinkolom gebracht. Tijdens het centrifugeren wordt het eDNA selectief gebonden aan het silica-membraan, terwijl verontreinigingen elueren. Resterende contaminanten worden verwijderd in de twee volgende wasstappen. Ten slotte wordt het eDNA geëluëerd in 100 µL 1x Tris-EDTA (TE-) buffer (pH 8) verwarmd bij 70 °C en gedurende 10 minuten geïncubeerd (Figuur 4.4) (Qiagen, 2020).



Figuur 4.4: eDNA-extractie

– Van staal in Sterivex™-HV-filter tot gebruiksklaar eDNA (Qiagen, 2020).

Benodigdheden en protocol

Zie Bijlage 5: eDNA-extractie van Sterivex filters zonder bewaarbuffer.

4.2.4 Concentratiebepaling eDNA met Quantus™ Fluorometer

De concentratie van het geëxtraheerde eDNA wordt bepaald met de Quantus™ Fluorometer (Promega®) met het QuantiFLuor® dsDNA dye (Promega®) systeem, volgens de instructies in de gebruiksaanwijzing.

Benodigdheden en protocol

Zie 4.1.2 voor de benodigdheden en het protocol.

4.2.5 Kwantificatie met dPCR

eDNA-concentraties van de geëxtraheerde zeewaterstalen worden gekwantificeerd met de QIAcuity One Digital PCR-systeem (Qiagen®) met de QIAcuity Nanoplate 26k 24-well (Qiagen®).

Benodigdheden en protocol

Zie 4.1.3 voor de benodigdheden en het protocol.

Wijzigingen of aanvullingen aan het protocol

- De mastermix en strips werden gedurende het hele proces op ijs bewaard.
- Bij het verdelen van de mastermix werd telkens een nieuwe tip gebruikt.
- Bij het laden van de plaat werd de 40 µL niet tot de tweede positie van de pipet gepipetteerd.

4.3 Data-analyse

De totale effectieve concentratie (C_e) (eDNA-kopieën per liter gefilterd water) werd berekend voor elk staal met een formule die alle verdunningsstappen alsook de IPC-correctie in rekening brengt (Formule 1).

$$C_e = \frac{\left(\frac{C_{dPCR(tong)} * V_r}{V_p} \right) * VF * V_e * FF}{V_w} * \left(\frac{C_{IPCtoegevoegd}}{C_{dPCR(IPC)}} \right) \quad (1)$$

Het product van het aantal kopieën tong per μL per staal gemeten op de dPCR ($C_{dPCR(tong)}$) met het totale volume van de dPCR-reactie (V_r) wordt gedeeld door het volume DNA geladen op de dPCR-plaat (V_p) en vervolgens vermenigvuldigd met de eventuele verdunningsfactor (VF) van het staal, het totale volume eluaat na extractie (V_e) en de filterfractie (FF) gebruikt tijdens de extractie. Deze laatste factor is in dit *assay* steeds 1. Het quotiënt van dit getal en het totale volume gefilterd water in liter (V_w), wordt vermenigvuldigd met de IPC-correctiefactor. Deze correctiefactor is de verhouding van de initiële concentratie IPC ($C_{IPCtoegevoegd}$) op de verkregen concentratie ($c/\mu\text{L}$) IPC per dPCR-reactie ($C_{dPCR(IPC)}$) en dient om de extractie-efficiëntie en PCR-inhibitie in rekening te brengen (Maes et al., 2023). De $C_{IPCtoegevoegd}$ wordt berekend door de hoeveelheid toegevoegd IPC, met een concentratie van 30 000 $c/\mu\text{L}$, in rekening te brengen met dezelfde volumes en verdunningsfactoren als het staal. Indien een staal onverdund wordt gelopen wordt bijgevolg een IPC-concentratie van 75 $c/\mu\text{L}$ verwacht.

5 Resultaten en discussie

De resultaten van de bachelorproef worden hier weergegeven en omvatten de eDNA-concentraties bepaald door zowel de Quantus™ Fluorometer (Promega®) als de *QIAcuity One Digital PCR-systeem* (Qiagen®). De resultaten van de dPCR worden bij de data-analyse kritisch benaderd met de bekomen LOD en LOQ. De uiteindelijke eDNA-concentratie van tong in de stalen, gemeten via dPCR, wordt berekend via een formule die alle verdunningsstappen, alsook de IPC-correctie, in rekening brengt. Deze concentraties worden in verband gebracht met zowel de biomassa (kg) als het aantal tong. Deze data is eveneens afkomstig van de BTS2022-campagne.

5.1 Bepaling LOD en LOQ van assay

5.1.1 Concentratiebepaling eDNA

De concentraties van de drie stalen die werden gemeten voor de bepaling van de LOD en LOQ van tong op de dPCR, liggen over het algemeen lager dan verwacht. Dit is mogelijk te verklaren door de toegenomen hoeveelheid gedegenererd DNA in de loop der tijd. Ingevroren DNA kan tot 24 maanden stabiel blijven, indien het geen ontdooicycli ondergaat (Wu et al., 2009). Staal S9_T3_1 bevat de hoogste eDNA-concentratie van 18 ng/μL. Dit staal werd genomen in een ton waarin negen vissen gedurende 24 uur hebben gezwommen als onderdeel van een gecontroleerd experiment. Dit resultaat ligt zoals verwacht hoger dan de concentraties van de stalen genomen in tonnen waarin vijf vissen slechts 1 uur hebben gezwommen. Respectievelijk hebben staal S5_T2_1 en S5_T2_2 een concentratie van 9,2 ng/μL en 6,4 ng/μL. Het aantal vissen en/of de duur van de *shedding* kan hierin een rol spelen. Staal S9_T3_1 wordt in dit onderzoek verder gebruikt voor de bepaling van de LOD en LOQ voor tong op de dPCR.

5.1.2 Kwantificatie met dPCR

Staal S9_T3_1 werd in verdunningen 1/10, 1/50, 1/1000, 10/10 000, 1/70 000 en 1/100 000 per tien replicaten gekwantificeerd met dPCR (Tabel 5.1). Resultaten tonen aan dat de gemiddelde concentratie van 0,99 c/μL, bij verdunning 1/10 000, een CV vertoont van 0,24. Naar de definitie van de LOQ, zijnde de laagste concentratie waarbij de CV lager ligt dan 0,35 (Klymus et al., 2019), is dit de kwantificatielimiet van dit *assay*. De concentratie van 0,99 c/μL komt overeen met 18 positieve partities. De LOD wordt bepaald door de laagste concentratie waarbij minimum negen replicaten een meting aantonen (Klymus et al., 2019). Verdunning 1/10 000 is de laagste concentratie waarbij minimum negen replicaten tong detecteren. Dit maakt de concentratie van 0,99 c/μL, overeenkomstig met 18 positieve partities, eveneens de LOD van dit *assay*. Bijgevolg kunnen alle concentraties die onder deze grens vallen niet betrouwbaar worden gedetecteerd en zullen deze worden herleid tot 0 c/μL.

Tabel 5.1: **Bepaling LOD en LOQ voor tong op de dPCR**

– Staal S9_T3_1 per verdunning in tienvoud: de concentraties (c/μL) en aantal positieve partities van tong worden weergegeven, met daaronder de berekening van de (CV) op basis van de verhouding SD op het gemiddelde. In rood: geen tong gedetecteerd.

Verdunnings-factor S9_T3_1	10		50		1000		10 000		70 000		100 000	
	Concentratie (c/μL) S. solea via dPCR	#positieve partities S. solea	Concentratie (c/μL) S. solea via dPCR	#positieve partities S. solea	Concentratie (c/μL) S. solea via dPCR	#positieve partities S. solea	Concentratie (c/μL) S. solea via dPCR	#positieve partities S. solea	Concentratie (c/μL) S. solea via dPCR	#positieve partities S. solea	Concentratie (c/μL) S. solea via dPCR	#positieve partities S. solea
	1638,1	16517	273,6	4600	10,1	193	1,2	23	0,000	0	0,159	3
	1480,8	15981	269,7	4482	8,3	159	0,9	16	0,106	2	0,107	2
	1268,5	15142	264,0	4218	10,4	197	0,7	12	0,108	2	0,055	1
	1454,8	16583	262,6	4373	10,4	192	0,8	15	0,269	5	0,000	0
	1601,2	17520	236,8	3617	9,3	175	0,9	17	0,000	0	0,000	0
	1331,5	15636	298,4	4875	10,6	198	1,1	20	0,111	2	0,217	4
	1514,4	16965	249,1	4101	7,9	147	1,3	23	0,222	4	0,000	0
	2239,0	9401	285,0	4675	9,6	179	1,0	18	0,164	3	0,000	0
	1495,6	14218	317,4	4993	8,2	155	1,3	24	0,054	1	0,162	3
	1331,4	15703	256,0	4204	8,1	153	0,7	13	0,000	0	0,107	2
Gemiddelde	1535,53	15366,60	271,26	4413,80	9,30	174,80	0,99	18,10	0,10	1,90	0,08	1,50
SD	274,04	2297,74	23,81	404,49	1,08	19,90	0,23	4,28	0,09	1,73	0,08	1,51
CV (stdev/gem)	0,18	0,15	0,09	0,09	0,12	0,11	0,24	0,24	0,91	0,91	1,01	1,01

Verdunning 1/70 000 toont echter slechts zeven positieve replicaten met een gemiddelde concentratie van 0,10 c/μL. Dit betekent dat er mogelijks nog een concentratie tussen 0,10 c/μL en 0,99 c/μL detecteerbaar en/of kwantificeerbaar is.

5.2 Kwantificatie van tong eDNA met dPCR

5.2.1 Concentratiebepaling eDNA

De eDNA-concentraties in de stalen (Bijlage 6, Tabel B1a) wijzen op een geslaagde eDNA-extractie van de waterstalen. Bij elk staal wordt een eDNA-concentratie gemeten die binnen een *range* ligt van 5,7-94 ng/μL. Desondanks is er bij de biologische replicaten per *sampling station* een relatief grote variatie te zien tussen de concentraties. Deze variatie kan mogelijks worden verklaard door het uitvoeren van metingen op verschillende momenten. Per *batch* wordt een nieuwe gekende standaard en een QuantiFluor® *dsDNA dye* werkoplossing aangemaakt. Variaties tussen deze concentraties kunnen bijgevolg te wijten zijn aan pipetteerfouten. Deze raming van de hoeveelheid eDNA kan eveneens een onderschatting zijn van de effectieve concentratie. Door degeneratie van het eDNA in het staal wordt niet al het eDNA gedetecteerd tijdens de meting. Dit kan mogelijks worden veroorzaakt door endo- en exonucleasen, UV-straling en aanwezige interfererende proteïnen (Dejean et al., 2011; USGS, 2018). Daarnaast werden ook de negatieve controles meegenomen in de Quantus™ Fluorometer (Promega®) concentratiebepaling (Bijlage 6, Tabel B1b). Deze tonen een concentratie binnen de *range* van 0-2,88 ng/μL. Dit wijst op een lichte contaminatie van de negatieve controles, die mogelijks afkomstig is van resterend eDNA in de Niskin™ flessen.

5.2.2 Kwantificatie met dPCR

De resultaten van de kwantificatie van het eDNA met dPCR (Tabel 5.2) zijn onderhevig aan de bepaalde LOD en LOQ. Bijgevolg worden de concentraties lager dan de LOD en LOQ van 18 positieve partities als negatief beschouwd en herleid tot 0 c/μL. Nadien worden deze resultaten

meegenomen in de data-analyse om de uiteindelijk eDNA-concentratie (c/L) van tong in de waterstalen te bepalen.

Tabel 5.2: Kwantificatie tong eDNA in stalen via dPCR

– Concentratie (c/μL) en aantal positieve partities van zowel tong als IPC weergegeven.

In rood: resultaten onder LOD en LOQ die werden herleid tot 0 c/μL.

Staal	Concentratie (c/μL) <i>S. solea</i> via dPCR	#positieve partities <i>S. solea</i>	Concentratie (c/μL) IPC via dPCR	#positieve partities IPC	Staal	Concentratie (c/μL) <i>S. solea</i> via dPCR	#positieve partities <i>S. solea</i>	Concentratie (c/μL) IPC via dPCR	#positieve partities IPC
BTS1_1	0,000	0	2,967	57	BTS60_1	0,000	0	3,302	61
BTS1_2	0,000	0	0,528	10	BTS60_2	0,000	0	0,266	5
BTS1_3	0,000	0	1,447	27	BTS60_3	0,000	0	1,008	19
BTS1_4	0,000	0	0,588	11	BTS60_4	0,000	0	0,329	6
BTS1_5	0,000	0	6,863	128	BTS60_5	0,948	18	0,895	17
BTS8_1	0,000	0	0,853	16	BTS61_1	0,000	0	2,171	40
BTS8_2	0,000	0	3,571	67	BTS61_2	0,000	0	2,170	41
BTS8_3	0,000	0	6,442	122	BTS61_3	0,000	0	0,376	7
BTS8_4	0,000	0	4,390	84	BTS61_4	0,000	0	1,410	26
BTS8_5	0,000	0	9,793	181	BTS61_5	0,000	0	1,026	19
BTS9_1	0,000	0	4,526	88	BTS83_1	0,000	0	1,086	20
BTS9_2	1,041	19	3,840	70	BTS83_2	0,000	0	0,388	7
BTS9_3	0,000	0	7,079	134	BTS83_3	0,000	0	0,053	1
BTS9_4	0,000	0	7,335	132	BTS83_4	0,000	0	0,330	6
BTS9_5	0,000	0	6,796	128	BTS83_5	0,000	0	16,680	306
BTS28_1	1,704	32	1,863	35	BTS85_1	0,000	0	0,938	17
BTS28_2	0,000	0	0,534	10	BTS85_2	1,999	37	0,648	12
BTS28_3	0,000	0	0,439	8	BTS85_3	0,000	0	0,651	12
BTS28_4	0,000	0	2,351	44	BTS85_4	0,000	0	0,107	2
BTS28_5	0,000	0	1,919	36	BTS85_5	0,000	0	0,821	15
BTS37_1	0,000	0	3,295	60	BTS102_1	0,000	0	0,475	9
BTS37_2	1,029	19	0,487	9	BTS102_2	0,000	0	3,795	71
BTS37_3	0,000	0	0,266	5	BTS102_3	0,000	0	3,452	63
BTS37_4	0,000	0	4,029	76	BTS102_4	0,000	0	1,516	28
BTS37_5	0,000	0	5,384	103	BTS102_5	0,000	0	2,268	41
BTS38_1	1,559	29	9,004	167	BTS112_1	0,000	0	3,999	74
BTS38_2	1,607	30	6,065	113	BTS112_2	0,000	0	4,628	86
BTS38_3	1,370	25	2,795	51	BTS112_3	0,000	0	5,607	104
BTS38_4	1,054	19	4,053	73	BTS112_4	0,000	0	4,547	87
BTS38_5	0,000	0	4,419	82	BTS112_5	0,000	0	8,279	160
BTS40_1	0,000	0	0,651	12					
BTS40_2	0,992	19	1,776	34					
BTS40_3	0,000	0	0,705	13					
BTS40_4	0,000	0	1,514	28					
BTS40_5	0,000	0	0,377	7					

Slechts 15 % van het totaal aantal stalen tonen een meting hoger dan de LOD en LOQ van 0,99 c/μL of 18 positieve partities. Dit wil zeggen dat 15 % van het totaal aantal stalen betrouwbaar kan worden gedetecteerd en gekwantificeerd op basis van de bepaalde LOD en LOQ voor dit assay. De bekomen concentraties van tong in de kwantificeerbare stalen liggen relatief laag. Een mogelijke oorzaak hiervoor kan zijn dat het doelDNA in competitie gaat met de IPC. Bij de analyse van de resultaten gegenereerd met de *QIAcuity Software Suite* (Qiagen®), wordt er steeds gekeken naar het aantal positieve partities IPC om te besluiten of een run goed is gelukt. Wanneer dit aantal te laag ligt, wordt het staal verder verdund tot een voldoende hoog aantal positieve partities kan worden gedetecteerd. Deze verdunningsstap is afkomstig van de veronderstelling dat een te hoge concentratie niet kan worden opgepikt door het toestel. Wanneer alle partities positief zullen meten kan geen berekening worden gemaakt door de *software*. Wanneer dit staal wordt verdund, zal bijgevolg de hoeveelheid doelDNA dalen. Indien de initiële concentratie tong eDNA in het staal zeer laag ligt, zal dit dus weinig partities detecteren. De eventuele verdunningsstappen worden in rekening gebracht bij de data-analyse.

Doorheen het volledige proces werden op verschillende momenten negatieve controles meegenomen om de contaminatie van de stalen na te gaan (Tabel 5.3). Bij de negatieve *field*

controles werd in één staal contaminatie van tong DNA gedetecteerd, die eveneens betrouwbaar kan worden gekwantificeerd. De afwezigheid van IPC (<10 positieve partities) bij de negatieve dPCR-controles wijst op een geslaagde negatieve controle tijdens dPCR.

Tabel 5.3: Kwantificatie tong eDNA in negatieve controlestalen via dPCR

– Concentratie (c/μL) en aantal positieve partities van zowel tong als IPC weergegeven. In rood: resultaten onder LOD en LOD die werden herleid tot 0 c/μL.

Staal	Concentratie (c/μL) <i>S. solea</i> via dPCR	#positieve partities <i>S. solea</i>	Concentratie (c/μL) IPC via dPCR	#positieve partities IPC
Negatieve <i>field</i> controles				
NEG1	1,338	25	3,748	70
NEG2	0,000	0	5,179	99
NEG 1.1 MID	0,000	0	3,895	73
NEG3	0,000	0	3,315	62
NEG_END	0,000	0	1,182	22
Negatieve filter controles				
STE1	0,000	0	4,123	76
STE2	0,000	0	6,800	123
Negatieve extractie controles				
NEG_EXT	0,000	0	6,287	119
Negatieve dPCR controles				
NEG_dPCR_1	0,000	0	0,213	4
NEG_dPCR_2	0,000	0	0,115	2
NEG_dPCR_3	0,000	0	0,000	0
NEG_dPCR_4	0,000	0	0,000	0
NEG_dPCR_5	0,000	0	0,000	0
NEG_dPCR_6	0,000	0	0,000	0
NEG_dPCR_7	0,000	0	0,000	0
NEG_dPCR_8	0,000	0	0,000	0
NEG_dPCR_9	0,000	0	0,000	0
NEG_dPCR_10	0,000	0	0,000	0
NEG_dPCR_11	0,000	0	0,000	0

In tegenstelling tot de *field*, filter en extractie controles, wordt bij de dPCR-controles geen IPC verwacht daar er geen IPC in de stalen aanwezig zou mogen zijn. Een mogelijke oorzaak van contaminatie in de *field* controles is het onvoldoende goed spoelen van de Niskin™ flessen tussen de staalnames door. Deze gedetecteerde contaminatie toont aan dat de stalen mogelijks gecontamineerd zijn.

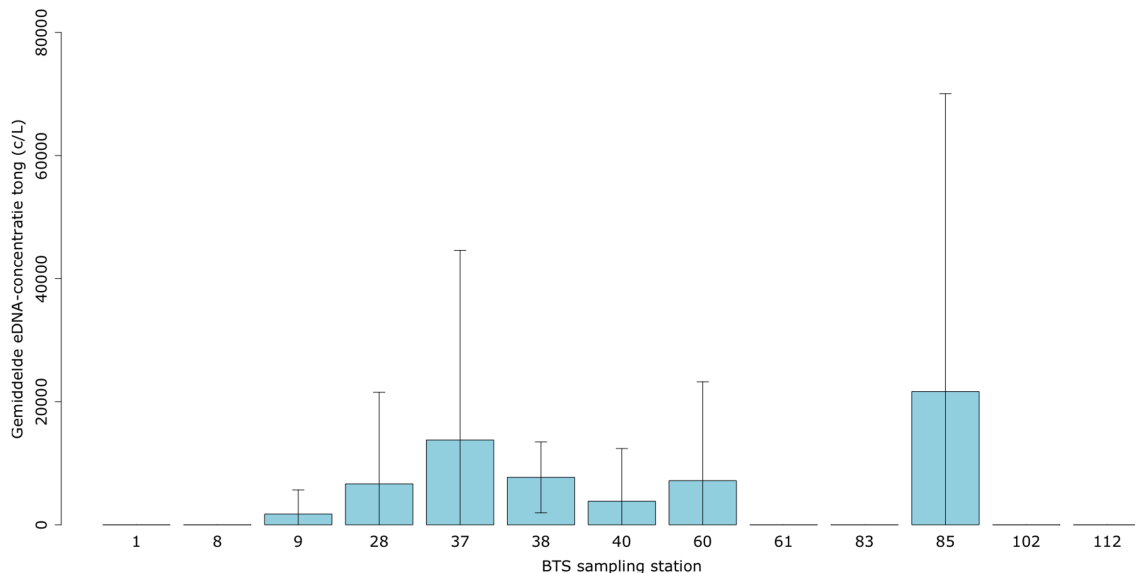
5.3 Data-analyse

De totale effectieve concentratie eDNA-kopieën per liter gefilterd water werd berekend voor elk staal met een formule die alle verdunningsstappen alsook de IPC-correctie in rekening brengt (Formule 1). Hier volgt een voorbeeldberekening waarbij de formule wordt toegepast op het resultaat van een biologisch replicaat waarvan de gemeten concentratie hoger ligt dan de bekomen LOD en LOQ. Bij staal BTS85_2 werd 1,17 L water gefilterd, 1,990 c/μL tong en 0,648 c/μL IPC gedetecteerd, bij een 1/3 verdunning van het staal. In de reactiemix van 40 μL zit 5 μL staal, afkomstig van het eluaat met een volume van 100 μL. Indien deze bekomen concentratie van 2805,61 c/L wordt vermenigvuldigd met de IPC-correctiefactor van 38,58, bevat staal BTS85_2 een concentratie van 108 241,28 c/L.

5.3.1 eDNA-concentraties in veld- en controlestalen

Het gemiddelde van de biologische replicaten per station werd genomen om de variabiliteit tussen de stations te evalueren (Figuur 5.1). Op basis van de variantie tussen de verschillende stations kan worden gekeken naar de mate van onzekerheid of willekeurige fout in de

resultaten. Stations 1, 8, 61, 83, 102 en 112 tonen een gemiddelde concentratie van 0 c/L ten gevolge van de gehanteerde detectie- en kwantificatiegrens. Stations 85 en 37 bijvoorbeeld, tonen een grote variantie omdat de concentraties van de replicaten een grote *range* hebben. Dit maakt het moeilijk om van deze stations een betrouwbaar beeld te schetsen. Station 38 met de kleinste variantie geeft bijgevolg het meest representatieve beeld weer van de werkelijke concentratie in het water.



Figuur 5.1: Gemiddelde eDNA-concentratie van tong (c/L) per BTS-station
– Gemiddelde concentratie met aanduiding van foutbalken, ter evaluatie van de variabiliteit van de resultaten; gemaakt in RStudio.

De concentraties die werden meegenomen in de data-analyse tonen een aanzienlijke variabiliteit tussen de biologische replicaten. Deze hoge variabiliteit werd eerder gerapporteerd en kan worden verklaard door de heterogene aard van eDNA die ongelijkmatig verspreid is in de omgeving (Hinlo et al., 2018). De Noordzee is een dynamisch *well-mixed* systeem waardoor eDNA niet op de plaats van afgifte blijft, maar wordt verspreid en gedegradeerd over tijd (Murakami et al., 2019). In de toekomst zou een model dat de eDNA-verspreiding simuleert van waarde kunnen zijn voor de raming van de biomassa en de abundantie op basis van eDNA (Fukaya et al., 2021).

Daarnaast zou de afgifte van eDNA onderhevig kunnen zijn aan biologische processen zoals de voortplanting (Takeuchi et al., 2019). De voortplanting van tong vindt plaats in ondiepe, maar niet per se kustwateren tijdens het voorjaarsseizoen (Delbare, z.d.; van Leeuwe, 2010). De stalen van dit onderzoek werden buiten dit paaiseizoen genomen. Indien dit onderzoek zich zou herhalen binnen het paaiseizoen en paaigebied van tong zou dit een waardevolle aanvulling kunnen betekenen over de voortplanting van tong, wat relevant is voor de visserij. Het monitoren van de eDNA-concentraties doorheen het jaar zou hieraan kunnen bijdragen. ILVO heeft dergelijk patronenonderzoek reeds op poten gezet, met behulp van project LifeWatch.

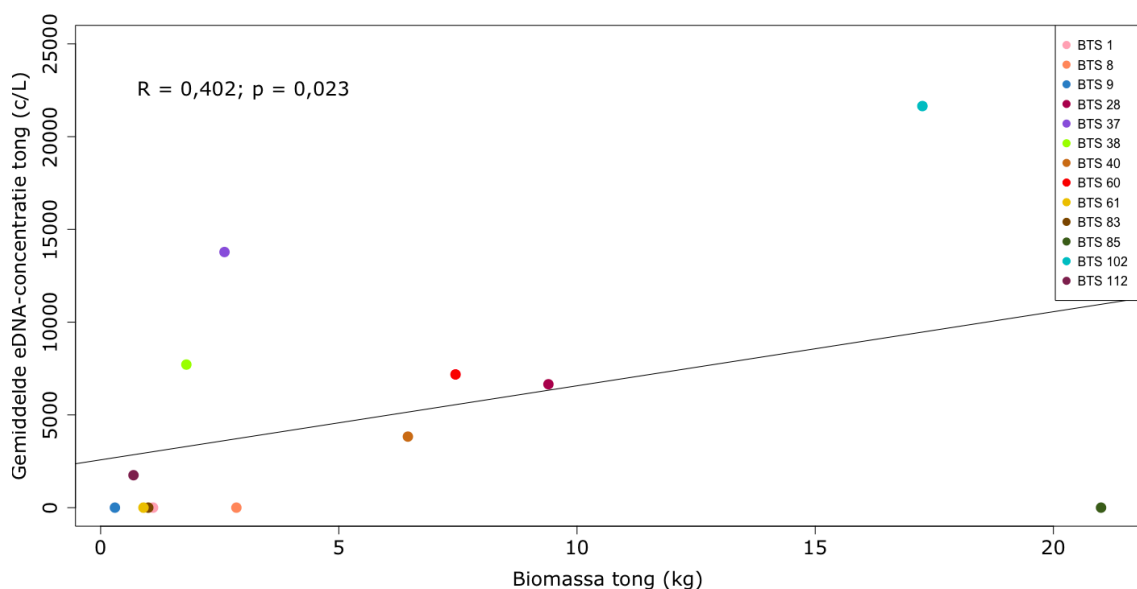
De gecontamineerde *field* controles tonen een gemiddelde concentratie van 9114,65 c/L (Bijlage 6, Figuur B2). Hoewel deze concentratie relatief hoog ligt, toont eerder onderzoek aan

dat deze contaminatie geen impact heeft op de eigenlijke concentratie in de stalen. In dit onderzoek werd een Niskin™ fles met een gekende concentratie gevuld en nadien gespoeld. Het steriele water dat nadien in deze fles zat en werd opgevangen, toonde een concentratie aan dat een 1/20 verdunning was van de initiële concentratie. Aangezien eDNA-concentraties in het water al zeer laag liggen, heeft deze resterende concentratie quasi geen impact op de werkelijke eDNA-concentratie van de stalen. De andere controlestalen genomen bij filtratie, extractie en dPCR, toonden geen aanwezigheid van tong DNA. Bijgevolg is de contaminatie van de stalen verwaarloosbaar.

5.3.2 Vergelijking eDNA-concentraties met biomassa en aantal tong op basis van boomkor data

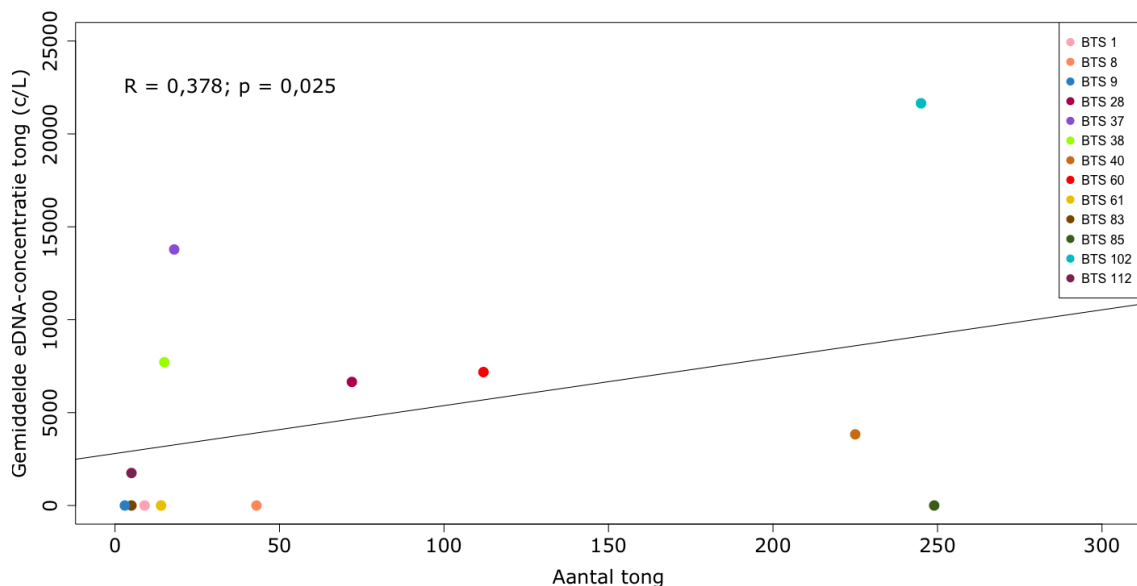
De uiteindelijke concentraties worden in verband gebracht met de biomassa. Daarnaast wordt de correlatie bekeken met de abundantie. De eDNA-concentraties (c/L) werden vergeleken met de waargenomen biomassa (kg) en aantal vis in de sleepnetten. De data van de biomassa en aantallen van tong in de BTS2022-campagne werden uit de SmartFish-databank geëxtraheerd met behulp van R *package* SmartFish.

Wanneer een lineair regressiemodel van de eDNA-concentratie in functie van de biomassa wordt opgesteld (Figuur 5.2), toont dit een zwak positieve correlatie met een Pearson-correlatiecoëfficiënt (R) van 0,402. Deze coëfficiënt geeft aan in hoeverre veranderingen in de ene variabele samengaan met veranderingen in de andere. Met andere woorden is dit een maat voor het lineair verband tussen twee variabelen (Turney, 2022). De correlatie tussen de gemiddelde eDNA-concentratie (c/L) en de biomassa (kg) is zwak positief. De significantie van deze positieve relatie kan worden berekend met de T-toets (Turney, 2022). Hieruit volgt een p-waarde van 0,023 en is bijgevolg statistisch significant ($p < \alpha$, met $\alpha = 0,05$).



Figuur 5.2: Gemiddelde eDNA-concentratie van tong (c/L) in functie van de biomassa (kg) – Biomassadata van BTS2022-campagne, gehaald uit SmartFish; met vermelding van BTS sampling stations in legende, Pearson-correlatiecoëfficiënt (R) en p-waarde; gemaakt in RStudio.

De resultaten van deze correlatie komen overeen met eerder gevoerde onderzoeken door Salter et al. (2019) en Maes et al. (2023). Resultaat van dit laatste gelijkaardig onderzoek naar de correlatie tussen de eDNA-concentratie van tong en de biomassa toont eveneens een significant positieve correlatie aan, alhoewel de correlatie hier minder sterk is. Dit is een mogelijks gevolg van de weinige stations waarin tong werd gedetecteerd. Hier wordt door de LOD en LOQ het merendeel aan biologische replicaten per station herleid tot 0 c/L. De combinatie van de weinige kwantificeerbare stations en de lage biomassa's zorgt voor dit verband. Uit een lage biomassa aan vis kan weinig eDNA voortkomen. Het dynamisch *well-mixed* systeem van de Noordzee, dat zorgt voor het verspreiden en degenereren van eDNA, kan bijgevolg een beperkende factor zijn op de detecteerbaarheid van eDNA (Murakami et al., 2019). Daarnaast wordt het lineair verband tussen de eDNA-concentratie en het aantal tong volgens hetzelfde model bepaald (Figuur 5.3). Het verband toont een zwak positieve correlatie met een Pearson-correlatiecoëfficiënt van 0,378 en een bekomen p-waarde van 0,025. Bijgevolg is deze correlatie, net als bij de biomassa statistisch significant ($p < \alpha$, met $\alpha = 0,05$).



Figuur 5.3: Gemiddelde eDNA-concentratie van tong (c/L) in functie van het aantal tong – Aantallen van BTS2022-campagne, gehaald uit SmartFish; met vermelding van BTS sampling stations in legende, Pearson-correlatiecoëfficiënt (R) en p-waarde; gemaakt in Rstudio.

De correlatie tussen de eDNA-concentratie en de biomassa alsook de correlatie tussen de eDNA-concentratie en het aantal vis zijn in beide gevallen significant zwak positief en tonen een gelijkaardige Pearson-correlatiecoëfficiënt. Om te kunnen bevestigen dat het aantal vis, naast de biomassa, een parameter zou kunnen zijn, wordt de lineariteit en significantie tussen deze variabelen bekeken. Het regressiemodel tussen het aantal vis en de biomassa (kg) (Bijlage 6, Figuur B3) toont een Pearson-correlatiecoëfficiënt van 0,890 en een bekomen p-waarde van 0,020. Zoals verwacht is hier een sterk positieve correlatie te zien, die eveneens significant is ($p < \alpha$, met $\alpha = 0,05$). Bijgevolg is het aantal vis een veelbelovende bijkomstige parameter om de eDNA-concentratie en mogelijks zelfs de biomassa te bepalen. Het aantal vis of de abundantie werd eerder onderzocht als alternatieve parameter voor de raming van

visbevoorrading (Maes et al., 2023; Yates et al., 2019). De bevindingen van dit onderzoek komen overeen met een eerdere studie die een sterkere correlatie aantoonde tussen eDNA-concentratie en abundantie (Yates et al., 2019).

De zwak positieve correlatie tussen eDNA-concentratie en biomassa, wijst op een veelbelovend model waarbij eDNA-detectie een complementaire methode is voor de biomassabepaling. Dit verband is echter afkomstig uit gebieden waar weinig tot geen tong aanwezig is. Indien dit onderzoek zich zou herhalen met stalen uit tongrijke gebieden zou een nauwkeurigere correlatie kunnen worden verwacht (Maes et al., 2023). Daarenboven ligt het merendeel aan bemonsterde stations op ruime afstand van zandbanken, *dumping sites* en/of windmolenparken. BTS-station 85 ligt echter nabij een *dumping site* en toont eveneens de hoogste biomassa en abundantie. In de toekomst kan worden gekeken naar de invloed van dergelijke gebieden op de leefgebieden van tong. Desondanks beperkt dit model zich tot de biomassa en abundantie. Bijkomstige gegevens zoals lengte, gewicht, leeftijd, etc. (Tengvall, 2022), die tevens worden verzameld via boomkorvisserij, kunnen voorlopig niet worden bepaald aan de hand van dit model. Hierdoor kan eDNA-detectie voorlopig niet als alternatief worden beschouwd.

Wanneer een accurater model is gevonden, zou dit na validatie kunnen worden geïmplementeerd in de monitoring en *stock assessment* van tong. Validatie kan via het controleren van het model op correcte voorspellingen van de biomassa op basis van de gevonden eDNA-concentraties. Dit gevalideerd model zou dan kunnen dienen als een snellere, kostenefficiënte, non-invasieve methode van biomassabepaling in gebieden waar geen boomkorvisserij mogelijk is bijvoorbeeld. Het integreren van beïnvloedende parameters zoals hydrologische en biologische processen, saliniteit, temperatuur, waterdiepte, etc. (Takeuchi et al., 2019; van Leeuwe, 2010) zou een meerwaarde voor het model kunnen betekenen. De samenwerking tussen instanties zoals ICES en ILVO kan met up-to-date gegevens dit model actualiseren (ICES, z.d.).

6 Conclusie

Resultaten tonen een zwak positieve correlatie aan tussen eDNA-concentratie en biomassa, alsook abundantie. Dit draagt bij aan het bewijs dat eDNA-concentraties positief correleren met de biomassa en de abundantie. Hoewel de correlaties zwakker zijn dan reeds gevoerd onderzoek (Maes et al., 2023; Salter et al., 2019), kan een nauwkeurigere correlatie, mogelijks te vinden bij tongrijke gebieden, het potentieel aantonen van het implementeren van eDNA-detectie voor de biomassabepaling van tong. Dit kan bijgevolg worden gebruikt als een complementaire, betrouwbare en non-invasieve manier van detectie en biomassabepaling, nodig om een efficiënt en duurzaam beheer van de visbestanden te versterken. De methode kent ook beperkingen zoals contaminatie, detectielimieten en de variërende en beperkte detecteerbaarheid van eDNA (Collins et al., 2018; Dell'Anno & Corinaldesi, 2004; Murakami et al., 2019). Daarenboven hangt de eDNA-concentratie sterk af van verscheidene omgevingsomstandigheden zoals hydrologische en biologische processen (Maes et al., 2023), wat verder onderzoek vereist. In de toekomst kan patronenonderzoek omtrent de eDNA-verspreiding en -afgifte, zowel binnen als buiten het paaiseizoen en de paaigebieden, een waardevolle aanvulling betekenen.

Referentielijst

- Blaas, M., Kerkhoven, D., & Swart, H. E. de. (2001). Large-scale circulation and flushing characteristics of the North Sea under various climate forcings. *Climate Research*, 18(1-2), 47-54. <https://doi.org/10.3354/cr018047>
- Boomkor. (z.d.). Geraadpleegd 1 maart 2023, van <https://www.vliz.be/nl/boomkor>
- Cashion, T., Tyedmers, P., & Parker, R. W. R. (2017). Global reduction fisheries and their products in the context of sustainable limits. *Fish and Fisheries*, 18(6), 1026-1037. <https://doi.org/10.1111/faf.12222>
- Collins, R. A., Wangensteen, O. S., O’Gorman, E. J., Mariani, S., Sims, D. W., & Genner, M. J. (2018). Persistence of environmental DNA in marine systems. *Communications Biology*, 1, 185. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0192-6>
- Dejean, T., Valentini, A., Duparc, A., Pellier-Cuit, S., Pompanon, F., Taberlet, P., & Miaud, C. (2011). Persistence of Environmental DNA in Freshwater Ecosystems. *PLOS ONE*, 6(8), e23398. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023398>
- Delbare, D. (z.d.). *De levenscyclus van tong*. 17-18.
- Dell’Anno, A., & Corinaldesi, C. (2004). Degradation and Turnover of Extracellular DNA in Marine Sediments: Ecological and Methodological Considerations. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 4384-4386. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.4384-4386.2004>
- EEA. (2001). *Eutrophication in Europes coastal waters; Topic Report No. 7, 2001—European Environment Agency* [Page]. <http://europa.eu.int>
- EEA. (2012, november 9). *North Sea physiography (depth distribution and main currents)—European Environment Agency* [Figure]. <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/figures/north-sea-physiography-depth-distribution-and-main-currents>
- EEA. (2016, juli 28). *Bottom trawl fishing intensity in the North Sea—European Environment Agency* [Figure]. <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/figures/bottom-trawl-fishing-intensity-in>
- EMoSEM. (z.d.). Geraadpleegd 3 april 2023, van <https://odnature.naturalsciences.be/emosem/state-of-the-art/english-channel-southern-north-sea.php>
- Fleet Register. (2023). https://webgate.ec.europa.eu/fleet-europa/stat_glimpse_en
- Fukaya, K., Murakami, H., Yoon, S., Minami, K., Osada, Y., Yamamoto, S., Masuda, R., Kasai, A., Miyashita, K., Minamoto, T., & Kondoh, M. (2021). Estimating fish population abundance by integrating quantitative data on environmental DNA and hydrodynamic modelling. *Molecular Ecology*, 30(13), 3057-3067. <https://doi.org/10.1111/mec.15530>
- Hansen, B. K., Bekkevold, D., Clausen, L. W., & Nielsen, E. E. (2018). The sceptical optimist: Challenges and perspectives for the application of environmental DNA in marine fisheries. *Fish and Fisheries*, 19(5), 751-768. <https://doi.org/10.1111/faf.12286>
- Hinlo, R., Lintermans, M., Gleeson, D., Broadhurst, B., & Furlan, E. (2018). Performance of

eDNA assays to detect and quantify an elusive benthic fish in upland streams. *Biological Invasions*, 20(11), 3079-3093. <https://doi.org/10.1007/s10530-018-1760-x>

ICES. (z.d.). *Who we are*. Geraadpleegd 17 maart 2023, van <https://www.ices.dk/about-ICES/who-we-are/Pages/Who-we-are.aspx>

ICES. (2020). *Request from the Netherlands regarding the impacts of pulse trawling on the ecosystem and environment from the sole (Solea solea) fishery in the North Sea* [Report]. ICES Advice: Special Requests. <https://doi.org/10.17895/ices.advice.6020>

ICES. (2021). *Greater North Sea ecoregion – Fisheries overview* [Report]. ICES Advice: Fisheries Overviews. <https://doi.org/10.17895/ices.advice.9099>

ICES. (2022a). *ICES Annual Report 2021* [Report]. ICES Annual Report. <https://doi.org/10.17895/ices.pub.20254731.v1>

ICES. (2022b). *Sole (Solea solea) in divisions 7.h–k (Celtic Sea South, southwest of Ireland)* [Report]. ICES Advice: Recurrent Advice. <https://doi.org/10.17895/ices.advice.19453832.v1>

ICES. (2022c). *Sole (Solea solea) in Subarea 4 (North Sea)* [Report]. ICES Advice: Recurrent Advice. <https://doi.org/10.17895/ices.advice.19453814.v1>

ICES. (2022d). *Working Group on the Assessment of Demersal Stocks in the North Sea and Skagerrak (WGNSSK)* [Report]. ICES Scientific Reports. <https://doi.org/10.17895/ices.pub.19786285.v3>

Infographic on Pulse Fishing—Brochure—Pulse Fishing. (2017, april 25). [Brochure]. Ministerie van Economische Zaken en Klimaat.

<https://www.pulsefishing.eu/documents/leaflets/2017/04/25/infographic-pulse-fishing>

Jerde, C. L. (2021). Can we manage fisheries with the inherent uncertainty from eDNA? *Journal of Fish Biology*, 98(2), 341-353. <https://doi.org/10.1111/jfb.14218>

Klymus, K. E., Merkes, C. M., Allison, M. J., Goldberg, C. S., Helbing, C. C., Hunter, M. E., Jackson, C. A., Lance, R. F., Mangan, A. M., Monroe, E. M., Piaggio, A. J., Stokdyk, J. P., Wilson, C. C., & Richter, C. A. (2019). *Reporting the limits of detection and quantification for environmental DNA assays*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/edn3.29>

Knudsen, S. W., Ebert, R. B., Hesselsøe, M., Kuntke, F., Hassingboe, J., Mortensen, P. B., Thomsen, P. F., Sigsgaard, E. E., Hansen, B. K., Nielsen, E. E., & Møller, P. R. (2019). Species-specific detection and quantification of environmental DNA from marine fishes in the Baltic Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 510, 31-45. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2018.09.004>

Maes, S. M., Desmet, S., Brys, R., Sys, K., Ruttink, T., Maes, S., Hostens, K., Vansteenbrugge, L., & Derycke, S. (2023). Detection and quantification of two commercial flatfishes (*Solea solea* and *Pleuronectes platessa*) in the North Sea using environmental DNA. *Environmental DNA*, n/a(n/a). <https://doi.org/10.1002/edn3.426>

Meer over de Belgische visserij | Vis. (z.d.). Geraadpleegd 27 februari 2023, van <https://www.belgianfish.com/nl/meer-over-de-belgische-visserij>

Meeste Noordzeebestanden gezond, maar sterke daling quota-advies voor tong, haring, tarbot

en griet. (2022, juni 30). WUR. <https://www.wur.nl/nl/show/meeste-noordzeebestanden-gezond-maar-sterke-daling-quota-advies-voor-tong-haring-tarbot-en-griet.htm>

Moreau, K., Torreele, E., Polet, H., & Lenoir, H. (2016). De Vruchten van De Zee. *De grote rede*, 45.

Morley, A. A. (2014). Digital PCR: A brief history. *Biomolecular Detection and Quantification*, 1(1), 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2014.06.001>

MSY objective – FishSec. (z.d.). Geraadpleegd 21 maart 2023, van <https://www.fishsec.org/management-strategies/msy-objective/>

Murakami, H., Yoon, S., Kasai, A., Minamoto, T., Yamamoto, S., Sakata, M. K., Horiuchi, T., Sawada, H., Kondoh, M., Yamashita, Y., & Masuda, R. (2019). Dispersion and degradation of environmental DNA from caged fish in a marine environment. *Fisheries Science*, 85(2), 327-337. <https://doi.org/10.1007/s12562-018-1282-6>

Nihoul, J. C. J., & Hecq, J. H. (1984). Influence of the residual circulation on the physico-chemical characteristics of water masses and the dynamics of ecosystems in the Belgian coastal zone. *Continental Shelf Research*, 3(2), 167-174. [https://doi.org/10.1016/0278-4343\(84\)90005-0](https://doi.org/10.1016/0278-4343(84)90005-0)

Noordzee | Ecomare Texel. (z.d.). *Ecomare*. Geraadpleegd 27 februari 2023, van <https://www.ecomare.nl/verdiep/leesvoer/noordzee/>

Noordzeetong | Vissoorten | Mowi Belgium. (z.d.). Geraadpleegd 16 maart 2023, van <https://www.pieters.be/nl/viskennis/vissoorten/noordzeetong>

OPSAR Commission. (2000). *Region 2: Greater North Sea*.

Pecceu, E., & Van Hoey, G. (2020). *Paaiplaatsen van tong (Solea solea) in en rond de Belgische visgronden – Overzicht van de kennis*. https://ilvo.vlaanderen.be/uploads/documents/Mededelingen/262_paaigronden.pdf

Platvissen: Kennis en weetjes | Ecomare Texel. (z.d.). *Ecomare*. Geraadpleegd 16 maart 2023, van <https://www.ecomare.nl/verdiep/leesvoer/dieren/dieren-van-de-wadden/platvissen/>

Promega. (2022). *Quantus™ Fluorometer Operating Manual*. <file:///Users/kaatn/Downloads/Quantus%20Fluorometer%20Operating%20Manual%20TM396.pdf>

Qiagen. (2020). *DNeasy® Blood & Tissue Handbook*. QIAGEN. [file:///Users/kaatn/Downloads/HB-2061-003_HB_DNY_Blood_Tissue_0720_WW%20\(1\).pdf](file:///Users/kaatn/Downloads/HB-2061-003_HB_DNY_Blood_Tissue_0720_WW%20(1).pdf)

Qiagen. (2021). *QIAcuity User Manual Extension*. QIAGEN. file:///Users/kaatn/Downloads/HB-2839-003_UM_QIAcuity_UM_Extension_0621_WW.pdf

Quan, P.-L., Sauzade, M., & Brouzes, E. (2018). dPCR: A Technology Review. *Sensors*, 18(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/s18041271>

Regulation (EU) 2019/1241 of the European Parliament and of the Council of 20 June 2019 on the conservation of fisheries resources and the protection of marine ecosystems through technical measures, amending Council Regulations (EC) No 1967/2006, (EC) No 1224/2009

and Regulations (EU) No 1380/2013, (EU) 2016/1139, (EU) 2018/973, (EU) 2019/472 and (EU) 2019/1022 of the European Parliament and of the Council, and repealing Council Regulations (EC) No 894/97, (EC) No 850/98, (EC) No 2549/2000, (EC) No 254/2002, (EC) No 812/2004 and (EC) No 2187/2005. (2019, juni 20). [Text].

<https://Webarchive.Nationalarchives.Gov.Uk/Eu-Exit/https://Eur-Lex.Europa.Eu/Legal-Content/EN/TXT/?Uri=CELEX:32019R1241>; Queen's Printer of Acts of Parliament.
<https://www.legislation.gov.uk/eur/2019/1241>

Renders, K., & Sas, R. (2014). *Verse tong een topper, maar wel een dure*. 21-25.

Salter, I., Joensen, M., Kristiansen, R., Steingrund, P., & Vestergaard, P. (2019). Environmental DNA concentrations are correlated with regional biomass of Atlantic cod in oceanic waters. *Communications Biology*, 2(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0696-8>

Scherrens, N. (2020). *De Belgische Zeevisserij 2020 – Aanvoer en besomming*.

Statbel. (2023a). *Zeevisserij | Statbel*. <https://statbel.fgov.be/nl/themas/landbouw-visserij/zeevisserij#panel-12>

Statbel. (2023b, maart 21). *Belgische zeevisserij herleeft in 2022: Verhoogde aanvoer en betere prijzen | Statbel*. <https://statbel.fgov.be/nl/nieuws/belgische-zeevisserij-herleeft-2022-verhoogde-aanvoer-en-betere-prijzen>

Takahara, T., Minamoto, T., Yamanaka, H., Doi, H., & Kawabata, Z. (2012). Estimation of Fish Biomass Using Environmental DNA. *PLOS ONE*, 7(4), e35868.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035868>

Takeuchi, A., Iijima, T., Kakuzen, W., Watanabe, S., Yamada, Y., Okamura, A., Horie, N., Mikawa, N., Miller, M. J., Kojima, T., & Tsukamoto, K. (2019). Release of eDNA by different life history stages and during spawning activities of laboratory-reared Japanese eels for interpretation of oceanic survey data. *Scientific Reports*, 9(1), Article 1.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-42641-9>

Te weinig data over tong: Nieuw onderzoek tracht via (e)DNA de gaten te vullen - ILVO Vlaanderen. (2022, februari 14). ILVO (Nederlands). <https://ilvo.vlaanderen.be/nl/nieuws/te-weinig-data-over-tong-nieuw-onderzoek-tracht-via-edna-de-gaten-te-vullen>

Tengvall, J. (2022, januari 4). *Sustainable Fishing Levels & Quotas | How It Works*.
<https://www.foodunfolded.com/article/sustainable-fishing-levels-quotas-how-it-works>

Thomsen, P. F., Møller, P. R., Sigsgaard, E. E., Knudsen, S. W., Jørgensen, O. A., & Willerslev, E. (2016). Environmental DNA from Seawater Samples Correlate with Trawl Catches of Subarctic, Deepwater Fishes. *PLOS ONE*, 11(11), e0165252.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165252>

Total Allowable Catches (TACs). (z.d.). Oceana Europe. Geraadpleegd 17 maart 2023, van <https://europe.oceana.org/total-allowable-catches-tacs/>

Turney, S. (2022, mei 13). *Pearson Correlation Coefficient (r) | Guide & Examples*. Scribbr.
<https://www.scribbr.com/statistics/pearson-correlation-coefficient/>

- USGS. (2018). *Environmental DNA (eDNA) | U.S. Geological Survey*.
<https://www.usgs.gov/special-topics/water-science-school/science/environmental-dna-edna>
- van Leeuwe, M. (2010, februari 12). *De Kinderkamer van de Noordzee 12-02-2010*.
<https://www.waddenacademie.nl/wetenschap/wadweten/archief-wadweten-2010/de-kinderkamer-van-de-noordzee-12-02-2010>
- van Rodijnen, P. (2015, maart 30). Boomkorvisserij op de Noordzee. *Onderwaterbeelden*.
<https://www.underwaterbeelden.nl/boomkorvisserij-de-noordzee/>
- Visquota—Visserij—Rijksoverheid.nl*. (2018, december 27). [Onderwerp]. Ministerie van Algemene Zaken. <https://www.rijksoverheid.nl/onderwerpen/visserij/visquota-en-tijdelijke-sluitingen-vangstgebieden>
- Vissersvloot*. (2023, februari 17). www.vlaanderen.be. <https://www.vlaanderen.be/statistiek-vlaanderen/landbouw-en-visserij/vissersvloot>
- VLIZ. (2014). De effecten van pulsvisserij door Nederlandse vaartuigen in Belgische wateren—Een synthese van het Vlaams wetenschappelijk onderzoek. *VLIZ Beleidsinformerende Nota's*.
<https://www.vliz.be/nl/imis?module=ref&refid=237914>
- VLIZ. (2020). *Oppervlakte-stromingen | Planeet zee*.
<https://www.planeetzee.be/lesmodule/10?page=6>
- Wu, J., Cunanan, J., Kim, L., Kulatunga, T., Huang, C., & Anekella, B. (2009). *Stability of Genomic DNA at Various Storage Conditions. 2009 Annual Meeting (Vol. 12)*.
https://www.mygreenlab.org/uploads/2/1/9/4/21945752/cs_-_dna_stability_at_4_-20_-80_isber2009_bharathi.pdf
- Yates, M. C., Fraser, D. J., & Derry, A. M. (2019). Meta-analysis supports further refinement of eDNA for monitoring aquatic species-specific abundance in nature. *Environmental DNA*, 1(1), 5-13. <https://doi.org/10.1002/edn3.7>

Bijlagen

Bijlage 1: Quantus™ Fluorometer concentratiebepaling eDNA

Supplies

Materials and equipment

- 50 mL Falcon tube
- 5 mL tube
- 0,5 mL Promega® tubes
- Micropipettes en pipette tips
- Quantus™ Fluorometer (Promega®)
- Vortex (VWR®)

Reagents

- Extracted eDNA samples
- 1x TE-buffer:
0,2 M Tris [pH 7,5], 20 mM EDTA [pH 8]
- Lambda DNA standard (100 ng/μL)
(Promega®)
- QuantiFluor® dsDNA dye 200x (Promega®)

Preparation of the blank, standard and samples

1. Dilute the 20x TE buffer (pH 7,5) (Promega®) to 1x TE buffer:
Calculate how much you need: 1 mL/ 7 samples.
 - a. In a 50 mL Falcon: 1 mL 20x TE + 19 mL 1x TE
 - b. Vortex well
2. Label the 0,5 mL Promega® tubes including one blank and one standard.
3. Fill the tubes according to the following scheme:

Blank	100 μL 1x TE buffer	
Standard (200 ng/μL)	98 μL 1x TE buffer	2 μL DNA standard (100 ng/ μL)*
Samples	99 μL 1x TE buffer	1 μL sample*

* Added in the LAF cabinet.

4. Make the QuantiFluor® dsDNA Dye working solution:
Calculate how much you need: 100 μL/tube + 100 μL excess.**
 - a. In a 5 mL Eppendorf: 995 μL 1x TE buffer + 5 μL QuantiFluor® dsDNA Dye
 - b. Vortex well** *Rond off the volume of the QuantiFluor® dsDNA dye working solution.*
example:
24 samples + 1 blanco + 1 standard = 26 tubes
→ 100 μL QuantiFluor® dye working solution/tube = 2600 μL → 3 mL
5. Add 100 μL to every 0,5 mL Promega® tube. Pipette up and down each time.
6. Incubate at room temperature for 10 minutes in darkness.

Measurement of the blank, standard and samples

7. Activate the Quantus™ Fluorometer by pressing any button.
8. Program as dsDNA and select ng/μL and 1 μL of DNA.
9. Measure blank and save.
10. Measure standard and save.
11. Measure samples, write concentration down.

Bijlage 2: eDNA-kwantificatie met *QIAcuity One Digital PCR* (Qiagen®)

Supplies

Materials and equipment

- 1,5 mL tubes
- PCR 8-well strips
- Micropipettes en pipette tips
- Roller
- Nanoplate seal (Qiagen®)
- QIAcuity Nanoplate 26k 24-well (Qiagen®)
- QIAcuity One digital PCR (Qiagen®)
- QIAcuity Software Suite (Qiagen®)
- Microcentrifuge (Eppendorf®)
- Vortex (VWR®)

Reagents

- Extracted eDNA samples
- RNase-free water (Qiagen®)
- 20 µM target primer, F and R (Merck®)
- 10 µM target probe (IDT®)
- 20 µM IPC primer, F and R (IDT®)
- 10 µM IPC probe (IDT®)
- 4x Probe PCR Master Mix (Qiagen®)

Preparation of the PCR master mix & reaction mix – loading the plate

1. Thaw the QIAcuity Probe PCR Master Mix, template DNA, primers, probes and RNase-free water. Vigorously mix the QIAcuity Probe PCR master mix and the individual solutions. Centrifuge briefly to collect liquids at the bottom of the tubes.
2. Prepare in a 1,5 mL Eppendorf the PCR Master Mix for the number of reactions needed + two, according to the following scheme, and vortex well.

	1 reaction (µL)	24+2 reactions (µL)
4x Probe PCR mastermix	10	260
IPC forward primer (20 µM)	1,5	39
IPC reverse primer (20 µM)	1,5	39
IPC probe (10 µM)	1,5	39
Target forward primer (20 µM)	1,5	39
Target reverse primer (20 µM)	1,5	39
Target probe (10 µM)	1,5	39
RNase-free water	16*	416*

Template DNA (added in step 4)	5
--------------------------------	---

Total reaction volume	40	910
-----------------------	----	-----

* Volume may vary, depending on concentration of the primer/probe mix used and template DNA.

3. Dispense 35 µL (may vary) of the PCR Master Mix, which contains all components except the template DNA, into the wells of PCR strips.
Move from the UV cabinet to the sterile LAF cabinet.
4. Then, add template DNA into each well that contains the PCR Master Mix. Do so with great caution to avoid contamination!
5. Centrifuge briefly to collect liquids at the bottom of the tubes.

- Transfer the content of each well from the standard PCR plate to the wells of the QIAcuity Nanoplate 26k 24-well. Do so with great caution to avoid contamination!
- Seal the nanoplate properly using the QIAcuity Nanoplate Seal provided in the QIAcuity Nanoplate 26k 24-well Kit. Use the roller to properly attach the seal. Make sure the edges are folded over and firmly attached to the edge of the dPCR plate.

Set up thermal cycling conditions

- Program the cycler of the QIAcuity instrument according to following scheme:

Step	Time	Temperature (°C)
PCR initial heat activation	2 min	95
2 step cycling (40 cycles):		
Denaturation	15 s	95
Combined annealing/extension	30 s	56*

* Temperature during annealing/extension and number of cycles may vary depending on assay type.

- Place the Nanoplate into the QIAcuity instrument and start the dPCR program.

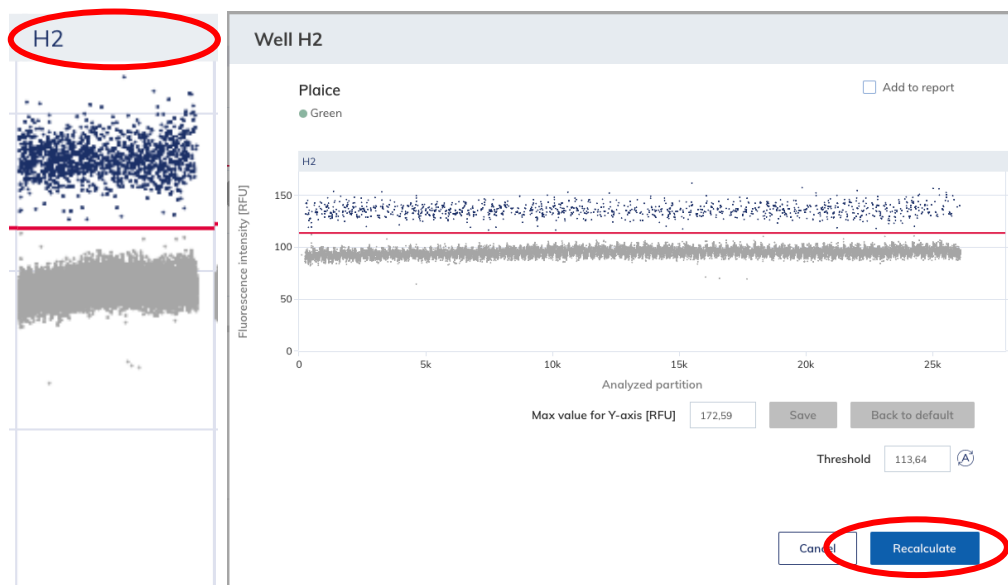
Analyzing dPCR results after running with QIAcuity Software Suite (Qiagen®).

Ground rules for analyzing results consistently (!!)

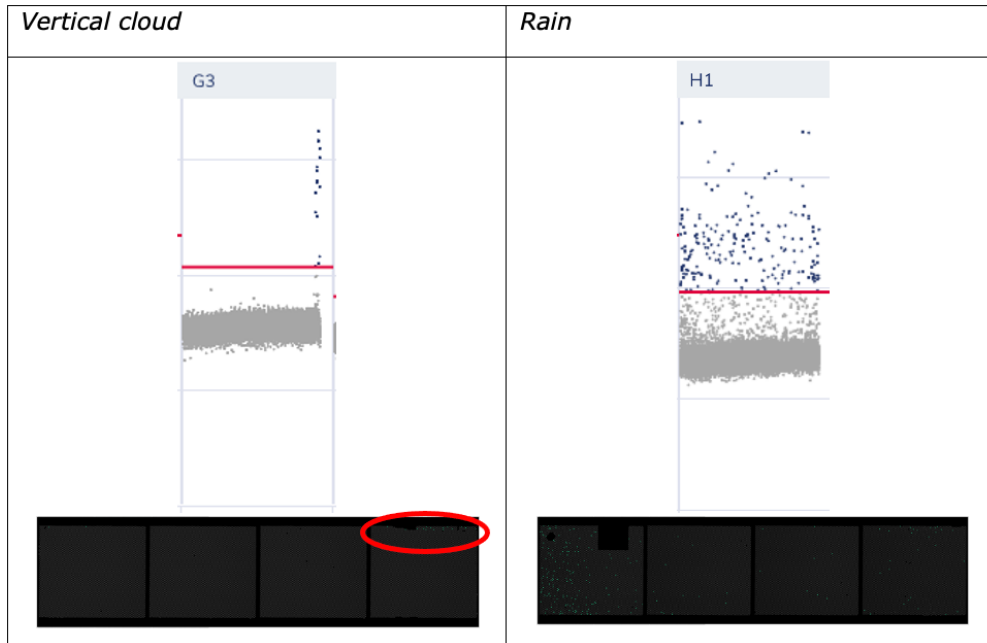
1) Check if samples have been successful

1D scatterplot:

The threshold should always be in the middle between the two (expected) clouds. draw a line between the lower and upper cloud, the middle between these clouds is the threshold. If necessary, adjust it individually by clicking on the well name.



When a well shows a 'vertical' cloud or 'rain' the sample should be run again. This means that the distribution between the wells did not work out, this can be seen at 'signalmap'.



List:

Once the clouds are checked, the IPC positive partitions are always considered. From this, 4 situations can occur:

	Pos IPC partitions	Pos DNA partitions	Outcome
1	0 – 10	0 – LOD	Re-run the sample after a dilution is made (range 1-10 ng/μL)
2	0	>LOD	IPC was probably not added
3	>50	0 – LOD	Done, no fish to detect
4	>10	>LOD	Done

2) Samples to be re-run

Samples to be run again after dilution are diluted to a concentration range between 1 - 10 ng/μL.

Dilution (1/2, 1/4, ...) is made with 1x TE buffer (pH 8).

3) Data-analysis

The LOD and LOQ determine which values are used to interpret:

Pos DNA partitions	Outcome
<LOD	0
LOD – LOQ	Sample can be detected, but quantification is not reliable
>LOQ	Quantification is reliable

Per sample, only the results of the first run that succeeded well (i.e. a sufficiently high number of positive IPC partitions) are used for data-analysis

Bijlage 3: Belgica BTS-campagne 2022 – eDNA sampling

Belgica BTS campagne 2022 - 24/8/22 - 2/9/22 eDNA sampling - SoleDNA project

Date	Time (UTC)	Station	Coordinates		Salinity PSU	Temperature (°C)	Depth CTD (m)	remarks
24/08/2022	10:27	40	51,346	2,914	32,9	21,81	15,7	
24/08/2022	16:26	1	51,400	2,515	34,7	21,00	30,3	possibly hit bottom; recycling of gauzes
26/08/2022	14:35	102	52,281	1,703	34,1	21,25	14,1	recycling of gauzes
27/08/2022	04:50	60	53,241	0,514	34,2	20,24	18,3	
28/08/2022	14:52	61	53,049	1,505	34,2	19,16	28,4	
29/08/2022	07:52	28	52,833	2,279	34,3	19,65	45,9	
30/08/2022	04:46	112	53,728	1,867	34,5	19,07	25,5	
30/08/2022	13:14	9	53,457	2,664	34,3	19,65	26,7	
30/08/2022	16:31	8	53,198	2,741	34,3	19,64	29,1	
31/08/2022	06:09	83	51,951	1,584	34,4	20,58	12,9	
31/08/2022	15:16	85	51,561	1,851	34,8	20,49	41,6	
1/09/2022	06:40	38	51,179	1,849	34,9	20,14	35,9	
1/09/2022	11:03	37	51,373	2,185	34,9	20,34	32,7	

Each time temp, salinity and depth at close of 1st bottle.

Bijlage 4: Filtratie waterstalen protocol

Materials and equipment

- Sterivix™-HV filters (Millipore®) (check if enough)
- luer locks (check if enough)
- Masterflex-L/S pump (Masterflex®)
- pump heads + pumphead screws
- pump tubes (cut to appropriate length) + luerlock tube connectors
- bottle with bleach and capture bottle
- gloves
- VWR 10 L cups to catch filtered water
- VWR measuring cylinders to measure filtered water
- paper towels
- bleach spray bottle
- ziplock bags
- alcohol pen
- identifier stickers (see document on teams)
- list of samples to note filter volumes
- pen
- PMD bag for empty sample bottles
- bag for small trash
- 10 L bucket to catch water samples
- fresh waterbottles to rinse tubing
- rag to clean water from floor

Preparation

Put your sample bottles you want to filter outside of the freezer the day before. Avoid putting them in direct sunlight or any UV source and apply enough spacing between bottles. Do not mix or shake the bottles.

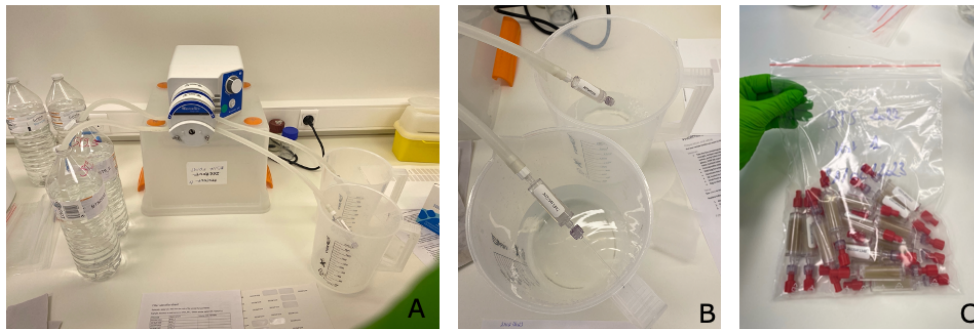
Set up

1. Remove the motor from the box and elevate the pump by putting it on the box.
2. Plug the motor into the socket.
3. Put the head on the motor (slot corresponds to plate in head), place the second head on it.
4. Attach heads to motor: rod, roundel, bolt in each hole and tighten.
5. Place the tubes in the heads by lifting the handles and laying the tubes in the holders. Close the handles afterwards.

Filtering the samples

1. Insert the inlet side into the bleach bottle and the outlet into the capture bottle, rinse the tubes for around 10 seconds on speed 7 and then remove the inlet side until the tubes are empty. Dry off the outside of the tubes.
2. Insert the inlet in 0,5 L clean water bottles and the outlet in VWR cup. Rinse using around 1/4th of a bottle at speed 7. Remove the outlet to empty the tubes again. Discard the water.

3. Attach a filter to the luer lock connector. Filters should always be floating above liquids never be submerged!
Put the inlet in the sample bottle and filter at speed 4 until 1 L is filtered or until the filter is clogged. Avoid that inlet directly sucks sediment from the bottom of the bottle.
4. Remove the filter and attach luer caps at both ends and put filter code sticker on the filter.
5. Measure the amount of water filtered with the measuring cylinder and note down the volume and sample code with its corresponding filtercode in the filter identifier sheet.
6. Discard the water in the bucket.
7. Repeat steps 1-6 for all samples.
8. Put the labelled filters in a labelled ziplock bag.
9. Freeze the bag with filters in at ca. -21 °C.
10. Note any irregularities in the "eDNA filter and extract codes.xlsx" on Teams



Figuur B1: Water filtration setup

– A: Masterflex pump filters two water samples; B: Sterivex™-HV filters with filter code, filtering the samples; C: Labeled ziplock bag with labeled filters for freezing.

Filtering negative

Same protocol as samples but use a clean 2 L bottle as 'sample'.

Bijlage 5: eDNA-extractie van Sterivex filters zonder bewaarbuffer

Hieronder wordt een aangepast uittreksel van een deel van de op het labo aanwezige werkinstructie getoond.

Supplies

Materials and equipment

- DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen®)
- Micropipettes en pipette tips
- 5 mL tubes
- 1,5 mL tubes
- 5 mL syringes
- Tissues
- Centrifuge (Eppendorf®)
- Incubator-Genie™ (Scientific industries, Inc®)
- Vortex (VWR®)

Reagents

- IPC gBlock® (30 000 c/μL) (-21 °C) (IDT®)
- Ice-cold ethanol (96-100 %)
- 1x TE-buffer (pH 8)

Preparation

1. Remove Sterivex filters from freezer and clean a 1st time with bleach.
2. Introduce Sterivex filters into SAS PrePCR Gav35, clean again with bleach and then clean thoroughly with 70 % ethanol.

Set up

1. Run the UV in the PCR cabinet for 15 minutes.
2. Turn on the PCR cabinet.
3. Set the Incubator-Genie to 56 °C.
4. When commissioning a new DNeasy® Blood & Tissue Kit, add an appropriate amount of ethanol 96-100 % once to AW1 and AW2 buffer. The quantities are noted on the packages.
5. Buffers ATL and AL should be clear. If turbid, warm the buffers in the incubator.

Protocol

Preparation of lysis buffer

For 1 sample: mix in an appropriate container:

718 μL ATL + 2 μL IPC (30 000 c/μL) + 80 μL proteinase K

	ATL mix for 12 extractions		μL
	x1	x14	
ATL buffer	718	10052	
Prot K	80	1120	
IPC (30 000 c/μL)	2	28	
			11200

ATL mix for 24 extractions

x28

ATL buffer	718	20104
Prot K	80	2240
IPC (30 000 c/μL)	2	56

22400

Lysis of the tissue-laden filter and binding of the DNA

1. Remove the inlet luer-lock™ cap from the filter.
2. Pipette 800 μL of the lysis buffer onto the filter through the inlet using a pipette.
3. Screw the inlet luer-lock™ cap back onto the filter and vigorously (manually) shake the filter for several seconds.
4. Incubate the filters overnight at 56 °C in a rotary incubator (position 6).

After overnight incubation:

5. Place the Incubator-Genie at 70 °C (heating time about 15 min) and heat TE 1x at 70 °C (pH 8) in the thermomixer according to the amount of samples.
For elution of one sample, you need 100 μL.
6. Aspirate the lysis buffer from the filter through the inlet using a 5 mL syringe and transfer to a 5 mL Eppendorf.
7. For each sample, successively add 750 μL of AL buffer and 750 μL of ice-cold ethanol directly after.
8. Vortex (pulsing) very briefly.
9. Transfer the contents of the 5 mL Eppendorf (including precipitate) in several steps (max. 650 μL at a time) to a DNeasy Mini spin column placed on a collection tube.
10. Centrifuge at 6000 g for 1 min (reuse the collection tubes in between by pouring off the filtrate and dabbing the collection tube on a tissue).

Washing the DNA

11. Apply 500 μL of buffer AW1+ to the column.
12. Centrifuge for 1 min at 6000 g.
13. Keep the column with the bound DNA on it, remove the collection tube containing filtrate and place the column on a new collection tube.
14. Apply 500 μL of buffer AW2+ to the column.
15. Centrifuge for 3 min at 18000 g.
16. Keep the column with the bound DNA on it, remove the collection tube containing filtrate and place the column on a new collection tube.
17. Centrifuge for 1 min at 18000 g.
18. Place the column containing the bound DNA on a sterile 1,5 mL Eppendorf and discard the collection tube containing filtrate.

Dissolve the DNA in 100 µl final volume

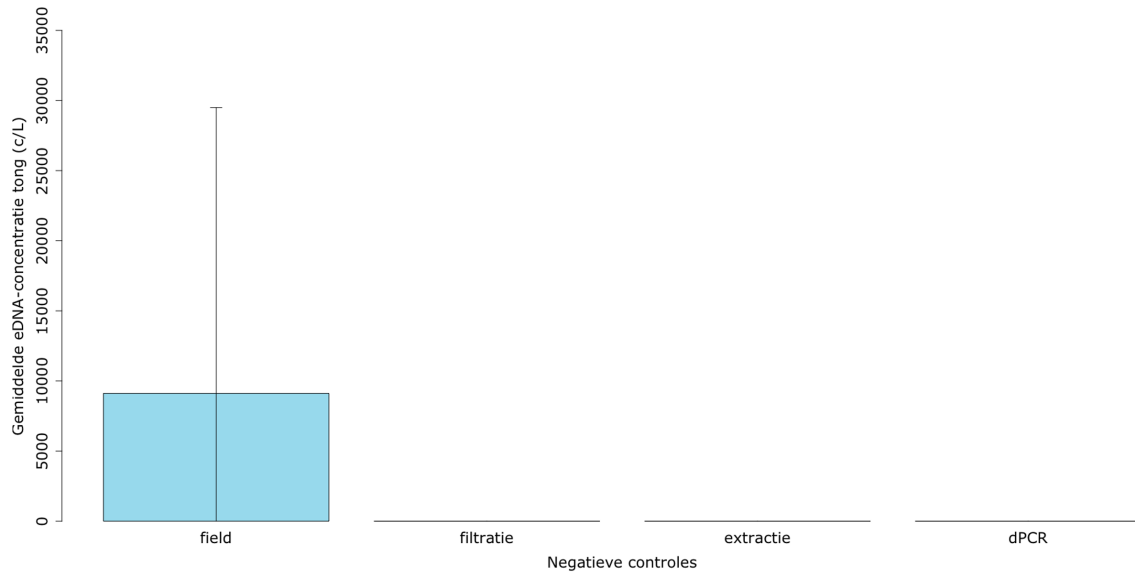
19. Apply 50 µL of preheated (70 °C) TE (pH 8) to the column.
20. Incubate immediately for 10 min at room temperature.
21. Centrifuge for 1 min at 6000 g.
22. Add another 50 µL of warm TE to the column and incubate again for 10 min.
23. Centrifuge for 1 min at 6000 g.
24. Discard the column and save the DNA.
25. Stick the appropriate sticker on the Eppendorf and complete the Excel "eDNA extractions" and store in the freezer (approx. -21 °C)

Bijlage 6: Aanvullende resultaten

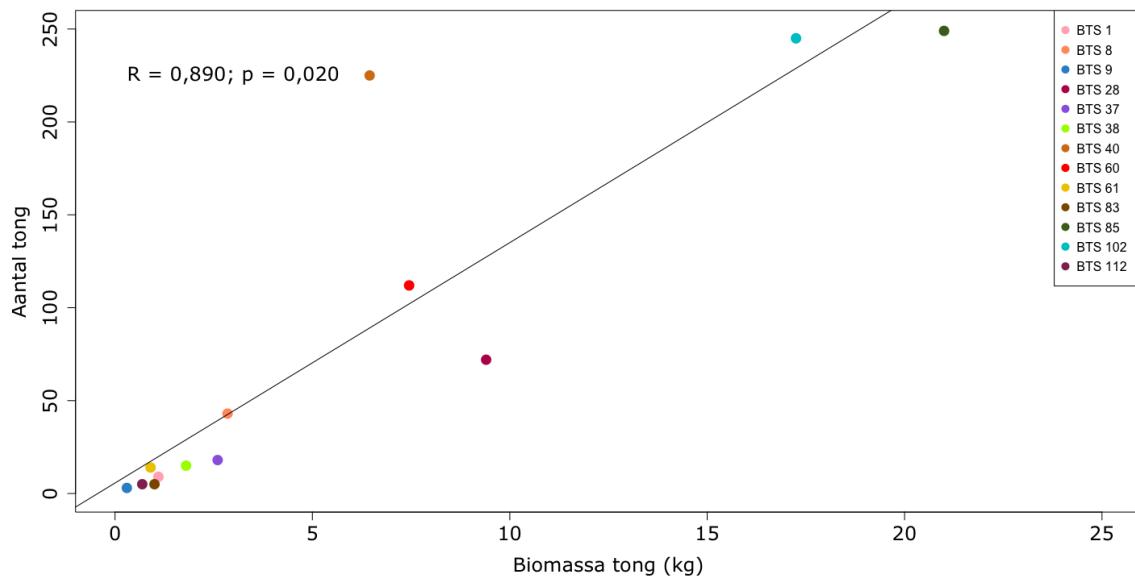
Tabel B1: **eDNA-concentraties (ng/μL) gemeten met de Quantus™ Fluorometer (Promega®)** –
 A: Concentratie field stalen, alternerend blauw en wit gearceerd zijn de biologische replicaten per
 sampling station; B: Negatieve controles.

A		B	
Staal	eDNA-concentratie (ng/μL)	Staal	eDNA-concentratie (ng/μL)
BTS1_1	53	BTS60_1	61
BTS1_2	59	BTS60_2	16
BTS1_3	52	BTS60_3	54
BTS1_4	60	BTS60_4	35
BTS1_5	94	BTS60_5	51
BTS8_1	41	BTS61_1	23
BTS8_2	32	BTS61_2	35
BTS8_3	35	BTS61_3	31
BTS8_4	29	BTS61_4	31
BTS8_5	31	BTS61_5	60
BTS9_1	42	BTS83_1	9,7
BTS9_2	70	BTS83_2	7,9
BTS9_3	41	BTS83_3	5,7
BTS9_4	52	BTS83_4	7,1
BTS9_5	21	BTS83_5	10
BTS28_1	27	BTS85_1	43
BTS28_2	59	BTS85_2	43
BTS28_3	33	BTS85_3	36
BTS28_4	15	BTS85_4	44
BTS28_5	18	BTS85_5	68
BTS37_1	58	BTS102_1	16
BTS37_2	51	BTS102_2	23
BTS37_3	38	BTS102_3	48
BTS37_4	60	BTS102_4	19
BTS37_5	27	BTS102_5	33
BTS38_1	30	BTS112_1	29
BTS38_2	37	BTS112_2	46
BTS38_3	21	BTS112_3	50
BTS38_4	28	BTS112_4	36
BTS38_5	43	BTS112_5	39
BTS40_1	77		
BTS40_2	85		
BTS40_3	75		
BTS40_4	59		
BTS40_5	76		

Staal	eDNA-concentratie (ng/μL)
Negatieve field controles	
NEG1	0,252
NEG2	0,765
NEG 1.1 MID	0,154
NEG3	0,068
NEG_END	Lower than Blank
Negatieve filter controles	
STE1	2,210
STE2	2,880
Negatieve extractie controle	
NEG_EXT	0,029



Figuur B2: Gemiddelde eDNA-concentratie van tong (c/L) per negatieve controle
 – De controlestappen, behalve field, tonen geen aanwezigheid van tong DNA; gemaakt in RStudio.



Figuur B3: Het aantal tong in functie van de biomassa (kg)
 – Biomassadata en aantallen van BTS2022-campagne, gehaald uit SmartFish; met vermelding van BTS sampling stations in legende, Pearson-correlatiecoëfficiënt (R) en p-value; gemaakt in RStudio.