

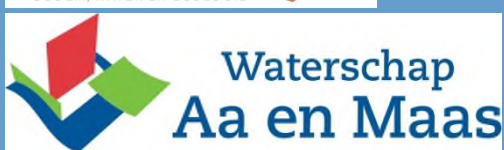
KWR 2017.095 | December 2017

Monitoring van vismigratie met eDNA



BASECLEAR

FOR 100% DNA RESULTS



Monitoring van vismigratie met eDNA

KWR 2017.095 | December 2017

Opdrachtnummer

401350

Projectmanager

Ton van Leerdam

Kwaliteitsborger(s)

Edwin Kardinaal & Gertjan Medema

Auteur(s)

Michiel Hootsmans, Marloes van der Kamp, Bart Wullings, Guido Atsma, Rob Gubbels, Matthijs Koole, Harry Tolkamp & Tom van den Bogert

Verzonden aan

ATKB, BaseClear, Waterschap Aa & Maas, Waterschap Brabantse Delta, Waterschap Limburg, Witteveen+Bos

Dit onderzoek is uitgevoerd in samenwerking met ATKB, BaseClear, de waterschappen Aa & Maas, Brabantse Delta en Limburg, en Witteveen+Bos. Deze activiteit is mede gefinancierd met PPS-financiering uit de Toeslag voor Topconsortia voor Kennis en Innovatie (TKI's) van het ministerie van Economische Zaken en Klimaat en de resultaten zijn openbaar.



Jaar van publicatie
2017

Meer informatie

dr.ir. Michiel Hootsmans
T (030) 6069 648
E michiel.hootsmans@kwrwater.nl

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511
F +31 (0)30 60 61 165
E info@kwrwater.nl
I www.kwrwater.nl

KWR Watercycle
Research
Institute

KWR 2017.095 | December 2017 © KWR

Alle rechten voorbehouden.
Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enig andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever.

Samenvatting

Monitoring van vismigratie met eDNA: een kansrijke benadering

Waterbeheerders moeten periodiek de toestand van hun visbestand bepalen voor de Europese Kaderrichtlijn Water (KRW). Afhankelijk van het watertype bepalen ze, naast de soortensamenstelling, ook de dichtheid van vissoorten in aantallen of biomassa. Nieuwe methoden die zich richten op de aanwezigheid van eDNA zijn een goedkoop, diervriendelijk en mogelijk ook betrouwbaarder alternatief ten opzichte van traditionele visstandbemonstering voor de bepaling van de soortensamenstelling.

Voor monitoring van de soortensamenstelling van een vispopulatie is een nieuwe publiek beschikbare eDNA metabarcoding ontwikkeld, de NL-Vispopulatiescan. De methode is in het laboratorium gevalideerd en in de praktijk getoetst, en er is een waterbemonsteringsprotocol opgesteld. De resultaten uit het onderzoek laten zien dat in de geanalyseerde wateren waar voldoende DNA kon worden geëxtraheerd, met deze metabarcoding een grote diversiteit aan vissoorten wordt aangetoond. De eveneens toegepaste inzet van qPCR om enkele doelsoorten te detecteren geeft een beeld van de kwantitatieve verspreiding van eDNA van de populaties van deze soorten. Ze is daarmee in potentie een interessante aanpak om snel een indruk te krijgen van mogelijke migratiebelemmeringen en van belangrijke concentratiegebieden. De toegepaste eDNA extractiemethode middels precipitatie in het veld bleek nog niet in alle onderzochte watermonsters in staat om voldoende eDNA te concentreren. Vooralsnog is het gebruik van een labfiltratie stap robuuster.

Belang: Om de ecologische kwaliteit van Europese wateren op orde te krijgen, moeten waterbeherende instanties omvangrijke maatregelenpakketten implementeren. Voor vispopulaties is onder meer een ongehinderd ruimtelijk gebruik nodig van het habitat. De effectiviteit van de grote diversiteit aan gekozen oplossingen voor een vrije vismigratie wordt beperkt gemonitord. Traditionele visvangsttechnieken zijn tamelijk kostbaar en tijdrovend, en geven niet altijd een goed beeld van het feitelijk gebruik door doelsoorten van stroomgebieden en vispassages. Er bestaat dan ook een belangrijke behoefte aan een snelle, kwalitatieve en kwantitatieve methode om de verspreiding en migratie van vispopulaties, en de effectiviteit van vispassages te monitoren en te beoordelen. De in dit onderzoek beoogde toepassing van eDNA voor de monitoring van vismigratie kan worden gezien als een quick scan methode om een ruimtelijk dekkend beeld te verkrijgen van de verspreiding van vispopulaties in een stroomgebied tegen relatief beperkte kosten.

Aanpak: Het hoofddoel van het project was de ontwikkeling en toetsing in een pilot van een publiek beschikbaar, niet-gepatenteerd vismonitoringsysteem gebaseerd op eDNA. Daarmee moet de soortensamenstelling en verspreiding van vispopulaties in een stroomgebied kunnen worden vastgesteld. Mogelijk kan met gegevens over eDNA abundantie worden beoordeeld in welke mate vispopulaties worden belemmerd bij hun stroomopwaartse migratie langs beken en rivieren. De hiervoor benodigde werkzaamheden hebben zich afgespeeld binnen de volgende drie onderzoekslijnen:

- Ontwikkeling en toetsing van een eDNA metabarcoding techniek om de soortensamenstelling en verspreiding van vissoorten in een of meer stroomgebieden te bepalen.

- Ontwikkeling en toetsing van kwantitatieve eDNA detectie om mogelijke migratie belemmeringen te identificeren.
- Inventarisatie van de kwantitatieve verspreiding van enkele soorten met qPCR.

Resultaten: De analyse van diverse kunstmatig samengestelde mock visgemeenschappen wijst uit dat de NL-Vispopulatiescan reproduceerbaar is met een lage detectiegrens en daarmee een groot onderscheidend vermogen heeft. De NL-Vispopulatiescan geeft in de onderzochte systemen een belangrijk aanvullend beeld van de aanwezige diversiteit aan soorten ten opzichte van de KRW visstandbemonstering. Er worden met deze aanpak meestal meer soorten gedetecteerd, maar soms ook enkele soorten gemist.

De eDNA detectie met qPCR lijkt een instrument waarvoor nader onderzoek zinvol is naar haar toepasbaarheid als middel om de verspreiding van gewenste en ongewenste soorten in beeld te brengen. Het voordeel ten opzichte van een kwalitatieve metabarcoding analyse is dat met qPCR gegevens ook een tussen locaties te vergelijken kwantitatief beeld van de hoeveelheid eDNA in ruimte en tijd kan worden verkregen. Een directe vergelijking tussen aantallen DNA kopieën en aantallen individuen en biomassa gegevens is door het ontbreken van bruikbare onderzoeksresultaten vooralsnog niet mogelijk. Onduidelijk is bijvoorbeeld in hoeverre de hoeveelheid afgescheiden DNA materiaal wordt beïnvloed door de grootte van een individu en of het soortafhankelijk is. De resultaten van de toepassing van qPCR detectie van enkele doelsoorten ondersteunen echter de veronderstelling dat met deze methode een indicatie kan worden verkregen van mogelijke belemmeringen voor vismigratie in termen van hoeveelheden eDNA. Ook lijken hiermee de voor doelsoorten belangrijke deelgebieden in een watersysteem relatief snel en met beperkte inzet van menskracht te kunnen worden verkend.

De gebruikte eDNA extractiemethode middels precipitatie in het veld blijkt in sommige wateren gevoelig voor verstoringen. De oorzaak hiervan is nog niet achterhaald, maar vooralsnog is het gebruik van een labfiltratie stap robuuster. Verder is bij (zeer) lage visdichtheden naar verwachting ook maar weinig eDNA aanwezig, en dan voornamelijk in de directe omgeving van de betreffende vissen. Net zoals bij iedere bemonsteringsmethode speelt daarmee ook de trefkans van het betreffende eDNA een belangrijke rol, en kunnen soorten worden gemist. De geconstateerde variatie tussen qPCR replica monsters was meestal tamelijk beperkt. De ontwikkelde bemonsteringsprocedure voor qPCR lijkt dan ook voldoende representatief te zijn geweest.

Conclusies en aanbevelingen: Ten opzichte van een reguliere KRW visstandbemonstering geeft een eDNA analyse met de NL-Vispopulatiescan goede aanvullende informatie over soortensamenstelling. Voor routinematige toepassing van eDNA detectiemethoden is behoefte aan een landelijke richtlijn waarin criteria worden vastgelegd waaraan een dergelijke methode moet voldoen. Het verdient aanbeveling om in elke metabarcoding analyse een mock test mee te nemen.

Vervolgonderzoek is nodig om de mogelijke oorzaak te achterhalen van het soms opgetreden eDNA extractieprobleem bij een veldprecipitatie. Vooralsnog wordt het gebruik van een labfiltratie stap aangeraden. Verder wordt op grond van de geconstateerde variatie tussen qPCR replica monsters een benodigde replicatie aanbevolen van 3-5 monsters. Dit aantal wordt hoger naarmate een kleiner verschil ten opzichte van een gemiddelde moet kunnen worden vastgesteld.

Het tijdens trekperioden frequent toepassen van qPCR bepalingen rond een mogelijke belemmering voor vismigratie kan meer inzicht verschaffen in de potentie van deze techniek

om de noodzaak of effectiviteit van een vispassage snel in beeld te brengen. Dat geldt ook voor de inzet van een quick-scan met qPCR analyses om daarmee relatief snel en gebiedsdekkend te bepalen welke locaties bijzonder interessant lijken voor een doelsoort. Belangrijk aandachtspunt bij de inzet van qPCR is de interpretatie van het signaal: het aantal DNA kopieën is vooralsnog niet direct te relateren aan aantallen of biomassa's van vispopulaties.

Om de toepasbaarheid en het vertrouwen rondom de inzet van eDNA gebaseerde detectie te vergroten, is de verdere uitbouw gewenst van de in het project ontwikkelde landelijke DNA sequentie database zodat voor iedere soort meerdere replica sequenties beschikbaar zijn. Daarmee kan ook beter worden vastgesteld in hoeverre diverse eDNA methodes onderling vergelijkbaar zijn, en wat optimale toepassingsgebieden zijn.

Dit onderzoek is uitgevoerd in samenwerking met ATKB, BaseClear, de waterschappen Aa & Maas, Brabantse Delta en Limburg, en Witteveen+Bos. Deze activiteit is mede gefinancierd met PPS-financiering uit de Toeslag voor Topconsortia voor Kennis en Innovatie (TKI's) van het ministerie van Economische Zaken en Klimaat en de resultaten zijn openbaar.

Inhoud

1	Inleiding	7
1.1	Aanleiding	7
1.2	Projectdoelstellingen	7
1.3	Projectgroep en samenwerking	8
1.4	Leeswijzer	8
2	eDNA methode ontwikkeling	10
2.1	Inleiding	10
2.2	Ontwikkeling en validatie DNA metabarcoding voor Nederlandse vissoorten	10
2.3	Ontwikkeling en validatie qPCR markers voor geselecteerde soorten	17
3	Onderzoeksopzet	22
3.1	Onderzoeksgebieden en bemonsteringslocaties	22
3.2	Monsternamen en conservering	30
4	Resultaten	33
4.1	Verspreiding van vissoorten in diverse stroomgebieden (metabarcoding)	33
4.2	Identificatie van mogelijke migratiebelemmeringen met qPCR	53
4.3	Kwantitatieve verspreiding van geselecteerde soorten	54
4.4	Schatting van benodigde aantal replica qPCR monsters	58
5	Algemene discussie, conclusies en aanbevelingen	60
5.1	Inleiding	60
5.2	Methode ontwikkeling eDNA metabarcoding en qPCR	60
5.3	Bevindingen met de NL-Vispopulatiescan	62
5.4	Bevindingen met de qPCR methode	63
5.5	Conclusies	64
5.6	Aanbevelingen	65
6	Referenties	66
	Bijlage I Procedure voor de bemonstering van water ten behoeve van de detectie van vissen met behulp van eDNA analyse	67
	Bijlage II Percentage eDNA sequenties (metabarcoding) en eDNA concentraties (qPCR) van alle monsters	72

Bijlage III Primerinformatie metabarcoding	80
Bijlage IV KRW bemonsterings gegevens 2016	81
• De Roer	82
• Dieze en Aa	84
• Beken ten zuiden van Breda	85
• Mark-Vliet	86
Bijlage V Lineaire verbanden tussen soortaandeel in eDNA en aandeel in biomassa of aantal	87

1 Inleiding

1.1 Aanleiding

Om de ecologische kwaliteit van Europese wateren op orde te krijgen, moeten waterbeherende instanties omvangrijke maatregelpakketten implementeren. Daarmee kunnen ze voldoen aan de vereisten die worden gesteld door de Habitatrichtlijn en met name de Europese Kaderrichtlijn Water (KRW). Voor vispopulaties is onder meer een ongehinderd ruimtelijk gebruik nodig van het habitat. Daarbij is de connectiviteit van belang en dus de passeerbaarheid van de vele stuwen, gemalen, sluizen en waterkrachtcentrales die een belemmering kunnen vormen voor vismigratie, bijvoorbeeld van en naar paaigebieden en tussen gebieden voor opgroei en overwintering. De effectiviteit van de grote diversiteit aan gekozen oplossingen voor een vrije vismigratie wordt beperkt gemonitord. Traditionele visvangsttechnieken zijn tamelijk kostbaar en tijdrovend, en geven niet altijd een goed beeld van het feitelijk gebruik door doelsoorten van stroomgebieden en vispassages. Er bestaat dan ook behoefte aan een snelle, kwalitatieve en kwantitatieve methode om de verspreiding en migratie van vispopulaties, en de effectiviteit van vispassages te monitoren en te beoordelen.

Het benutten van eDNA informatie over vispopulaties gebaseerd op eDNA detectie en eDNA kwantificering in stromende wateren is een relatief nieuwe ontwikkeling. De in dit onderzoek beoogde toepassing van eDNA voor de monitoring van vismigratie kan worden gezien als een quick scan methode om een ruimtelijk dekkend beeld te verkrijgen van de soortensamenstelling en hiermee de verspreiding van vispopulaties in een stroomgebied tegen relatief beperkte kosten. Een belangrijke toetsing ligt in het vergelijken van de kwalitatieve en kwantitatieve eDNA signalen met de door middel van directe bevissingen verkregen informatie. Daarbij moet worden opgemerkt dat het aantal DNA kopieën in een watermonster vooralsnog niet direct is te relateren aan aantallen of biomassa's van vispopulaties.

De beoogde nieuwe monitoring technologie heeft in principe een brede toepasbaarheid in Nederland en ook ver daar buiten. Dat komt onder meer omdat de KRW vereisten in de gehele EU gelden. Van de ongeveer 3000 prioritaire vismigratieknelpunten in Nederland is momenteel pas 1/3 voorzien van een vispassage. Daarvan is zo'n 20% gemonitord (Wanningen *et al*, 2012). Eindgebruikers en adviesbureaus kunnen met een eDNA quick scan de soortensamenstelling van vispopulaties en de effectiviteit van maatregelen gericht op het faciliteren van vismigratie goed beoordelen en verbeteren. Beslissingen tot een meer gedetailleerde monitoring en voor mogelijk noodzakelijke aanvullende investeringen kunnen beter worden onderbouwd. Met een mede door dit TKI project gerealiseerd portfolio van toepassingen in Nederland kunnen aanbieders van eDNA detectiemethoden hun marktkansen in binnen- en buitenland vergroten.

1.2 Projectdoelstellingen

Het hoofddoel van het project is de ontwikkeling en toetsing in een pilot van een publiek beschikbaar, niet-gepatenteerd vismonitoringsysteem gebaseerd op eDNA. Daarmee moet in ieder geval de soortensamenstelling en verspreiding van vispopulaties in een stroomgebied kunnen worden vastgesteld. Mogelijk kan met gegevens over eDNA abundantie ook worden beoordeeld in welke mate vispopulaties worden belemmerd bij hun stroomopwaartse migratie langs beken en rivieren. Met een dergelijke eDNA quick-scan kan uiteindelijk een

beeld worden verkregen van vismigratiepatronen in ruimte en tijd in stroomgebieden, en wordt inzicht in de effectiviteit van maatregelen vergroot.

De hiervoor benodigde werkzaamheden hebben zich afgespeeld binnen de volgende drie onderzoekslijnen:

- *Ontwikkeling en toetsing van een eDNA metabarcoding techniek om de soortensamenstelling en verspreiding van vissoorten in een of meer stroomgebieden te bepalen.* Hoe verandert het voorkomen van vispopulaties in een stroomgebied in de tijd en in de ruimte (denk bijvoorbeeld aan opgroei, voortplanting)? Met behulp van een nieuw te ontwikkelen metabarcoding techniek (NGS) kunnen dergelijke vragen worden beantwoord.
- *Ontwikkeling en toetsing van kwantitatieve eDNA detectie om mogelijke migratie belemmeringen te identificeren.* In hoeverre biedt een vispassage een afdoende oplossing voor de passeerbaarheid? Hierbij wordt de potentie bestudeerd van de inzet van de zogenaamde qPCR methodiek waarmee kwantitatief en gevoelig voor een beperkt aantal doelsoorten kan worden onderzocht of hun verspreiding in termen van eDNA abundantie al of niet wordt belemmerd door bijvoorbeeld een stuw.
- *Inventarisatie van de kwantitatieve verspreiding van enkele soorten met qPCR.* Waar houden vissoorten zich vooral op in een systeem zoals de Roer? Hoe verspreiden gewenste en ongewenste soorten (zoals uitheemse grondels) zich over bijvoorbeeld het Mark stroomgebied? Ook hier is onderzocht welke informatie hierover in termen van eDNA abundantie door de inzet van qPCR kan worden verzameld.

1.3 Projectgroep en samenwerking

Dit project is uitgevoerd als samenwerking tussen ATKB, BaseClear, Waterschap Aa & Maas, Waterschap Brabantse Delta, Waterschap Limburg (vh. Roer & Overmaas), Witteveen+Bos en KWR Watercycle Research Institute. De deelnemende waterschappen hadden en hebben als eindgebruikers behoefte aan een betrouwbare, kosteneffectieve monitoring methodiek voor de verspreiding van vispopulaties bij het formuleren en uitvoeren van hun waterbeheer. Witteveen+Bos en ATKB, gerenommeerde adviseurs op het gebied van visecologie en uitvoerders en coördinatoren van vismonitoring, zagen in dit project een kans om hun adviesmogelijkheden te verbreden. KWR en Baseclear konden zo hun portfolio van kennis en advisering over geavanceerde op eDNA gebaseerde detectie en monitoring in waterketen en watersysteem vergroten.

De projectgroep bestond uit:

- Igor Spierts (tot 16/5/17), Matthijs Koole (vanaf 16/5/17) (ATKB)
- Tom van den Bogert (BaseClear)
- Guido Atsma (Waterschap Aa & Maas)
- Marco Beers (Waterschap Brabantse Delta)
- Rob Gubbels, Harry Tolkamp (Waterschap Limburg)
- Tim Puts (tot 1/7/17), Marloes van der Kamp (vanaf 1/7/17), Witteveen+Bos
- Michiel Hootsmans, Ton van Leerdam, Bart Wullings (KWR Watercycle Research Institute)

1.4 Leeswijzer

In Hoofdstuk 2 wordt ingegaan op de ontwikkeling en validatie van een nieuwe eDNA metabarcoding methode, de NL-Vispopulatiescan. Ook wordt aandacht besteed aan de realisatie en validatie van de diverse qPCR markers voor geselecteerde doelsoorten.

In Hoofdstuk 3 worden de diverse onderzoeksgebieden bij de drie deelnemende waterschappen beschreven, evenals de gehanteerde bemonsteringsprocedure.

In Hoofdstuk 4 worden de resultaten van de diverse eDNA analyses in samenhang beschreven met resultaten afkomstig van beschikbare KRW visstandbemonsteringen. De resultaten van de diverse metabarcoding analyses worden behandeld in hoofdstuk 4.1, gevolgd door de resultaten voor diverse qPCR analyses: bij de ECI stuw in de Roer (4.2) en in de Roer en in de Mark en Vliet (4.3). Ook wordt hier in 4.4 aandacht besteed aan het aantal benodigde replica qPCR monsters.

In Hoofdstuk 5 worden de bevindingen besproken en worden conclusies en aanbevelingen gepresenteerd.

2 eDNA methode ontwikkeling

2.1 Inleiding

Het met eDNA analyseren van enerzijds de verspreiding van vissoorten in een stroomgebied en anderzijds de kwantitatieve detectie van specifieke vissoorten vraagt om toepassing van verschillende op eDNA detectie gebaseerde methodieken. Voor analyse van de voorkomende vissen in een stroomgebied is een metabarcoding methodiek ontwikkeld waarbij het aanwezige eDNA in een watermonster is geanalyseerd op de aanwezigheid van DNA van vissen met behulp van geavanceerde DNA sequentie analyse. Soortspecifieke detectie en kwantificering van het eDNA van geselecteerde vissoorten is uitgevoerd met een DNA-detectiemethode op basis van qPCR. Voor elke gekozen vissoort is daarbij een specifieke methode ontwikkeld op basis van selectieve primers.

De eDNA methodiek is gebaseerd op het identificeren van DNA sporen die levende organismen achterlaten in het milieu. De grootste bron van eDNA van vissen in het water is afkomstig van uitwerpselen, slijm en huid of schubben. Deze DNA sporen verspreiden zich in het water en worden langzaam en afhankelijk van onder andere de watertemperatuur afgebroken. In stilstaand water zal DNA zich maar weinig verplaatsen, maar in stromend water zal het zich verspreiden en zo verder verdunnen. Om het aanwezige eDNA van alle vissoorten in een watermonster te “vangen” is net als voor iedere monitoringmethode een goede bemonsteringsstrategie noodzakelijk (zie voor de in dit project ontwikkelde aanpak paragraaf 3.2.2 en Bijlage 1).

2.2 Ontwikkeling en validatie DNA metabarcoding voor Nederlandse vissoorten

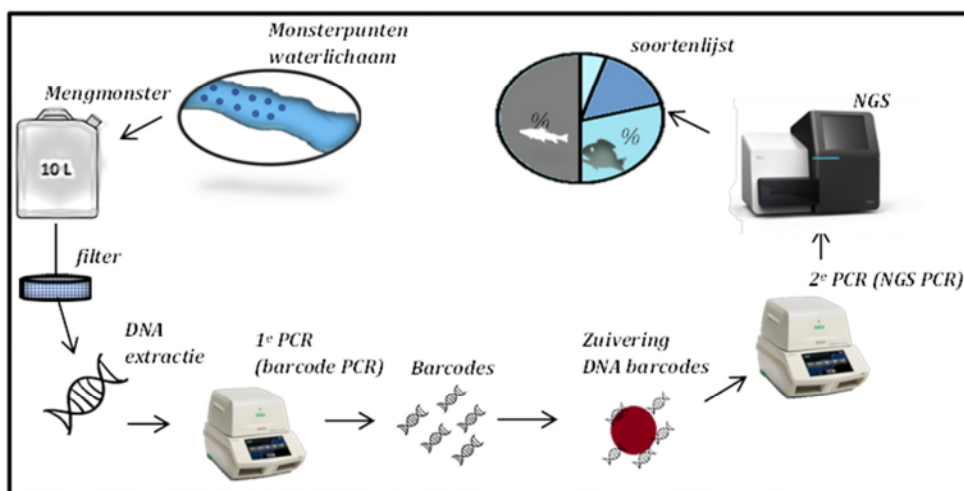
2.2.1 Inleiding

Met de metabarcoding analyse worden de aanwezige vissoorten geïdentificeerd op basis van hun unieke DNA code. Het DNA van elk organisme bevat geconserveerde delen waarvan de DNA volgorde van de nucleotiden overeenkomend is met verwante of minder verwante soorten. Het bevat ook variabele delen die juist veel verschillen. Deze maken uiteindelijk elke soort, en zelfs elk organisme uniek. De overeenkomsten worden ingezet om een DNA-fragment te selecteren dat voorkomt in alle te onderscheiden vissoorten. Anderzijds worden de bijbehorende soortspecifieke verschillen die op dit fragment liggen bepaald om zo de vissoorten te onderscheiden (de soortspecifieke barcode). In een metabarcoding analyse wordt dit DNA fragment selectief uit het gezuiverde DNA vermenigvuldigd met behulp van de PCR techniek en twee korte specifieke PCR primers. In dit onderzoek is een voor dit doel niet eerder toegepast DNA-fragment geselecteerd. Er zijn nieuwe primers ontworpen en gevalideerd en de methodiek is verder geoptimaliseerd (zie Figuur 2-1).

De ontwikkeling van de metabarcoding methodiek is onder te verdelen in verschillende stappen:

1. Selectie van een gen/regio/DNA fragment geschikt voor metabarcoding van vissen
2. Ontwerp van specifieke primers voor vermenigvuldiging van het geselecteerde DNA fragment bij alle Nederlandse vissoorten (*in silico*, dus in de computer berekend)
3. Optimalisatie en validatie van de metabarcoding PCR voor zogenaamde next generation sequencing (NGS; *in vitro*, dus uitgetest in het laboratorium)

4. Ontwikkeling van een zogenaamde mock gemeenschap met zuiver soortspecifiek DNA in het laboratorium
5. Ontwikkeling van een referentiedatabase met visbarcodes
6. Veldexperiment
7. Ontwikkeling en validatie van een methodiek voor analyse van NGS resultaten



FIGUUR 2-1. SCHEMATISCHE WEERGAVE VAN DE METABARCODING METHODIEK

2.2.2 Ontwikkeling (*in silico* en *in vitro*, stap 1-3)

Voor de selectie van een gen en DNA regio welke geschikt is voor metabarcoding en ontwerp van specifieke primers zijn bij aanvang 12S rRNA gen, 16S rRNA gen en cytochroom b gen-sequenties verzameld van alle 75 Nederlandse zoetwatervissen uit de database van het National Center of Biotechnology Information (NCBI). De sequenties zijn vervolgens geanalyseerd met specialistische software (Bionumerics). Er is gezocht of er op de genen een regio voorkomt waarin aan weerszijden geconserveerde regio's aanwezig zijn voor het ontwerp van "universele" visprimers en waarbij tussen de geconserveerde regio's een (hyper)variabel deel bestaat waarmee de voorkomende vissoorten kunnen worden onderscheiden.

Het cytochroom b gen bleek ongeschikt vanwege een te grote DNA-sequentie variëteit waardoor het niet mogelijk bleek om universele primers te ontwerpen. Het 12S rRNA gen is een vrij kort gen met dus een relatief korte DNA-sequentie waarvan een potentieel geschikte regio reeds is gepatenteerd voor metabarcoding toepassing. Daardoor viel het verder af voor dit onderzoek. Uiteindelijk bleek op het 16S rRNA gen een korte DNA regio aanwezig te zijn van ongeveer 110 nucleotiden welke voldeed aan de gestelde criteria (mitochondriaal DNA, regio 42' tot 45' van het 16S rRNA gen van vissen (Satoh *et al.*, 2016). Dit DNA fragment was potentieel zeer geschikt voor ontwerp van een metabarcoding methodiek door de aanwezigheid van geconserveerde flanken en een zeer variabele tussenliggende regio die als barcode kan dienen.

Voor een optimale en gelijksoortige vermenigvuldiging van elk mogelijk aanwezig vis DNA is de keuze gemaakt om voor elke visfamilie een primer te ontwerpen die exact past. Het bleek daarbij mogelijk om voor sommige families dezelfde primer toe te passen. Daar komt bij dat de primers vaak onderling maar een of enkele nucleotiden verschillen. Uiteindelijk zijn er 9 verschillende primers ontwikkeld die in 8 paren het DNA van alle in Nederland voorkomende zoetwatervissen optimaal amplificeren (zie Tabel 2-1 en Bijlage 3).

TABEL 2-1. SPECIFIEKE METABARCODING PRIMERS VOOR DETECTIE VAN DE VERSCHILLENDE NEDERLANDSE ZOETWATERVISSEN (FAMILIES).

Primerpaar	Doelfamilie(s)
F1 + R2	Baarzen
F2 + R1	Karpers, BERPJE, Modderkruipers, Zonnebaars
F3 + R2	Harders, Stekelbaarzen, Tandkarper (gup), grondels (invasieve), Donderpadden en Zalmen en Forellen
F3 + R1	Snoeken, Hondsvissen, Spiering, Alen, Haringen
F4 + R2	Kwabaal
F2 + R3	(Dwerg)Meerval
F3 + R5	Steuren
F4 + R4	Prikken

Deze 8 verschillende ontworpen primerparen zijn vervolgens individueel getest met een SYBR green gradiënt PCR. De temperatuurgadiënt werd ingesteld op 55 tot 70°C. Deze experimenten langs een temperatuurgadiënt hebben tot doel om de volgende zaken te bepalen: (1) de optimale annealing temperatuur waarbij de PCR plaatsvindt, (2) de selectiviteit (wordt alleen de doelsoort gedetecteerd in een matrix van verwante soorten), (3) de specificiteit (worden alle doelsoorten betrouwbaar gedetecteerd) en (4) de mogelijke vorming van aspecifieke DNA producten. De opzet van een experiment wordt weergegeven in Tabel 2-2. In een analyse kunnen in totaal 96 DNA monsters worden verwerkt. Er is hier gekozen voor een indeling van 8 temperaturen en 12 verschillend samengestelde monsters per temperatuur. Per experiment is horizontaal het DNA van 7 verschillende vissoorten toegevoegd: Baars, Karper, Driedoornige stekelbaars, Snoek, Kwabaal, Europese meerval en Beekprik (in de tabel aangeduid met de codes A tot en met G). Deze vissoorten vertegenwoordigen elk een visfamilie die geamplificeerd wordt door een specifiek primerpaar. Het DNA van drie van de soorten Bruine kikker, Kleine watersalamander, Heikikker en Kamsalamander is ook toegevoegd aan elk experiment als negatieve controlegroep om te bepalen of de primers voldoende specifiek zijn. Vervolgens is er ook

TABEL 2-2. SCHEMATISCHE WEERGAVE VAN ONTWERP VAN PCR-EXPERIMENTEN VOOR OPTIMALISATIE VAN PCR-PRIMERS

12*8 well plaat	Doelsoort primer		1 primer verschillend ¹		2 primers verschillend ¹			Negatieve controlegroep (salamander e.d.)			Negatieve controle	
Temp. gradiënt	Vis A	Vis B	Vis C	Vis D	Vis E	Vis F	Vis G	Dier A	Dier B	Dier C	water	water
70												
62												
62												
55												

1, DNA van vissen waarvoor respectievelijk optimaal één of twee andere primers zijn ontworpen

een negatieve controle meegenomen met DNA-vrij water. Verticaal in Tabel 2-2 is in de 8 beschikbare welletjes op de analyse plaat eenzelfde DNA-concentratie toegevoegd per temperatuurniveau van de gradiënt.

De resultaten van de PCR-experimenten van alle verschillende vissoorten, primerparen en de annealing temperatuur zijn vervolgens vergeleken en geanalyseerd (Van der Pouw Kraan, 2016). Op deze manier is er vastgesteld hoe efficiënt elk primerpaar de doelsequentie van de verschillende vissoorten amplificeert. In een volgende fase van het onderzoek zijn de primers in PCR-experimenten samengevoegd om te testen hoe efficiënt een combinatie van primerparen de verschillende vis-DNA barcodes kan amplificeren. Voor dit experiment is hetzelfde DNA, mastermix en protocol gebruikt als bij de testen voor individuele primerparen. In het laatste experiment zijn alle negen primers toegevoegd aan één PCR mastermix. In alle experimenten is vanzelfsprekend ook een negatieve controle meegenomen bestaande uit DNA-vrij water.

Op basis van de verschillende experimenten is geconcludeerd dat de gekozen combinatie van primers zeer goed in staat is de verschillende visfamilies op een efficiënte en gelijke wijze te vermenigvuldigen (Van der Pouw Kraan, 2016). Alleen primer R5 bleek niet te voldoen aan de criteria waardoor het noodzakelijk is voor detectie van de Steuren in vervolgonderzoek een nieuwe primer te ontwerpen en te valideren.

De optimale annealing temperatuur voor de metabarcoding PCR met de gecombineerde primers is 60°C. Op basis van het validatieonderzoek is de specificiteit van de afzonderlijke primerparen en het mengsel van primers zeer goed. In de mock test (zie hierna in paragraaf 2.2.3) is dit verder onderzocht. Ook de selectiviteit van de primerparen is voldoende (Van der Pouw Kraan, 2016). Er wordt incidenteel een DNA fragment op basis van het DNA van de negatieve controlegroep vermenigvuldigd (Bruine kikker, Kleine watersalamander, etc.) maar dit gebeurt alleen bij een zeer hoog aantal DNA kopieën. Deze aantallen zullen in de praktijk niet voorkomen. Daarnaast worden in een metabarcoding analyse de DNA fragmenten afzonderlijk geïdentificeerd waarbij dus eventuele sequenties van deze diersoorten alsnog afvallen.

2.2.3 Ontwikkeling van een mock gemeenschap (stap 4)

Voor het bepalen van de betrouwbaarheid, gevoeligheid en eventueel optreden van fouten in de metabarcoding analyse is een controlemonster of referentiemonster ontwikkeld dat in elke analyse additioneel wordt geanalyseerd. Dit referentiemonster bestaat uit een mengsel van DNA afkomstig van 16 verschillende vissoorten (Tabel 2-3). Dit wordt een mock gemeenschap genoemd (mock betekend letterlijk nep/onecht). Dit extra monster geeft inzicht in het verloop van de hele procedure van DNA vermenigvuldiging met de (NGS-) primers, NGS analyse en identificatie van de DNA sequenties.

Bij het samenstellen van de mock gemeenschap is er naar gestreefd om voor elke vissoort een equimolaire concentratie toe te voegen. Dat betekent dat van elke vissoort evenveel DNA fragmenten worden toegevoegd. Het DNA van de verschillende vissoorten is verzameld door middel van een huid/slijm swab. Met behulp van een DNA extractiekit is het DNA hieruit geëxtraheerd. Vervolgens is het DNA zeer nauwkeurig gekwantificeerd met behulp van een zogenoemd 'droplet' of 'digitaal' PCR experiment. Dit is een "PCR 2.0" waarbij de PCR mix wordt verdeeld over 20.000 druppeltjes. Elk druppeltje wordt vervolgens geanalyseerd op de aanwezigheid van het specifieke PCR-product. Het DNA van de verschillende vissoorten is op basis van deze informatie verdund, samengevoegd en uitgevuld in verschillende buisjes om te gebruiken in volgende experimenten.

TABEL 2-3. SAMENSTELLING VAN DE MOCK GEMEENSCHAP, MET HET GEBRUIKTE AANTAL DNA KOPIEËN PER PCR.

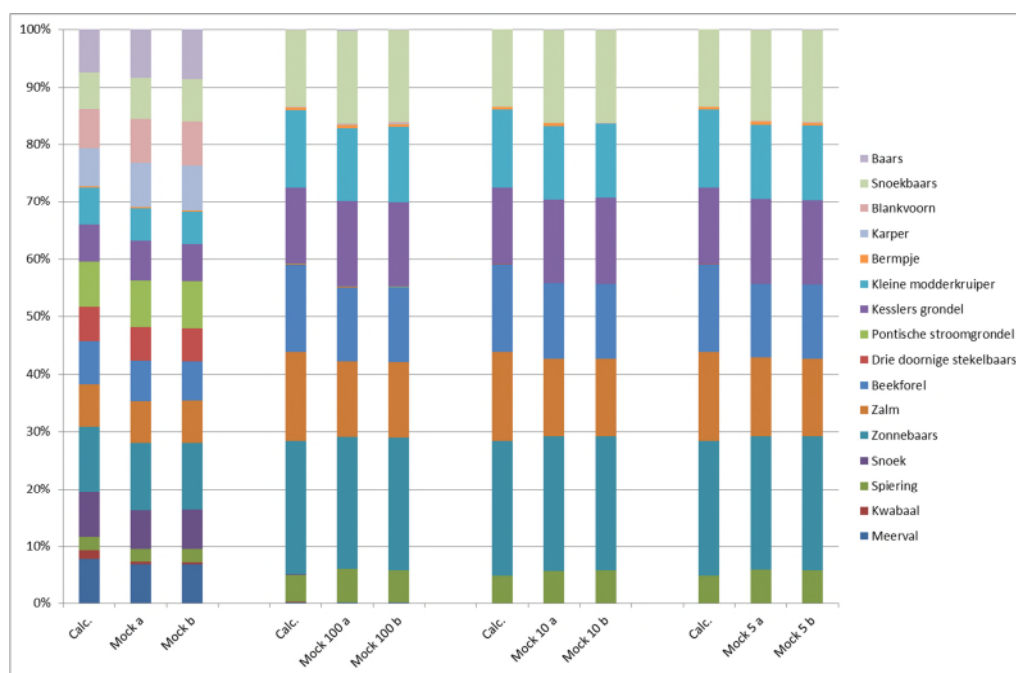
Familie	Soort	Primerpaar	DNA kopieën
Baarzen	Baars	F1+R2	1,62*10 ⁴
	Snoekbaars	F1+R2	1,40*10 ⁴
Karpers	Blankvoorn	F2+R1	1,48*10 ⁴
	Karper	F2+R1	1,44*10 ⁴
Modderkruipers en Bermpjes	Bermpje	F2-R1	6,13*10 ²
	Kleine modderkruiper	F2-R1	1,42*10 ⁴
Grondels	Kesslers grondel	F3+R2	1,40*10 ⁴
	Pontische stroomgrondel	F3+R2	1,72*10 ⁴
Stekelbaarzen	Driedoornige stekelbaars	F3+R2	1,30*10 ⁴
Zalmen en forellen	Beekforel	F3+R2	1,60*10 ⁴
	Zalm	F3+R2	1,63*10 ⁴
Zonnebaarzen	Zonnebaars	F3+R2	2,46*10 ⁴
Snoeken	Snoek	F3+R1	1,73*10 ⁴
Spiering	Spiering	F3+R1	5,12*10 ³
Kwabalen	Kwabaal	F4+R2	3,17*10 ³
Meervallen	Meerval	F2+R3	1,71*10 ⁴

Tijdens de validatie van de methode is tevens de gevoeligheid van de metabarcoding geanalyseerd door het DNA van verschillende vissoorten in de mock test in zeer lage concentratie toe te voegen (Tabel 2-4 en Figuur 2-2). Hiervoor zijn drie aangepaste mock gemeenschappen samengesteld waarin telkens van acht vissoorten een veel lager DNA kopie aantal is toegevoegd (Baars, Blankvoorn, Karper, Pontische stroomgrondel, Driedoornige stekelbaars, Snoek, Kwabaal en Meerval). In de aangepaste mock gemeenschappen zijn respectievelijk 100 DNA-kopieën (mock 100), 10 kopieën (mock 10) en 5 kopieën (mock 5) van deze vissoorten toegevoegd in het resulterende monster. Van de overige vissoorten is het aantal DNA fragmenten in elke mock gelijk. Hoewel hun absolute aantal DNA-kopieën in de vier mock gemeenschappen gelijk is gebleven verandert hun bijbehorende aandeel (percentage) in het monster natuurlijk wel. In de kolom “calc.” (Tabel 2-4) is het percentage DNA kopieën weergegeven ten opzichte van het totaal aantal DNA fragmenten in de mock gemeenschap. De metabarcoding analyse van de mock monsters is in duplo uitgevoerd (twee monsters van iedere mock gemeenschap). Uit de resultaten van de mock monsters blijkt dat alle vissoorten worden gedetecteerd en ook het percentage geïdentificeerde DNA fragmenten komt zeer goed overeen met de samenstelling op basis van de nauwkeurige kwantificering met behulp van de droplet PCR. Ook “sporen” van 10 DNA kopieën zijn bij alle monsters gedetecteerd en zelfs vrijwel alle 5 DNA kopie monsters waren positief (ondanks een aandeel < 0.01%).

Het percentage DNA sequenties per vissoort is zeer overeenkomend tussen de twee replica mock monsters in elk van de vier experimenten. Het absolute verschil tussen beide replica's is maximaal 0,5%, ofwel maximaal 8% als percentage van hun gemiddelde (Kessler's grondel). De reproduceerbaarheid van de metabarcoding experimenten op basis van de mock gemeenschap is daarom als goed beoordeeld. Van enkele vissoorten is het percentage DNA sequenties enigszins verschillend van wat op basis van de droplet PCR werd verwacht.

TABEL 2-4. AANWEZIGHEID VAN DE VISSSEN IN DE MOCK GEMEENSCHAP UITGEDRUKT ALS PERCENTAGE DNA SEQUENTIES TEN OPZICHTE VAN HET TOTAAL OP BASIS VAN BEREKENING MET DROPLET PCR (CALC.) EN NEXT GENERATION SEQUENCING (A EN B). IN DE MONSTERS 'MOCK 100', 'MOCK 10' EN 'MOCK 5' ZIJN VAN DE ACHT CURSIEF GEDRUKTE SOORTEN RESPECTIEVELIJK 100, 10 EN 5 KOPIEËN TOEGEVOEGD IN HET BETREFFENDE MOCK MONSTER.

Soort	Mock			Mock 100			Mock 10			Mock 5		
	Calc.	a	b	Calc.	a	b	Calc.	a	b	Calc.	a	b
Baars	7,44	8,41	8,58	0,09	0,20	0,15	0,01	0,07	0,09	0,00	0,06	0,08
Snoekbaars	6,41	7,13	7,48	13,23	16,18	16,00	13,32	16,17	16,20	13,33	15,90	16,08
Blankvoorn	6,80	7,67	7,69	0,09	0,16	0,18	0,01	0,08	0,06	0,00	0,07	0,06
Karper	6,61	7,82	7,89	0,09	0,12	0,11	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00
Bermpje	0,28	0,20	0,19	0,58	0,56	0,57	0,58	0,52	0,06	0,58	0,59	0,53
Kleine modderkruiper	6,53	5,64	5,65	13,47	12,70	13,06	13,56	12,81	12,93	13,57	12,85	12,99
Kesslers grondel	6,43	6,81	6,31	13,26	14,84	14,65	13,35	14,48	14,98	13,36	14,83	14,66
Pontische stroomgrondel	7,87	8,16	8,34	0,09	0,09	0,09	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01
Driedoornige stekelbaars	5,95	5,86	5,62	0,09	0,10	0,08	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00
Beekforel	7,36	7,02	6,88	15,19	12,84	12,98	15,29	13,21	13,03	15,30	12,79	12,95
Zalm	7,46	7,30	7,34	15,39	13,16	13,17	15,50	13,50	13,50	15,51	13,71	13,47
Zonnebaars	11,27	11,76	11,63	23,27	22,95	23,12	23,43	23,41	23,27	23,44	23,26	23,32
Snoek	7,93	6,68	6,83	0,09	0,06	0,06	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Spiering	2,35	2,23	2,33	4,85	5,95	5,66	4,88	5,73	5,85	4,88	5,91	5,85
Kwabaal	1,46	0,42	0,40	0,09	0,02	0,03	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Meerval	7,85	6,91	6,82	0,09	0,08	0,07	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00



FIGUUR 2-2. PERCENTAGE VAN DE GEÏDENTIFICEERDE DNA FRAGMENTEN IN DE VERSCHILLENDE METABARCODING ANALYSES VAN DE MOCK MONSTERS.

Mogelijk is dit veroorzaakt door kleine afwijkingen die zijn ontstaan tijdens het verdunnen en uitvullen van de mock monsters. Het aantal DNA fragmenten van de Kwabaal dat is gedetecteerd, is relatief laag ten opzichte van de berekende aantallen. In vervolgonderzoek kan worden uitgezocht of dit is veroorzaakt door een lagere DNA-concentratie in de mock of wordt veroorzaakt door de specifieke primer F4.

Het analyseren van een mock gemeenschap in een metabarcoding analyse is duidelijk een belangrijke toevoeging en samen met het rendement van de DNA extractie een mogelijkheid om de betrouwbaarheid van de metabarcoding analyse in elk experiment te kwantificeren. Op basis van de resultaten van de analyses van de mock communities is voor dit onderzoek geconcludeerd dat er geen replica NGS monsters nodig waren.

2.2.4 ID barcode database (stap 5)

Voor het identificeren van de DNA fragmenten uit de NGS-analyse is een database aangelegd met de DNA informatie van de barcode (16S rRNA gen regio) van de in Nederland voorkomende vissoorten. Vrijwel alle zoetwatervissoorten zijn in de database aanwezig (75 soorten). Er is naar gestreefd om van elke vissoort de barcode te verzamelen van minimaal een vijftal in Nederland gevangen vissen. Mede door materiaal verkregen van Sportvisserij Nederland en Naturalis Biodiversity Center, bevat de database nu voor 60% van de soorten tenminste één Nederlandse barcode; voor 36% van de soorten zijn het er al drie of meer. Voor minder voorkomende vissoorten is alleen de barcode beschikbaar uit de wetenschappelijke DNA-database (NCBI) (o.a. Steuren, Harders, Marene). In de komende tijd dient de database verder te worden gevuld met barcodes gebaseerd op vismateriaal dat in Nederland verzameld is.

2.2.5 NGS analyse (stap 6-7)

De PCR voor vermenigvuldiging van de barcode met behulp van de nieuwe primers is uitgevoerd met een zogenaamd "proof reading" taq-polymerase. Dit enzym is speciaal ontwikkeld om DNA fragmenten te amplificeren met zo min mogelijk fouten. Dit PCR product

is vervolgens door BaseClear geanalyseerd. De DNA fragmenten zijn met door BaseClear ontwikkelde software opgeschoond en geïdentificeerd met behulp van de ID barcode database. De DNA fragmenten zijn op basis van een 100% match met de referentie database op naam gebracht. Hiermee worden mogelijke fouten in de identificatie voorkomen en dit maakt het ook mogelijk ID's van zeer verwante vissoorten te onderscheiden (zie Tabel 2-5). Daarmee wordt ook het belang aangetoond van een ID database waarin van elke vissoort de volledige genetische variatie in de barcode is opgenomen. De variatie per vissoort in de hier gebruikte barcode is overigens zeer klein.

TABEL 2-5. VERSCHILLEN IN AANTAL DNA BASEPAAREN TUSSEN DE GEANALYSEERDE BARCODES VAN DE MEEST VERWANTE NEDERLANDSE VISSOORTEN.

0 basenparen verschil	1 basepaar verschil	2 basenparen verschil	3 basenparen verschil
Grote Marene -Houting	Giebel-Goudvis	Snoekbaars - Baars	Rietvoorn/Ruisvoorn-Alver
Bronforel-Beekforel-Zeeforel		Beekdonderpad - Rivierdonderpad	Alver-Kolblei
		Zalm-Grote Marene	Zilverkarper-Grootkopkarper
		Winde-Serpeling	Kroeskarper-Giebel
			Kroeskarper-Goudvis

2.3 Ontwikkeling en validatie qPCR markers voor geselecteerde soorten

2.3.1 Inleiding

Diverse voor dit project geselecteerde vissoorten zijn met behulp van specifieke qPCR methoden kwantitatief gedetecteerd. Voor detectie van de Rivierdonderpad, Kleine modderkruiper, Winde en de Kreeftenfamilie *Cambaridae* waren bij aanvang van het project al PCR-primers beschikbaar. Voor de Brasem, Kopvoorn, Barbeel, Zalm, Marmergrondel, Zwartbekgrondel en Bruine Amerikaanse dwergmeerval zijn nieuwe primers ontworpen en aansluitend gevalideerd. Ook zijn soortspecifieke probes ontworpen en gevalideerd waarmee het gevormde PCR-product selectief kan worden gedetecteerd. Door toepassing van probes met verschillende gekleurde labels wordt het mogelijk in een zogenaamde multiplex-detectie meerdere specifieke qPCR-methoden samen te voegen. Daarmee kunnen in één PCR-detectie experiment meerdere vissoorten gelijktijdig worden gekwantificeerd.

2.3.2 Ontwikkeling (*in silico* en *in vitro*)

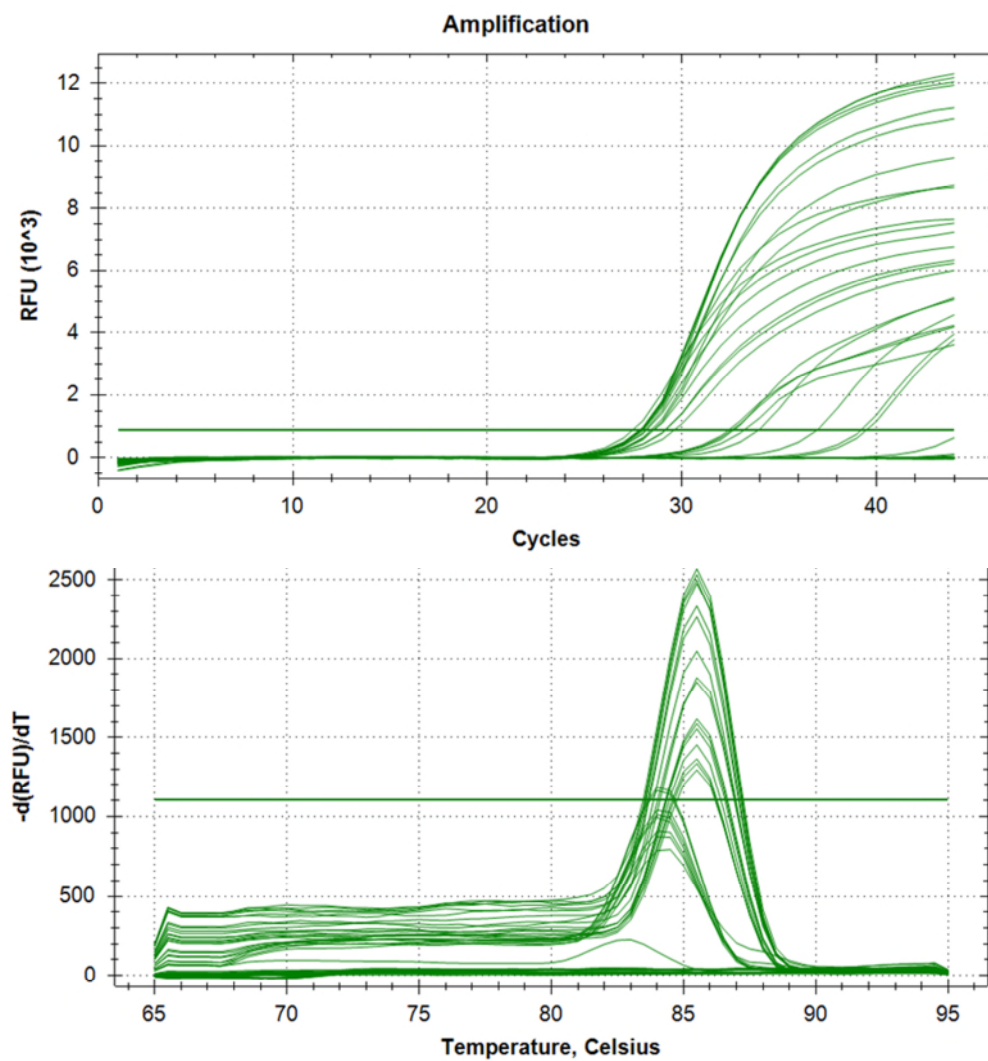
In het databaseprogramma Bionumerics zijn beschikbare sequenties uit de wetenschappelijke database toegevoegd voor de geselecteerde vissoorten. Dit is gedaan voor zowel het Cytb als het COI-gen voor alle Europese vissoorten, inclusief enkele "outgroups" zoals *Homo sapiens* en de waterpissebed *Asellus aquaticus*. Primers zijn ontworpen op die posities van een gen waar de DNA-volgorde van alle aanwezige DNA-sequenties van de doelsoort mee overeenkomt maar tegelijk maximaal verschillend is ten opzichte van verwante vissoorten. Tevens is er naar gestreefd de amplicon lengte (de lengte van het gewenste PCR-fragment) maximaal 150 nucleotiden te laten zijn, een smelttemperatuur van de primers te bereiken van ongeveer 58 °C en een GC-percentage tussen de 40-60%. Het GC-percentage betreft het aandeel van de DNA nucleotiden C en G in het totaal aantal gedetecteerde nucleotiden (A, T, C en G) van de beide primers. Het is van invloed op de bindingssterkte van de primers aan het doel-DNA en dit percentage moet voor de beide primers die gezamenlijk de gewenste DNA sequentie (het amplicon) selecteren ongeveer gelijk zijn. Deze relatief strenge randvoorwaarden voor ontwerp van de primers

zijn noodzakelijk omdat de primers uiteindelijk in een zogenaamd multiplex detectie zullen worden samengevoegd.

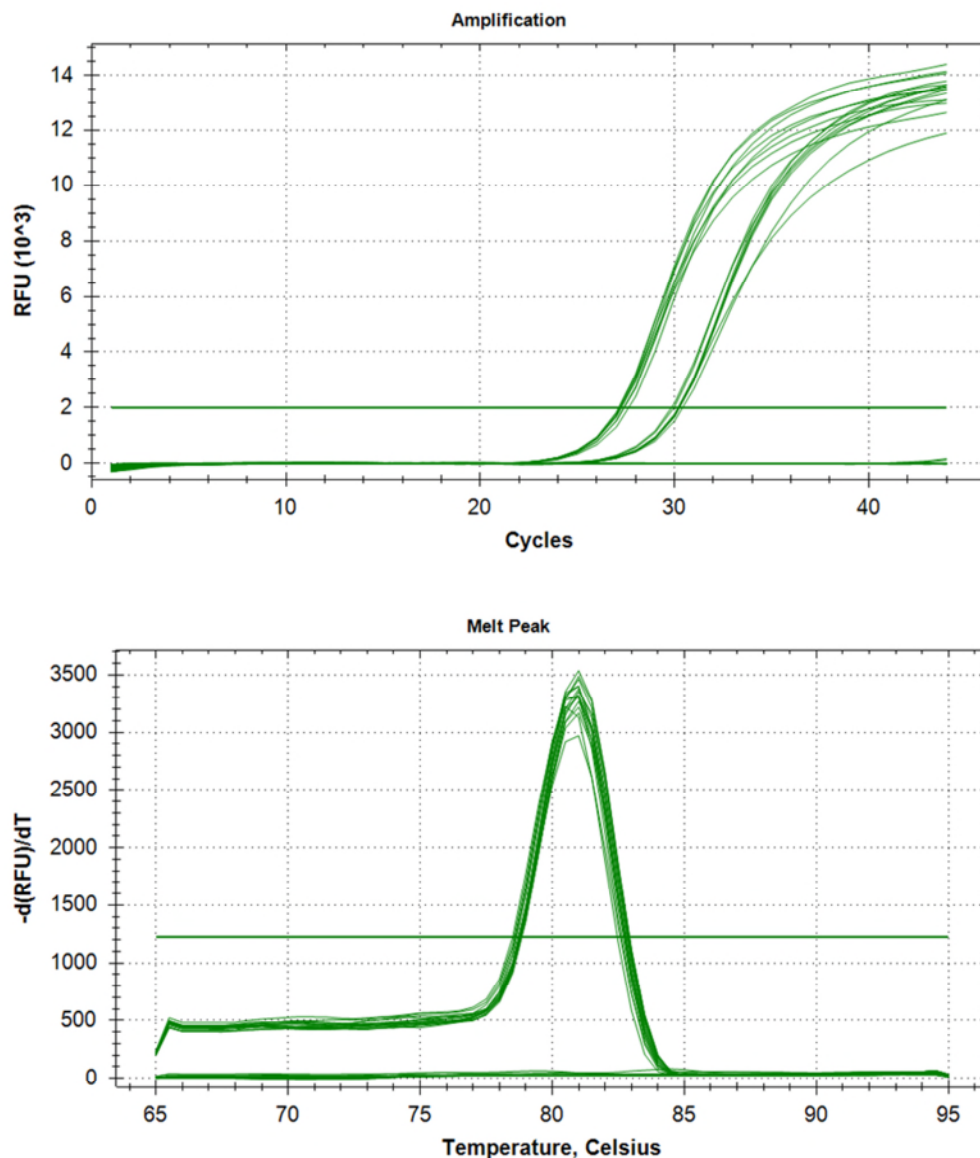
Als eerste controle zijn de ontworpen primers in silico getest door te analyseren of de DNA-volgorde van de primers uniek is. Dat gebeurt door ze te vergelijken met de wetenschappelijke DNA-database in een zogenaamde “Blast”-analyse. Voor alle ontworpen primers waren er overeenkomende DNA-fragmenten in de database. De enige uitzondering waren de primers voor detectie van de Rivierdonderpad (*Cottus perifretum*). Hier waren gelijkenissen met andere verwante *Cottus*-soorten, echter niet met de Beekdonderpad (*Cottus rhenanus*), de enige andere in Nederland voorkomende soort van dit genus.

Voor optimalisatie van de PCR is voor elk primerpaar de annealing temperatuur geoptimaliseerd, en is onderzocht of de primers specifiek en selectief zijn. Hiervoor zijn temperatuurgradiënt experimenten uitgevoerd waarin DNA-isolaten van de doelsoort samen met verwante en niet-verwante soorten werden geanalyseerd (zie ook Tabel 2-2). De gradiënt PCR experimenten zijn uitgevoerd tussen de 48 en 66 °C. De amplificatie van DNA is gemeten met behulp van de zogenaamde SYBR-green kleuring. Om te bepalen of het ook een specifiek DNA-product betreft is er een smeltcurve analyse uitgevoerd. (zie Figuur 2-3 en Figuur 2-4).

Figuur 2-3 geeft ter illustratie de gradiënt-PCR ingezet met DNA van Zwartbekgrondel (2x), Pontische stroomgrondel, Marmergrondel, Spiering, Kleine watersalamander en twee blanco's. De temperatuurgradiënt is ingesteld tussen 54-64°C. De verschillende DNA amplificatiecurven zijn het gevolg van het meer of juist minder optimaal verlopen van de PCR door te lage-optimale-te hoge annealing temperatuur. Naast een lagere eind DNA-concentratie wordt ook de Cq-waarde, het aantal cycli waarna het gevormde DNA wordt gedetecteerd, beïnvloed door de annealing temperatuur. De PCR verloopt optimaal bij een minimale Cq met een hoge DNA eindconcentratie. Op basis van de smeltcurve analyse is bepaald of het DNA-product specifiek is of het resultaat van zogeheten aspecifieke binding. Specifieke producten kwamen op bij DNA van de Zwartbekgrondel en hadden een smelttemperatuur van 85,5°C. Aspecifieke producten werden alleen gevormd met DNA van Pontische stroomgrondel bij lage annealing temperatuur (<60°C) maar deze hadden een afwijkende smelttemperatuur (84°C). Indien een probe (zie hierna) wordt toegepast in de PCR worden deze aspecifieke producten niet meer gedetecteerd.



FIGUUR 2-3. GRADIENT PCR EXPERIMENT SYBR GREEN VOOR COI NEOGOBIUS MELANOSTOMUS (ZWARTBEKGRONDEL) MET BOVEN DE ONLINE DNA-VERMENIGVIULDIGING EN ONDER DE SMELTTEMPERATUUR ANALYSE.



FIGUUR 2-4. GRADIENT PCR EXPERIMENT SYBR GREEN VOOR COI PROTERORHINUS SEMILUNARIS (MARMERGRONDEL) MET BOVEN DE ONLINE DNA-VERMENIGVULDIGING EN ONDER DE SMELTTTEMPERATUUR ANALYSE.

Figuur 2-4 geeft een ander voorbeeld van een gradiënt-PCR met COI primers ingezet met DNA van twee Marmergrondels. Alleen met het DNA van de Marmergrondel werd een DNA-fragment gevormd met een smelttemperatuur van ongeveer 81°C.

De volgende stap in de ontwikkeling van de specifieke detectiemethoden is de validatie van de specifieke probe. De probe is net zoals de primers een korte oligonucleotide waarvan de DNA-volgorde overeenkomt met de DNA-volgorde van een stukje van het DNA dat wordt vermenigvuldigd met de primers. Tijdens de PCR zal de probe aan het vermenigvuldigde DNA binden. Door gebruik te maken van een probe detectie wordt de mogelijkheid geschapen van multiplex PCR. Ook wordt voorkomen dat mogelijk aspecifiek gevormde DNA-producten worden gedetecteerd. Het eindresultaat is dat er voor elke uitgekozen vissoort een specifieke qPCR-methode inclusief specifieke probe is ontworpen en gevalideerd.

Multiplex qPCR

Er zijn in totaal zes multiplex qPCR methodes ontworpen op basis van de diverse vissoorten die door het projectteam zijn uitgekozen. De keuze voor het doelgen per afzonderlijke PCR is zo gedaan dat er per multiplex zoveel mogelijk een gelijke verdeling is van de twee genen. Daarnaast is elke probe gelabeld met een fluorescent label voor online detectie in de qPCR.

De zes ontwikkelde multiplex PCR's detecteren de volgende soorten (zie ook Tabel 2-6):

- A1: Brasem, Kopvoorn
- A2: Barbeel, Zalm, Zeeprik
- B1: Marmergrondel, Rivierdonderpad
- B2: Zwartbekgrondel, Winde
- C1: Kopvoorn, Kleine modderkruiper, Bruine Amerikaanse dwergmeerval
- C2: Rivierdonderpad en zoetwaterkreeftenfamilie *Cambaridae*

Voor het onderzoek naar de mogelijkheden van qPCR bij de detectie van mogelijke belemmeringen voor vismigratie is de multiplex PCR groep A toegepast. De multiplex PCR's groep B en groep C zijn ingezet bij het onderzoek naar de inzet van qPCR bij het bepalen van kwantitatieve verspreidingsinformatie.

TABEL 2-6. ONTWIKKELDE QPCR METHODIEKEN. POSITIE: LOCATIE VAN GEKOZEN DNA FRAGMENT OP HET DOELGEN. MULTIPLEX GROEP: SOORTEN DIE SAMEN IN ÉÉN ANALYSE WORDEN GEDETECTEERD. LABEL PROBE: TYPE AANDUIDING VAN HET IN DE ANALYSE GEBRUIKTE FLUORESCENTE LABEL VAN DE BETREFFENDE SOORTSPECIEKE PROBE.

Doelsoort	Doelgen	Positie	Multiplex-groep	Label probe
Brasem	<i>CytB</i>	177-288	A1	FAM
Kopvoorn	<i>CO1</i>	234-345	A1, C1	Cy5
Barbeel	<i>CytB</i>	478-600	A2	Texas Red
Zalm	<i>CytB</i>	146-256	A2	FAM
Zeeprik	<i>CO1</i>	252-340	A2	Cy5
Marmergrondel	<i>CytB</i>	574-667	B1	FAM
Zwartbekgrondel	<i>CO1</i>	330-437	B2	FAM
Rivierdonderpad	<i>CO1</i>	232-334	B1, C2	Cy5
Winde	<i>CO1</i>	250-321	B2	Cy5
Kleine modderkruiper	<i>CytB</i>	573-714	C1	FAM
Bruine Amerikaanse dwergmeerval	<i>CO1</i>	263-361	C1	Texas Red
<i>Cambaridae</i>	<i>12S</i>	6492-6733	C2	FAM

3 Onderzoeksopzet

3.1 Onderzoeksgebieden en bemonsteringslocaties

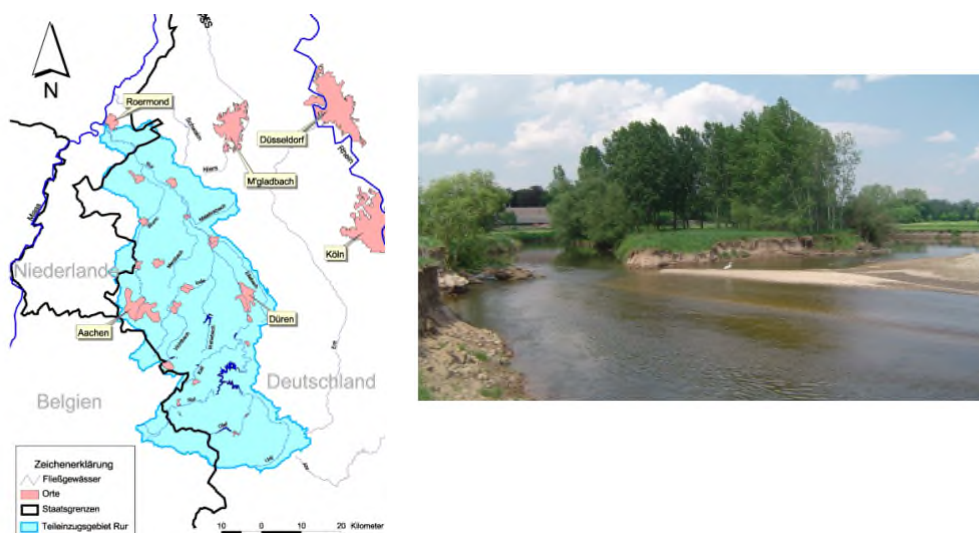
De onderzoeksgebieden voor de praktijk toetsing van de methoden zijn in samenspraak met de betrokken waterschappen geselecteerd. Hierbij is er naar gestreefd om daarbinnen bemonsteringslocaties te selecteren waar in 2016 KRW-visbemonsteringen uitgevoerd zouden worden of anderszins een beeld van de visstand is. Hiermee is beoogd een zo deugdelijk mogelijke vergelijking tussen eDNA en KRW bemonsteringsgegevens te kunnen maken.

Onderstaande paragrafen geven een beschrijving van de onderzoeksgebieden en presenteren een overzicht van de bemonsteringslocaties.

3.1.1 De Roer (Waterschap Limburg)

3.1.1.1 Beschrijving onderzoeksgebied

In het beheergebied van waterschap Limburg is de Roer in het Nederlandse gedeelte, tussen Vlodrop en Roermond als onderzoeksgebied gekozen. De Roer is in dit traject een natuurlijk meanderende rivier en is aangewezen als KRW type R15 (snelstromende rivier op kiezelhoudende bodem). De rivier slingert door het landschap en plaatselijk zijn duidelijk erosie en sedimentatie zichtbaar. De stroomsnelheden variëren sterk tussen de 0.3 en 1.0 m/s. De Roer mondt in Roermond uit op de Maas. Net bovenstrooms daarvan ligt de ECI waterkrachtcentrale. Deze centrale is in 2007 passeerbaar gemaakt waardoor vrije migratie met de Maas mogelijk is. In Figuur 3-1 is een totaaloverzicht van het grensoverschrijdende stroomgebied gegeven.



FIGUUR 3-1. TOTAALOVERZICHT VAN HET GRENSOVERSCHRIJDENDE STROOMGEBIED VAN DE ROER + EEN IMPRESSIE VAN HET NEDERLANDSE GEDEELTE VAN DE ROER (GUBBELS *ET AL.*, 2016).

Sinds de jaren zestig/zeventig is de waterkwaliteit van de Roer sterk verbeterd. De gehalten aan totaal-fosfor, PCB's en zware metalen zijn sterk afgenomen. Tevens is het voor vissen

essentiële zuurstofgehalte toegenomen. De visstand heeft zich dan ook vanaf eind jaren 80 duidelijk hersteld. In 2015 zijn er maar liefst 47 verschillende vissoorten aangetroffen, waarvan 24 stroomminnende soorten zoals Atlantische zalm, Zeeforel en Rivierdonderpad. Een kleiner gedeelte betreft 15 eurytope soorten zoals Brasem, Baars en Blankvoorn en het kleinste aandeel bestaat uit 8 plantminnende soorten zoals Rietvoorn/Ruisvoorn en Zeelt.

3.1.1.2 Bemonsteringslocaties

In de Roer zijn vier soorten monsters genomen:

1. eDNA monsters voor metabarcoding analyse op trajectniveau;
2. KRW visbemonsteringen op trajectniveau;
3. eDNA monsters voor qPCR analyse;
4. vistellingen door vrijwilligers bij de ECI waterkrachtcentrale te Roermond.

De metabarcoding en KRW visbemonsteringen zijn op dezelfde locaties uitgevoerd. In Figuur 3-2 is een overzicht van de bemonsteringslocaties gegeven.



FIGUUR 3-2. OVERZICHT BEMONSTERINGSLOCATIES IN DE ROER (GEEL: METABARCODING + KRW MONSTERS, ORANJE: QPCR MONSTERS + VIS TELLINGEN BIJ ECI, ROOD: QPCR MONSTERS).

eDNA monsternamen voor metabarcoding en KRW bevissing langs de Roer

Op 12 t/m 14 september en 2 oktober 2017 hebben op de bemonsteringslocaties met code OROER905, OROER715, OROER550, OROER520, OROER440, OROER312 en OROER195 zowel KRW bevissingen als eDNA bemonsteringen plaatsgevonden. De eDNA bemonsteringsprocedure is hierna beschreven in 3.2 en Bijlage 1. De KRW bevissing is op locatie ROER905 uitgevoerd met zegen en op de locaties ROER715, ROER550, ROER250, ROER440, ROER312 en ROER 195 is gewerkt met een elektrovistuijg. Alle KRW bevissingen zijn uitgevoerd door ATKb. Zie voor uitgebreide beschrijving paragraaf 3.2.

eDNA monsternamen voor qPCR analyse langs de Roer

Op 28 juni 2016 zijn tevens langs de Roer, op bemonsteringslocaties Roer 1 t/m 7 in triplo qPCR monsters genomen door het waterschap voor de analyse van de doelsoorten Brasem, Kopvoorn, Barbeel, Zalm en Zeeprik.

eDNA monsternamen voor qPCR analyse en vistrapgegevens bij de ECI waterkrachtcentrale

Op drie data, respectievelijk 18 april, 9 mei en 4 juni 2016 zijn boven- en benedenstrooms van de ECI waterkrachtcentrale te Roermond, in triplo qPCR monsters verzameld voor de doelsoorten Brasem, Kopvoorn, Barbeel en Zalm door vrijwilligers onder begeleiding van het waterschap. Daarnaast zijn op dezelfde vistrap visgegevens door deze vrijwilligers verzameld. In Gubbels *et al.* (2016) is een situatieschets te vinden, evenals veel informatie over vangstgegevens over de periode 2009-2014.

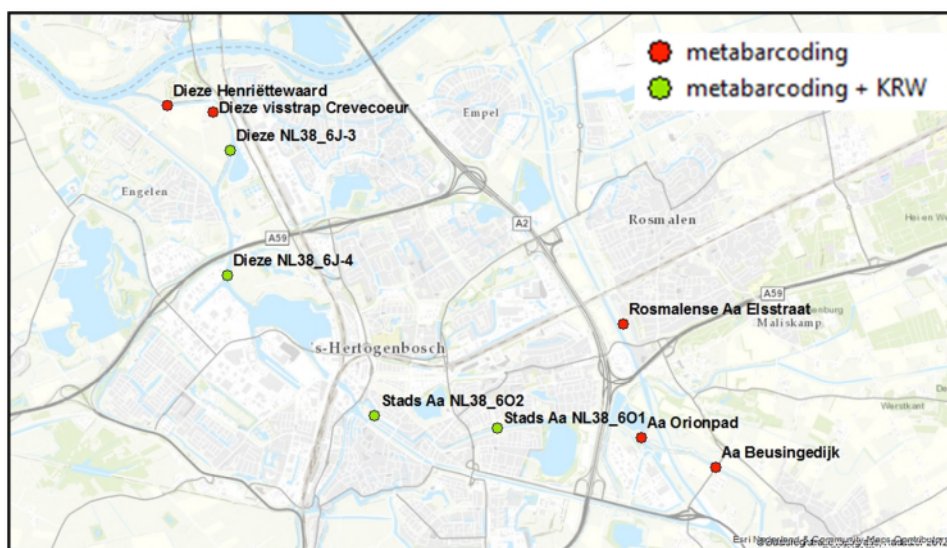
3.1.2 Dieze en Aa (Waterschap Aa en Maas)

3.1.2.1 Beschrijving onderzoeksgebied

In het beheergebied van Waterschap Aa & Maas zijn de Dieze en Aa als onderzoeksgebied gekozen. De waterlichamen liggen in het stedelijk gebied van Den Bosch en zijn aangewezen als KRW type R6: langzaam stromend riviertje op zand/klei. De breedte en diepte varieert tussen respectievelijk 10 - 50 m en 1 - 4,5 m. De waterkwaliteit wordt als slecht tot ontoereikend beschouwd. Er is geen tot beperkte plantengroei aanwezig. De visbiomassa is laag en niet divers in soorten. Kenmerkende soorten zijn Baars, Blankvoorn en Zwartbekgrondel.

3.1.2.2 Bemonsteringslocaties en type bemonstering

In de Dieze en Aa zijn twee soorten monsters genomen. Het betreft reguliere KRW visbemonsteringen en metabarcoding monsters op trajectniveau. In Figuur 3-3 is een overzicht gegeven van de bemonsteringslocaties. Figuur 3-4 geeft er een impressie van.



FIGUUR 3-3. OVERZICHT BEMONSTERINGSLOCATIES IN DIEZE EN AA (GROEN: METABARCODING EN KRW BEMONSTERING, ROOD: METABARCODING BEMONSTERING).

	Dieze - vistrap Crevecoeur
	Dieze - Henriëttewaard
	Aa - Beusingedijk
	Stadse Aa
	Dieze (NL38_6J-4 en NL38-6J-3)
	Rosmalense Aa - Elsstraat



FIGUUR 3-4. SFEERIMPRESSIE VAN EEN AANTAL BEMONSTERINGSLOCATIES.

eDNA monsternamen voor metabarcoding en KRW bevissing Dieze en Aa

Op 14 oktober 2016 zijn op de bemonsteringslocaties NL38_60_1 (Stadse Aa), NL38-60_2 (Stadse Aa), NL38-6J-3 (Dieze), NL38-6J-4 (Dieze), Henriëttewaard (Dieze), visstrap Crevecoeur (Dieze), Elsstraat (Rosmalense Aa), Beusingsedijk (Aa) en Orionpad 9Aa metabarcoding monsters genomen door Bureau Waardenburg. De eDNA bemonsteringsprocedure is hierna beschreven in 3.2 en Bijlage 1. Op 14 oktober 2016 heeft tevens op de monsterpunten NL38_60_1, NL38-60_2, NL38-6J-3, NL38-6J-4 een KRW bevissing plaatsgevonden. De KRW bevissing is op monsterpunten NL38_60_1, NL38-60_2 uitgevoerd met een elektrovistuig vanaf een boot. Op monsterpunten NL38-6J-3, NL38-6J-4 is deze uitgevoerd met een stortkuil en elektrovistuig. De bemonstering is uitgevoerd door Bureau Waardenburg (Spier & Broeckx, 2016). In Tabel 3-1 is een overzicht gegeven van de karakteristieken van de bemonsteringslocaties en de gehanteerde bevissingsmethoden.

TABEL 3-1. KARAKTERISTIEKEN VAN DE BEMONSTERINGSLOCATIES EN BEVISSINGSMETHODEN IN AA EN DIEZE (WATERSCHAP AA & MAAS)

Locatie	Code locatie	Beschrijving	KRW bevissing
Stadse Aa	NL38_60_1 NL38-60_2	Langzaam stromend (5-20 cm/s) riviertje op zand/klei (type R6 (spec)). Breedte ca. 50m. Diepte 4 - 4,5 m. Geen plantengroei aanwezig.	elektrovistuig vanaf een boot
Dieze	NL38-6J-3 NL38-6J-4 Henriëttewaard visstrap Crevecoeur	Langzaam stromend (5-20 cm/s) riviertje op zand/klei (type R5 (BB)). Breedte ca. 30m. Diepte ca. 3 m. Beperkte plantengroei aanwezig.	stortkuil en elektrovistuig
Rosmalense Aa	Elsstraat	Langzaam stromend (5-20 cm/s) riviertje op zand/klei (type R6). Breedte 10- 40 m. Diepte 1 - 4.5 m. Beperkte plantengroei aanwezig.	Geen KRW bevissing
Aa	Beusingsedijk Orionpad	Langzaam stromend (5-20 cm/s) riviertje op zand/klei (type R6). Breedte 10- 40 m. Diepte 1 - 4.5 m. Beperkte plantengroei aanwezig	Geen KRW bevissing

3.1.3 Beken ten zuiden van Breda en Mark & Vliet (Waterschap Brabantse Delta)

3.1.3.1 Beschrijving onderzoeksgebied

In het beheergebied van waterschap Brabantse Delta zijn diverse beken ten zuiden van Breda bemonsterd. Het betreft de Aa of Weerij, Kleine Beek, Bijloop, Bavelse Leij, Boven Mark en de Chaamse beken. Daarnaast zijn locaties gekozen in en het Mark en Vliet stelsel; Steenbergse en Roosendaalse Vliet, Mark-Dintel en het Markkanaal. Het betreft langzaam stromende boven-, midden- of benedenlopen of kleine riviertjes op zand. De onderzochte waterlopen zijn geclassificeerd als KRW type R4, R5 of R6 en hebben gemiddeld een zomerstroomsnelheid lager dan 5 cm/s. In de Kleine Beek is een aanzienlijke hoeveelheid plantengroei aanwezig. Op de bemonsteringslocaties in de overige waterlopen is de plantengroei beperkt. De waterlopen in het Mark en Vliet stelsel zijn in gebruik als scheepvaartkanaal en hebben stortstenen oevers.

De waterlopen zijn met elkaar verbonden. In het zuiden van het beheergebied van waterschap Brabantse Delta ontspringen diverse kleine beekjes die uitmonden in de Boven Mark en Aa of Weerij. Deze twee beken komen samen in de singels van Breda en stromen vervolgens richting het noorden als het waterlichaam Mark en Vliet, dat uiteindelijk uitkomt in het Volkerak. De sluizen tussen Mark en Vliet en Volkerak staan gewoonlijk open, waardoor vissen vanuit het Volkerak deze riviertjes kunnen optrekken. Via de singels van Breda kunnen de vissen vervolgens de Boven Mark of de Aa of Weerij opzwemmen. In de Boven Mark is alleen de eerste stuw voorzien van een vispassage. De Bavelse Leij en Chaamse Beken zijn daarmee voor vissen bereikbaar, maar bovenloopjes verder stroomopwaarts, zoals de Strijbeekse Beek en het Merkske nog niet. Door de vispassages in de Aa of Weerij kunnen vissen via deze beek tot in België trekken en ook de zijbeken de Bijloop en Kleine Beek bereiken. Alleen de eerste vier stuwen in de Kleine Beek zijn van vispassages voorzien.

In de Mark en Vliet, Aa of Weerij en Boven Mark komen de in Nederland meest algemeen voorkomende soorten voor. Dit zijn soorten zoals Baars, Brasem, Rietvoorn/Ruisvoorn, Snoek, Blankvoorn, Tiendoornige stekelbaars en Pos. Daarnaast komen enkele soorten voor die geassocieerd worden met stromende milieus. In de Mark en Vliet zijn dat Rivierdonderpad en Winde en in de Aa of Weerij en Boven Mark Bempje, Winde en Riviergrondel. Door de beperkte stroming is het aantal stroomminnende soorten en vissen over het algemeen laag. Afgezien van het bovenstroomse deel van de Aa of Weerij is de bedekking met planten gering en daardoor is het aantal plantminnende soorten en vissen over het algemeen ook laag. Voorafgaand aan de inventarisaties van 2016 zijn de uitheemse Zwartbekgrondel en Marmergrondel in 2014 voor het eerst bij bemonsteringen in de Mark en Vliet waargenomen. Deze soorten lijken via het Markkanaal en vanuit het Volkerak deze riviertjes op te trekken.

In de bovenloopjes de Bijloop, Bavelse Leij en Chaamse Beken is de stroming plaatselijk iets hoger dan in de grotere beken. Vooral in de Bijloop en Chaamse beken is daardoor het aantal stroomminnende soorten en aantalsaandeel van deze soorten iets hoger. In de monding van deze beken is de soortenrijkdom nog redelijk, maar verder stroomopwaarts neemt dat door de beperkte dimensies snel af en bestaat de visstand in hoofdzaak uit soorten zoals Tiendoornige stekelbaars, Bempje en soms Riviergrondel. De laatste jaren blijkt Rivierdonderpad de benedenstroomse delen van de Bavelse Leij en Chaamse Beken te koloniseren.

In de Kleine Beek zijn vanwege de plantengroei en beperkte stroming een grotere dichtheid aan plantminnende soorten zoals Rietvoorn/Ruisvoorn en Tiendoornige stekelbaars te verwachten.

3.1.3.2 Bemonsteringslocaties en type bemonstering

In het onderzoeksgebied van Brabantse Delta zijn drie soorten monsters genomen:

1. eDNA monsters voor metabarcoding analyse op trajectniveau;
2. KRW visbemonsteringen op trajectniveau;
3. eDNA monsters voor qPCR analyse op trajectniveau.

In totaal zijn er op 26 locaties monsters genomen. Het betreft 10 locaties waar een metabarcoding analyse en 16 locaties waar een qPCR analyse is uitgevoerd. De locaties zijn in Figuur 3-5 weergegeven.



FIGUUR 3-5. OVERZICHT BEMONSTERINGSLOCATIES IN HET BEHEERGEBIED VAN BRABANTSE DELTA (GROEN: METABARCODING, GEEL METABARCODING + KRW BEMONSTERING, ORANJE QPCR + KRW EN ROOD: QPCR).

Metabarcoding en KRW bevissing beken ten zuiden van Breda

Op 15 en 16 augustus 2016 hebben in de beken Aa of Weerij, Kleine Beek en Bijloop metabarcoding bemonsteringen plaatsgevonden door ATKb. De eDNA bemonsteringsprocedure is hierna beschreven in 3.2 en Bijlage 1. KRW bemonsteringen hebben op dezelfde bemonsteringslocaties en tegelijkertijd in de Aa of Weerij en de Bijloop plaatsgevonden. Dit onderzoek is door ATKb uitgevoerd met een elektrovisttuig en op brede delen ook met zegen (Koole, 2017). In Tabel 3-2 is een overzicht gegeven van de karakteristieken van de bemonsteringslocaties en de gehanteerde bevissingsmethoden.

TABEL 3-2. KARAKTERISTIEKEN VAN DE METABARCODING BEMONSTERINGSLOCATIES EN BEVISSINGSMETHODEN TEN ZUIDEN VAN BREDA (WATERSCHAP BRABANTSE DELTA).

Beek	Code locatie	Beschrijving	KRW bevissing
Aa of Weerijs	AW_ZT_H5	Langzaam stromende (5-10 cm/s)	elektrovissen langs oevers + zegen in open water op 15-08-2016
	AW_TW_G4	midden- benedenloop op zand (type R5).	
	AW_WB_F8	Breedte 12 - 18 m. Diepte 1 - 1,5 m.	
	AW_BE_D1	Beperkt plantengroei aanwezig.	
	AW_EW_C2		
Kleine Beek	KL_SA_E1	Permanent langzaam stromende (0-5 cm/s) bovenloop op zand (type R4).	Geen KRW bevissing
	KL_AB_D1	Breedte 3,5 - 6 m. Diepte 0,5 - 1,5 m.	
	KL_BA_C3	Aanzienlijke plantengroei aanwezig	
	KL_BL_B2		
Bijloop	BT_BI_I1	Permanent langzaam stromende (5-10 cm/s) bovenloop op zand (type R4). Breedte 3- 4 m. Diepte 0,5 - 0,75 m. Beperkte plantengroei aanwezig	Wadend elektro vissen langs lijnvormig oppervlak over de gehele breedte op 16-08-2016

qPCR en KRW bevissing beken ten zuiden van Breda

Op 1 en 3 augustus 2016 zijn er in totaal in de Chaamse beken, Boven Mark en Bavelse Leij, respectievelijk 5,2 en 1 eDNA monsters (in triplo) genomen door ATKb. De eDNA bemonsteringsprocedure is hierna beschreven in 3.2 en Bijlage 1. Het betrof qPCR analyses voor de kwantitatieve analyse van de Rivierdonderpad, Kleine modderkruiper, Kopvoorn en zoetwaterkreeften van de familie *Cambaridae*.

Daarnaast heeft op de locaties in de Chaamse beken en op locatie BA_WE_A2 in de Bavelse Leij gelijk volgend op de eDNA monsternamen een KRW bemonstering plaatsgevonden door ATKb. De visstand op locatie BA-WE-A5 in de Bavelse Leij is niet voor de KRW bemonsterd. De visstand in de Boven Mark is wel voor de KRW bemonsterd, maar niet op de locatie waar monsters voor eDNA/qPCR zijn genomen. In Tabel 3-3 is een overzicht gegeven van de karakteristieken van de bemonsteringslocaties en de gehanteerde bevissingsmethoden.

qPCR en KRW bevissing Mark-Vliet

Op 22 juli 2016 zijn de Steenbergse en Roosendaalse Vliet, Mark-Dintel en het Markkanaal op 8 bemonsteringslocaties in triplo bemonsterd op eDNA door ATKb. De eDNA bemonsteringsprocedure is hierna beschreven in 3.2 en Bijlage 1. Het betrof een qPCR voor de kwantitatieve analyse van de Marmergrondel, Zwartbekgrondel, Rivierdonderpad en de Winde. De eDNA bemonstering heeft vanuit een boot plaatsgevonden.

Gelijktijdig met de eDNA bemonstering heeft een KRW bemonstering met elektrovisapparatuur aan de oevers plaatsgevonden door ATKb. In Tabel 3-4 is een overzicht gegeven van de bemonsteringslocaties.

TABEL 3-3. KARAKTERISTIEKEN VAN DE QPCR BEMONSTERINGSLOCATIES EN BEVISSINGSMETHODEN TEN ZUIDEN VAN BRED A (WATERSCHAP BRABANTSE DELTA).

Beek	Code locatie	Beschrijving	KRW bemonstering
Chaaanse beken	CH_NO_C4	Permanent langzaam stromende (5-10 cm/s) bovenloop op zand (type R4). Breedte ca. 2,5 m. Diepte 0,5 m. Beperkte plantengroei aanwezig.	Wadend elektro vissen over de gehele breedte op 1-08-2016
	CH_NO_B1		
	CH_NO_A2		
	CH_RO_B3		
	CH_ZU_D2		
Boven Mark	BM_VB_A1	Langzaam stromend riviertje op zand/klei (type R6) op bemonsteringslocatie (10-20 cm/s). Breedte ca. 8 m. Diepte 1- 1,5 m. Weinig plantengroei in waterloop aanwezig.	Geen KRW bemonstering
Bavelse Leij	BA_WE_A5 BA_WE_A2	Permanent langzaam stromende (5-15 cm/s) bovenloop op zand (type R4). Breedte ca. 1.5 m. Diepte 0,5 - 0,75 m. Beperkte plantengroei aanwezig	Alleen bij BA_WE_A2 heeft op 3-08-2017 een KRW elektrobevissing over de gehele breedte plaatsgevonden.

TABEL 3-4. KARAKTERISTIEKEN VAN DE QPCR BEMONSTERINGSLOCATIES EN BEVISSINGSMETHODEN IN HET MARK EN VLIET STELSEL (WATERSCHAP BRABANTSE DELTA).

Watersysteem	Code locatie	Beschrijving	KRW bevissing
Mark en Vliet	MV_SR_C1	Langzaam stromend riviertje op zand/klei (type R6) (<5 cm/s). Breedte ca. 40 m. Weinig plantengroei aanwezig. De waterlichamen hebben de karakteristieken van een scheepvaartkanaal en hebben een stortstenen oeververdediging.	Elektrovissen langs de oevers op 22-07-2016
	MV_SR_B1		
	MV_MD_L2		
	MV_MD_K4		
	MV_MD_H5		
	MV_MD_G7		
	MV_MK_A4		
	MV_MK_A3		

3.2 Monsternamen en conservering

3.2.1 KRW visstandsbemonstering en visbestandsschatting

De KRW visbemonsteringen zijn uitgevoerd door ATK B (Waterschap Limburg en Brabantse Delta) en Bureau Waardenburg (Waterschap Aa en Maas).

De toegepaste methoden betroffen doorgaans elektrovissen of zegen of een combinatie van beiden. Bij waterschap Aa & Maas is in de Dieze en Aa op bemonsteringslocaties NL38-6J-3 en NL38-6J-4 gevist met een stortkuil in combinatie met een elektrovistuig (Spier & Broeckx, 2016). De KRW visbemonsteringen zijn uitgevoerd conform het Handboek Hydrobiologie (Bijkerk, 2014). Op waterlichaam- en trajectniveau zijn door de adviesbureaus ATK B en Bureau Waardenburg visbestandsschattingen gemaakt. De visbestandsschattingen geven per soort een schatting van de aantallen en het aantal kilo per hectare vis. De visbestandsschattingen zijn gemaakt met het programma Piscaria. In Koole (2017) en in Spier

& Broeckx (2017) is een uitgebreide beschrijving van de bemonsteringsmethode en betrouwbaarheid gegeven.

3.2.2 Methode van eDNA veldbemonstering en conservering

Er is een procedure opgesteld voor het bemonsteren van waterlopen voor de eDNA analyse. Daarbij is onderscheid gemaakt tussen langzaam stromende smalle waterlopen (<8 m, <1 m/s), langzaam stromende brede waterlopen (>8 m, <1 m/s), en brede, snelstromende waterlopen (>8 m; >1 m/s). De procedure is in nauwe samenwerking met de projectpartners en op pragmatische gronden vastgesteld. De bijbehorende werkvoorschriften staan beschreven in Bijlage 1. Doel van de eDNA analyse is om een representatief beeld te krijgen van de soortensamenstelling of de hoeveelheid eDNA van doelsoorten, langs een KRW traject van 250 m lengte. Daarbij werden per traject mengmonsters samengesteld uit 10-20 deelmonsters van 50-100 ml, waarmee werd geprobeerd om een zo goed mogelijk beeld te krijgen van de relevante habitats (zie Tabel 3-5). Het water werd ter plaatse geconserveerd met isopropanol en in de koelkast bewaard voor latere analyse in het KWR laboratorium.

TABEL 3-5. OVERZICHT VAN AANTAL EN VOLUME VAN DEELMONSTERS PER MENGMONSTER VAN 1 LITER TEN BEHOEVE VAN EEN METABARCODING ANALYSE. IN GEVAL VAN EEN QPCR ANALYSE IS EEN BEMONSTERING IN TRIPLO UITGEVOERD (ZIE BIJLAGE 1 VOOR EEN NADERE TOELICHTING).

type water	breedte	snelheid	deelmonsters		locatie deelmonsters
			aantal	volume	
Smalle, langzaam stromende beken	< 8 m	< 1 m/s	10	100 ml	verdeeld over de lengte langs traject
Brede, langzaam stromende beken	> 8 m	< 1 m/s	20	50 ml	verdeeld over de lengte langs traject
Brede, snelstromende rivieren	> 8 m	> 1 m/s	20	50 ml	verdeeld over breedte aan begin traject

Bij metabarcoding analyse wordt alleen aan- of afwezigheid gedetecteerd. Daarbij zijn replica monsters minder noodzakelijk en is het van belang voldoende deelmonsters te nemen van de verschillende mogelijke habitats. De in de procedure opgenomen aantallen deelmonsters zijn door de projectgroep bepaald op basis van expert opinion en praktische haalbaarheid. Voor het met qPCR vaststellen van kwantitatieve verschillen in DNA kopie aantallen van doelsoorten is het noodzakelijk om een aantal replica monsters te nemen. Er is immers een schatting van de variatie rond een gemiddelde nodig, om de betekenis van eventuele verschillen in gemiddelde waarden tussen locaties of in de tijd te kunnen duiden.

Het aantal replica watermonsters voor qPCR analyse is als volgt ingeschat. KWR beschikt over een dataset van metingen aan eDNA van diverse vissoorten in de IJssel (Patberg *et al.*, 2016). Deze dataset bestaat uit vier bemonsteringslocaties, elk op drie opeenvolgende dagen bemonsterd. Per bemonsteringslocatie (een traject van ongeveer 300 m) zijn toen negen watermonsters geanalyseerd. Zo konden er per vissoort dus 12 schattingen van gemiddelde aantallen DNA kopieën/l worden gedaan, samen met hun bijbehorende variantie (vier locaties maal drie meetdata).

Uit de gegevens van dit onderzoek kan worden geschat hoeveel replicamonsters voor een locatie moeten worden bemonsterd en geanalyseerd. Onderstaand kader geeft een toelichting op de theoretische achtergrond hiervan. In dit onderzoek is er voor gekozen om een kwantitatief verschil van 100-200% ten opzichte van het gemiddelde aantal DNA

kopieën/l van een bemonsteringslocatie vast te kunnen stellen. Bij een gewenste betrouwbaarheid van 90% wordt dan geschat dat er 3 replica monster per locatie moeten worden bemonsterd. Voor echt zeldzame soorten is het hiervoor benodigde aantal monsters meestal hoger (5-10, of meer). En ook voor het detecteren van kleinere kwantitatieve verschillen tussen locaties zijn meer replica monsters per locatie nodig. Als een goed compromis tussen het redelijk betrouwbaar kunnen detecteren van een verschil en een niet te groot aantal monsters per locatie, is daarom voor het hier beschreven qPCR onderzoek een aantal van drie mengmonsters per locatie gekozen. Uit de uiteindelijke analyses blijkt in hoeverre dit aantal monsters inderdaad het gewenste resultaat heeft opgeleverd.

Toelichting op de theorie voor gebruikte berekeningen van het benodigde aantal monsters per locatie

Een bandbreedte of betrouwbaarheidsinterval rond een gemiddelde waarde kan worden berekend als:

$$X_{\text{gem}} \pm t \cdot s / \sqrt{n}$$

Hierin is n het aantal replica waarnemingen, en s de hiermee voor het monster geschatte standaardafwijking.

De grootte t is een statistische toetsingsgrootte waarvan de waarde wordt bepaald door het aantal waarnemingen waarop de geschatte standaardafwijking is gebaseerd, én op de betrouwbaarheid waarmee het betrouwbaarheidsinterval moet worden opgesteld. Meestal gaat het dan om een betrouwbaarheid van 90 of 95%. Dat is de kans dat de werkelijke gemiddelde waarde inderdaad binnen de grenzen van het berekende betrouwbaarheidsinterval ligt. Hoe hoger de betrouwbaarheid, hoe hoger de waarde van t , en dus ook hoe wijder de bandbreedte van het betrouwbaarheidsinterval.

Deze formule voor een bandbreedte B rond een gemiddelde kan ook worden gebruikt om een inschatting te maken van het aantal replica metingen dat nodig is om met een betrouwbaarheid van bijvoorbeeld 90% een verschil ten opzichte van een gemiddelde waarde als statistisch significant te kunnen detecteren (zie ook Ryding & Rast, 1989).

$$B = t \cdot s / \sqrt{n}, \text{ dus } n = (t \cdot s / B)^2$$

In deze formule is n het aantal replica metingen geworden dat nodig is om een gewenste bandbreedte B te behalen bij een bekende standaardafwijking s , met een gewenste betrouwbaarheid (bepaald door de keuze voor de t waarde). Bij een hogere gewenste betrouwbaarheid neemt de waarde van t toe, en dus ook het aantal benodigde replica metingen. En als de gewenste bandbreedte smaller moet worden, dan neemt het benodigde aantal replica metingen ook toe.

4 Resultaten

4.1 Verspreiding van vissoorten in diverse stroomgebieden (metabarcoding)

Op trajectniveau en waterlichaam niveau is een vergelijking gemaakt tussen de met eDNA gedetecteerde soorten in de metabarcoding analyses en de in de KRW-bevissingen gevangen soorten. In onderstaande paragrafen worden de resultaten per onderzoeksgebied en bemonsteringslocatie besproken.

4.1.1 Metabarcoding en KRW bevissing langs de Roer

In de Roer, ten zuiden van Roermond, heeft op 7 bemonsteringslocaties traditionele KRW bemonstering en metabarcoding onderzoek plaatsgevonden. Daarnaast heeft in de periode 2009 - 2014 uitgebreid onderzoek rond de ECI stuw plaatsgevonden (Gubbels *et al.*, 2016).

In Tabel 4-1 staan de gegevens voor de vergelijking tussen de eDNA en visstandbemonstering op de bemonsteringslocaties. Daarnaast is een vergelijking gemaakt op waterlichaam niveau. Hiervoor zijn de aangetroffen soorten van de 7 bemonsteringslocaties geaggregeerd en zijn vistrapgegevens uit de periode 2009 - 2014 van passerende vissen bij de ECI waterkrachtcentrale gebruikt. De gegevens zijn per gilde weergegeven. De Zeeprik zat niet in de toegepaste metabarcoding analyse en kon dus ook niet met eDNA aangetoond worden.

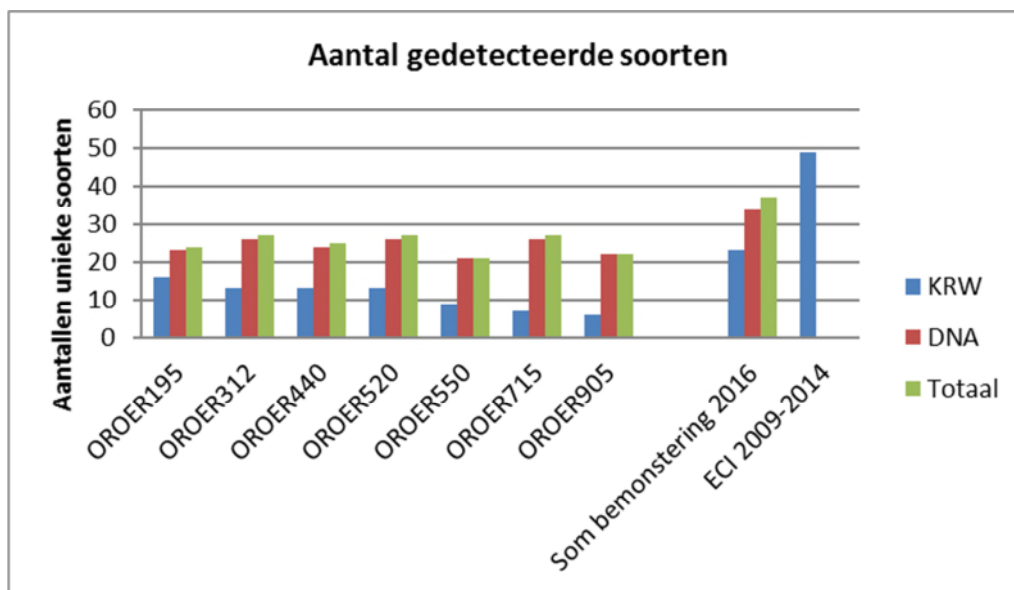
Aantal aangetroffen soorten

In Figuur 4-1 staat een overzicht van het aantal gedetecteerde soorten (eDNA + KRW samen) en daarnaast van het aantal gedetecteerde soorten in de eDNA bemonstering en de KRW bevissing. Ook is de som van het aantal soorten bij de bemonstering langs de Roer in 2016 weergegeven evenals de gecombineerde ECI visstandgegevens over de periode 2009-2014.

Op alle bemonsteringslocaties zijn met eDNA meer soorten aangetoond dan in de KRW bevissing. Het betreft in totaal 35 soorten met eDNA en 26 soorten in de KRW bemonstering. In de periode 2009 - 2014 zijn bij de vistrap bij de ECI waterkrachtcentrale 49 verschillende soorten aangetroffen, dus meer dan tijdens de DNA bemonstering. De meeste met eDNA gemiste soorten zijn in 2016 ook niet tijdens de reguliere KRW monitoring aangetroffen. Daarnaast betreft het zeldzame soorten of soorten waarvan bekend is dat de populatie na een hevige toename is ingezakt, zoals de exotische Marmergrondel. Deze soort lijkt sterk teruggedaan in abundantie door de opkomst van de Zwartbekgrondel, die wel overal is aangetroffen.

[illegible]

[illegible][illegible]



FIGUUR 4-1. AANTAL GEDETECTEERDE SOORTEN PER BEMONSTERINGSLOCATIE IN TOTAAL (EDNA+KRW) EN VOOR EDNA EN DE KRW BEVISSING APART. DAARNAAST IS EEN SOMMATIE VAN DE BEMONSTERING VAN 2016 GEGEVEN EN ZIJN DE GEGEVENS VAN HET AANTAL SOORTEN DAT IS GEVANGEN BIJ DE ECI STUW IN DE PERIODE 2009-2014 WEERGEGEVEN.

Soorten enkel aangetoond met KRW bevissing

In twee van de zeven bemonsteringslocaties zijn middels de eDNA-bemonstering alle soorten aangetoond die in de KRW bevissing waren gevangen. Op drie bemonsteringslocaties zijn er met eDNA soorten gemist die wel in de KRW-bevissing zijn gevangen. In Tabel 4-2 is een overzicht gegeven van de soorten die niet zijn gedetecteerd in de eDNA bemonstering. Het gaat om de soorten Bittervoorn, Rietvoorn/Ruisvoorn, Elrits en Zeeprik. De Zeeprik zat niet in de toegepaste metabarcoding analyse en kon dus ook niet met eDNA aangetoond worden. De Bittervoorn en Rietvoorn/Ruisvoorn die gemist werden met eDNA kwamen in zeer lage dichtheden voor. De geschatte biomassa bedroeg 0.1 kg/ha of minder (7-17 vissen/ha). Elrits werd tijdens de KRW bemonstering in hogere dichtheden aangetroffen. In Bijlage 4 is een overzicht gegeven van de visbestandsschattingen.

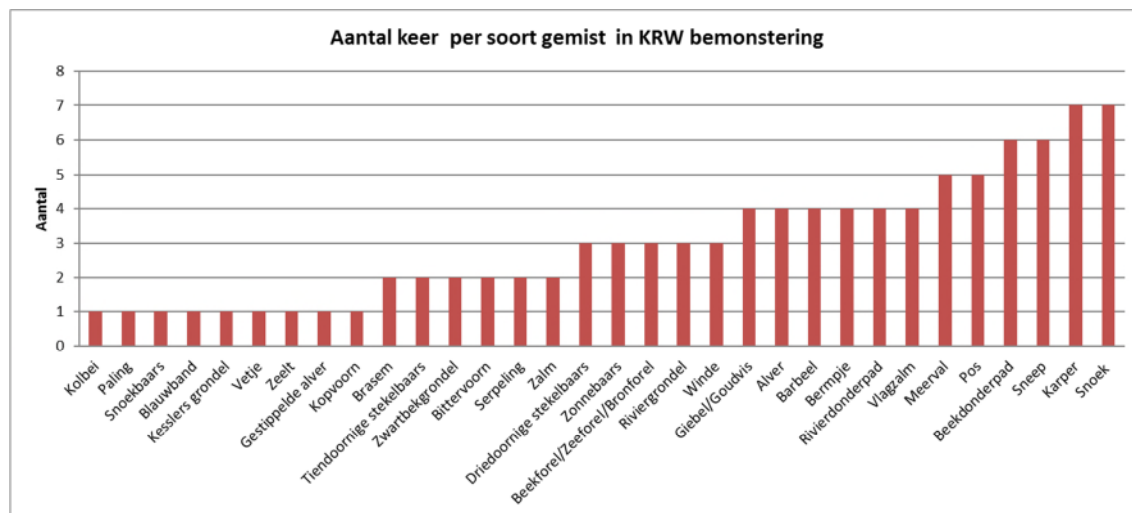
TABEL 4-2. SOORTEN DIE IN DE KRW VISBEMONSTERING GEVANGEN ZIJN MAAR NIET ZIJN GEDETECTEERD MET EDNA. DE ZEEPRIK ZAT NIET IN DE TOEGEPASTE METABARCODING ANALYSE. HET BETREFFENDE MONSTERPUNT, DE GESCHATTE BIOMASSA EN DE AANTALLEN PER HECTARE ZIJN AANGEGEVEN.

Soort	Aantal keer gemist in eDNA bemonstering	Gemist monsterpunt	N/ha	Kg/ha
Bittervoorn	1	OROER440	17	<0.1
Rietvoorn/Ruisvoorn	1	OROER715	7	0.1
Elrits	2	OROER195	15	0.1
		OROER312	580	0.2
Zeeprik	1	OROER520	14	0.1

Soorten enkel aangetoond met eDNA metabarcoding

Met eDNA zijn op alle bemonsteringslocaties meerdere soorten gedetecteerd die niet in de KRW bevissing in 2016 zijn gevangen. Wel zijn al deze soorten tijdens de bemonstering van de ECI waterkrachtcentrale in de periode 2009 - 2014 aangetroffen. In Figuur 4-2 staat weergegeven hoe vaak een soort wel met eDNA is aangetoond op een bemonsteringslocatie maar niet in de KRW-bevissing is aangetroffen. De meeste van de gemiste soorten zijn op twee of meer locaties gemist met de KRW bevissing. Karper en Snoek zijn op alle locaties bij de KRW bevissingen gemist. Zeker van grotere dieren is bekend dat ze vistuigen kunnen ontwijken.

In Bijlage 2 is een overzicht gegeven van de eDNA data. Hierin is aangegeven hoe algemeen deze soorten waren in de eDNA monsters (uitgedrukt als aandeel in DNA sequenties van de soort ten opzichte van het totaal aan DNA sequenties in het watermonster). Daaruit blijkt dat een aantal soorten (Karper, Brasem, Barbeel, Kopvoorn en Riviergrondel) die enkel met eDNA werden aangetoond op een bemonsteringslocatie, daar in hoge DNA dichtheden voorkwamen: grofweg in meer dan 10% van het totaal aangetroffen aantal DNA sequenties op het betreffende monsterpunt.



FIGUUR 4-2. HET AANTAL KEER DAT EEN MET EDNA GEDETECTEERDE SOORT GEMIST IS BIJ EEN KRW BEMONSTERING OP ZEVEN LOCATIES IN DE ROER.

4.1.2 Metabarcoding en KRW bevissing Dieze en Aa

In de Dieze, Aa en Stadse Aa is op negen bemonsteringslocaties een eDNA bemonstering voor een metabarcoding analyse uitgevoerd. Op de locaties Beusingsedijk en Orionpad kon te weinig DNA worden geëxtraheerd voor een sequentie analyse. Waardoor hier onvoldoende DNA is aangetroffen is nog onzeker. In paragraaf 5.2 wordt hier nader op ingegaan.

Op vier bemonsteringslocaties heeft een traditionele KRW bemonstering plaatsgevonden. Op bemonsteringslocatie NL38_6J-4 zijn geen vissen aangetroffen tijdens de KRW visbemonstering. In Tabel 4-3 staan de gegevens voor de vergelijking tussen de eDNA en visstandbemonstering op de bemonsteringslocaties. Daarnaast wordt hier een vergelijking gemaakt op waterlichaam niveau. Hiervoor zijn de soorten van de bemonsteringslocaties geaggregeerd voor de Dieze en Stadse Aa. Tabel 4-4 geeft een overzicht van de resultaten van de eDNA bemonstering voor de locaties Henriëttewaard, vistrap Crevecoeur (puntbemonstering nabij vispassage) en Elsstraat.

TABEL 4-3. VERGELIJKING SOORTENLIJST EDNA METABARCODING EN KRW BEVISSING (GROEN = KRW, GESTREEPT = EDNA, WIT = GEEN DETECTIE, GROEN + GESTREEPT = KRW + EDNA).

	NL38_601 (Stadse Aa)	NL38_602 (Stadse Aa)	NL38_6J-4 (Dieze)	NL38_6J-3 (Dieze)	Stadse Aa (NL38- 60-1 + NL36-60-2)	Dieze (NL38-6J-3 + NL38_6J-4)	
Eurytoop							
Baars Blankvoorn Brasem Driedoornige stekelbaars Karper Kleine modderkruiper Kolblei Paling/Aal Pos Snoekbaars							Alleen KRW KRW en eDNA Geen eDNA
Exoot							
Marm grondel Roofblei Zwartbek grondel							
Plantminnend							
Bittervoorn Giebel/Goudvis Rietvoorn/Ruisvoorn Snoek							

Vetje						
Zeelt						
Stroomminnend						
Alver						
Berpje						
Kopvoorn						
Riviergrondel						
Winde						

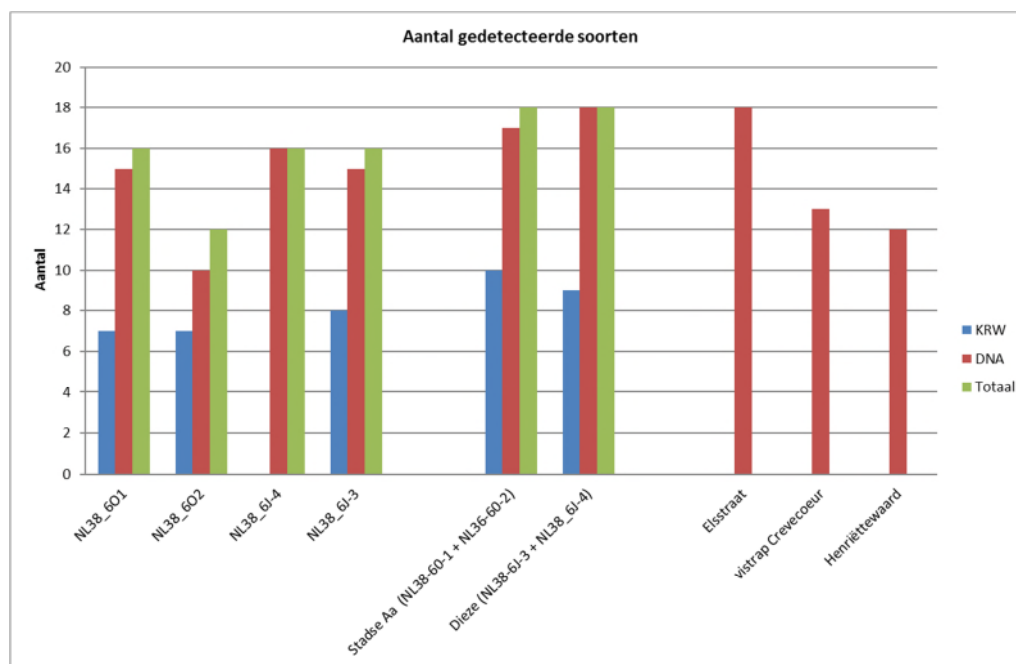
TABEL 4-4. SOORTENLIJST EDNA METABARCODING HENRIËTTEWAARD, ELSSTRAAT, VISSTRAP CREVECOEUR (GESTREEPT = EDNA, WIT = GEEN DETECTIE).

	Elsstraat (Rosmalense Aa)	visstrap Crevecoeur (Dieze)	Henriëttewaard (Dieze)	
Eurytoop				
Baars				Geen DNA
Blankvoorn				
Brasem				
Driedoornige stekelbaars				
Karper				
Kleine modderkruiper				
Kolblei				
Paling/Aal				
Pos				
Snoekbaars				
Tienddoornige stekelbaars				
Exoot				
Marmmergrondel				
Roofblei				

Witvingrondel			
Zwartbekgrondel			
Plantminnend			
Bittervoorn			
Rietvoorn/Ruisvoorn			
Snoek			
Zeelt			
Stroomminnend			
Alver			
Bermpje			
Riviergrondel			
Winde			

Aantal aangetroffen soorten

In Figuur 4-3 staat een overzicht van het totaal aantal gedetecteerde soorten (eDNA + KRW samen) en daarnaast van het aantal gedetecteerde soorten in de eDNA bemonstering en de KRW bevissing. Ook is de som van het aantal soorten in 2016 voor de Dieze en Stadse Aa weergegeven op basis van de bemonsteringslocaties NL38_601, NL38_602, NL38_6J_4, NL38_6J3. Voor de locaties Elsstraat, vistrap Crevecoeur en Henriëttewaard zijn alleen de aantallen gedetecteerde soorten in de eDNA bemonstering beschikbaar.



FIGUUR 4-3. AANTAL GEDETECTEERDE SOORTEN PER MONSTERPUNT IN TOTAAL (EDNA +KRW) EN VOOR EDNA EN KRW BEVISSING APART.

Op alle bemonsteringslocaties waar ook KRW bevissingen hebben plaatsgevonden zijn met eDNA meer soorten aangetoond dan in de KRW bevissing. Het betreft voor de Stadse Aa 17 soorten met eDNA tegenover 10 soorten in de KRW bemonstering en bij de Dieze 18 soorten met eDNA tegenover 9 soorten in de KRW bemonstering.

Op de bemonsteringslocaties Elsstraat, vistrap Crevecoeur en Henriëttewaard zijn respectievelijk 18, 13 en 12 verschillende vissoorten aangetroffen. Het betreft op de exotische Witvingrondel (Elsstraat) na dezelfde soorten die in de Dieze en Stadse Aa zijn aangetroffen.

Soorten enkel aangetoond met KRW bevissing

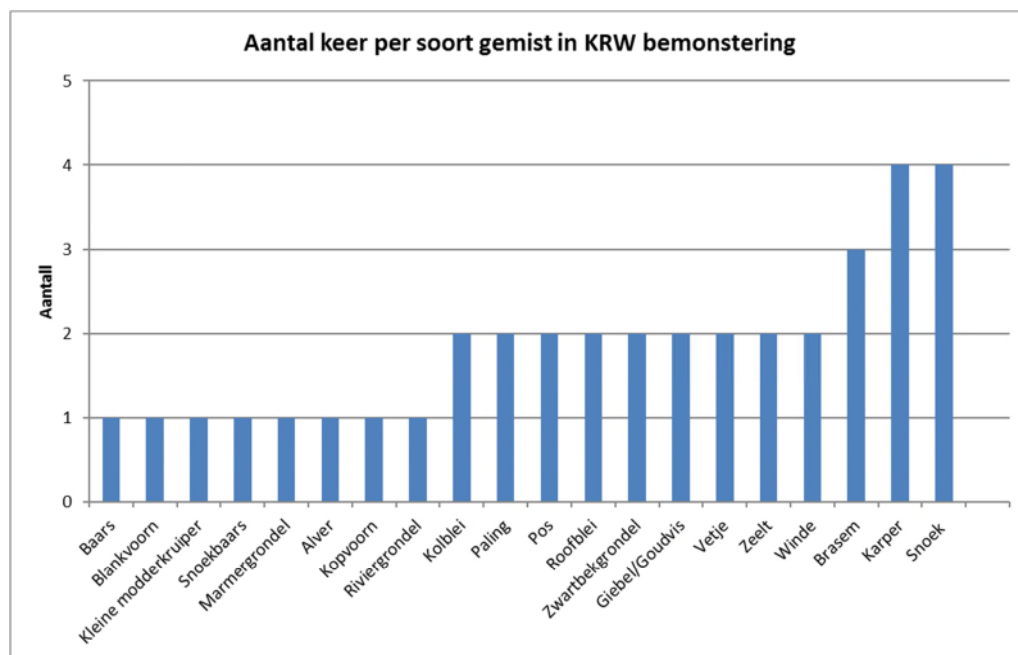
Op drie bemonsteringslocaties zijn er met eDNA een of twee soorten gemist die wel in de KRW-bevissing waren gevangen (zie Tabel 4-5). Deze soorten kwamen in de KRW bevissing in (zeer) lage dichtheden voor (geschatte dichtheid 2-5 vissen/ha). Als gevolg hiervan zou het kunnen zijn dat er te weinig eDNA in het water aanwezig was om in het monster te komen of gedetecteerd te worden.

TABEL 4-5. SOORTEN DIE IN DE KRW VISBEMONSTERING GEVANGEN ZIJN MAAR NIET ZIJN GEDETECTEERD MET EDNA. HET BETREFFENDE MONSTERPUNT, DE GESCHATTE BIOMASSA EN DE AANTALLEN PER HECTARE ZIJN AANGEGEVEN.

Soort	Aantal keer gemist in eDNA bemonstering	Gemist monsterpunt	N/ha	Kg/ha
Kleine modderkruiper	1	NL38_602	2	<<0.1
Bittervoorn	1	NL38_601	3	<<0.1
Alver	1	NL38_6J-3	3	0.2
Bermpje	1	NL38_602	5	<<0.1

Soorten enkel aangetoond met eDNA metabarcoding

Met eDNA zijn op alle bemonsteringslocaties meerdere soorten gedetecteerd die niet in de KRW bevissing in 2016 zijn gevangen. In Figuur 4-4 staat hoe vaak een soort op het totaal van monsterpunten wel met eDNA is aangetoond op een bemonsteringslocatie maar niet in de KRW-bevissing is aangetroffen. De meeste van de gemiste soorten zijn twee of meer keren gemist met de KRW bevissing. Karper en Snoek zijn ook hier op alle locaties bij de KRW bevissingen gemist.



FIGUUR 4-4. PER SOORT HET AANTAL KEER DAT EEN MET EDNA GEDETECTEERDE SOORT GEMIST IS BIJ EEN KRW-BEMONSTERING. BEMONSTERINGSPUNTEN ELSSTRAAT, VISTRAP CREVECOER EN HENRIËTTEWAARD IN DE ANALYSE NIET MEEGENOMEN, AANGEZIEN HIER GEEN VERGELIJKINGSDATA BESCHIKBAAR IS

In Bijlage 2 is een overzicht gegeven van de eDNA data. Hierin is aangegeven hoe algemeen deze soorten waren in de eDNA monsters (uitgedrukt als aandeel in eDNA sequenties van de soort t.o.v. het totaal aan eDNA-sequenties in het watermonster). Daaruit blijkt dat er soorten bij waren (bijvoorbeeld Brasem en Zwartbekgondel) die in relatief hoge eDNA-dichtheden voorkwamen: grofweg in meer dan 10% van het totaal aantal aangetroffen eDNA-sequenties op het betreffende monsterpunt.

4.1.3 Metabarcoding en KRW bevissing beken ten zuiden van Breda

In de beken ten zuiden van Breda, respectievelijk de Kleine beek, Aa of Weerij en Bijloop heeft op 10 bemonsteringslocaties eDNA onderzoek plaatsgevonden. Daarnaast zijn in de Aa of Weerij en Bijloop KRW bevissingen uitgevoerd.

Op de locaties AW_TW_G4 (Aa of Weerij), AW_BE_D1 (Aa of Weerij), KL_SA_E1 (Kleine Beek), KL_AB_D1 (Kleine Beek) en BT_BI_I1 (Bijloop) kon te weinig eDNA worden geëxtraheerd voor sequentie analyse. Waardoor hier onvoldoende eDNA is aangetroffen is nog onzeker. In paragraaf 5.2 wordt hier nader op ingegaan.

In Tabel 4-6 staan de gegevens voor de vergelijking tussen de eDNA en visstandbemonstering op de bemonsteringslocaties in de Aa of Weerij. Daarnaast wordt hier een vergelijking gemaakt op waterlichaamniveau. Hiervoor zijn de soorten van alle negen KRW bemonsteringslocaties gecombineerd. De laatste kolom in de tabel bevat een overzicht van de soorten die op de drie locaties zijn aangetroffen waarvoor ook het eDNA geëxtraheerd kon worden.

In Tabel 4-7 staat een overzicht van de eDNA bemonstering van de locaties in de Kleine Beek.

TABEL 4-6. VERGELIJKING SOORTENLIJST EDNA METABARCODING EN KRW BEVISSING AA OF WEERIJS (GROEN = KRW, GESTREEPT = EDNA, WIT = GEEN DETECTIE, GROEN + GESTREEPT = KRW + EDNA).

	AW_ZT_H5	AW_WB_F8	AW_EW_C2	Hele waterlichaam	Meetpunten AW-ZT-H5, AW_WB_F8, AW_EW_C2	Legenda
Eurytoop						
Alver						Alleen KRW
Baars						KRW en DNA
Blankvoorn						Geen
Brasem						DNA
Karper						
Kleine modderkruiper						
Kolblei						
Paling/Aal						
Pos						
Snoekbaars						
Exoot						
Blauwband						
Roofblei						
Zonnebaars						
Zwartbekgrondel						
Plantminnend						
Bittervoorn						
Rietvoorn/Ruisvoorn						
Snoek						
Tienddoornige stekelbaars						
Vetje						
Zeelt						
Stroomminnend						
Rivierdonderpad						

Bermpje					
Riviergrondel					
Winde					

TABEL 4-7. SOORTENLIJST OP BASIS VAN EDNA ANALYSE KLEINE BEEK (GESTREEPT = DNA, WIT = GEEN DETECTIE).

	KL_BA_C3	KL_BL_B2	Kleine Beek KRW (2013)	
Eurytoop				Legenda
Baars				Alleen KRW
Blankvoorn				KRW en DNA
Brasem				Geen
Driedoornige stekelbaars				DNA
Karper				
Kleine modderkruiper				
Kolblei				
Paling/Aal				
Pos				
Snoekbaars				
Spiering				
Exoot				
Marmmergrondel				
Zonnebaars				
Zwartbekgrondel				

Plantminnend

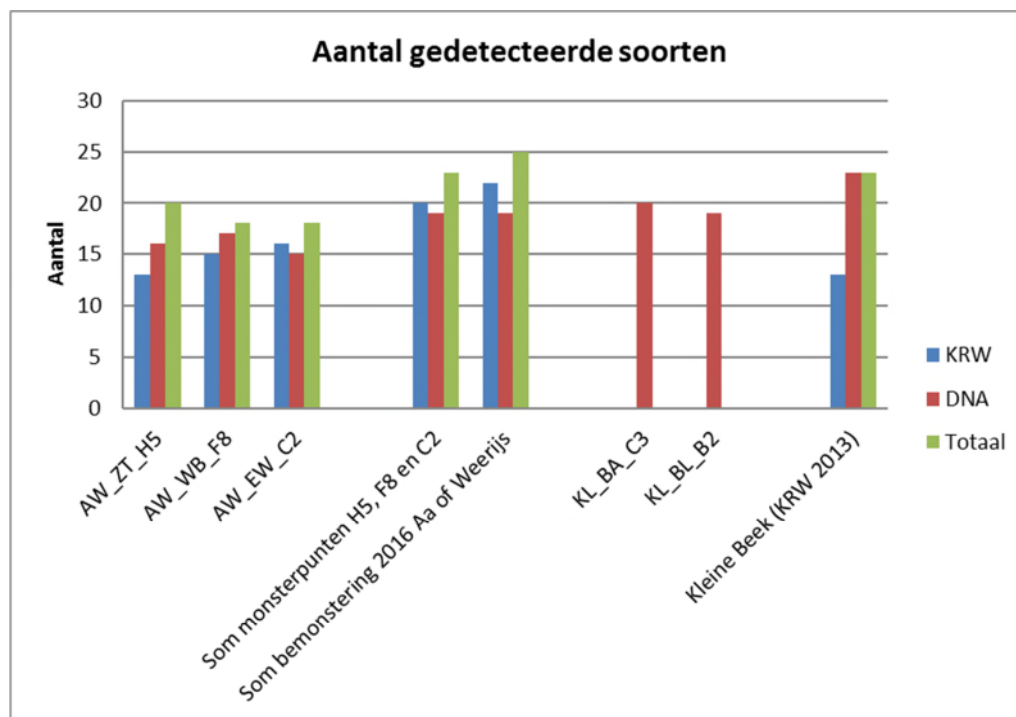
Bittervoorn			
Giebel/Goudvis			
Rietvoorn/ Ruisvoorn			
Snoek			
Tiendornige stekelbaars			
Vetje			
Zeelt			

Stroomminnend

Bermpje			
Riviergrondel			
Winde			

Aantal aangetroffen soorten

In Figuur 4-5 staat een overzicht van het aantal gedetecteerde soorten in de eDNA bemonstering en de KRW bevissing en het totaal aantal gedetecteerde soorten (eDNA + KRW samen). Ook is de som van het aantal soorten bij de bemonstering in 2016 weergegeven in de Aa of Weerijis en van de combinatie van de monsterpunten AW_ZT_H5, AW_WB_F8 en AW_EW_C2.



FIGUUR 4-5. AANTAL GEDETECTEERDE SOORTEN PER BEMONSTERINGSLOCATIE IN TOTAAL (EDNA+KRW) EN VOOR EDNA EN DE KRW BEVISSING APART.

Op de monsterpunten (AW_ZT_H5 en AW_WB_F8) in de Aa of Weerijis zijn met eDNA meer soorten aangetoond dan in de KRW bemonstering. Het betreft respectievelijk 16 en 17 soorten met eDNA en 13 en 15 soorten in de KRW bemonstering.

In totaal zijn er met beide methoden samen 25 unieke soorten aangetoond. Bij de vergelijking tussen de visbestandsgegevens van de Aa of Weerijis voor de drie locaties samen en op waterlichaam niveau zijn er met de KRW bemonstering meer soorten aangetoond dan met eDNA. De meest voorkomende soorten zoals Baars, Blankvoorn, Brasem, Rietvoorn/Ruisvoorn en Riviergrondel zijn met beide methodes gevonden.

Op de beide bemonsteringslocaties voor eDNA in de Kleine Beek zijn respectievelijk 20 en 19 verschillende vissoorten aangetroffen. Op waterlichaam niveau betreft het 23 unieke soorten, waaronder:

- veel voorkomende eurytope soorten zoals Baars, Blankvoorn, Brasem en Karper;
- een grote hoeveelheid plantminnende soorten, waaronder Zeelt en Rietvoorn/Ruisvoorn;
- exotische soorten zoals de invasieve Zwartbekgrondel;
- stroomminnende soorten zoals het BERPJE, Winde en de Riviergrondel.

De grote soortendiversiteit in de Kleine Beek is opvallend. Normaal gesproken is de soortenrijkdom in bovenloopjes als de Kleine Beek lager dan in midden-/benedenlopen als de Aa of Weerij. Bij de resultaten van de eDNA bemonstering is dit andersom. Het verwachte beeld – lagere soortenrijkdom in de Kleine Beek - kwam wel naar voren bij eerdere KRW bemonsteringen. In 2009 en 2013 was het totaal aantal soorten bij KRW bemonsteringen in de Kleine Beek respectievelijk 11 en 13 (tegenover 23 in 2016 met eDNA) en in de Aa of Weerij in 2010 en 2013 respectievelijk 19 en 18. In 2011 zijn echter bij de meest benedenstroomse stuwen in de Kleine Beek vispassages aangelegd. Hierdoor is vismigratie tussen de Aa of Weerij en Kleine Beek mogelijk gemaakt. Het is echter niet heel waarschijnlijk dat de soortenrijkdom als gevolg van deze aanleg zo sterk is toegenomen als de eDNA resultaten doen vermoeden. Tijdens een bemonstering in 2015 bij de meest benedenstroomse vispassage werden namelijk enkel soorten aangetroffen, met uitzondering van de Paling/Aal en de Bruine Amerikaanse dwergmeerval, die in 2009 al in de Kleine Beek aangetroffen waren. De Bruine Amerikaanse dwergmeerval is tijdens de eDNA bemonstering niet gedetecteerd (de soort zat wel in de soortsequentie bibliotheek waarmee de analyse is uitgevoerd).

Soorten enkel aangetoond met KRW bevissing

Op de bemonsteringslocaties zijn in de Aa of Weerij met eDNA enkele soorten gemist die wel in bijbehorende KRW-bemonstering waren gevangen. In Tabel 4-8 staat een overzicht van deze soorten. Alleen Winde is op twee locaties gemist, de andere soorten op één locatie.

TABEL 4-8. SOORTEN DIE IN DE KRW VISBEMONSTERING VAN DE AA OF WEERIJS OP EEN LOCATIE GEVANGEN ZIJN MAAR NIET ZIJN GEDETECTEERD MET EDNA. HET BETREFFENDE MONSTERPUNT, DE GESCHATTE BIOMASSA EN DE AANTALLEN PER HECTARE ZIJN AANGEGEVEN.

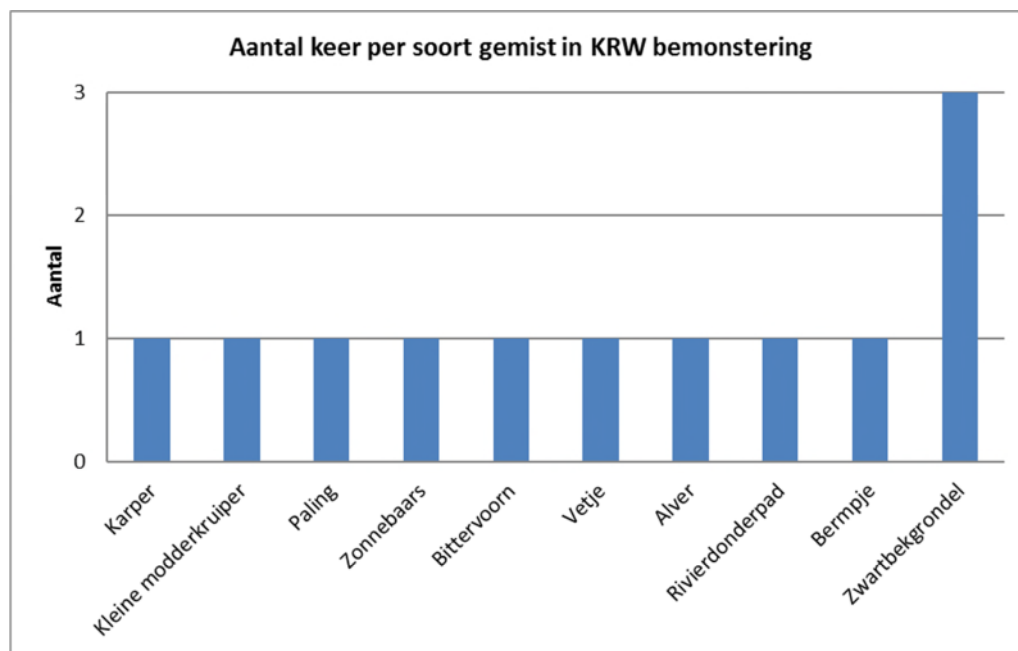
Soort	Aantal keer gemist in eDNA bemonstering	Gemist monsterpunt	N/ha	Kg/ha
Kleine modderkruiper	1	AW_EW_C2	1166	1.9
Kolblei	1	AW_ZT_H5	83	0.6
Snoekbaars	1	AW_ZT_H5	3	9.6
Blauwband	1	AW_EW_C2	21	< 0.1
Roofblei	1	AW_ZT_H5	3	5.2
Alver	1	AW_ZT_H5	20	0.5
Winde	2	AW_WB_F8	8	< 0.1
		AW_EW_C2	21	35.1

De niet gedetecteerde populatie Winde en Kleine modderkruiper bestaat uit volgroeide dieren. Maar ook een populatie met adulte Alver is gemist, evenals een groot aantal Kolblei. Dit is opvallend omdat bijvoorbeeld Alver een soort is die in scholen in de waterkolom en aan het oppervlak leeft. Door de grootte van de populatie mag verwacht worden dat er voldoende eDNA sporen in het water zouden zijn achtergelaten die detecteerbaar waren.

Soorten enkel aangetoond met eDNA metabarcoding

Met eDNA zijn op de bemonsteringslocaties in de Aa of Weerij twee tot zeven soorten gedetecteerd die niet in de KRW bemonstering in 2016 zijn gevangen. In Figuur 4-6 staat weergegeven op hoeveel bemonsteringslocaties een soort wel met eDNA is aangetoond maar

niet in de KRW-bevissing is aangetroffen. De Zwartbekgrondel is op alle negen locaties bij KRW bemonsteringen in de hele Aa of Weerijs gemist, maar met eDNA op alle drie de locaties aangetroffen.



FIGUUR 4-6. PER SOORT HET AANTAL KEER DAT EEN MET EDNA GEDETECTEERDE SOORT GEMIST IS BIJ EEN KRW BEMONSTERING.

De soorten die wel met eDNA, maar niet bij de KRW-bemonstering zijn aangetroffen, zijn in ca 1 - 10% van het totaal aangetroffen aantal DNA-sequenties aangetroffen en komen zeer waarschijnlijk in relatief lage dichtheden voor. In Bijlage 2 is een overzicht gegeven van de eDNA data. Hierin is aangegeven hoe algemeen deze soorten waren in de eDNA monsters (uitgedrukt als aandeel in eDNA sequenties van de soort t.o.v. het totaal aan eDNA-sequenties in het watermonster). Soorten waarvan slechts één of enkele dieren voorkomen, kunnen bij KRW-bemonsteringen gemist worden, omdat met de ingezette vangtuigen niet alle vissen gevangen worden. Onderstaand worden de meest opvallende gemiste soorten besproken.

Dat soorten zoals Paling/Aal en Kleine modderkruiper op één locatie wel zijn aangetroffen tijdens de eDNA bemonstering, maar niet tijdens de KRW bemonstering is goed te verklaren. Dit zijn soorten waarvan het bekend is dat ze relatief moeilijk te vangen zijn door hun bodem ingravende leefwijze. Overigens zijn deze soorten wel op andere trajecten in de Aa of Weerijs aangetroffen en mag ook daarom worden aangenomen dat deze soorten daadwerkelijk op de bemonsterde locatie aanwezig waren.

Karper is ook relatief goed in staat om aan vangtuigen te ontsnappen en zeker bij lage dichtheden is de kans aanwezig dat deze soort bij KRW-bemonsteringen gemist wordt. Aangezien Karper net als Paling/Aal en Kleine modderkruiper op andere locaties wel is aangetroffen, mag aangenomen worden dat deze soort daadwerkelijk op de bemonsterde locatie aanwezig was.

Ook voor kleine soorten die vooral tussen waterplanten zitten, zoals Bittervoorn en Vetje is het missen bij KRW bemonsteringen verklaarbaar, vooral als deze soorten in lage dichtheden

voorkomen. Voor deze soorten geldt trouwens ook dat ze wel op andere trajecten in de Aa of Weerij zijn aangetroffen. Eveneens voor Zonnebaars, Alver en Bempje geldt dat ze wel op andere locaties in de Aa of Weerij zijn waargenomen en dat deze soorten dus daadwerkelijk in het waterlichaam voorkomen. Rivierdonderpad is alleen met eDNA in de Aa of Weerij aangetroffen. Deze soort trekt de laatste jaren de beken ten zuiden van Breda op. Het is aannemelijk dat deze soort in de Aa of Weerij in lage dichtheden voorkomt en daardoor gemist is bij de KRW bemonstering.

De afwezigheid van de Zwartbekgrondel in de KRW bemonstering valt op. De Zwartbekgrondel is een exotische soort afkomstig uit het Ponto-Caspische gebied die langzaam aan zijn opmars via de grote rivieren door Nederland werkt. Het is een bodemvis die tussen stenig substraat (vooral stortsteen) leeft. De Riviergrondel, ook een bodemvis (zandig substraat) is in grote aantallen aangetroffen tijdens de KRW bemonstering. Het is te verwachten dat bij aanwezigheid van tevens op de bodem levende Zwartbekgrondels deze soort ook tijdens de reguliere KRW bemonstering in de Aa of Weerij gevangen was. Het aantreffen van Zwartbekgrondel met eDNA is des te opmerkelijker, omdat deze soort bij KRW bemonsteringen in de beken ten zuiden van Breda op geen enkele locatie is gevangen (in 2016 zijn in totaal 32 voor Zwartbekgrondel bereikbare locaties voor de KRW bemonsterd). Mogelijk is de soort wel aanwezig, maar nog in zeer lage dichtheden op locaties (zoals tussen stortstenen in vispassages) die niet voor de KRW worden bemonsterd.

Opvallende waarnemingen

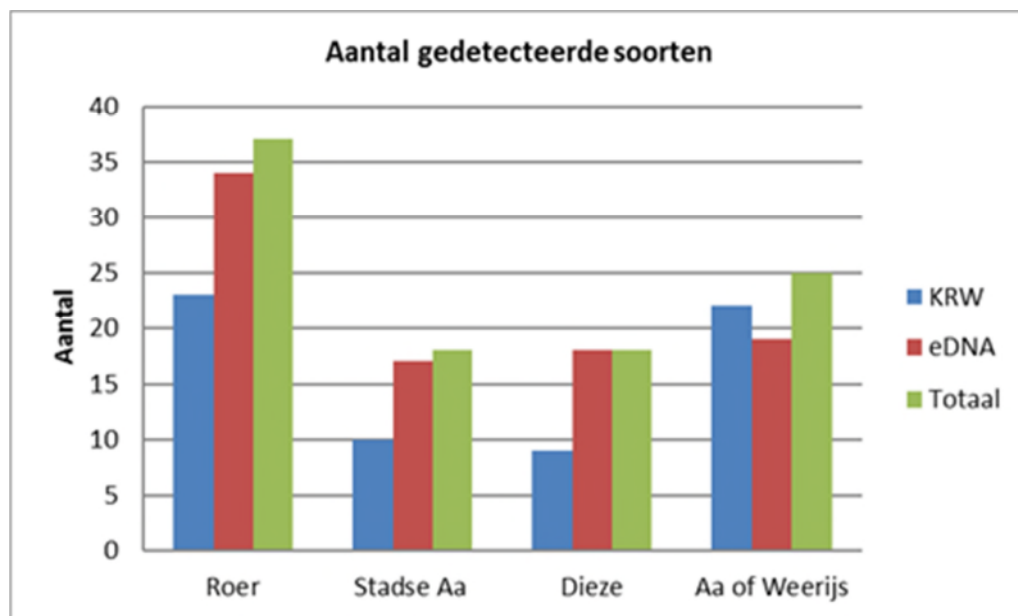
Tijdens de eDNA bemonstering zijn in de Kleine Beek een aantal opvallende waarnemingen gedaan. Zo worden soorten zoals Spiering en Snoekbaars aangetoond. De hoeveelheid DNA kopieën is echter wel erg laag. Spiering is een soort van groot open water, en is op grond van eerdere bemonsteringen niet in de Kleine Beek te verwachten. De Spiering is echter een soort die door sportvissers veelal als dood aas voor het vissen van Snoekbaars gebruikt wordt. Het is evenwel niet aannemelijk dat op deze wijze DNA van Spiering in de Kleine Beek terecht is gekomen, omdat Snoekbaars een soort is van diep, voedselrijk en doorgaans troebel water zoals boezemsystemen, rivieren vaarten en plassen. Het voorkomen van de soort in een ondiepe, heldere en plantenrijke bovenloop van een beek is opmerkelijk. De Snoekbaars is wel met de KRW-bemonstering (niet met eDNA) in de Aa of Weerij aangetroffen.

Tot slot is het opvallend dat de Winde en Marmergrondel niet in de Aa of Weerij zijn aangetroffen maar wel in de Kleine Beek. De Marmergrondel is een exoot die vanuit rijkswater optrekt. De Kleine Beek is via de Aa of Weerij te bereiken. Ook tijdens conventionele KRW bemonstering is de Marmergrondel in de Aa of Weerij niet aangetroffen. Van Winde is het waarschijnlijker dat deze soort voorkomt in de Kleine Beek, omdat uit eerdere KRW bemonsteringen is gebleken dat deze soort duidelijk geprofiteerd heeft van toegenomen vismigratiemogelijkheden en zich over de Aa of Weerij heeft verspreid. Daarnaast is het een soort die kan profiteren van een verbeterde waterkwaliteit.

4.1.4 Vergelijking op waterlichaamniveau

De gegevens van de metabarcoding analyse en KRW bevissingen van de Roer, Stadse Aa, Dieze en Aa of Weerij zijn geaggregeerd en vergeleken op waterlichaam niveau. Voor de Aa of Weerij zijn de visstandgegevens van alle KRW bemonsteringslocaties gebruikt, dus inclusief de zes locaties waar geen eDNA bemonstering heeft plaatsgevonden.

Figuur 4-7 geeft per waterlichaam een overzicht van het totaal aantal gedetecteerde soorten (eDNA + KRW samen) en daarnaast van het aantal gedetecteerde soorten in de eDNA bemonstering en de KRW bevissing. In de meeste waterlichamen zijn met eDNA meer soorten aangetoond in vergelijking met de KRW bevissing. Naar verhouding is vooral voor de Stadse Aa en de Dieze het verschil groot. Alleen in de Aa of Weerij zijn met de KRW-bemonstering meer soorten aangetoond.



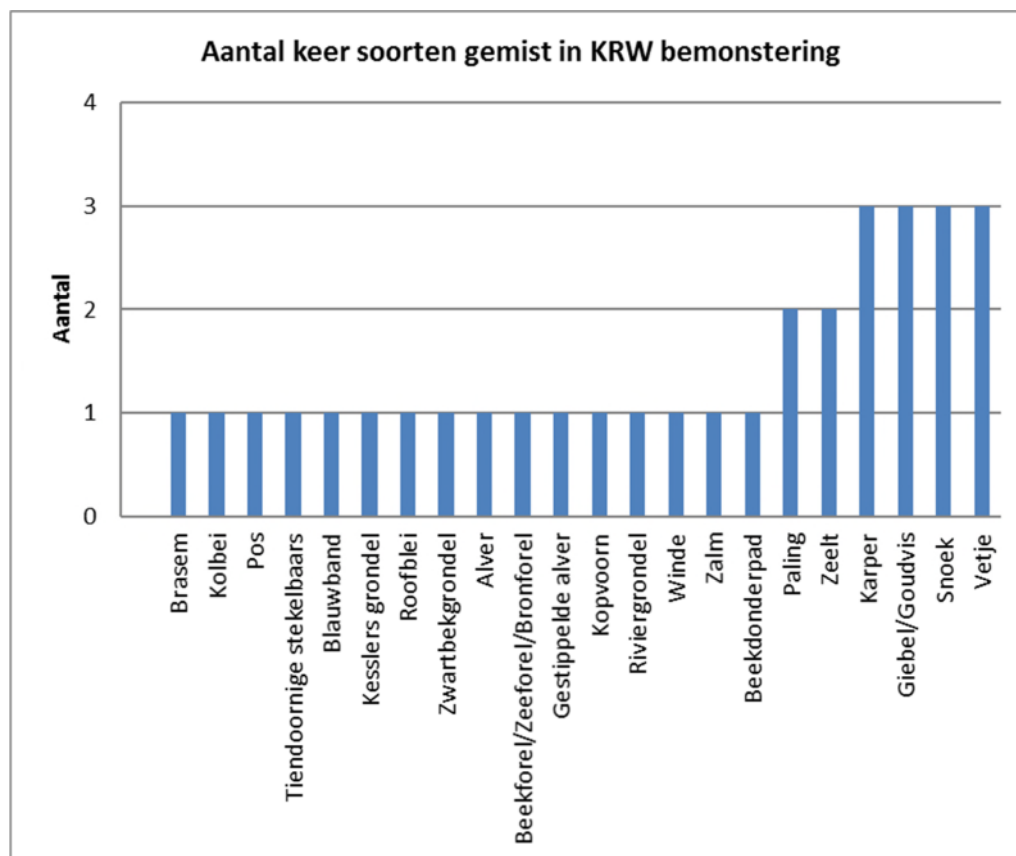
FIGUUR 4-7. AANTAL GEDETECTEERDE SOORTEN PER WATERLICHAAM IN TOTAAL (EDNA + KRW) EN VOOR EDNA EN DE KRW BEVISSING APART.

Op alle locaties worden er met de eDNA bemonstering enkele soorten niet gedetecteerd die wel in de KRW bevissing waren gevangen (zie Tabel 4-9). Aangezien het een aggregatie op waterlichaam niveau betreft worden er minder soorten gemist dan bij een vergelijking op het niveau van bemonsteringslocatie. De soorten die met eDNA niet werden gedetecteerd kwamen in zeer lage dichtheden voor (op de Winde na). Het niet aantreffen van Winde is opvallend, temeer omdat volgens de KRW bemonstering op één van de twee betreffende locaties Winde een substantieel aandeel heeft in de totale biomassa.

TABEL 4-9. SOORTEN DIE IN DE KRW-BEMONSTERING GEVANGEN ZIJN MAAR ZIJN GEMIST MET EDNA: GEGEVENS ZIJN DE SOORT, HET WATERLICHAAM, DE GESCHATTE BIOMASSE EN DE GESCHATTE AANTALLEN PER HECTARE PER LOCATIE.

	Waterlichaam	N/ha	Kg/ha
Snoekbaars	Aa of Weerij	3	9.6
Blauwband	Aa of Weerij	21	<<0.1
Roofblei	Aa of Weerij	3	5.2
Bittervoorn	Stadse Aa	3	<<0.1
Rietvoorn/Ruisvoorn	Roer	7	0.1
Alver	Dieze	3	0.2
Winde	Aa of Weerij	8	<<0.1
		21	35.1

In alle vier waterlichamen zijn met eDNA soorten aangetoond die niet in de KRW bevissing zijn gevangen. In Figuur 4-8 staat weergegeven in hoeveel waterlichamen een soort wel met eDNA is aangetoond maar niet tijdens de KRW bevissing.



FIGUUR 4-8. PER SOORT HET AANTAL WATERLICHAMEN WAARIN DE SOORT WEL MET EDNA MAAR NIET IN DE KRW BEVISSING IS AANGETOOND.

De soorten Karper, Giebel/Goudvis, Snoek en Vetje zijn in drie waterlichamen met de KRW bevissing gemist. In al deze gevallen betrof het een laag aandeel (<10%) in het totaal aantal eDNA sequenties. Vanuit andere studies is bekend dat karperachtigen vaker worden gemist in de KRW visbemonstering dan in de eDNA bemonstering (Herder & Kranenbarg, 2016). Een verklaring voor het relatief vaak missen van Karper op waterlichaam niveau ligt in het feit dat dit veelal grote volwassen vissen betreft die regelmatig voorkomen in lagere dichtheden en die goed kunnen vluchten. Vetje en Zeelt zijn plantminnende soorten die vanwege een hoge vegetatiedichtheid in lage dichtheden moeilijk te vangen zijn.

Naast een vergelijking op waterlichaam niveau is er gekeken of er een (lineair) verband te vinden is tussen de verhoudingen in aandelen eDNA per soort en aandelen in biomassa, aantallen en biomassa + aantallen. Het aandeel van de variantie in een dataset dat door een lineair verband kan worden verklaard wordt uitgedrukt als R-kwadraat (R^2). Dit is een waarde tussen de 0 en +1 waarbij een hoge R^2 aangeeft dat er een sterk verband is en een lage R^2 (rond de nul) aangeeft dat er een laag verband is. Zo geeft een R^2 boven de 0,8 bijvoorbeeld aan dat er een zeer sterke relatie is tussen de onderzochte variabelen: de waarde van de 1e variabele (aandeel in eDNA) is voorspellend voor de waarde van de 2e variabele (aandeel in biomassa en aantallen). Het lineaire verband tussen eDNA en de aantallen en dichtheden is

voor de waterlichamen Roer en Aa of Weerij's bepaald. De bijbehorende grafieken zijn in Bijlage 5 weergegeven.

De gevonden verbanden zijn (zeer) zwak. In Tabel 4-10 is een overzicht gegeven van de bijbehorende waarden voor R^2 .

TABEL 4-10. VERKLAARDE VARIANTIE (R^2) PER WATERLICHAAM VOOR EEN LINEAIR VERBAND TUSSEN HET AANDEEL EDNA SEQUENTIES PER SOORT EN HET AANDEEL BIOMASSA OF AANTAL PER SOORT.

Waterlichaam	R^2 Biomassa	R^2 Aantal
Aa of Weerij's	0.03	0.07
Aa of Weerij's, exclusief locatie AW_WB_F8*	0.13	0.29
Roer	0.13	0.21
Samen	0.08	0.14

* Op deze locatie bedraagt het percentage eDNA-sequenties voor Zonnebaars bijna 70% van het totaal. Een dergelijke hoge dichtheid wordt voor deze soort op basis van langjarige bemonsteringsgegevens zeer onaannemelijk geacht en daarom is de berekening ook zonder deze locatie uitgevoerd.

4.2 Identificatie van mogelijke migratiebelemmeringen met qPCR

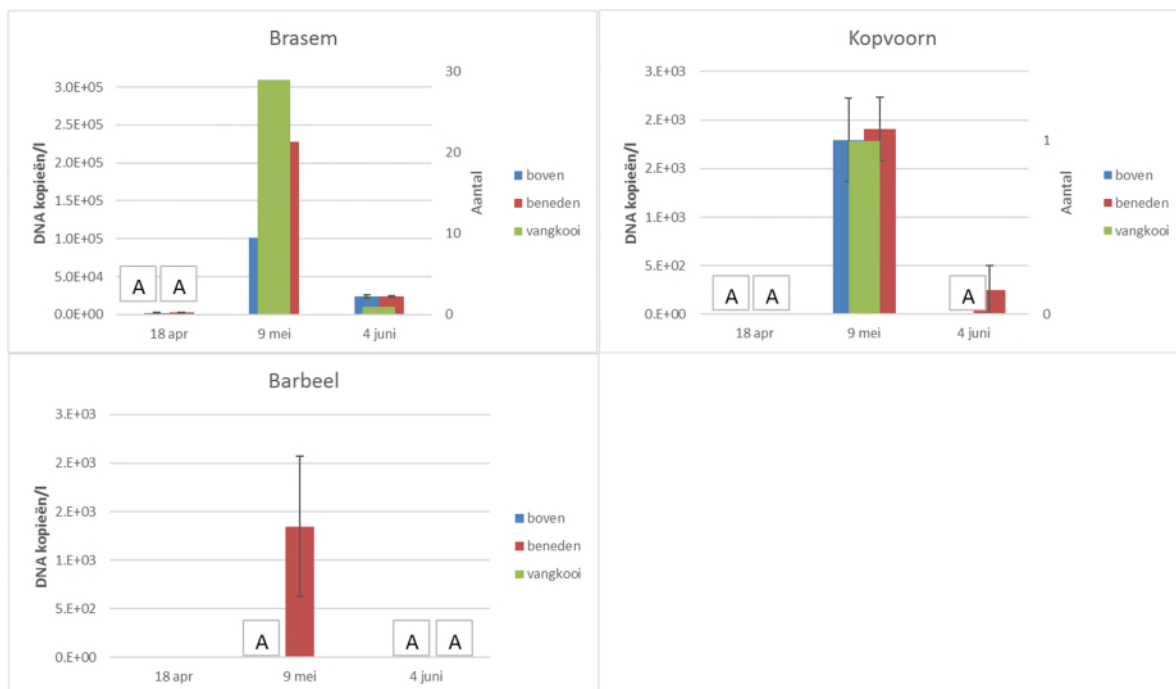
Bij de ECI waterkrachtcentrale te Roermond is een vergelijking gemaakt tussen de beschikbare vangkooigegevens van de doelsoorten Brasem, Kopvoorn, Barbeel, Zeeprik en Zalm en de resultaten van de kwantitatieve eDNA bepaling met qPCR in watermonsters direct boven- en benedenstrooms. De vangkooi is geleegd op dezelfde dag dat de eDNA bemonstering is genomen. In onderstaande paragraaf worden de resultaten besproken.

4.2.1 Resultaten qPCR en vistrapgegevens

Op 9 mei en 4 juni werden in de vangkooi respectievelijk 29 Brasems en 1 exemplaar aangetroffen. Op 9 mei werd zo ook één Kopvoorn gevangen. Geen van de doelsoorten werd gevangen op 18 april. Barbeel, Kopvoorn en Brasem zijn op alle data met eDNA aangetroffen. Barbeel is ook tijdens de reguliere KRW bemonstering in de Roer en Maas aangetoond. Zalm en Zeeprik zijn niet met eDNA aangetroffen en ook niet met de vangkooi gevangen op de monsterdagen.

In Figuur 4-9 zijn de kwantitatieve gegevens van de doelsoorten Brasem, Barbeel en Kopvoorn weergegeven. Met een A is aangegeven dat soorten wel met eDNA zijn aangetroffen, maar in een te lage hoeveelheid DNA kopieën om te kwantificeren. De standaardfouten zijn op basis van het aantal monsters (een triplo) berekend. De absolute eDNA gegevens tussen verschillende soorten zijn niet te vergelijken aangezien soorten kunnen verschillen in hoeveelheden afgegeven eDNA.

Op alle locaties waar eDNA is aangetroffen is dit DNA zowel boven- als benedenstrooms aangetroffen. Het aantal DNA kopieën benedenstrooms is voor Brasem en Barbeel op 9 mei hoger dan bovenstrooms. Voor de Kopvoorn is dat ook zo op 4 juni. Enerzijds zou dit verschil kunnen ontstaan doordat de standpopulatie benedenstrooms van de stuw door o.a. open verbinding met de Maas mogelijk hoger is. Anderzijds zou het ook kunnen betekenen dat de stuw op de betreffende meetdagen een (al dan niet tijdelijke) belemmering vormde voor stroomopwaartse migratie. Benedenstrooms zal er ook vermenging van eDNA optreden doordat daar zowel eDNA van de bovenstroomse populatie wordt aangetoond als van de benedenstroomse populatie. Opvallend is dat met behulp van de qPCR op sommige momenten een tamelijk groot verschil tussen de populaties direct boven- en benedenstrooms van de stuw is aangetoond.



FIGUUR 4-9. qPCR GEGEVENS EN VANGSTKOOIGEGEVENS BIJ DE ECI WATERKRACHTCENTRALE TE ROERMOND. WEERGEVEN ZIJN DE HOEVEELHEID DNA KOPIEËN BOVENSTROOMS (BLAUW), HOEVEELHEID DNA KOPIEËN BENEDENSTROOMS (ROOD) EN DE AANTALLEN GEVANGEN EXEMPLAREN IN DE VANGKOOI (GROEN). MET EEN A IS AANGEGEVEN DAT SOORTEN WEL MET EDNA ZIJN AANGETROFFEN, MAAR IN EEN TE LAGE HOEVEELHEID DNA KOPIEËN OM TE KWANTIFICEREN.

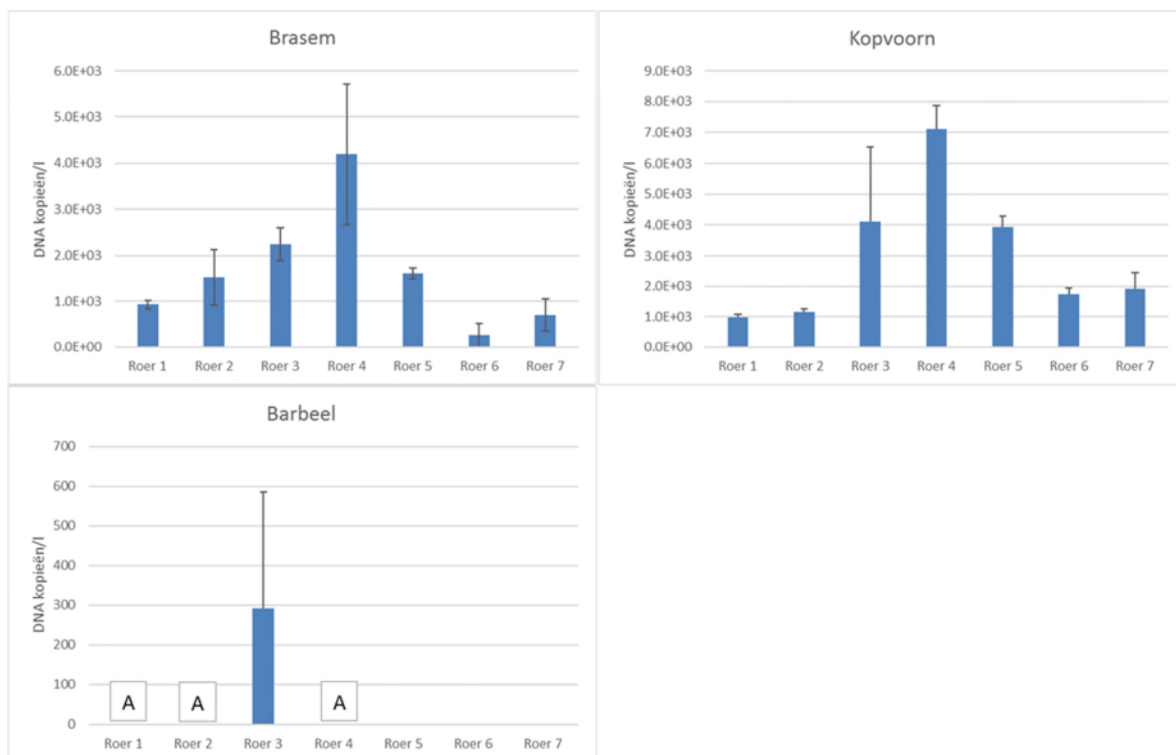
4.3 Kwantitatieve verspreiding van geselecteerde soorten

Bij een drietal onderzoeklocaties, namelijk de Roer, beken ten zuiden van Breda en in het Mark en Vliet stelsel zijn monsters genomen om een vergelijking te maken tussen de beschikbare visbestandgegevens van verschillende doelsoorten en de resultaten van de kwantitatieve eDNA bepaling met qPCR. In onderstaande paragraaf worden de resultaten besproken.

4.3.1 Resultaten qPCR langs de Roer

Op 28 juni 2016 heeft er een doelsoortanalyse langs een zevental monsterpunten voor de soorten Brasem, Kopvoorn, Barbeel, Zalm en Zeeprk plaatsgevonden. Dit is gedaan door een qPCR analyse uit te voeren. De analyses zijn in triplo uitgevoerd. Van Zalm en Zeeprk is tijdens de analyses geen eDNA aangetroffen.

In Figuur 4-10 zijn de resultaten van de qPCR analyses weergegeven, inclusief de bijbehorende standaardfouten als maat voor de variatie tussen de triplo's. Met een A is aangegeven dat soorten wel met eDNA zijn aangetroffen, maar in een te lage hoeveelheid DNA kopieën om te kwantificeren.

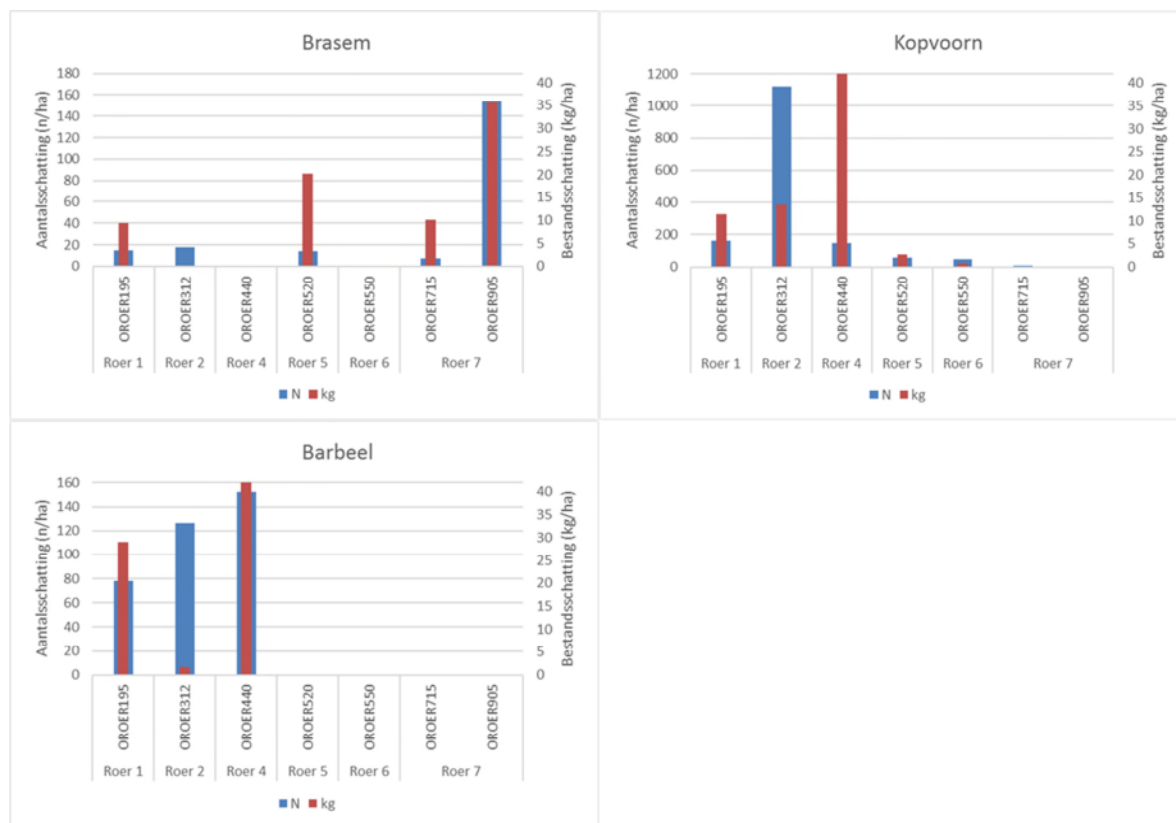


FIGUUR 4-10. QPCR GEGEVENS VAN DE DOELSOORTEN BRASEM, KOPVOORN EN BARBEEL. MET EEN A IS AANGEGEVEN DAT SOORTEN WEL MET EDNA ZIJN AANGETROFFEN, MAAR IN EEN TE LAGE HOEVEELHEID DNA KOPIEËN OM TE KWANTIFICEREN. STANDAARDFOUTEN OP BASIS VAN DE DRIE REPLICAS ZIJN OOK WEERGEGEVEN.

Het grootste aantal DNA kopieën bij zowel de Brasem, Kopvoorn en de Barbeel is aangetroffen op monsterpunten Roer 3 en Roer 4. Tevens is de standaardfout op deze monsterpunten het grootste. Dit komt bijvoorbeeld doordat bij de Brasem op Roer 4, één van de drie monsters ca. 3 keer zoveel eDNA bevatte als de beide andere replica monsters.

Op 12 t/m 14 september en 2 oktober 2017 heeft ook een KRW visstandbemonstering plaatsgevonden. De locaties komen niet exact overeen met deze eerdere qPCR bemonstering. De eDNA uitkomsten worden vergeleken met de KRW gegevens van de meest nabije locatie.

In Figuur 4-11 zijn de bestandsschattingen in aantal per hectare en kg per hectare over de verschillende trajecten in de Roer gegeven voor de drie met qPCR gedetecteerde soorten.



FIGUUR 4-11. KRW VISSTANDGEGEVENS VOOR BRASEM, KOPVOORN EN BARBEEL OP DIVERSE LOCATIES IN DE ROER (LINKER Y-AS: AANTAL PER HA IN BLAUW, RECHTER Y-AS: KG PER HA IN ROOD).

Te zien is dat bij beide bemonsteringen de doelsoorten Brasem, Kopvoorn en Barbeel zijn aangetroffen. Beide bemonsteringen geven een ander beeld van de verspreiding van de soorten over de bemonsteringslocaties. Dat kan komen doordat de monsters niet op hetzelfde tijdstip zijn genomen (juni 2016 resp. sept/okt. 2016). Daarnaast is een directe vergelijking tussen aantallen DNA kopieën en aantallen individuen en biomassa gegevens vooralsnog niet mogelijk.. Onduidelijk is bijvoorbeeld in hoeverre de hoeveelheid afgescheiden DNA materiaal wordt beïnvloed door de grootte van een individu en of het soortafhankelijk is. Wel geven beide bemonsteringen (eDNA en KRW) een indicatie dat er (op bemonsteringslocatie OROER 905 na) verder van Roermond af mogelijk een grotere populatie Kopvoorn en Barbeel voorkomt. Dit deel van de Roer is van een betere ecologische kwaliteit dan het benedenstroomse gedeelte.

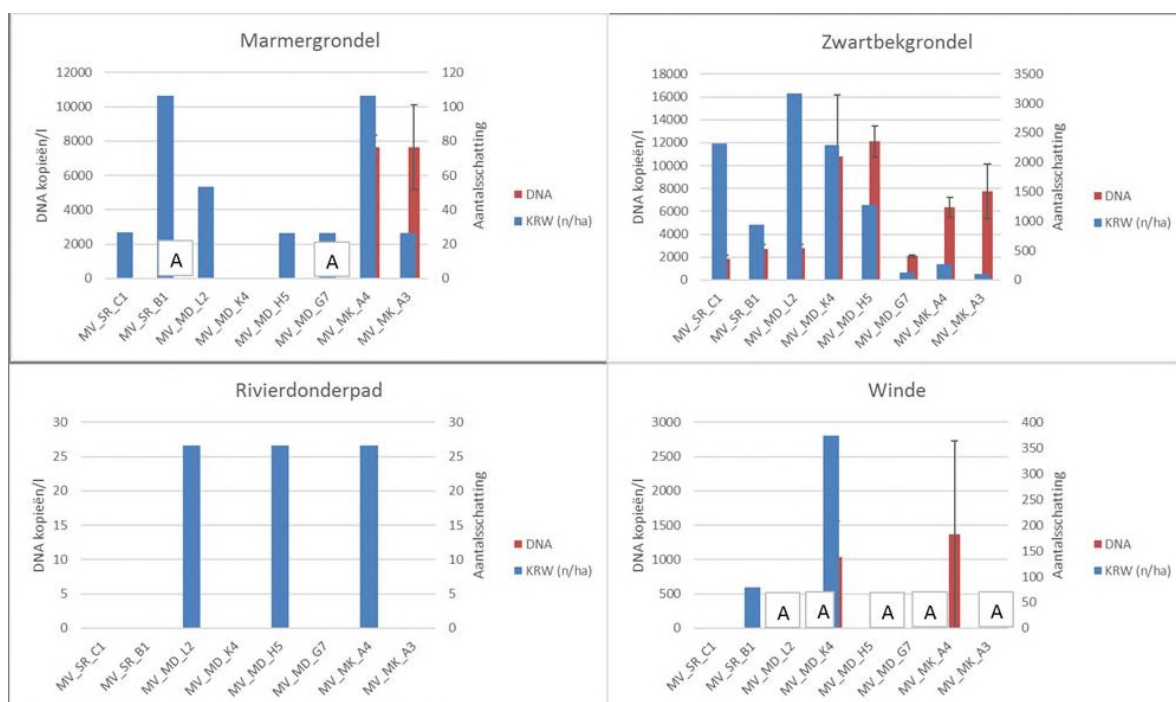
4.3.2 Resultaten qPCR en KRW bevissing beken ten zuiden van Breda

In de beken ten zuiden van Breda kon te weinig DNA worden geëxtraheerd voor een qPCR sequentie analyse. Waardoor hier onvoldoende DNA is aangetroffen is niet duidelijk. In paragraaf 5.2 wordt hier nader op ingegaan.

4.3.3 Resultaten qPCR en KRW bevissing Mark-Vliet

Op 21 en 22 juli 2016 heeft een doelsoortanalyse op een achttal monsterpunten plaatsgevonden van de soorten Marmergrondel, Rivierdonderpad, Zwartbekgrondel en Winde. Dit is gedaan door een qPCR analyse in triplo uit te voeren.

In Figuur 4-12 zijn de resultaten van de qPCR analyses weergegeven in samenhang met de KRW visbemonsteringsgegevens.



FIGUUR 4-12. QPCR EN KRW GEGEVENS IN HET MARK EN VLIET STELSEL. WEERGEVEN ZIJN DE HOEEVEELHEID EDNA KOPIEËN (ROOD) EN DE AANTALLEN GEVANGEN EXEMPLAREN MET DE KRW BEMONSTERING (ALS AANTAL/HA; BLAUW). MET EEN A IS AANGEGEVEN DAT SOORTEN WEL MET EDNA ZIJN AANGETROFFEN, MAAR IN EEN TE LAGE HOEEVEELHEID DNA KOPIEËN OM TE KWANTIFICEREN. STANDAARDFOUTEN OP BASIS VAN DE DRIE REPLICAS ZIJN OOK WEERGEGEVEN.

De variatie tussen de triplo's van de DNA monsters is weergegeven met standaardfouten. Met een A is aangegeven dat soorten wel met eDNA zijn aangetroffen, maar in een te lage hoeveelheid DNA kopieën om te kwantificeren.

Alle soorten behalve de Rivierdonderpad zijn in de qPCR analyses aangetroffen. Winde en Marmergrondel zijn meerdere malen aangetroffen in een te lage hoeveelheid DNA kopieën om te kwantificeren.

De variatie is berekend over triplo's en is relatief laag als gevolg van weinig spreiding in aantallen sequenties zoals gedetecteerd in de monsters. De KRW en de eDNA bemonsteringen geven een verschillend beeld van de verspreiding van de soorten over de bemonsteringslocaties. Daarnaast is een directe vergelijking tussen aantallen DNA kopieën en aantallen individuen en biomassa gegevens vooralsnog niet mogelijk. Onduidelijk is bijvoorbeeld in hoeverre de hoeveelheid afgescheiden DNA materiaal wordt beïnvloed door de grootte van een individu en of het soortafhankelijk is. Wel geven beide bemonsteringen (eDNA en KRW) een indicatie dat er binnen het Mark & Vliet systeem een ruimtelijke spreiding van de doelsoorten optreedt.

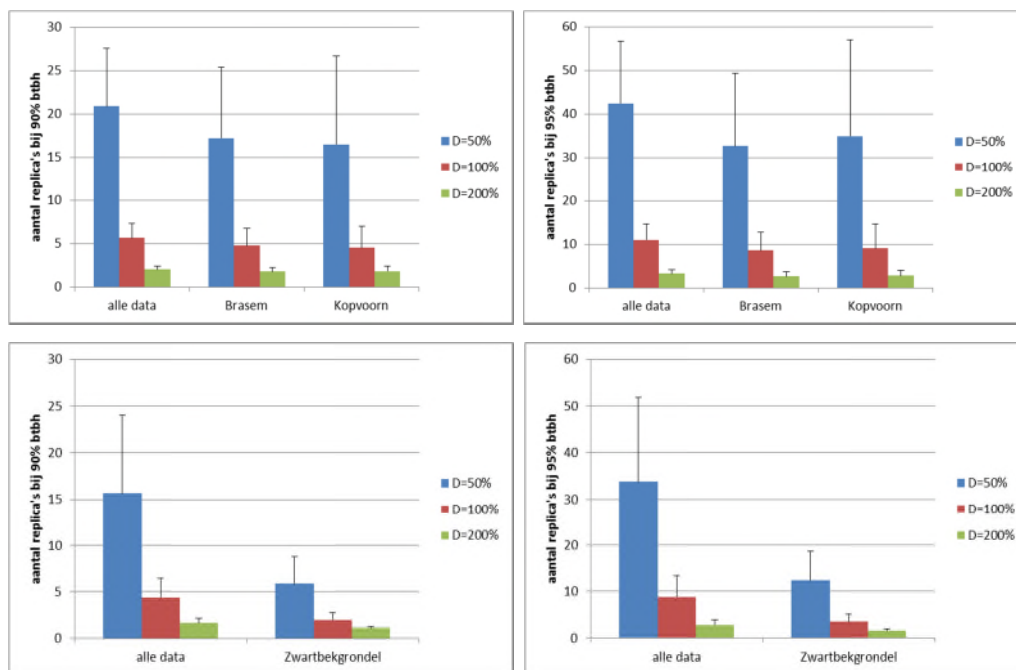
Wat opvalt is dat de Rivierdonderpad niet met eDNA is aangetroffen. Op basis van de beschikbare KRW visstandsgegevens werd de soort wel verwacht. Het betreft echter een erg kleine populatie die met name op de bodem leeft. Tijdens de KRW bemonsteringen in 2016 is op de drie locaties waar de soort werd gevonden steeds slechts één exemplaar gevangen. Het zou kunnen zijn dat er voor deze kleine populatie dichtheid een te klein volume water is geanalyseerd waardoor de soort onder de detectiegrens van de eDNA methode is gekomen.

4.4 Schatting van benodigde aantal replica qPCR monsters

De qPCR resultaten uit de Roer en uit het Mark-Vliet systeem zijn beschikbaar om een nieuwe schatting te maken van het aantal benodigde replica qPCR monsters (volgens de methode beschreven in 3.2.2). Daarmee kan achteraf worden vastgesteld in hoeverre het bij aanvang gekozen aantal van drie replica's een redelijke keuze is geweest. Deze schatting is apart uitgevoerd voor de Roer en voor de Mark-Vliet. Per watersysteem zijn alle beschikbare qPCR gemiddelden met hun standaardafwijking gebruikt (waarbij de daaruit apart geschatte benodigde aantallen replica's uit de resultaten van de betreffende vissoorten vervolgens samen zijn genomen). Daarnaast is dezelfde analyse ook uitgevoerd voor de vissoorten apart, voor zover er van een soort drie of meer qPCR gemiddelden beschikbaar waren.

Elk qPCR gemiddelde levert met haar standaardafwijking een schatting op voor het benodigde aantal replica's. Dat benodigde aantal is afhankelijk van drie factoren: de variatie tussen de replica's, de gewenste betrouwbaarheid waarmee een uitspraak over het aantal benodigde replica's moet worden gedaan en de grootte van het verschil ten opzichte van een gemiddelde waarde dat men nog als significant wil kunnen detecteren. In deze analyse is als illustratie gekozen voor twee betrouwbaarheidsniveaus voor de schatting van de benodigde aantallen replica's (90 en 95%), en voor drie niveaus van de omvang van een verschil dat men wil kunnen detecteren: 50%, 100% of 200% van de waarde van het gemiddelde. De resultaten staan weergegeven in Figuur 4-13.

Het benodigde aantal replica's daalt sterk bij een lager gekozen betrouwbaarheid voor de schatting ervan. Daarnaast neemt het aantal benodigde replica's ook af naarmate men genoeg kan nemen met een relatief hoge waarde van een te detecteren verschil met het gemiddelde. Indien het detecteren van een verschil van 50% van de gemiddelde waarde gewenst wordt, is het berekende aantal benodigde replica's hoog (15-40). Bij een verschil van 100-200% (dus een verschilwaarde gelijk aan een tot tweemaal het gemiddelde) is een meer realistisch aantal van 3-5 replica's passend te noemen.



FIGUUR 4-13. HET GESCHATTE AANTAL REPLICA QPCR BEPALINGEN BIJ EEN GEWENST TE DETECTEREN VERSCHIL (D) VAN 50, 100 OF 200% VAN HET GEMIDDELTE. BOVEN: GEGEVENS VOOR DE ROER. BENEDEN: GEGEVENS VOOR HET MARK-VLIET SYSTEEM. DE LINKERFIGUREN GEVEN DE AANTALLEN BIJ EEN 90% BETROUWBARE SCHATTING HIERVAN, DE FIGUREN RECHTS BIJ 95% BETROUWBAARHEID. DE FOUTENBALKEN GEVEN DE STANDAARDFOUTEN VOOR DE SCHATTING VAN HET WENSELIJK AANTAL REPLICA'S. NB: DE SCHAAL VAN DE Y-AS VAN DE FIGUREN VOOR 90% EN 95% BETROUWBAARHEID IS NIET GELIJK.

5 Algemene discussie, conclusies en aanbevelingen

5.1 Inleiding

In dit onderzoek is eDNA ingezet voor de ontwikkeling en toepassing van een nieuwe, publiek toegankelijke metabarcoding instrument voor de detectie van Nederlandse zoetwatervissen, de NL-Vispopulatiescan. Deze geeft op basis van vergelijkingen met reguliere KRW visstandbemonsteringen een goed beeld van de soortensamenstelling. Meestal werden beduidend meer soorten gedetecteerd dan met de uitgevoerde traditionele bevissingen. Zoals bij iedere bemonsteringsmethode speelt ook de trefkans van het betreffende eDNA een belangrijke rol, en kunnen soorten in heel lage aantallen en/of biomassadichtheden worden gemist.

Ook de toepasbaarheid van qPCR is verkend. Hiermee kan de aanwezige hoeveelheid eDNA van een of enkele specifieke doelsoorten worden gekwantificeerd. Zo is het in potentie mogelijk om snel de verspreiding van vissoorten in termen van eDNA hoeveelheden in een waterlichaam te bepalen. Deze aanpak biedt ook de mogelijkheid om verschillen in eDNA hoeveelheden vast te stellen direct boven- of benedenstrooms van een mogelijke migratiebelemmering. Bij duidelijke verschillen kan dit als aanwijzing worden benut voor gericht vervolgonderzoek om de werkelijke abundanties (visaantallen, biomassa's) te gaan bepalen.

Hierna wordt achtereenvolgens nog nader ingegaan op de methode ontwikkeling, de bevindingen met de toepassing van de NL-Vispopulatiescan en qPCR analyses. Daarna worden de conclusies en aanbevelingen gepresenteerd.

5.2 Methode ontwikkeling eDNA metabarcoding en qPCR

De methodiek van karakterisering van de vispopulatie en detectie van specifieke vissoorten op basis van eDNA is onder te verdelen in verschillende fasen: (1) waterbemonstering en conservering volgens protocol, (2) eDNA extractie en (3) eDNA analyse met behulp van NGS analyse of qPCR. Op basis van de validatie-experimenten van de primersets voor de verschillende qPCR methoden en metabarcoding is aangetoond dat de methoden selectief en specifiek zijn (zie 2.3.2). Ook de gevoeligheid van de qPCR's en de metabarcoding is goed. De analyse van diverse kunstmatig samengestelde mock visgemeenschappen heeft uitgewezen dat 10 eDNA-kopieën van vissoorten resulteerde in geïdentificeerde DNA-fragmenten. De oorzaak dat in een aantal monsters de eDNA analyse niet geslaagd is wordt waarschijnlijk veroorzaakt door (1) een geringe concentratie eDNA in het watermonster en/of (2) het onvoldoende DNA vergaren tijdens de DNA-extractie en (3) het niet optimaal verlopen van de PCR reactie.

Geringe eDNA concentratie

In elk monster is met behulp van een interne controle (IC) het rendement van de DNA-extractie gekwantificeerd en tevens een mogelijke remming in de PCR. In een deel van de monsters was het rendement van de IC hoog maar desondanks was het resultaat van de analyse negatief. De mogelijke oorzaak in deze monsters kan een te lage eDNA concentratie in het bemonsterde watervolume zijn. In het onderzoek is het bemonsterde water geconserveerd met behulp van isopropanol in een 250 ml centrifugebuis. Met deze aanpak

kan per centrifugebuis 140 ml water worden geconcentreerd of geprecipiteerd. Voor zowel de qPCR als de metabarcoding analyse zijn per monster drie centrifugebuizen gepoold waardoor het totale geanalyseerde watervolume 420 ml is. Deze aanpak van de waterconservering was gekozen om haar eenvoudige toepasbaarheid bij waterbemonstering in het veld. Mogelijk is dit watervolume in combinatie met de DNA extractie voor een deel van de monsters toch nog te gering om voldoende DNA te extraheren voor de analyse.

Suboptimale extractie

In een deel van de monsters waar de analyses niet zijn gelukt was het rendement van de DNA-extractie laag (<5%). Dit heeft waarschijnlijk tot gevolg gehad dat de DNA concentratie in het extract te laag was voor een betrouwbare metabarcoding of qPCR analyse. Het lage rendement van de IC kan verschillende oorzaken hebben zoals verlies van DNA tijdens de extractie en/of remming van de PCR door storende stoffen in het extract. In dit onderzoek is het meest waarschijnlijk dat de extractie is verstoord door een (zeer) hoog ijzer of humuszuur gehalte in de monsters. Het geladen DNA in het monster kan zich tijdens de extractie binden aan de geladen ijzer of humusdeeltjes waardoor het tijdens de zuivering verloren gaat.

Voor de watermonsters die zijn genomen uit de beken ten zuiden van Breda lijken de ijzergehalten niet hoog genoeg te zijn om voor ernstige verstoring te kunnen zorgen (meerjarig gemiddelde over alle locaties 2,4 mg Fe/l). Er kon geen statistisch significant verschil worden geconstateerd tussen het meerjarige gemiddelde van locaties met geslaagde en locaties met niet geslaagde analyses. Dat is gebleken uit de door waterschap Brabantse Delta aangeleverde chemische analyses voor deze wateren over de afgelopen jaren. Daarmee blijft de mogelijkheid aanwezig dat organische humuszuren er voor hebben gezorgd dat de eDNA extractie is gestoord. Een oplossing is om alternatieve eDNA-extractiemethoden te testen die ontwikkeld zijn om vooral humuszuren te verwijderen.

PCR niet optimaal

Een andere oorzaak die kan hebben meegespeeld is dat we voor dit onderzoek hebben gekozen om een zogenaamd "proofreading DNA taqpolymerase" te gebruiken. Hierdoor worden er aanmerkelijk minder fouten gemaakt tijdens de PCR stap waardoor de resultaten betrouwbaarder zijn. Wellicht is dit DNA polymerase echter gevoeliger voor remmende stoffen in het eDNA extract.

5.2.1 Optimalisatie methodiek

In het najaar van 2017 is aanvullend onderzoek uitgevoerd om de mogelijke oorzaak te achterhalen van het niet slagen van de metabarcoding analyse in een aantal monsters. Hiervoor zijn op 8 locaties watermonsters verzameld (Chaamse Beek duiker in weg Rakens-Geerbroek; Zundert Wildertsedijk; Buurtschap Effen; Vispassage Bieberg; Kleine Beek duiker in weg Stuivezand-Zundert; Mark en Dintel weg Prinsenbeek/Zevenbergen km 14,6; Aa, brug Beusingsdijk-Tiel en Aa 's-Hertogenbosch-Tiel). Deze locaties zijn zo geselecteerd dat voor een deel van de locaties de analyses in het eerdere onderzoek zijn mislukt maar ook enkele locaties waar de analyses juist wel zijn gelukt. Alle monsters zijn in eerste instantie opgewerkt met de precipitatiemethode die ook in het eerdere onderzoek is toegepast. Om de opwerking en DNA-extractie te beoordelen is met behulp van de NGS-PCR primers gericht op karperachtigen geanalyseerd of er voldoende DNA wordt geamplificeerd voor een betrouwbare metabarcoding analyse (op basis van ervaring zijn er dan minder dan 32 vermenigvuldigingscycli van het DNA nodig, aangegeven met een Cq-waarde <32). Deze eerste fase van het onderzoek was bedoeld om locaties te selecteren waarin deze aanpak onvoldoende resultaat opleverde waarna in een tweede fase verschillende alternatieve concentrerings- en DNA-extractiemethoden zijn toegepast. In de monsters afkomstig van

Zundert Wildertsedijk, Buurtschap Effen, Kleine Beek en Aa brug Beusingsdijk was het resultaat onvoldoende en deze monsters zijn geselecteerd voor vervolgonderzoek. Daarin zijn drie concentreringsmethoden toegepast (polycarbonaat (PC), polyethyleen sulfone (PES) en Sterifex) en drie verschillende DNA-extractiemethoden (Power biofilm, DNA easy en CTAB). De belangrijkste conclusie die uit het onderzoek kan worden getrokken is dat de aanpak van filtratie van 0,75-1 l water met behulp van een PES filter in combinatie met powerbiofilm kit robuuste resultaten oplevert. In elk van de geanalyseerde watermonsters leverde deze aanpak voldoende DNA op (Cq karper gelijk aan 25-27). De eventuele remming was zo gering (gezien het hoge rendement van de interne controle) dat een betrouwbare metabarcoding analyse mogelijk was. Tevens is bij deze aanpak een filtratie in het veld mogelijk.

5.3 Bevindingen met de NL-Vispopulatiescan

In dit onderzoek is een eerste vergelijking gemaakt van de resultaten verkregen met de ontwikkelde eDNA metabarcoding methode en die van traditionele KRW visstandbemonsteringen. Beide methoden zijn gebruikt voor het in beeld brengen van de ruimtelijke kwalitatieve verspreiding van de visgemeenschap.

Een belangrijke kanttekening bij deze vergelijking is dat de KRW-bevissingen ook onderhevig zijn aan beperkingen in vangstefficiëntie van de toegepaste vistuigen en toevalsprocessen door een beperkte steekproef. De eDNA uitkomsten worden hierdoor dus vergeleken met de beste gegevens die voorhanden zijn maar niet met de exacte werkelijkheid.

De resultaten van dit onderzoek laten zien dat de NL-Vispopulatiescan in de onderzochte systemen een belangrijk aanvullend beeld geeft van de aanwezige diversiteit aan soorten ten opzichte van de KRW bemonstering. Er worden met de metabarcoding analyse per locatie in vrijwel alle gevallen meer soorten gedetecteerd, maar soms ook soorten gemist. De soorten die aanvullend zijn aangetroffen zijn, op enkele soorten na (Marmergrondel, Snoekbaars, Spiering), binnen de context van de onderzochte watersystemen te verklaren. De opmerkelijke vondst van Spiering op een locatie in de Kleine Beek zou in theorie het gevolg kunnen zijn van het gebruik ervan als aas door sportvisserij. Het aantal met eDNA aangetroffen soorten op de locaties in de Kleine Beek is wel opmerkelijk hoog.

Deze resultaten zijn in lijn met eerdere bevindingen. In een studie van Herder & Kranenbarg (2016) waarbij een metabarcoding methode werd ingezet op trajectniveau in stilstaande wateren werden gemiddeld 1,6 keer zoveel soorten aangetroffen in vergelijking met traditionele bevissingsgegevens. Deze toename in aantal gedetecteerde soorten is waarschijnlijk het gevolg van de gevoeligheid van de metabarcoding methode. Ook heel kleine hoeveelheden eDNA worden gedetecteerd. Door die hoge gevoeligheid bestaat er ook een vergrote kans op vals positieve waarnemingen. Die hebben we echter door de analyse van een blanco kunnen uitsluiten. De NL-Vispopulatiescan heeft zo onder meer in de Roer laten zien dat ze een snelle en doeltreffende quick scan kan opleveren van de kwalitatieve verspreiding van een omvangrijk palet aan vissoorten.

Op veel locaties zijn met de eDNA bemonstering ook één of soms enkele soorten gemist die wel met de KRW bevissing zijn gevangen. In de Stadse Aa, Dieze en Roer betrof het soorten die in relatief lage dichtheden zijn aangetroffen (zie bijvoorbeeld Tabel 4-9). In de Aa of Weerijds betrof het ook relatief grote populaties, zoals die van de Winde. Mogelijk komt dit doordat er in de Aa of Weerijds een te beperkt aantal eDNA extracties is geslaagd om een representatief beeld van het waterlichaam als geheel te geven. In het algemeen kan worden gesteld dat ondanks de hoge detectiegevoeligheid, soorten toch ook met een eDNA analyse kunnen worden gemist. Bijvoorbeeld bij (zeer) lage visdichtheden is naar verwachting weinig

eDNA aanwezig, en dan voornamelijk in de directe omgeving van de betreffende vissen. Net zoals bij iedere bemonsteringsmethode speelt daarmee ook de trefkans van het betreffende eDNA een belangrijke rol, en kunnen soorten worden gemist. De toegepaste bemonsteringsprocedure is in de praktijk bij de monsternemers goed bevallen. Vanzelfsprekend is net als bij elke veldbemonstering ook voor een eDNA analyse de deskundigheid en gebiedskennis van de monsternemer van invloed op de kwaliteit en representativiteit van het verzamelde monster. Een vervolgstudie naar de effectiviteit van de hier gebruikte procedure in termen van trefkans van aanwezige soorten is zinvol. Daarmee kan worden vastgesteld wat een optimaal aantal deelmonsters of een optimaal deelmonstervolume is voor het bemonsteren van water ten behoeve van een metabarcoding analyse van de soortensamenstelling van de aanwezige vispopulatie.

5.4 Bevindingen met de qPCR methode

In dit onderzoek zijn qPCR bepalingen ingezet om een indruk te krijgen van kwantitatieve verschillen in eDNA in de onderzochte wateren. De qPCR analyses in de beken ten zuiden van Breda konden niet worden uitgevoerd omdat de eDNA extractie van de hier genomen watermonsters onvoldoende DNA materiaal opleverde. De oorzaken hiervoor zijn vermoedelijk gelijk aan die van de metabarcoding analyses in de Aa of Weerij, Kleine Beek en Bijloop (zie ook hierboven, bij 5.2).

Belemmeringen voor vismigratie, zoals een stuw, zouden kunnen leiden tot verschillen in de hoeveelheden eDNA direct boven- en benedenstrooms van dit object. De veronderstelling is dat migrerende vissen zich dan concentreren direct beneden de stuw, maar direct bovenstrooms niet of veel minder aanwezig zijn op het zelfde moment in de tijd. Indien een vispassage goed zou functioneren, wordt verwacht dat een dergelijke concentratiesprong in eDNA zich niet, of in ieder geval veel minder scherp, zou moeten voordoen.

De hier uitgevoerde qPCR analyses rondom de ECI stuw in Roermond waren nog maar beperkt in hun verdeling over het jaar. De potentie van de methode lijkt door de resultaten ervan wel te worden ondersteund. De drie onderzochte doelsoorten waarvan eDNA werd aangetroffen (Barbeel, Brasem en Kopvoorn) lieten op sommige momenten benedenstrooms een sterk verhoogde eDNA concentratie zien ten opzichte van de meting direct bovenstrooms van de stuw. Op enkele andere monsterdata bleken de concentratieverschillen over de stuw niet van elkaar af te wijken. Dit beeld past bij de hypothese dat bij een (tijdelijke) migratiebelemmering een concentratiesprong in eDNA zichtbaar zou worden. Om deze informatie nader te kunnen interpreteren is er beslist behoefte aan een meer uitgebreide dataset en een robuustere vergelijking met conventionele monitoringsgegevens. Het wordt dan ook aanbevolen om tijdens trekperiodes frequent dergelijke qPCR bepalingen rond een mogelijke belemmering voor vismigratie uit te voeren. Zo kan meer inzicht worden verkregen in de potentie van deze techniek om de noodzaak of effectiviteit van een vispassage in beeld te brengen.

De eDNA detectie met de qPCR methode is ook beproefd op haar mogelijkheden om de kwantitatieve verspreiding van de hoeveelheid eDNA van doelsoorten in (stromende) wateren vast te stellen. Tijdens een ééndaagse bemonstering langs de Roer konden voor de drie gedetecteerde doelsoorten (Barbeel, Brasem en Kopvoorn) duidelijke verschillen in eDNA concentratie worden vastgesteld langs de rivier. Ook KRW visstandbemonsteringen in de Roer lieten verschillen in aantallen en biomassa zien. Metingen in het Mark en Vliet stelsel met eDNA en met traditionele bevissingen gaven eveneens kwantitatieve verschillen tussen locaties aan. Beide methoden lieten daarbij niet altijd een overeenkomstig beeld zien. Dat kan onder meer te maken hebben met het feit dat eDNA concentraties vooralsnog niet eenvoudig zijn om te zetten naar visbiomassa's (zie hierna).

Ook bij de toepassing van qPCR voor inzicht in kwantitatieve verspreiding is het aantal waarnemingen nog beperkt gebleven. Niettemin ondersteunen de resultaten het idee dat qPCR in potentie een interessante optie kan worden om de verspreiding van gewenste en ongewenste doelsoorten in beeld te brengen. Het voordeel ten opzichte van een kwalitatieve metabarcoding analyse is dat met qPCR gegevens ook een tussen locaties te vergelijken kwantitatief beeld van de hoeveelheid eDNA in ruimte en tijd kan worden verkregen. Dat zou het in principe mogelijk maken om bijvoorbeeld kerngebieden en paaiplaatsen op een relatief eenvoudige manier te identificeren.

Een belangrijk aandachtspunt bij de inzet van qPCR is de interpretatie van het gekwantificeerde eDNA signaal. Een directe doorvertaling van qPCR gegevens over eDNA hoeveelheden naar aantallen vissen of biomassa informatie is ingewikkeld. Het vergt een gedetailleerde soortspecifieke studie naar onder meer de relatie tussen eDNA concentraties en visbiomassa's. Dergelijke relaties zijn voor enkele van de hier gebruikte vissoorten in mesocosms onderzocht en lijken veelbelovend (INBO, Rein Brys, mond.meded.nl). Vooralsnog is het echter niet te verwachten dat deze relaties zodanig robuust en algemeen geldend zullen worden, dat daarmee de voor de huidige KWR maatlatten benodigde gegevens over dichtheden in termen van aantallen en/of biomassa's van het visbestand kunnen worden geleverd. Voor het succesvol inzetten van een qPCR doelsoortbenadering hoeft het ontbreken van een dergelijke relatie overigens geen belemmering te vormen. Via een quick-scan met qPCR analyses in een zoekgebied waarin bijvoorbeeld het voorkomen van een doelsoort nog maar beperkt bekend is, kan worden vastgesteld welke locaties bijzonder interessant lijken voor de soort op grond van de gemeten hoeveelheid eDNA. Daarna kan indien gewenst een gerichte visstandbemonstering op deze plekken worden uitgevoerd want daaruit is meer aanvullende populatie informatie te verkrijgen dan uit alleen eDNA analyses zou kunnen worden gehaald.

Met de informatie over de variatie binnen de diverse qPCR resultaten kan worden bepaald wat een wenselijk aantal replica qPCR bepalingen is. Als de detectie van een verschil met een gemiddelde waarde wordt gewenst ter grootte van één tot tweemaal dat gemiddelde, dan is een aantal van 3-5 replica bepalingen meestal afdoende. Dat is overeenkomstig het resultaat van de eerdere schatting op basis van gegevens afkomstig uit de IJssel. Vanzelfsprekend kunnen lokale (heterogene) situaties toch grotere aantallen replica's noodzakelijk maken. En ook soortspecifieke verschillen zijn niet uit te sluiten. Tegelijkertijd lijkt de conclusie gerechtvaardigd dat de ontwikkelde bemonsteringsprocedure voldoende representatief is geweest om de variabiliteit tussen replica monsters beperkt te houden.

5.5 Conclusies

- De NL-vispopulatiescan is een geavanceerde methodiek waarmee relatief snel en effectief informatie over de soortensamenstelling en kwalitatieve verspreiding van de visstand valt te bepalen.
- De NL-Vispopulatiescan geeft in de onderzochte systemen een belangrijk aanvullend beeld van de aanwezige diversiteit aan soorten ten opzichte van de KRW visstandbemonstering. Er worden met deze aanpak meestal meer soorten gedetecteerd.
- De analyse van diverse kunstmatig samengestelde mock visgemeenschappen wijst uit dat de NL-Vispopulatiescan reproduceerbaar is met een lage detectiegrens en daarmee een groot onderscheidend vermogen heeft.
- De gebruikte eDNA extractiemethode (precipitatie in het veld met isopropanol) blijkt in sommige wateren gevoelig voor verstoringen. De oorzaak hiervan is nog niet achterhaald. Vooralsnog is het gebruik van een labfiltratie stap robuuster gebleken dan de in dit onderzoek gebruikte veldprecipitatie methode.

- Bij de NL-Vispopulatiescan kunnen soorten worden gemist. Bij (zeer) lage visdichtheden is naar verwachting ook maar weinig eDNA aanwezig, en dan voornamelijk in de directe omgeving van de betreffende vissen. En net zoals bij iedere bemonsteringsmethode speelt daarmee ook de trefkans van het betreffende eDNA een belangrijke rol.
- qPCR detectie lijkt een instrument waarvoor nader onderzoek zinvol is naar haar toepasbaarheid als middel om de verspreiding van gewenste en ongewenste soorten in beeld te brengen. Het voordeel ten opzichte van een kwalitatieve metabarcoding analyse is dat met qPCR gegevens ook een tussen locaties te vergelijken kwantitatief beeld van de hoeveelheid eDNA in ruimte en tijd kan worden verkregen. Belangrijk aandachtspunt is de interpretatie van het signaal: het aantal DNA-kopieën is voorsnog niet direct te relateren aan aantallen of biomassa's van vispopulaties.
- De resultaten van de toepassing van qPCR detectie van enkele doelsoorten ondersteunen de veronderstelling dat met deze methode een eerste indicatie kan worden verkregen van mogelijke belemmeringen voor vismigratie in termen van hoeveelheden eDNA. Ook lijken hiermee de voor doelsoorten belangrijke deelgebieden in een watersysteem relatief snel en met beperkte inzet van menskracht te kunnen worden verkend.
- De geconstateerde variatie tussen qPCR replica monsters was meestal voldoende beperkt om de vooraf nagestreefde mogelijkheid om verschillen van 100-200% van een gemiddelde te kunnen aantonen, haalbaar te maken. De ontwikkelde bemonsteringsprocedure voor qPCR lijkt dan ook voor dit doel geslaagd te zijn geweest.

5.6 Aanbevelingen

- Voor routinematige toepassing van eDNA detectiemethoden is behoefte aan een landelijke richtlijn waarin criteria worden vastgelegd waaraan een dergelijke methode moet voldoen. Het verdient aanbeveling om in elke metabarcoding analyse een mock test mee te nemen.
- Een vervolgstudie naar de effectiviteit van de waterbemonsteringsprocedure in termen van trefkans van het eDNA van aanwezige soorten is zinvol. Daarmee kan beter worden vastgesteld wat een optimaal aantal deelmonsters of een optimaal deelmonstervolume is voor het bemonsteren van water ten behoeve van een metabarcoding analyse van de soortensamenstelling van de aanwezige vispopulatie, cq voor een qPCR analyse van doelsoorten.
- Vervolgonderzoek is nodig om de mogelijke oorzaak te achterhalen van het soms opgetreden eDNA extractieprobleem bij de gebruikte veldprecipitatie met isopropanol. Voorsnog wordt het gebruik van een labfiltratie stap in plaats van een veldprecipitatie stap aangeraden.
- Op grond van de geconstateerde variatie tussen qPCR replica monsters wordt een benodigde replicatie aanbevolen van 3-5 monsters. Dit aantal wordt hoger naarmate een kleiner verschil ten opzichte van een gemiddelde moet kunnen worden vastgesteld.
- Om de toepasbaarheid en het vertrouwen rondom de inzet van eDNA gebaseerde detectie te vergroten, is de verdere uitbouw gewenst van de in het project ontwikkelde landelijke DNA sequentie database zodat voor iedere soort meerdere replica sequenties beschikbaar zijn. Daarmee kan ook beter worden vastgesteld in hoeverre diverse eDNA methodes onderling vergelijkbaar zijn, en wat optimale toepassingsgebieden zijn.

6 Referenties

- R. Bijkerk (red.), 2014. Handboek Hydrobiologie. Biologisch onderzoek voor de ecologische beoordeling van Nederlandse zoete en brakke oppervlaktewateren. Deels aangepaste versie. Stowa rapport 2014-02.
- R.E.M.B. Gubbels, M.H.A.M. Belgers & H.-J. Jochims, 2016. Vismigratie in de benedenloop van de Roer in de periode 2009-2014: soortspecifieke migratiekarakteristieken en - patronen. Resultaten van zes jaar monitoring bij de ECI waterkrachtcentrale te Roermond. Rapport Waterschap Roer & Overmaas, Sittard, 152 pp.
- J.E. Herder & J. Kranenburg, 2016. eDNA metabarcoding vissen – Verkennend onderzoek naar de mogelijke toepassing van eDNA voor de KRW vismonitoring, RAVON/STOWA rapport 2016-19.
- M. Koole, 2017. KRW visstandonderzoek in negen waterlichamen in het beheergebied van waterschap Brabantse Delta in 2016. Rapport ATKb, Geldermalsen.
- W. Patberg, J. Warmink, H. Ruiter, B. Wullings & E. Kardinaal, 2016. Met DNA visstand monitoren op de grote rivieren. H2O online 28 april 2016, 1-5.
- D. van der Pouw Kraan, 2016. De ontwikkeling van een nieuwe eDNA meta-barcoding methode voor zoetwatervissen in Nederland. Scriptie afstudeeronderzoek HBO biologie en medisch laboratorium onderzoek. KWR en Hogeschool Leiden, 26 pp.
- S.O. Ryding & W. Rast, 1989. The control of eutrophication of lakes and reservoirs. Unesco, Man and the Biosphere series volume 1, 314 pp.
- T.P. Satoh, M. Miya, K. Mabuchi & M. Nishida. 2016. Structure and variation of the mitochondrial genome of fishes. BMC Genomics, 17:719.
- J.L. Spier & P.B. Broeckx, 2017. KRW Visstandsonderzoek Waterschap Aa en Maas. Bureau Waardenburg Rapportnr. 16-228. Bureau Waardenburg, Culemborg.
- H. Wanningen, K. van den Wijngaard, T. Buijse & N. Breve, 2012. Nederland leeft met Vismigratie. Actualisatie landelijke database vismigratie. Rapport in opdracht van Sportvisserij Nederland en Planbureau voor de leefomgeving, 31 pp.

Bijlage I Procedure voor de bemonstering van water ten behoeve van de detectie van vissen met behulp van eDNA analyse

De hier beschreven procedure heeft betrekking op de bemonstering van water uit zwak- en snelstromende waterlopen. Het bevat specifieke richtlijnen voor de bemonstering van water ten behoeve van de detectie van vissen met behulp van eDNA-analyse inclusief aanwijzingen over hoe kruisbesmetting van DNA kan worden voorkomen, en over de gekozen replicatie. Het voorschrift geldt zowel voor detectie van specifieke vissoorten met qPCR als mede voor detectie van de soortensamenstelling van de aanwezige vispopulatie met metabarcoding. Bij een qPCR met gelijktijdige detectie van meerdere doelsoorten zal een optimale keuze van de deelmonsters per locatie afhangen van de mate waarin habitats van de soorten overlappen of verschillen.

In dit werkvoorschrift wordt in drie deelprocedures onderscheid gemaakt tussen langzaam stromende smalle waterlopen (<8 m; < 1 m/s), langzaam stromende brede waterlopen (>8 m; <1 m/s), en brede, snelstromende waterlopen (>8 m; >1 m/s). De procedures zijn in nauwe samenwerking met de projectpartners en op pragmatische gronden vastgesteld.

Smalle, langzaam stromende beken

Een bemonsteringslocatie wordt conform een KRW visstandbemonstering omschreven als een traject van 250 m lengte over de breedte van een waterloop. De eDNA bemonstering gebeurt voorafgaand aan een eventuele reguliere visstandbemonstering. Langs het traject van 250 m wordt vanaf de kant een mengmonster genomen van in totaal 1000 ml water. Dit mengmonster van 1000 ml wordt samengesteld uit 10 deelmonsters, elk van 100 ml water, genomen met een deelmonsterflesje aan een telescopische stok langs het totale monstertraject van 250 m. Het traject wordt in stroomopwaartse richting bemonsterd. Met het deelmonsterflesje wordt steeds op een op het oog representatieve plek een watermonster genomen, waarbij alle aanwezige habitats voor de doelsoorten op het traject naar evenredigheid bemonsterd worden. Niet te dicht bij de kant of de bodem, om opwervend sediment te vermijden. Voor de detectie van specifieke vissoorten met qPCR worden de debemonsteringslocaties zoveel mogelijk daar gekozen waar de trefkans voor de betreffende soorten het grootst is. Elk deelmonster wordt genomen met een (wegwerp) plastic fles van 100 ml en verzameld in een plastic fles van één liter voor het te analyseren mengmonster. Om contaminatie via de monsterapparatuur te voorkomen wordt per locatie na voltooiën van de bemonstering het 100 ml deelmonsterflesje weggegooid en de bemonsteringsstok gedesinfecteerd door de stok en flesbevestiging in te spuiten met een "DNase away"-oplossing. De buitenkant van de mengmonsterfles hoeft niet te worden gedesinfecteerd. De watermonsters moeten zo spoedig mogelijk worden gekoeld. Voor het conserveren van het bemonsterde water worden drie centrifugebuizen die al deels door KWR zijn gevuld met isopropanol verder aangevuld met het water uit de mengmonsterfles. Op deze wijze wordt het aanwezige DNA in het water geconserveerd en zijn de monsters in de koelkast langere tijd houdbaar.

Stappenplan:

1. Bevestig een schoon/nieuw 100 ml deelmonsterflesje aan de telescopische fles-monsternemer.
2. Breng de deelmonsterfles boven het punt dat men wil bemonsteren. Schuif de telescopische stok zover uit als nodig is;
3. Beweeg de deelmonsterfles met de opening naar beneden door de waterspiegel en laat de fles vollopen op de diepte waar men het monster wil verzamelen;
4. Giet het deelmonster in een schone/nieuwe 1000 ml plastic fles voor het mengmonster. Ter voorkoming van contaminatie mag de dop van de 1000 ml fles tijdens bemonstering bij voorkeur niet worden neergelegd. Moet de dop toch worden neergelegd, dan moet dit op een schone plaats gebeuren en met de onderkant naar beneden. De binnenkant van de dop mag niet in aanraking komen met contaminerend materiaal.
5. Bemonster in het geval van qPCR bemonstering op deze plaats nog twee maal een deelmonster en giet deze over in twee andere 1000 ml flessen om te komen tot een triplo monster;
6. Herhaal deze (deel)bemonstering nog op 9 andere plaatsen in stroomopwaartse richting langs het totale monstertraject van 250 m. De deelmonsters voor alle replicamonsters langs hetzelfde monstertraject kunnen met hetzelfde 100 ml flesje worden bemonsterd;
7. Verwijder na voltooiing van de monsternamen de deelmonsterfles. Droog de monsterstok af met een tissue en spuit de stok in met de "DNase away"-oplossing. De stok hoeft niet te worden afgedroogd; de buitenkant van de mengmonsterfles hoeft niet te worden gedesinfecteerd;
8. Vul per mengmonster drie 250 ml centrifugebuizen die al deels zijn gevuld met isopropanol (oranje dop) verder aan met water uit de mengmonsterfles tot de rand waar de versmalling bij de dop begint. Dit kan direct in het veld gebeuren maar ook op een later tijdstip mits op dezelfde dag dat de bemonstering is uitgevoerd. Bewaar in dat geval de flessen met mengmonster op ijs in een koelbox.
9. Bewaar de centrifugebuizen in de koelkast (4 °C)

2. Brede, langzaam stromende rivieren

Een bemonsteringslocatie wordt conform een KRW visstandbemonstering omschreven als een traject van 250 m lengte over de breedte van een waterloop. De eDNA bemonstering gebeurt voorafgaand aan een eventuele reguliere visstandbemonstering. Langs het traject van 250 m wordt vanaf een boot een mengmonster genomen van in totaal 1000 ml water. Dit mengmonster van 1000 ml wordt samengesteld uit 20 deelmonsters, elk van 50 ml water, genomen met een deelmonsterflesje aan een telescopische stok langs het totale monstertraject van 250 m. De deelmonsters worden voor de boot genomen. Het traject wordt in stroomopwaartse richting bemonsterd. Met het deelmonsterflesje wordt steeds op een op het oog representatieve plek een watermonster genomen, waarbij alle aanwezige habitats voor de doelsoorten op het traject naar evenredigheid bemonsterd worden. Niet te dicht bij de kant of de bodem, om opwervend sediment te vermijden. Voor de detectie van specifieke vissoorten met qPCR worden de deelbemonsteringslocaties zoveel mogelijk daar gekozen waar de trefkans voor de betreffende soorten het grootst is. Het aantal en volume van de deelmonsters kan daarop aangepast worden. Als de specifieke doelsoorten voor qPCR bijvoorbeeld oevergebonden zijn, volstaan tien deelmonsters van 100 ml in de oeverzone van het traject. Elk deelmonster wordt genomen met een (wegwerp) plastic fles van 50 ml en verzameld in een plastic fles van één liter voor het te analyseren mengmonster. Om contaminatie via de monsterapparatuur te voorkomen wordt per locatie na voltooiing van de bemonstering het 50 ml deelmonsterflesje weggegooid en de bemonsteringsstok gedesinfecteerd door de stok en flesbevestiging in te spuiten met een "DNase away"-oplossing. De buitenkant van de mengmonsterfles hoeft niet te worden gedesinfecteerd. De watermonsters moeten zo spoedig mogelijk worden gekoeld. Voor het conserveren van het

bemonsterde water worden drie centrifugebuizen die al deels door KWR zijn gevuld met isopropanol verder aangevuld met het water uit de mengmonsterfles. Op deze wijze wordt het aanwezige DNA in het water geconserveerd en zijn de monsters in de koelkast langere tijd houdbaar.

Stappenplan:

1. Bevestig een schoon/nieuw 50 ml deelmonsterflesje aan de telescopische fles-monsternemer (bij een qPCR met specifieke doelsoorten kan het volume van de deelmonsters desgewenst groter zijn en kan een 100 ml deelmonsterflesje gebruikt worden).
2. Breng de deelmonsterfles in stroomopwaartse richting voor de boot boven het punt dat men wil bemonsteren. Schuif de telescopische stok zover uit als nodig is;
3. Beweeg de deelmonsterfles met de opening naar beneden door de waterspiegel en laat de fles vollopen op de diepte waar men het monster wil verzamelen; zorg dat het monsterflesje stroomopwaarts van de boot blijft;
4. Giet het deelmonster in een schone/nieuwe 1000 ml plastic fles voor het mengmonster. Ter voorkoming van contaminatie mag de dop van de 1000 ml fles tijdens bemonstering bij voorkeur niet worden neergelegd. Moet de dop toch worden neergelegd, dan moet dit op een schone plaats gebeuren en met de onderkant naar beneden. De binnenkant van de dop mag niet in aanraking komen met contaminerend materiaal.
5. Bemonster in het geval van qPCR bemonstering op deze plaats nog twee maal een deelmonster en giet deze over in twee andere 1000 ml flessen om te komen tot een triplo monster;
6. Herhaal deze (deel)bemonstering nog op 19 andere plaatsen in stroomopwaartse richting langs het totale monstertransect van 250 m. De deelmonsters voor alle replicamonsters langs het monstertraject kunnen met hetzelfde 50 ml flesje worden bemonsterd (bij een qPCR met specifieke doelsoorten kan het aantal deelmonsters desgewenst lager zijn, met een deelmonstervolume van 100 ml);
7. Verwijder na voltooiing van de monsternamen de deelmonsterfles. Droog de monsterstok af met een tissue en spuit de stok in met de "DNase away"-oplossing. De stok hoeft niet te worden afgedroogd; de buitenkant van de mengmonsterfles hoeft niet te worden gedesinfecteerd;
8. Vul per mengmonster drie 250 ml centrifugebuizen die al deels zijn gevuld met isopropanol (oranje dop) verder aan met water uit de mengmonsterfles tot de rand waar de versmalling bij de dop begint. Dit kan direct in het veld gebeuren maar ook op een later tijdstip mits op dezelfde dag dat de bemonstering is uitgevoerd. Bewaar in dat geval de flessen met mengmonster op ijs in een koelbox.
9. Bewaar de centrifugebuizen in de koelkast (4 °C)

3. Brede, snelstromende rivieren

Een bemonsteringslocatie wordt conform een KRW visstandbemonstering omschreven als een traject van 250 m lengte over de breedte van een waterloop. De eDNA bemonstering gebeurt voorafgaand aan een eventuele reguliere visstandbemonstering. Stroomafwaarts aan het begin van het traject wordt vanaf een boot of brug of wadend een mengmonster genomen van in totaal 1000 ml water. Dit mengmonster van 1000 ml wordt samengesteld uit 20 deelmonsters, elk van 50 ml water, genomen met een deelmonsterflesje aan een telescopische stok over de totale breedte van het water. De deelmonsters worden steeds in stroomopwaartse richting bemonsterd. Bij ondiep water (tot 50 cm diep) worden zo op 5 deelbemonsteringslocaties over de breedte, steeds 4 deelmonsters genomen op dezelfde diepte. Bij dieper water (tot 1 meter): per deelbemonsteringslocatie 2 deelmonsters op 30 cm onder het water oppervlak en 2 deelmonsters op 80 cm onder het water oppervlak; in

totaal weer op 5 plaatsen over de breedte. Bij water dieper dan 1 m worden op elk van de 5 deelbemonsteringslocaties over de breedte, 4 deelmonsters genomen op 4 dieptes (onder het oppervlak, boven de bodem en equidistant daartussen de overige 2; bijv. 30-80-130-180 cm onder water; of 20-70-120-170). Met het deelmonsterflesje wordt steeds op een op het oog representatieve plek een watermonster genomen, waarbij alle aanwezige habitats voor de doelsoorten op de bemonsteringslocatie naar evenredigheid bemonsterd worden. Niet te dicht bij de kant of de bodem, om opwervend sediment te vermijden. Voor de detectie van specifieke vissoorten met qPCR worden de deelbemonsteringslocaties zoveel mogelijk daar gekozen waar de trefkans voor de betreffende soorten het grootst is. Het aantal en volume van de deelmonsters kan daarop aangepast worden. Elk deelmonster wordt genomen met een (wegwerp) plastic fles van 50 ml en verzameld in een plastic fles van één liter voor het te analyseren mengmonster. Om contaminatie via de monsterapparatuur te voorkomen wordt per locatie na voltooiing van de bemonstering het 50 ml deelmonsterflesje weggegooid en de bemonsteringsstok gedesinfecteerd door de stok en flesbevestiging in te spuiten met een “DNase away”-oplossing. De buitenkant van de mengmonsterfles hoeft niet te worden gedesinfecteerd. De watermonsters moeten zo spoedig mogelijk worden gekoeld. Voor het conserveren van het bemonsterde water worden drie centrifugebuizen die al deels door KWR zijn gevuld met isopropanol verder aangevuld met het water uit de mengmonsterfles. Op deze wijze wordt het aanwezige DNA in het water geconserveerd en zijn de monsters in de koelkast langere tijd houdbaar.

Stappenplan:

1. Bevestig een schoon/nieuw 50 ml deelmonsterflesje aan de telescopische fles-monsternemer (bij een qPCR met specifieke doelsoorten kan het volume van de deelmonsters desgewenst groter zijn en kan een 100 ml deelmonsterflesje gebruikt worden).
2. Breng de deelmonsterfles in stroomopwaartse richting boven het punt dat men wil bemonsteren. Schuif de telescopische stok zover uit als nodig is;
3. Beweeg de deelmonsterfles met de opening naar beneden door de waterspiegel en laat de fles vollopen op de diepte waar men het monster wil verzamelen; zorg dat het monsterflesje stroomopwaarts van de positie van de monsternemer blijft;
4. Giet het deelmonster in een schone/nieuwe 1000 ml plastic fles voor het mengmonster. Ter voorkoming van contaminatie mag de dop van de 1000 ml fles tijdens bemonstering bij voorkeur niet worden neergelegd. Moet de dop toch worden neergelegd, dan moet dit op een schone plaats gebeuren en met de onderkant naar beneden. De binnenkant van de dop mag niet in aanraking komen met contaminerend materiaal.
5. Bemonster in het geval van qPCR bemonstering op deze plaats nog twee maal een deelmonster en giet deze over in twee andere 1000 ml flessen om te komen tot een triplo monster;
6. Bemonster nog 3 maal op deze deellocatie een deelmonster op dezelfde of andere dieptes (in afhankelijkheid van de totale waterdiepte; zie de beschrijving hierboven);
7. Herhaal deze (deel)bemonstering nog op 4 andere plaatsen in stroomopwaartse richting langs de breedte van de bemonsteringslocatie. De deelmonsters voor alle replicamonsters langs het monstertraject kunnen met hetzelfde 50 ml flesje worden bemonsterd;
8. Verwijder na voltooiing van de monsternamen de deelmonsterfles. Droog de monsterstok af met een tissue en spuit de stok in met de “DNase away”-oplossing. De stok hoeft niet te worden afgedroogd; de buitenkant van de mengmonsterfles hoeft niet te worden gedesinfecteerd;
9. Vul per mengmonster drie 250 ml centrifugebuizen die al deels zijn gevuld met isopropanol (oranje dop) verder aan met water uit de mengmonsterfles tot de rand waar de versmalling bij de dop begint. Dit kan direct in het veld gebeuren maar ook op een

later tijdstip mits op dezelfde dag dat de bemonstering is uitgevoerd. Bewaar in dat geval de flessen met mengmonster op ijs in een koelbox.

10. Bewaar de centrifugebuizen in de koelkast (4 °C)

Bijlage II Percentage eDNA sequenties (metabarcoding) en eDNA concentraties (qPCR) van alle monsters

TABEL II-1 : PERCENTAGE DNA-SEQUENTIES MET BEHULP VAN METABARCODING ANALYSE VAN LOCATIES WATERSCHAP LIMBURG.

Soort	OROER905	OROER715	OROER550	OROER520	OROER440	OROER195	OROER312
Zwartbek grondel	20,67	5,26	2,66	3,68	0,32	0,19	0,06
Zonnebaars	0,55	1,08	1,37	0,47	0,10	0,63	0,33
Zeelt							0,04
Zalm		0,16		0,17			
Winde	0,37			0,95	0,09		0,35
Vlagzalm		0,50	0,31	0,46	1,20	0,56	2,47
Vetje						0,45	
Tien doornige stekelbaars		0,08		0,26			
Snoekbaars						0,15	0,20
Snoek	5,20	0,37	1,11	0,91	0,57	0,11	0,88
Sneep	0,83	0,73	0,38	0,36	0,45	0,20	0,81
Serpeling	2,77	2,21	6,01	2,71	8,08	4,91	5,67
Riviergrondel	3,20	6,60	6,72	15,21	6,34	7,13	6,06
Donderpad	3,63	2,45	1,72	3,43	2,79	1,62	4,00
Pos	8,09	0,63			0,09	0,25	0,15
Paling	4,79	8,92	0,88	1,12	3,26	0,45	3,17
Meerval	1,14	1,99	1,98	0,79	1,24	0,21	1,52
Kopvoorn	6,02	5,21	11,00	11,38	10,14	24,93	14,74
Kolbei							0,17
Kesslers grondel	0,72						
Karper	3,67	14,51	5,83	1,96	4,66	4,72	10,97
Giebel/Goedvis		0,06	0,40	0,33	0,81		
Gestippelde alver				0,10			
Drie doornige stekelbaars	1,51	5,01	7,57	3,94	4,35	2,75	8,11
Brasem	13,52	4,97	15,56	5,59	5,75	1,05	7,29
Blauwband		0,06					
Blankvoorn	5,09	4,18	2,39	2,70	2,39	2,57	1,15
Bittervoorn	0,30			0,70			
Bermpje	0,36	1,10	0,87	0,36	0,36	2,04	1,06
Beekforel/Zeeforel/Bronforel		0,54			0,23		0,42
Beekdonderpad		0,93	3,85	0,75	1,04	1,03	3,67
Barbeel	6,70	9,69	9,17	24,77	23,11	34,33	18,90
Baars	10,07	21,51	19,57	15,59	18,51	9,48	7,53
Alver	0,82	1,27	0,65	1,28	4,14	0,23	0,27
Aantal soorten	22	26	21	26	24	23	26

TABEL II-2: PERCENTAGE DNA-SEQUENTIES MET BEHULP VAN METABARCODING ANALYSE VAN LOCATIES WATERSCHAP AA EN MAAS.

Soort	Elststraat voetgangersbruggetje	Locatie NL38_601	Locatie NL38_602	Locatie NL38_6J-4	Locatie NL38_6J-3	Vispassage HW	Henriettewaard
Zwartbek grondel		2,47	38,89	33,93	34,86	22,31	62,80
Zeelt	0,49	1,66		0,38	0,34		0,07
Witvin grondel	0,03						
Winde	11,83			0,66	4,48	1,18	1,46
Vetje			0,82		0,02		
Tien doornige stekelbaars	1,02						
Snoekbaars				14,35	1,49	2,18	0,84
Snoek	1,76	5,11	1,74	1,30	0,63	0,51	
Ruisvoorn	0,42	0,25		0,55			
Roofblei					0,37	0,15	
Riviergrondel	7,40	8,04				0,18	0,33
Pos		2,26	7,56	15,41	6,46	9,80	0,98
Paling				2,48	2,53	0,75	2,71
Marmer grondel	11,74	32,43	6,91	0,96	3,07	1,74	3,86
Kopvoorn				0,38			
Kolbei	0,35	0,51	0,00	1,49	0,26		
Kleine modderkruiper	0,22	0,35					
Karper	0,90	0,84	3,74	2,44	3,17	32,46	2,90
Goudvis/Giebel		0,29		0,44			
Drie doornige stekelbaars	20,92						
Brasem	1,52	22,89	14,72	16,50	28,84	3,15	6,04
Blankvoorn	31,73	4,83	6,62	2,67	8,33	11,42	1,83
Bittervoorn	0,23						
Bermpje	5,31	2,85					
Baars	3,90	15,21	18,37	6,07	5,14	14,19	16,19
Alver	0,24		0,64				
Aantal soorten	18	15	10	16	15	13	12

TABEL II-3: PERCENTAGE DNA-SEQUENTIES MET BEHULP VAN METABARCODING ANALYSE VAN LOCATIES WATERSCHAP BRABANTSE DELTA.

Soort	Aa of weerijs (AW_ZT_H5)	Aa of weerijs (AW_WB_F8)	Aa of weerijs (AW_EW_C2)	Kleine Beek (KL_BA_C3)	Kleine Beek (KL_BL_B2)
Zwartbek grondel	3,86	2,91	3,18	1,81	0,37
Zonnebaars	2,72	69,27	3,66	0,51	
Zeelt	5,77	1,27	5,06	3,08	10,03
Winde				0,32	0,21
Vetje	5,67	0,60	7,57	1,24	2,98
Tien doornige stekelbaars				1,26	2,28
Spiering					0,30
Snoekbaars					0,10
Snoek	0,61	0,63	0,53	0,47	0,14
Ruisvoorn	1,65	0,75	0,88	8,51	10,34
Riviergrondel	1,53	3,72	7,83	12,25	9,95
Pos	6,57	4,03	4,96		0,09
Paling	1,09			11,44	6,78
Marmer grondel				0,09	
Kolbei		0,93	1,65		1,07
Kleine modderkruiper	1,45	0,48		0,03	
Karper	4,33	1,08	4,65	13,64	5,67
Giebel/Goudvis				0,23	0,22
Drie doornige stekelbaars				0,19	
Brasem	24,07	5,08	20,07	3,20	1,67
Blankvoorn	31,58	7,66	25,34	22,18	12,15
Bittervoorn	0,84	0,64	4,75	0,41	
Bermpje	1,78		5,60	15,24	34,77
Donderpad		0,12			
Baars	6,47	0,58	4,26	3,89	0,87
Alver		0,24			
Aantal soorten	16	17	15	20	19

TABEL II-4: RESULTATEN VAN DE QPCR ANALYSE EN DETECTIE VAN EDNA KOPIEËN VOOR DE VIJF DOELSOORTEN IN WATERMONSTERS UIT DE ROER ROND DE ECI STUW IN ROERMOND VOOR HET ONDERZOEK OM MOGELIJKE MIGRATIE BELEMMERINGEN TE IDENTIFICEREN. *BOVEN*: DIRECT STROOMOPWAARTS VAN DE STUW; *BENEDEN*: DIRECT STROOMAFWAARTS VAN DE STUW. MENGMONSTER GEEFT AAN DAT HET MONSTER IS SAMENGESTELD UIT DEELMONSTERS CONFORM DE BEMONSTERINGSPROCEDURE (ZIE BIJLAGE 1). NUMMERS GEVEN DE REPLICAS MENGMONSTERS AAN, GENOMEN PER LOCATIE-DATUM COMBINATIE.

sample info	Rendement (%)	Brasem Kopieën/l	Kopvoorn Kopieën/l	Zalm Kopieën/l	Barbeel Kopieën/l	Zeeprik Kopieën/l
18-apr boven mengmonster 1	49,8	3,0E+03	+			
18-apr beneden mengmonster 1	48,8	3,8E+03				
18-apr boven mengmonster 2	50,6	2,5E+03	+			
18-apr beneden mengmonster 2	52,1	1,5E+03				
18-apr boven mengmonster 3	49,8	1,6E+03	+			
18-apr beneden mengmonster 3	56,3	2,1E+03				
9-mei boven mengmonster 1	51,4	1,2E+05	2,5E+03		+	
9-mei beneden mengmonster 1	55,1	3,5E+05	2,6E+03		2,5E+03	
9-mei boven mengmonster 2	56,3	9,5E+04	1,9E+03		+	
9-mei beneden mengmonster 2	52,7	2,2E+05	1,6E+03		1,6E+03	
9-mei boven mengmonster 3	53,6	8,8E+04	1,0E+03		+	
9-mei beneden mengmonster 3	57,0	1,1E+05	1,6E+03		+	
4-jun boven mengmonster 1	54,4	2,7E+04			+	
4-jun beneden mengmonster 1	57,9	2,7E+04	7,5E+02		+	
4-jun boven mengmonster 2	62,6	1,9E+04			+	
4-jun beneden mengmonster 2	62,9	2,3E+04			+	
4-jun boven mengmonster 3	62,8	2,4E+04			+	
4-jun beneden mengmonster 3	60,3	2,2E+04			+	

+: eDNA gedetecteerd maar onder kwantificatiegrens

TABEL II-5: RESULTATEN VAN DE QPCR ANALYSE EN DETECTIE VAN EDNA KOPIEËN IN WATERMONSTERS VOOR EEN INVENTARISATIE VAN DE KWANTITATIEVE VERSPREIDING VAN EDNA VOOR DE VIJF DOELSOORTEN LANGS ZEVEN LOCATIES IN HET NEDERLANDSE STROOMGEBIED VAN DE ROER. DE GEOGRAFISCHE COÖRDINATEN VAN DE LOCATIES STAAN IN DE KOLOM SAMPLE INFO. PER LOCATIE ZIJN DRIE REPLICA MONSTERS GENOMEN, AANGEGEVEN MET LETTERS. ELK REPLICA MONSTER IS SAMENGESTELD UIT DEELMONSTERS CONFORM DE BEMONSTERINGSPROCEDURE (ZIE BIJLAGE 1).

sample info	Rendement (%)	Brasem Kopieën/l	Kopvoorn Kopieën/l	Zalm Kopieën/l	Barbeel Kopieën/l	Zeeprik Kopieën/l
Roer Traject 1a - X,Y203841-349108 203972-349317	53,0	7,9E+02	9,1E+02		+	
Roer Traject 1b - X,Y203841-349108 203972-349317	55,8	8,8E+02	8,3E+02		+	
Roer Traject 1c - X,Y203841-349108 203972-349317	53,6	1,1E+03	1,2E+03		+	
Roer Traject 2a - X,Y203221-350754 203011-350672	58,0	9,3E+02	1,1E+03		+	
Roer Traject 2b - X,Y203221-350754 203011-350672	1,3	-	-	-	-	-
Roer Traject 2c - X,Y203221-350754 203011-350672	53,4	2,1E+03	1,3E+03		+	
Roer Traject 3a - X,Y201313-350995 201123-350820	55,4	2,1E+03	1,7E+03		+	
Roer Traject 3b - X,Y201313-350995 201123-350820	50,4	1,7E+03	1,7E+03		+	
Roer Traject 3c - X,Y201313-350995 201123-350820	54,7	2,9E+03	8,9E+03		8,8E+02	
Roer Traject 4a - X,Y199962-351191 199678-351366	55,3	2,0E+03	8,0E+03		+	
Roer Traject 4b - X,Y199962-351191 199678-351366	52,4	7,1E+03	5,6E+03			
Roer Traject 4c - X,Y199962-351191 199678-351366	54,0	3,4E+03	7,8E+03		+	
Roer Traject 5a - X,Y198472-351081 198269-351181	53,1	1,8E+03	4,5E+03			
Roer Traject 5b - X,Y198472-351081 198269-351181	57,2	1,5E+03	4,0E+03			
Roer Traject 5c - X,Y198472-351081 198269-351181	47,6	1,5E+03	3,3E+03			
Roer Traject 6a - X,Y198063-352215 197784-352242	64,1	+	2,1E+03			
Roer Traject 6b - X,Y198063-352215 197784-352242	61,0	7,8E+02	1,8E+03			
Roer Traject 6c - X,Y198063-352215 197784-352242	62,9	+	1,4E+03			
Roer Traject 7a - X,Y197395-353162 197238-353353	45,7	+	9,1E+02			
Roer Traject 7b - X,Y197395-353162 197238-353353	57,5	9,9E+02	2,7E+03			
Roer Traject 7c - X,Y197395-353162 197238-353353	53,3	1,11E+03	2,1E+03			

-: te laag rendement van de IC voor een betrouwbare analyse; +: eDNA gedetecteerd maar onder kwantificatiegrens

TABEL II-6: RESULTATEN VAN DE QPCR ANALYSE EN DETECTIE VAN EDNA KOPIEËN IN WATERMONSTERS VOOR EEN INVENTARISATIE VAN DE KWANTITATIEVE VERSPREIDING VAN EDNA VOOR DE VIER DOELSOORTEN LANGS ACHT LOCATIES IN HET MARK EN VLIET STELSEL. DE GEOGRAFISCHE COÖRDINATEN VAN BEGIN- EN EINDPUNT VAN DE BEMONSTERDE TRAJECTEN STAAN IN DE KOLOM SAMPLE INFO. PER LOCATIE ZIJN DRIE REPLICA MONSTERS GENOMEN, AANGEGEVEN MET LETTERS. ELK REPLICA MONSTER IS SAMENGESTELD UIT DEELMONSTERS CONFORM DE BEMONSTERINGSPROCEDURE (ZIE BIJLAGE 1).

sample info	Rendement (%)	Marmergrondel Kopieën/l	Rivierdonderpad Kopieën/l	Zwartbekgrondel Kopieën/l	Winde Kopieën/l
Mark en Vliet 1a - XY-begin;81926 402165-eind;81699 401969	35,5			2,45E+03	
Mark en Vliet 1b - XY-begin;81926 402165-eind;81699 401969	49,3			1,68E+03	
Mark en Vliet 1c - XY-begin;81926 402165-eind;81699 401969	44,7			1,42E+03	
Mark en Vliet 2a - XY-begin;83691 402252-eind;83947 402266	54,6			1,99E+03	+
Mark en Vliet 2b - XY-begin;83691 402252-eind;83947 402266	55,1	+		2,99E+03	+
Mark en Vliet 2c - XY-begin;83691 402252-eind;83947 402266	55,5			3,24E+03	+
Mark en Vliet 3a - XY-begin;86694 406012-eind;86591 406237	56,9			2,43E+03	+
Mark en Vliet 3b - XY-begin;86694 406012-eind;86591 406237	55,1			2,34E+03	
Mark en Vliet 3c - XY-begin;86694 406012-eind;86591 406237	49,4			3,47E+03	+
Mark en Vliet 4a - XY-begin;88100 405115-eind;88328 404996	61,3			5,91E+03	1,7E+03
Mark en Vliet 4b - XY-begin;88100 405115-eind;88328 404996	50,5			2,15E+04	1,4E+03
Mark en Vliet 4c - XY-begin;88100 405115-eind;88328 404996	63,3			5,09E+03	+
Mark en Vliet 5a - XY-begin;95046 402742-eind;94892 402540	38,4			1,12E+04	+
Mark en Vliet 5b - XY-begin;95046 402742-eind;94892 402540	66,3			1,0E+04	
Mark en Vliet 5c - XY-begin;95046 402742-eind;94892 402540	51,5			1,5E+04	+
Mark en Vliet 6a - XY-begin;97517 404551-eind;97708 404719	52,9	+		1,9E+03	+
Mark en Vliet 6b - XY-begin;97517 404551-eind;97708 404719	54,9	+		2,3E+03	
Mark en Vliet 6c - XY-begin;97517 404551-eind;97708 404719	53,4			2,1E+03	+
Mark en Vliet 7a - XY-begin;113704 405729-eind;113498 405581	54,7	8,4E+03		8,0E+03	4,1E+03
Mark en Vliet 7b - XY-begin;113704 405729-eind;113498 405581	59,1	8,2E+03		5,5E+03	
Mark en Vliet 7c - XY-begin;113704 405729-eind;113498 405581	55,0	6,3E+03		5,5E+03	

Mark en Vliet 8a - XY-begin;114569 406245-eind;114797 406355	50,5	8,3E+03		1,2E+04	+
Mark en Vliet 8b - XY-begin;114569 406245-eind;114797 406355	48,6	1,2E+04		5,7E+03	
Mark en Vliet 8c - XY-begin;114569 406245-eind;114797 406355	52,3	3,1E+03		5,1E+03	

+: eDNA gedetecteerd maar onder kwantificatiegrens

Bijlage III Primerinformatie metabarcoding

PCR PRIMER OVERZICHT METABARCODING

Primer	Sequentie 5' - 3'	8 primerparen
F1	GACGAGAAGACCTATGAAG	1 F1+R2 baarzen
F2	GACGAGAAGACCTTTGGAG	2 F2+R1 karpers
F3	GACGAGAAGACCTATGGAG	3 F3+R2 harders, stekelbaarzen, gup, grondels, rivierdonderpad, zalmachtigen
F4	GACGAGAAGACCTGTGGAG	4 F3+R1 snoek, paling, fint en elft
R1	GGTCGCCCCAACCGAAG	5 F4+R2 kwabaal
R2	GGTCGCCCCAACCAAAG	6 F2+R3 Europese meerval
R3	GCAGTCGCCCCAACTGAAG	7 F4+R4 prikken
R4	CGTCGTCGTGGATATTACTTTTG	8 F3+R5 steuren
R5	CAACCGAAAACATTAGGATCAGG	

Bijlage IV KRW bemonsterings gegevens 2016

De Roer

		OROER905		OROER715		OROER550		OROER520		OROER440		OROER312		OROER195	
Gilde	Vissoort	N	kg	-	-	N	kg	N	kg	N	kg	N	kg	N	kg
Eurytoop	Aal/Paling	-	-	22	13.2	38	21.7	56	39.7	25	14.1	9	5.1	22	14.5
	Alver	-	-	-	-	-	-	-	-	17	0.1	44	0.2	178	0.0
	Baars	56	8.3	37	1.1	45	0.4	137	7.0	75	0.8	71	1.3	415	2.7
	Blankvoorn	164	8.7	22	0.3	8	0.1	39	1.8	8	0.1	9	0.1	63	0.8
	Brasem	153	35.6	7	10.0	-	-	14	20.2	-	-	18	0.0	15	9.4
	Driedoornige														
	Stekelbaars	-	-	-	-	8	0.0	-	-	8	0.0	267	0.2	7	0.0
	Giebel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Meerval	-	-	-	-	8	14.7	14	5.9	-	-	-	-	-	-
	Snoek	14	1.6	10	1.3	15	1.6	21	20.4	6	1.2	-	-	15	2.1
	Snoekbaars	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	0.1
Limnofiel	Bittervoorn	-	-	-	-	-	-	-	-	17	0.0	-	-	-	-
	Rietvoorn/Ruisvoorn	-	-	7	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Tienddoornige														
	Stekelbaars	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Zeelt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rheofiel	Barbeel	-	-	-	-	-	-	-	-	152	189.5	127	1.7	78	29.0
	Beekforel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Bermpje	-	-	-	-	-	-	-	-	17	0.0	53	0.3	89	0.3
	Elrits	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	560	0.2	15	0.1

	Kopvoorn	-	-	7	0.1	45	0.9	56	2.7	146	59.1	1120	13.4	164	11.4
	Rivierdonderpad	-	-	-	-	-	-	11	0.0	-	-	27	0.1	67	0.3
	Riviergrondel	-	-	-	-	-	-	14	0.1	358	3.8	400	0.2	19	0.4
	Serpeling	25	1.7	-	-	-	-	35	1.4	25	0.6	27	0.3	12	1.1
	Sneep	70	22.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Winde	-	-	-	-	-	-	11	1.0	-	-	-	-	-	-
	Vlagzalm	-	-	-	-	15	0.4	-	-	15	4.4	-	-	-	-
	Zeepril	-	-	-	-	-	-	14	0.1	-	-	-	-	-	-
Exoot	Blauwband	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Goudvis	-	-	-	-	-	-	25	1.3	-	-	-	-	-	-
	Marmergrondel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Zonnebaars	-	-	30	0.3	23	0.3	32	0.5	-	-	-	-	67	0.8
	Zwartbekgrondel	584	3.4	-	-	15	0.2	53	0.6	8	0.1	-	-	7	0.0

Dieze en Aa

		Stadse Aa		Dieze	
Gilde	Vissoort	<i>N</i>	<i>kg</i>	<i>N</i>	<i>kg</i>
Eurytoop	Aal/Paling	-	-	-	-
	Alver	-	-	3	0,2
	Baars	82	1,4	190	3,6
	Blankvoorn	24	0,1	2035	24,1
	Brasem	-	-	257	65
	hybride	-	-	4	0,1
	Kleine modderkruiper	2	0	-	-
	Kolblei	-	-	19	1
	Pos	5	0	94	0,8
	Snoekbaars	-	-	13	4
Limnofiel	Bittervoorn	3	0	-	-
	Rietvoorn/Ruisvoorn	-	-	-	-
	Snoek	9	8,6	5	2,4
	Zeelt	3	0,1	-	-
Rheofiel	Bermpje	-	-	-	-
Exoot	Zwartbekgrondel	6	0	-	-
	Marm grondel	33	-	127	-

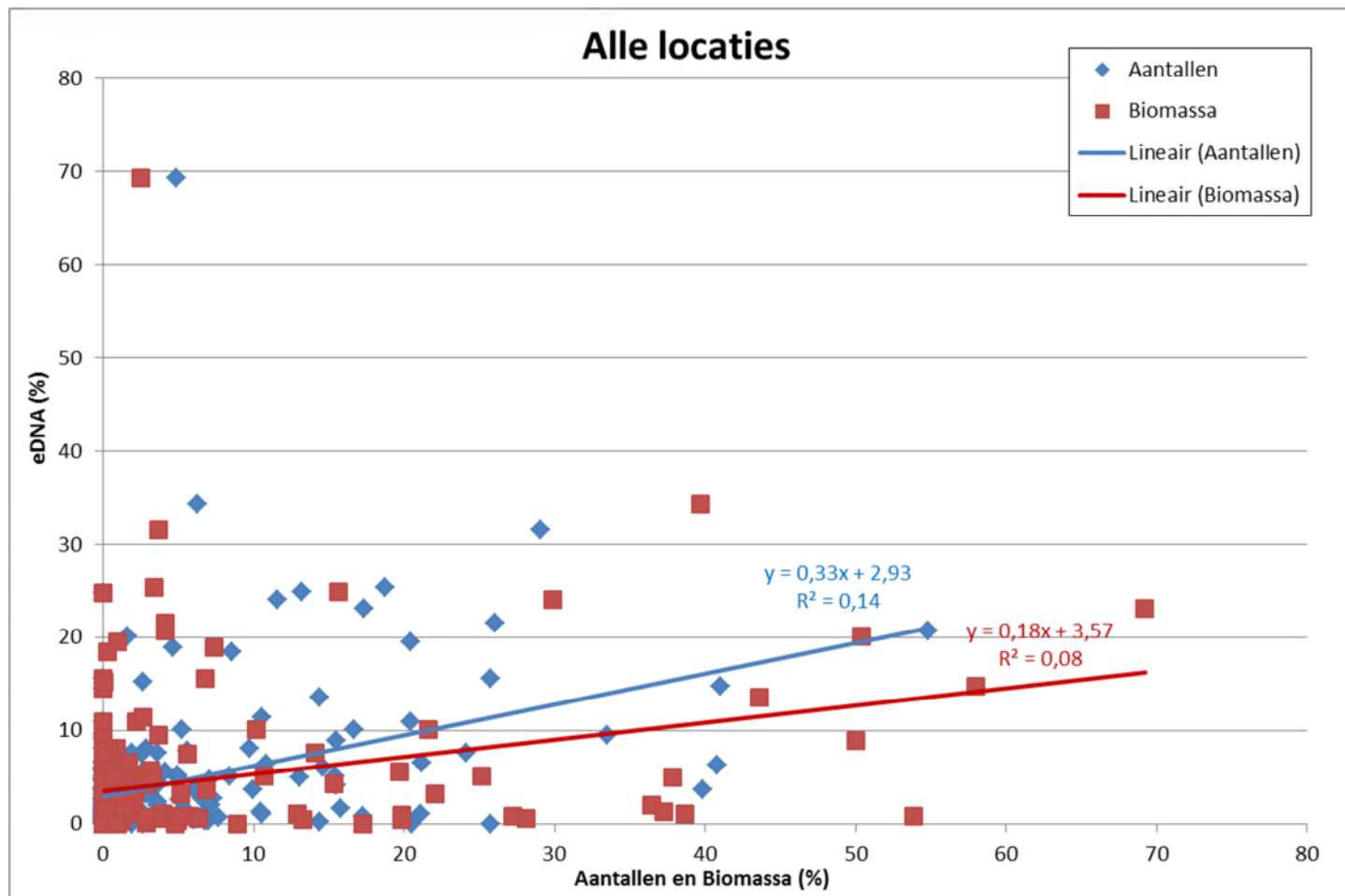
Beken ten zuiden van Breda

		AW_EW_C2		AW_BE_D1		AW_WB_F8		AW_TW_G4		AW_ZT_H5		BT_BI_I1	
Gilde	Vissoort	N	kg	-	-	N	kg	N	kg	N	kg	N	kg
Eurytoop	Aal/Paling	-	-	-	-	-	-	12	5.1	-	-	12	1.5
	Alver	-	-	-	-	-	-	-	-	20	0.5	-	-
	Baars	167	6.0	98	2.4	78	2.0	259	3.1	175	1.8	424	3.2
	Blankvoorn	850	6.9	415	2.8	495	7.8	737	7.5	470	4.0	97	2.8
	Brasem	75	102.7	28	0.2	173	13.9	78	7.2	188	32.2	12	12.5
	Hybride	8	0.5	13	0.3	-	-	2	0.0	8	0.1	-	-
	Karper	-	-	-	-	3	0.5	-	-	3	16.5	-	-
	Kleine modderkruiper	1166	1.9	-	-	25	0.1	73	0.2	-	-	-	-
	Kolblei	21	0.4	13	0.0	8	0.1	78	0.5	83	0.6	-	-
	Pos	146	1.3	3	0.0	5	0.0	68	0.5	343	1.8	-	-
	Snoekbaars	-	-	-	-	-	-	-	-	3	9.6	-	-
Limnofiel	Bittervoorn	321	0.1	168	0.0	40	0.0	65	0.0	-	-	-	-
	Rietvoorn/Ruisvoorn	258	10.0	232	1.2	158	1.6	121	1.0	255	1.5	24	0.8
	Snoek	93	27.0	63	13.7	57	3.5	23	2.1	32	30.3	73	4.8
	Vetje	88	0.1	132	0.0	35	0.0	12	0.0	-	-	-	-
	Zeelt	592	6.8	52	0.6	50	20.6	90	5.2	3	3.4	12	0.0
Rheofiel	Bermpje	187	0.4	13	0.0	-	-	-	-	-	-	48	0.0
	Rivierdonderpad	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	0.0
	Riviergrondel	-	-	-	-	818	3.8	-	-	40	0.3	61	0.3
	Winde	21	35.1	3	0.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Exoot	Blauwband	21	0.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Roofblei	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Zonnebaars	275	4.3	77	1.3	100	1.4	2	0.0	-	-	-	-

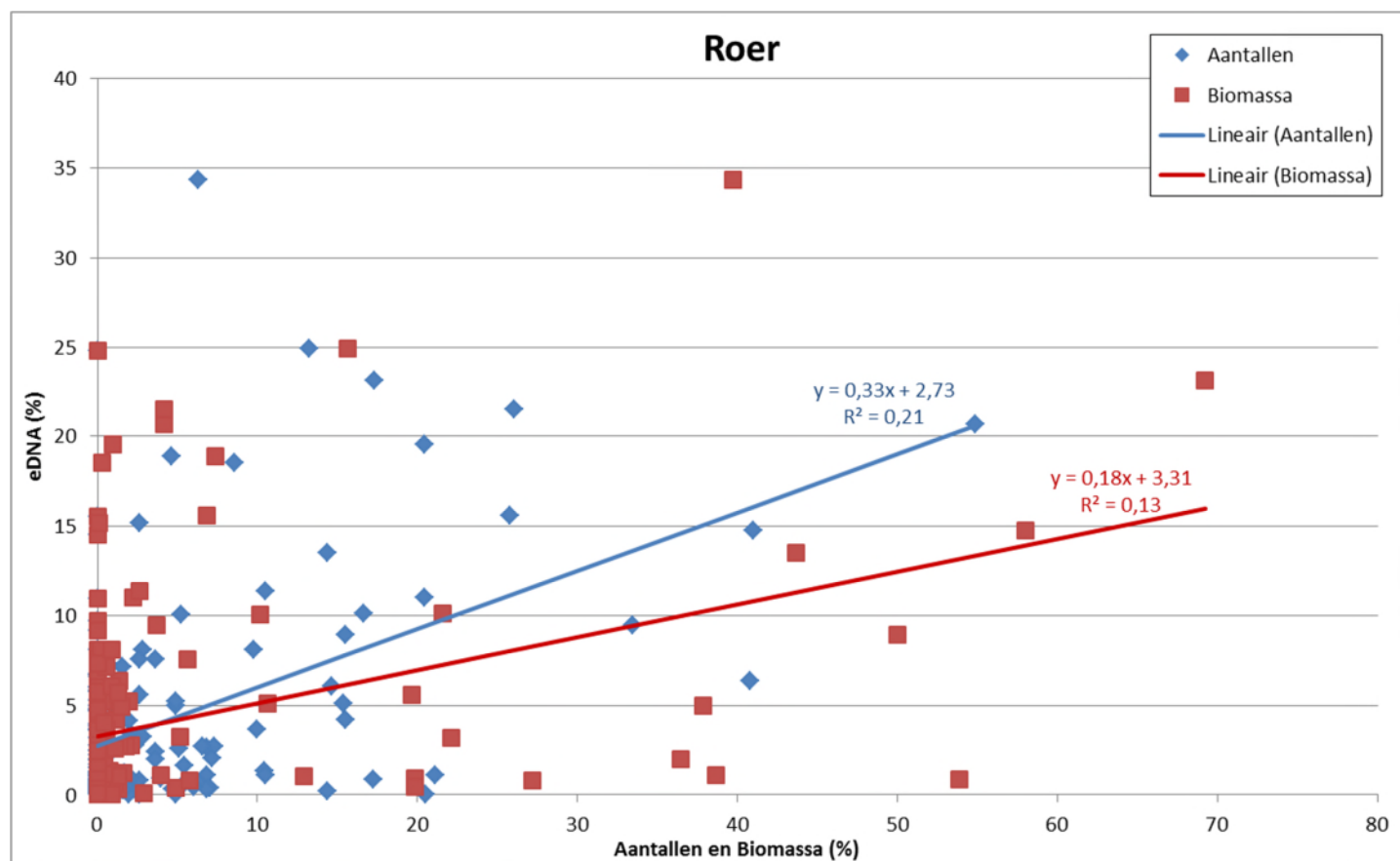
Mark-Vliet

	MV_SR_C1		MV_SR_B1		MV_MD_L2		MV_MD_K4		MV_MD_H5		MV_MD_G7		MV_MK_A4		MV_MK_A3	
Vissoort	N	kg	N	kg	N	kg	N	kg	N	kg	N	kg	N	kg	N	kg
Marmmgrondel	26.7	0.0	106.7	0.0	53.3	0.0	-	-	26.7	0.0	26.7	0.0	106.7	0.0	26.7	0.0
Rivierdonderpad	-	-	-	-	26.7	0.1	-	-	26.7	0.2	-	-	26.7	0.0	-	-
Zwartbekgrondel	2320.0	0.0	933.3	0.0	3173.6	0.0	2293.6	0.0	1280.0	0.0	133.3	0.0	26.7	0.0	106.7	0.0
Winde	-	-	80.0	0.1	53.3	0.1	373.3	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-

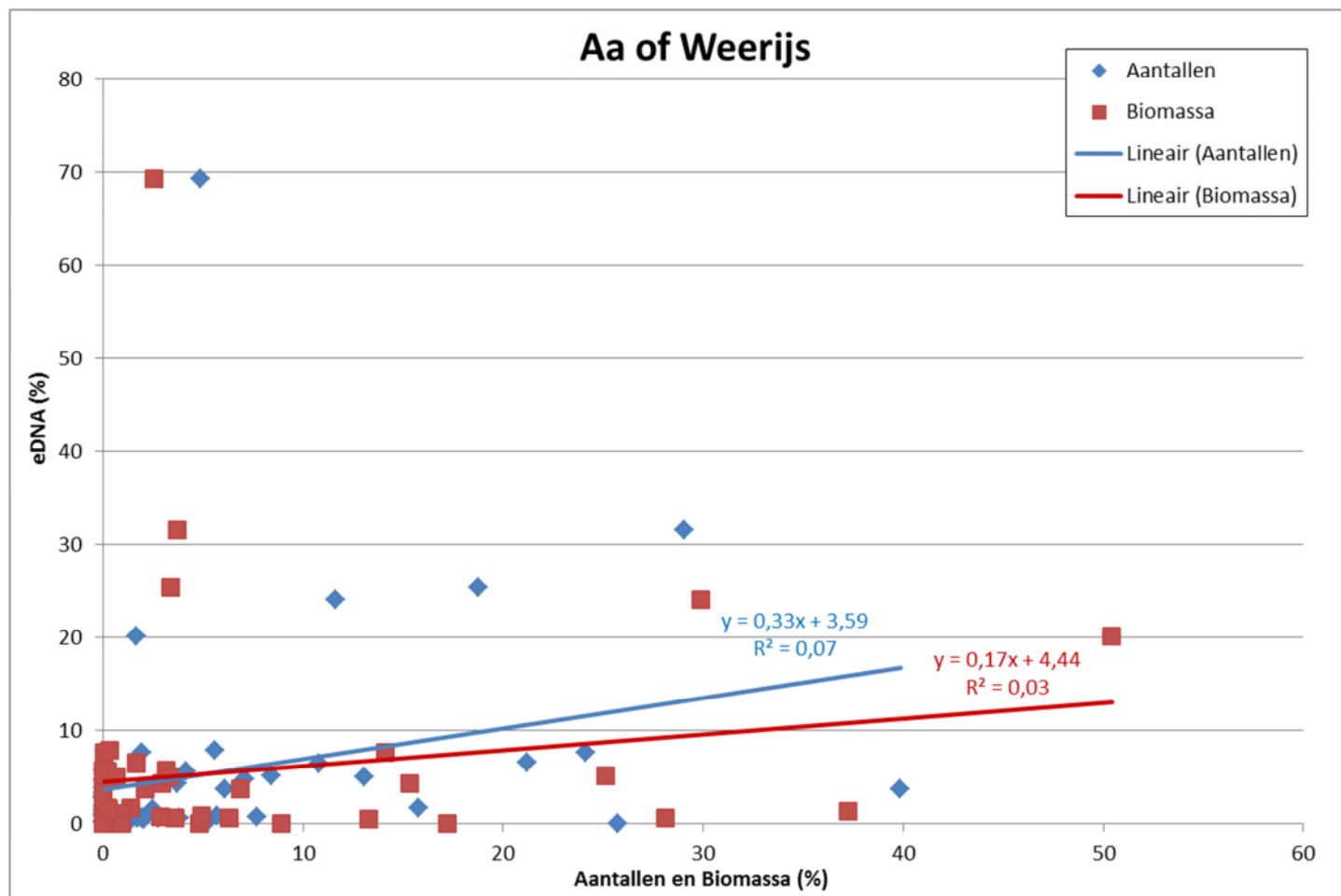
Bijlage V Lineaire verbanden tussen soortaandeel in eDNA en aandeel in biomassa of aantal



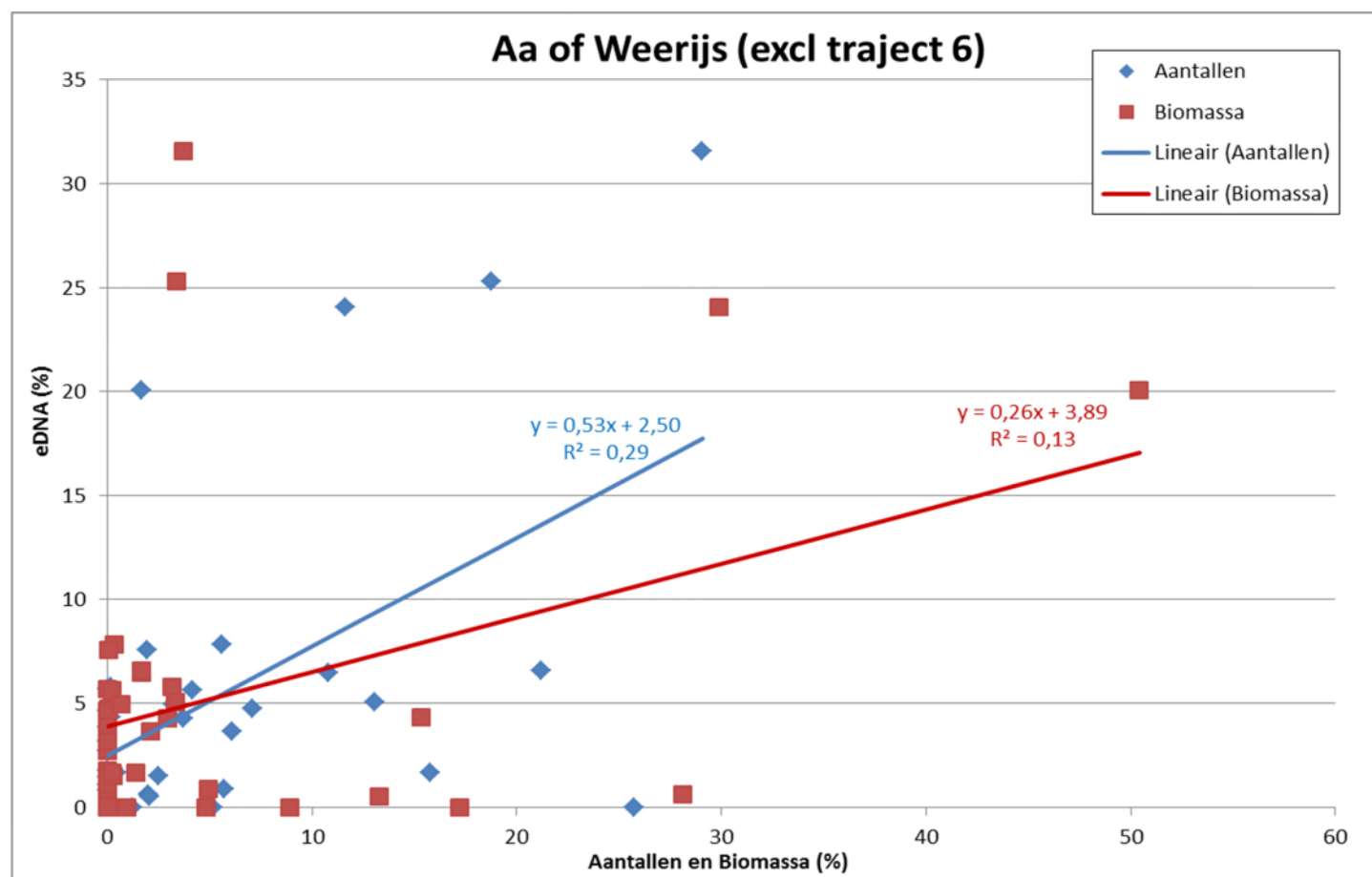
FIGUUR 1 LINEAIRE VERBANDEN TUSSEN EDNA EN TRADITIONELE VISSTANDBEMONSTERING VAN DE LOCATIES IN DE ROER EN AA OF WEERIJ.



FIGUUR 2 LINEAIRE VERBANDEN TUSSEN EDNA EN TRADITIONELE VISSTANDBEMONSTERING VAN DE LOCATIES IN DE ROER.



FIGUUR 3 LINEAIRE VERBANDEN TUSSEN EDNA EN TRADITIONELE VISSTANDBEMONSTERING VAN DE LOCATIES IN DE AA OF WEERIJS.



FIGUUR 4 LINEAIRE VERBANDEN TUSSEN EDNA EN TRADITIONELE VISSTANDBEMONSTERING VAN DE LOCATIES IN DE AA OF WEERIJS (EXCLUSIEF TRAJECT 6).