

eDNA METABARCODING VISSSEN

ONDERZOEK NAAR DE MOGELIJKE TOEPASSING VAN
eDNA VOOR DE KRW VISMONITORING (2016)

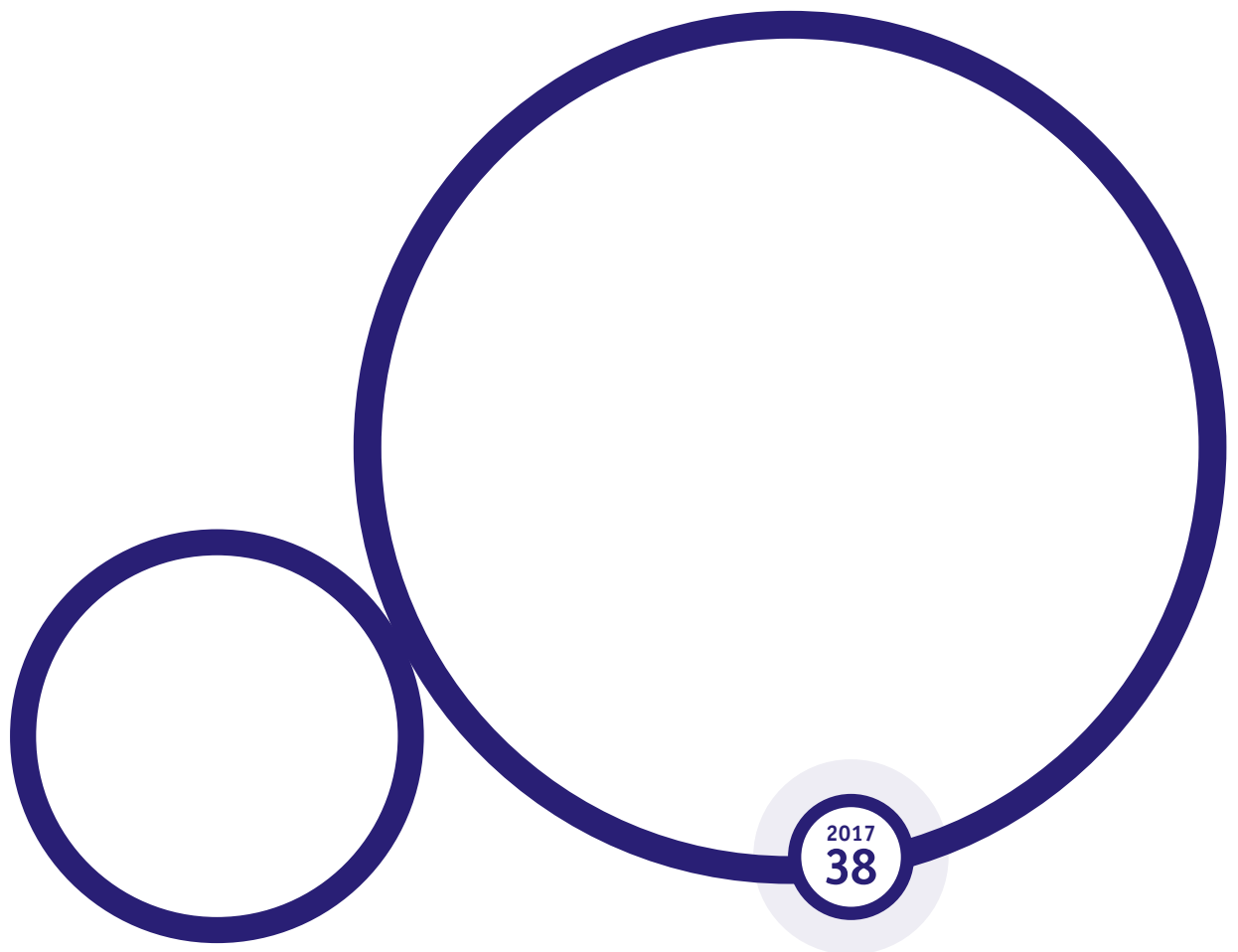


2017
38

stowa

eDNA METABARCODING VISSSEN

ONDERZOEK NAAR DE MOGELIJKE TOEPASSING VAN
eDNA VOOR DE KRW VISMONITORING (2016)



COLOFON

UITGAVE

Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer
Postbus 2180
3800 CD Amersfoort

TITEL | eDNA metabarcoding vissen

SUBTITEL | Onderzoek naar de mogelijke toepassing van eDNA voor de KRW vismonitoring (2016)

REFERAAT | Nieuwe DNA methoden zijn sterk in opkomst voor het in beeld brengen van ecologische parameters zoals de visstand. Sinds 2013 doet RAVON in samenwerking met STOWA en waterschappen onderzoek naar de mogelijke toepassing van een eDNA metabarcoding methode voor de KRW vismonitoring. Onderhavige rapportage gaat in op de resultaten van het onderzoek uit 2016. In 2016 is er in plaats van op trajectniveau (onderzoeken 2013 & 2015) op waterlichaamniveau een vergelijking gemaakt tussen de resultaten met eDNA en KRW-bevissingen. Op deze manier werd verder inzicht verkregen in de toepasbaarheid van eDNA in kwalitatief en mogelijk semi-kwantitatief visstandonderzoek.

WIJZE VAN CITEREN | Herder J.E., en J. Kranenbarg, 2017. eDNA metabarcoding vissen - Onderzoek naar de mogelijke toepassing van eDNA voor de KRW vismonitoring (2016), RAVON/STOWA rapport 2017-38

SAMENSTELLERS | Jelger Herder en Jan Kranenbarg

PROJECTLEIDER | Jelger Herder

BEGELEIDINGSGROEP | STOWA (Bas van der Wal) | Waterschap Rijn & IJssel (Matthijs de Vos) | Wetterskip Fryslân (Harry Boonstra) | Hoogheemraadschap van Schieland en de Krimpenerwaard (Johan van Tent) | Hoogheemraadschap van Rijnland (Bart Schaub) | Waterschap Rivierenland (Johan de Jong) | Waterschap Amstel, Gooi en Vecht (Tim Pelsma) | Hoogheemraadschap de Stichtse Rijnlanden (Brigitte Mangelaars) | Waterschap Vechtstromen (Bert Knol) en Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier (Gert van Ee).

DANKWOORD | Het onderzoek is uitgevoerd met financiële ondersteuning van STOWA, Waterschap Rijn & IJssel, Wetterskip Fryslân, Hoogheemraadschap van Schieland en de Krimpenerwaard, Hoogheemraadschap van Rijnland, Waterschap Rivierenland, Waterschap Amstel, Gooi en Vecht, Hoogheemraadschap de Stichtse Rijnlanden, Waterschap Vechtstromen en Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier. Vanuit deze organisaties is een begeleidingsgroep samengesteld met daarin Bas van der Wal (STOWA), Matthijs de Vos (Waterschap Rijn & IJssel), Harry Boonstra (Wetterskip Fryslân), Johan van Tent (Hoogheemraadschap van Schieland en de Krimpenerwaard), Bart Schaub (Hoogheemraadschap van Rijnland), Johan de Jong (Waterschap Rivierenland), Tim Pelsma (Waterschap Amstel, Gooi en Vecht), Brigitte Mangelaars (Hoogheemraadschap de Stichtse Rijnlanden), Bert Knol (Waterschap Vechtstromen) en Gert van Ee (Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier). Wij zijn hun hiervoor zeer erkentelijk. Daarnaast danken wij ATKB, Altenburg en Wymenga en Bureau Waardenburg voor het aanleveren van de gegevens van de KRW-visbemonsteringen.

WEBSITE | www.stowa.nl

VORMGEVING | Vormgeving Studio B, Nieuwkoop

FOTOGRAFIE | Jelger Herder. Foto's omslag: *Rivierdonderpad met eDNA en schubben van een karper*

DRUK | DPP, Houten

RAVON/STOWA | 2017-38 | **ISBN** | 978.90.5773.764.0

PROJECTNUMMER RAVON: 2016.108

AANTAL PAGINA'S INCLUSIEF BIJLAGEN | 60

AMERSFOORT, APRIL 2018

COPYRIGHT | Teksten uit dit rapport mogen worden overgenomen, mits met bronvermelding. De in het rapport ontwikkelde, dan wel verzamelde kennis is om niet verkrijgbaar. De eventuele kosten die STOWA voor rapporten in rekening brengt, zijn uitsluitend kosten voor het vormgeven, vermenigvuldigen en verzenden.

DISCLAIMER | Dit rapport is gebaseerd op de meest recente inzichten in het vakgebied. Desalniettemin moeten bij toepassing ervan de resultaten te allen tijde kritisch worden beschouwd. De auteurs en STOWA kunnen niet aansprakelijk worden gesteld voor eventuele schade die ontstaat door toepassing van het gedachtegoed uit dit rapport.

 **stowa**

 **SPYGEN**

 **Waterschap
Rivierenland**

 **Waterschap
vechtstromen**

 **RAVON**

 **Hoogheemraadschap van
Schiedam en de Krimpenerwaard**

 **wateronet**

 **Hoogheemraadschap van
Rijnland**

 **Waterschap Rijn en IJssel**
WATERBEHEER: VEILIG EN OP MAAT

 **Hoogheemraadschap
Hollands
Noorderkwartier**

 **WETTERSKIP
FRYSLÂN**

 **DE STICHTSE
RIJNLANDEN**



TEN GELEIDE

De ecologische kwaliteit van watersystemen wordt bepaald aan de hand van de samenstelling van plantaardige en dierlijke onderdelen van het voedselweb. Naast algen, waterplanten en kleine waterdiertjes (macrofauna) wordt ook gekeken naar de opbouw van de visstand. Tot op heden is het bemonsteren van vispopulaties technisch lastig, tijdrovend, (daardoor) kostbaar en betrekkelijk onnauwkeurig.

Dit rapport beschrijft de mogelijkheden die een recente techniek, die van het opsporen van vis door het meten van DNA-sporen, biedt voor het in beeld brengen van de visstand.

In grote lijnen samenvattend kan worden gezegd dat het bepalen van de visstand via 'environmental DNA' zeer veelbelovend is. De techniek is niet belastend voor de vissen, geeft een nauwkeurig beeld van de samenstelling van de populatie en van de onderlinge verhouding tussen de afzonderlijke soorten.

De techniek is kansrijk en zou verder ontwikkeld kunnen worden om toegepast te worden in de huidige beoordelingsmethode die gehanteerd wordt voor waterkwaliteitsrapportages.

De technieken voor het opsporen van 'environmental DNA' ontwikkelen zich razendsnel. Er is zicht op dat het beschikbaar komen van deze technieken over enige jaren zal leiden tot een nieuw type beoordelingsmethode, waarbij maximaal gebruik gemaakt zal worden van de mogelijkheden die de technieken bieden.

Het rapport is een vervolg op STOWArapport 2016-19. Beide rapporten bevatten naast de onderzoeksresultaten ook een beschrijving van een aantal technieken en geven daardoor een overzicht van de recente ontwikkelingen op dit vakgebied.

De in de rapporten beschreven onderzoeksresultaten zullen worden ingebracht in nationaal en internationaal overleg over meetmethoden en beoordelingsmethoden.

JOOST BUNTSMA

Directeur

INHOUDSOPGAVE

Colofon	2	
Ten geleide	5	
H1	INLEIDING	9
1.1	Kader	9
1.2	Onderzoekstraject RAVON, STOWA en de waterschappen	9
1.2.1	<i>Reeds uitgevoerd onderzoek</i>	9
1.2.2	<i>Onderzoeksvragen 2016</i>	10
1.3	Leeswijzer	11
H2	ONDERZOEKSOPZET	15
2.1	Onderzoekslocatie	15
2.2	Monstername	16
2.2.1	<i>KRW-visbemonsteringen</i>	16
2.2.2	<i>eDNA-metabarcoding bemonsteringen</i>	16
2.3	Analyse eDNA monsters	18
H3	RESULTATEN	21
3.1	In beeld brengen visgemeenschapsvariabelen	21
3.1.1	<i>Aantal aangetroffen soorten</i>	21
3.1.2	<i>Verhoudingen tussen aangetroffen soorten</i>	23
3.2	Benodigd aantal monsters voor het bepalen van de soortensamenstelling	24
3.3	Ruimtelijke verdeling van monsters in plassen/meren	27
3.4	Het mengen van watermonsters van meerdere trajecten	30
3.4.1	<i>Effect van mengen op soortensamenstelling</i>	30
3.4.2	<i>Vergelijking bemonsteringstrategieën voor bepalen soortensamenstelling</i>	32
3.4.3	<i>Effect mengen op verhoudingen tussen soorten</i>	33
H4	DISCUSSIE, AANBEVELINGEN & CONCLUSIES	37
4.1	In beeld brengen visgemeenschapsvariabelen	37
4.1.1	<i>Aantal gedetecteerde soorten in de visgemeenschap</i>	37
4.1.2	<i>Aandeel van vissoorten in de visgemeenschap</i>	38
4.1.3	<i>Onverwachte soorten met eDNA-metabarcoding</i>	39
4.2	Benodigd aantal monsters	39
4.3	Ruimtelijke verdeling van monsters in grote wateren	41
4.4	Effect van mengmonsters	42
4.4.1	<i>Mengmonsters van drie trajecten</i>	42
4.4.2	<i>Mengmonsters van een compleet waterlichaam</i>	42
4.5	Conclusies	43
H5	HOE VERDER	45
5.1	Onderzoekstraject, ideeën voor een maatlat	45
5.2	Tijdspad	47
5.3	Verwachte kostenreductie	48

H6	LITERATUUR	51
	BIJLAGE 1 Met eDNA extra aangetroffen soorten ten opzichte van KRW	53
	BIJLAGE 2 Correlatie tussen aandeel eDNA en biomassa, aantallen en biomassa + aantallen	54
	STOWA in het kort	60



H1 INLEIDING

1.1 KADER

In 2000 is de Kaderichtlijn Water (KRW) van kracht geworden in de lidstaten van de Europese Unie. De KRW voorziet in de bescherming en verbetering van aquatische ecosystemen en duurzaam gebruik van water. Het doel is voor alle wateren een 'goede toestand' te bereiken. De 'goede toestand' is onderverdeeld in een goede chemische en een goede ecologische toestand. De ecologische toestand wordt bepaald aan de hand van kwaliteitselementen waaronder vissen. Om de ontwikkeling van de ecologische toestand voor vissen te volgen voeren de waterschappen en Rijkswaterstaat periodiek visbemonsteringen uit. Deze KRW-visbemonsteringen worden uitgevoerd volgens de methodiek uit het Handboek Hydrobiologie (STOWA, 2014) waarbij conventionele methoden zoals fuiken, electrovisserij en zegens worden ingezet.

Sinds 2011 is in Nederland en een aantal andere landen zoals België, Denemarken, Engeland, Frankrijk en de Verenigde Staten de innovatieve environmental DNA-methode (eDNA) sterk in opkomst. De methode is gebaseerd op het feit dat organismen die in het water leven daarin kleine stukjes DNA achter laten via faeces, urine en huidcellen. Door het oplossend vermogen van water worden deze kleine stukjes DNA verspreid over een groot volume en oppervlak. Dit DNA is in het lab aan te tonen met behulp van primers en PCR (Polymerase Chain Reaction). Voor vissen hebben eDNA-methoden gemiddeld een (veel) hogere trefkans, zijn niet invasief (soorten hoeven niet gevangen te worden), hebben de potentie om in hoge mate gestandaardiseerd te kunnen worden en kunnen een kostenbesparing vormen ten opzichte van de huidige visbemonstering. In Herder *et al.*, 2014a is een overzicht gegeven.

De eerste eDNA methoden maakten gebruik van soortspecifieke primers voor het detecteren van één of enkele doelsoorten in een watermonster (Ficetola *et al.*, 2008). Het eerste Nederlandse onderzoek richtte zich op de detectie van grote modderkruipers (Herder *et al.*, 2012). Voor het gelijktijdig detecteren van alle vissoorten in een eDNA monster is de methode met soortspecifieke primers niet geschikt (zie kader). Dit is wel mogelijk met eDNA metabarcoding toepassingen waarbij middels gebruik van universele primers het DNA van een hele soortgroep (in dit geval vissen) vermeerderd wordt. Door de DNA-codes uit te lezen middels Next Generation Sequencing en deze vervolgens te vergelijken met een referentiedatabase kan een complete soortenlijst gegenereerd worden.

1.2 ONDERZOEKSTRAJECT RAVON, STOWA EN DE WATERSCHAPPEN

In 2013 is RAVON in samenwerking met de STOWA en de waterschappen een onderzoekstraject gestart (Herder *et al.*, 2014b). Het hoofddoel hiervan is, onderzoeken of eDNA metabarcoding (zie gebruikte methode paragraaf 2.3.) een alternatief kan vormen voor de huidige KRW-visbemonsteringen. Hieronder worden de resultaten van het reeds uitgevoerde onderzoek beschreven en wordt ingegaan op de vragen van het onderzoek van 2016. De resultaten worden in onderhavige rapportage beschreven.

1.2.1 Reeds uitgevoerd onderzoek

In 2013 heeft RAVON i.s.m. STOWA en vier waterschappen een eerste pilot in Nederland uitgevoerd naar de toepassing van eDNA metabarcoding voor vissen (Herder *et al.*, 2014b). De resultaten waren bemoedigend. In stilstaande wateren werden evenveel of meer vissoorten gedetecteerd.

**eDNA BARCODING**

De eerste eDNA toepassing betrof de detectie van Amerikaanse brulkickers in Frankrijk (Ficetola *et al.*, 2008). Sindsdien heeft de methode een vlucht genomen en volgden er vele onderzoeken aan een scala van soorten. Het eerste onderzoek in Nederland richtte zich op soortspecifieke eDNA detectie van de grote modderkruiper (Herder *et al.*, 2012). In deze pilotstudie werd in het veld voor de eDNA methode een trefkans van 87,5% gevonden, dit bleek veel hoger dan met huidige methoden zoals electrovisserij. In vervolgonderzoeken (Herder *et al.*, 2013b; De Bruin *et al.*, 2014) werden deze resultaten bevestigd. Andere vissoorten waarvoor in het buitenland vergelijkbare resultaten zijn behaald zijn onder andere zilverkarper en grootkopkarper (Jerde *et al.*, 2011), karper (Takahara *et al.*, 2012), zonnebaars (Takahara *et al.*, 2013) en zeeperk en zeeforel (Gustavson *et al.*, 2015). In al deze onderzoeken is gewerkt met soortspecifieke primers die enkel het DNA van de doelsoort vermeerderen, ook wel eDNA barcoding genoemd. Met eDNA barcoding is het slechts mogelijk één tot enkele soorten gelijktijdig in een watermonster te detecteren.

**eDNA METABARCODING**

Het identificeren van meerdere soorten tegelijk uit een environmental DNA monster wordt eDNA metabarcoding genoemd (Taberlet *et al.*, 2012). Bij deze methoden worden er onder andere primers ontwikkeld die generiek toepasbaar zijn voor meerdere soorten, zoals een soortgroep of soorten binnen een familie. In dit onderzoek wordt er gebruik gemaakt van primers die in Frankrijk ontwikkeld zijn en zich richten op de hele soortgroep vissen (Valentini *et al.*, 2016).

In de analyse wordt het DNA van alle vissen uit een monster vermeerderd. Vervolgens worden de vermeerderde DNA-codes uitgelezen door middel van Next Generation Sequencing (NGS) waarna een databestand wordt verkregen met alle DNA-codes. Op de computer wordt vervolgens een match gemaakt tussen deze DNA-codes en een referentiedatabase (codes van alle soorten). Bij een grootschalig onderzoek in Frankrijk (o.a. Rhône), Nederland (Herder *et al.*, 2014b en Herder en Kranenbarg, 2016) en Denemarken werden hogere aantallen soorten aangetroffen met eDNA metabarcoding dan met gelijktijdige bevissingen met traditionele methoden. Deze resultaten zijn onlangs gepubliceerd in *Molecular Ecology* (Valentini *et al.*, 2016).

**eDNA BARCODING VERSUS eDNA METABARCODING**

eDNA metabarcoding heeft de voorkeur boven een meervoudige soortspecifieke eDNA barcoding (waarbij voor iedere soort een aparte PCR met een soortspecifieke primer wordt uitgevoerd). Doordat de hoeveelheid eDNA in een monster beperkt is, moeten er bij een meervoudige soortspecifieke benadering voor iedere soort apart PCRs in replica worden uitgevoerd. De hoeveelheid eDNA in een monster is dan slechts toereikend voor het gelijktijdig analyseren van enkele soorten. Hoofdstuk 4 van het in 2014 verschenen review over de toepassingsmogelijkheden van eDNA (Herder *et al.*, 2014a) bevat een uitgebreide beschrijving en vergelijking van beide methoden.

teerd met eDNA dan in de gelijktijdige KRW-visbemonsteringen met traditionele vangtuigen. Ook werd er een verband gevonden tussen de gevangen aantallen per vissoort en de hoeveelheid eDNA: van soorten die het meest gevangen werden, werd veelal ook het meeste eDNA gevonden. In stromende wateren vielen de resultaten tegen. De oorzaak daarvan lag in de toegepaste monstermethode en conservering van de monsters (dit is inmiddels opgelost door een andere monsterstrategie en een nieuw type buffer die zorgt voor een maandenlange conservering van de monsters).

In 2015 is er een vervolg aan deze eerste pilot gegeven, samen met STOWA en elf waterschappen, waarin de methode op een veel groter aantal locaties (55) en verschillende KRW-watertypen (12) getest is (Herder & Kranenbarg, 2016). Hierbij is op KRW-trajectniveau een vergelijking gemaakt tussen de KRW-bevissing (met electrovissen, zegen en/of kuil) en eDNA-metabarcoding. De belangrijkste conclusies waren:

- Met eDNA werden gemiddeld 1,6 keer meer soorten aangetoond op een traject dan in de KRW-bevissing.
- De trefkans met eDNA lag voor alle soorten boven de 75%, veelal boven de 90%.
- De eDNA-monstername en analyse bleken goed reproduceerbaar qua uitkomsten in verhoudingen tussen soorten. Dit biedt perspectief tot kwantificering middels eDNA in de toekomst.

In het onderzoek in 2015 is ook gekeken naar de relatie tussen het aandeel eDNA sequenties per soort en het aandeel in biomassa per soort. Het bleek met de gehanteerde opzet (op trajectniveau) niet mogelijk om een goede vergelijking te maken. De factor toeval, bijvoorbeeld het net wel of niet vangen van een grote vis, speelt op trajectniveau waarschijnlijk een te grote rol waardoor een goede vergelijking tussen de eDNA uitkomsten en de werkelijkheid op het traject aanwezige visbiomassa niet mogelijk was.

1.2.2 Onderzoeksvragen 2016

Onderhavige rapportage gaat in op de resultaten van het onderzoek uit 2016. In 2016 is er in plaats van op trajectniveau (onderzoeken 2013 & 2015) op waterlichaamniveau een vergelijking gemaakt tussen de resultaten met eDNA en KRW-bevissingen. De gecombineerde KRW-bevissingen (alle trajecten en methoden samen) binnen een waterlichaamniveau vormen de beste informatie die voorhanden is over de soortensamenstelling en geven in veel gevallen ook visbestandschattingen (afhankelijk van watertype). Deze visbestandschattingen komen in de regel tot stand middels een groot aantal beviste KRW-trajecten waardoor uitschieters uitmiddelen (4 tot 31 trajecten per waterlichaam in deze studie). Op deze manier wordt verder inzicht verkregen in de toepasbaarheid van eDNA in kwalitatief en mogelijk semi-kwantitatief visstandonderzoek.

In dit onderzoek stonden de volgende onderwerpen centraal:

- 1 Visbestandschatting op waterlichaamniveau
 - Kwalitatief / aantal soorten: in welke mate komt het aantal middels eDNA aangetroffen soorten op waterlichaamniveau overeen met het aantal soorten dat binnen de KRW-bevissingen is aangetroffen? Deze vraag is in eerdere jaren onderzocht op KRW-trajectniveau.
 - Semi-kwantitatief: in welke mate komen de verhoudingen in gevonden eDNA sequenties tussen vissoorten op waterlichaamniveau overeen met de verhoudingen in biomassa en aantallen die binnen de KRW-bevissingen zijn aangetroffen?

2 Monsterstrategie voor verschillende KRW-watertypen op waterlichaamniveau

- Hoeveel eDNA monsters zijn er nodig voor een representatief beeld van de soortensamenstelling in een waterlichaam?
- Is de ruimtelijke positionering van eDNA monsters binnen grotere waterlichamen zoals meren en plassen van invloed op het aantreffen van vissoorten en de gevonden verhoudingen in eDNA sequenties tussen deze vissoorten? Waar kunnen de monsters het best verzameld worden? (m.a.w. geven eDNA-monsters uit de oeverzone andere resultaten dan die in het open water?)
- Wat is het effect op de uitkomsten qua soortensamenstelling en verhoudingen tussen soorten als meerdere locaties samen in een enkel eDNA-monster gemengd worden?

Ad 1) Uit eerdere onderzoeken is naar voren gekomen dat de eDNA methode zich zeer goed leent voor het bepalen van het aantal vissoorten dat in een waterlichaam voorkomt. De verhoudingen waarin de verschillende soorten voorkomen zijn echter ook een belangrijk element binnen de beoordelingsystematiek van de KRW-vismaatlaten. Daarom worden de mogelijkheden om met eDNA metabarcoding de verhoudingen tussen vissoorten te bepalen nadrukkelijk onderzocht.

Ad 2) Voor een goed beeld van de aanwezige visgemeenschap is het belangrijk om te weten hoeveel watermonsters hiervoor met de eDNA metabarcoding techniek verzameld en geanalyseerd dienen te worden. Dit is ook vanuit kosten oogpunt van belang: hoe minder monsters er geanalyseerd hoeven te worden, hoe geringer de kosten.

Om de onderzoeksvragen te beantwoorden zijn er in negen waterlichamen in totaal 90 eDNA monsters genomen. Zeven waterlichamen behoren tot het M-type (stilstaand water) variërend van meren, laagveenplassen tot kanalen en sloten. Twee waterlichamen behoren tot het R-type (stromend water). De eDNA resultaten zijn vergeleken met de uitkomsten van de standaard KRW-visbemonsteringen die, kort nadat de eDNA monsters genomen waren, werden uitgevoerd op de onderzochte locaties of in een enkel geval met gegevens van een eerder uitgevoerde KRW-bevissing.

1.3 LEESWIJZER

Hoofdstuk 1 beschrijft de eDNA-metabarcoding methode, het onderzoekstraject van RAVON, STOWA en de waterschappen dat sinds 2013 loopt en de onderzoeksvragen die binnen het onderzoek van 2016 zijn onderzocht (huidige rapportage). *Hoofdstuk 2* beschrijft de onderzoeksmethoden. Allereerst worden de onderzoekslocaties beschreven in *paragraaf 2.1*, vervolgens de gehanteerde onderzoeksmethoden voor de KRW-bevissingen en eDNA bemonsteringen in *paragraaf 2.2*. *Paragraaf 2.3* beschrijft de eDNA-analyses: gehanteerde primers, extracties, PCR, sequencing, lab-condities en bio-informatica. *Hoofdstuk 3* beschrijft de resultaten. *Paragraaf 3.1* gaat in op het in beeld brengen van soortensamenstelling en verhoudingen tussen soorten. *Paragraaf 3.2* gaat in op het benodigd aantal eDNA monsters voor een compleet beeld van de aanwezige soorten. *Paragraaf 3.3* beschrijft de ruimtelijke verdeling van monsterpunten in grote meren (oeverzone versus open water). *Paragraaf 3.4* beschrijft het effect van het mengen van eDNA monsters op de soortensamenstelling en verhoudingen tussen soorten. *Hoofdstuk 4* betreft de discussie aanbevelingen en conclusies. *Paragraaf 4.1* gaat in op het middels eDNA-metabarcoding in beeld brengen van visgemeenschapsvariabelen zoals soortensamenstelling en verhoudingen tussen soorten. *Paragraaf 4.2* bediscussieert het benodigd aantal eDNA monsters. *Paragraaf 4.3* bediscussieert de ruimtelijke monsterstrategie in grote wateren en

paragraaf 4.4 gaat in op het mengen van eDNA monsters. *Paragraaf 4.5* geeft een kort en bondig overzicht van de belangrijkste conclusies uit het onderzoek van 2016. *Hoofdstuk 5* beschrijft ten slotte het hele onderzoekstraject waarbinnen deze studie valt, beschrijft de potentiële kostenreductie bij het inzetten van eDNA voor KRW-monitoring en geeft een leidraad voor mogelijk te nemen vervolgstappen. Tot slot wordt de gebruikte literatuur weergegeven in *hoofdstuk 6* en bevatten *bijlage 1 en 2* achtergrondgegevens uit deze studie.



H2 ONDERZOEKSOPZET

2.1 ONDERZOEKSLOCATIE

De onderzoekslocaties zijn in samenspraak met de bij het onderzoek betrokken waterschappen geselecteerd. Hierbij is er naar gestreefd om verschillende KRW-watertypen mee te nemen waar in 2016 een KRW-visbemonstering uitgevoerd zou worden. Door op deze locaties een eDNA bemonstering uit te voeren hoefde er voor de vergelijking geen extra visbemonsteringen uitgevoerd te worden.

Op één locatie is in 2016 geen KRW uitgevoerd (Tielerwaarden), hier vergelijken we de uitkomsten van de eDNA monsternamen met de uitkomsten van de KRW-visbemonstering uit 2014. In het Broekvelden-Vettenbroek stond oorspronkelijk een complete KRW-bemonstering gepland voor 2016. Door omstandigheden is enkel met de zegen gevist (geen elektrovisserij en stortkuil), daardoor is er geen volledig beeld van de visstand verkregen voor de vergelijking.

Tabel 2.1 geeft een overzicht van het aantal onderzochte locaties per KRW-watertype. In [figuur 2.1](#) zijn de monsterlocaties op kaart weergegeven. Er zijn zeven waterlichamen met stilstaand water bemonsterd (M-typen) en twee met stromend water (R-typen). Onder de waterlichamen met stilstaand water bevonden zich matig diepe meren (M20), een grote ondiepe laagveenplas (M27), laagveen vaarten en kanalen (M10), een regionaal kanaal (M3) en sloten (M1a). De stromende wateren varieerden van een klein bovenloopje (R5) tot een bredere langzaam stromende rivier (R6 en R7).

TABEL 2.1 OVERZICHT BEMONSTERDE WATERLICHAMEN, KRW-WATERTYPE

Het aantal eDNA monstertrajecten met tussen haakjes het aantal mengmonsters (3 trajecten samen) en het aantal KRW trajecten waarbij E staat voor Elektrovisserij, Z staat voor Zegen en SK voor stortkuil.

WATERLICHAAM	KRW-WATERTYPE	BESCHRIJVING	AANTAL MONSTERS	AANTAL KRW TRAJECTEN
Regge	R7+R6	Langzaam stromende rivier / riviertje op zand/klei	9 (3)	8E
Bijleveld	M3	Gebufferde (regionale) kanalen	6 (2)	3E + 2Z
Boven Slinge	R5	Langzaam stromende midden-/benedenloop op zand	6 (2)	6E
Eilandspolder	M10	Laagveen vaarten en kanalen	9 (3)	21E + 10Z
Kralingse Plas	M27	Matig grote ondiepe laagveenplassen	9 (4)	4E + 4SK + 2Z
Noorder IJplas	M20	Matig grote diepe gebufferde meren	6 (3)	3E + 4Z
Polderhoofdkanaal	M10	Laagveen vaarten en kanalen	6 (2)	3E + 3Z
Tielerwaarden	M1a	Zoete sloten (gebufferd)	6 (2)	6E
Vettenbroek	M20	Matig grote diepe gebufferde meren	9 (3)	4E



FIG 2.1 LIGGING VAN DE ONDERZOEKSLOCATIES

2.2 MONSTERNAME

2.2.1 KRW-visbemonsteringen

De KRW-visbemonsteringen zijn uitgevoerd door de adviesbureaus ATKB (bij zes waterschappen), Bureau Waardenburg (bij Waterschap Rivierenland), Altenburg en Wymenga (bij Waterschap Fryslân) en door het waterschap zelf (Waterschap Rijn en IJssel). De toegepaste methodieken betroffen doorgaans electrisch vissen (met Deka, Brettschneider of aggregaat) of zegen en in de helft van de gevallen een combinatie van beiden. Op de Kralingse Plas is daarnaast ook gevist met een stortkuil. De KRW-visbemonsteringen zijn uitgevoerd volgens het Handboek Hydrobiologie (STOWA, 2014). Door omstandigheden kon in 2016 in het Vettenbroek niet electrisch en met stortkuil gevist worden, de visbestandschatting kon hier daardoor niet conform het Handboek Hydrobiologie uitgevoerd worden. In *tabel 2.1* is per waterlichaam weergegeven hoeveel trajecten er bevist zijn en welke methoden zijn ingezet.

Visbestandschattingen

Voor de M-typen (stilstaande wateren) is gebruik gemaakt van de visbestandschattingen die op basis van de KRW-visbemonsteringen zijn gemaakt door de uitvoerende adviesbureaus. Deze visbestandschattingen geven per soort een schatting van het aantal kilo per hectare.

Voor de R-typen vormt een visbestandschatting in termen van biomassa geen onderdeel van de huidige KRW maatlatten. Voor deze waterlichamen (Regge en Boven Slinge) is de gevangen biomassa per soort berekend op basis van lengte-gewicht. Hierbij is niet gecorrigeerd voor vangstinspanning en bevist oppervlak. Er is voor de vergelijking met de eDNA-uitkomsten enkel gekeken naar de verhoudingen tussen soorten en niet naar absolute biomassa.

2.2.2 eDNA-metabarcoding bemonsteringen

De monsters zijn voorafgaand aan de KRW-visbemonstering verzameld (behalve in de Tielerswaarden waar de KRW-visbemonstering al in 2014 is uitgevoerd en het Polderhoofdkanaal waar de KRW-bemonstering in hetzelfde jaar maar voorafgaand aan de eDNA bemonstering plaats vond). Op deze manier wordt uitgesloten dat de KRW-visbemonstering de eDNA resultaten kunnen beïnvloeden (bijvoorbeeld door het extra vrijkomen van DNA omdat vissen gevangen worden).

In kleine wateren en stromende wateren zijn dezelfde trajecten (250 meter) bemonsterd als in de KRW-bevissing. Dit geldt voor Bijleveld, Polderhoofdkanaal, Tielerswaarden, Regge en Boven Slinge.

In de grotere waterlichamen zijn er trajecten van 750 meter bemonsterd met eDNA waarbij er gekeken is naar een representatieve dekking over het hele waterlichaam. Hierbij zijn de locaties van de KRW-trajecten zoveel mogelijk meegenomen als uitgangspunt. In enkele waterlichamen zijn niet alle KRW-trajecten opgenomen binnen de eDNA bemonsteringen en/of is er ruimer bemonsterd dan enkel op de KRW-trajecten. Uitgangspunt was een optimale dekking met de eDNA-bemonstering.

Mengmonsters

Naast de losse monsters zijn ook mengmonsters verzameld om te onderzoeken wat voor effect het mengen heeft op de uitkomsten met betrekking tot de soortensamenstelling en de verhoudingen tussen soorten. Per drie eDNA trajecten is ook een apart eDNA-mengmonster verzameld van deze drie trajecten samen. In de kleine wateren en stromende wateren beslaan mengmonsters 750 meter (3 keer 250 meter), in de grote waterlichamen beslaan ze 2250 meter (3 keer 750 meter). Daarnaast is in twee waterlichamen een compleet mengmonster van het

hele waterlichaam verzameld. Dit ging om de Kralingse Plas (mengmonster van 4500 meter) en Noorder IJplas (mengmonster van 2700 meter).

Monstermethode

Alle monsters zijn verzameld met VigiDNA filters, speciaal ontwikkeld voor eDNA (poriegrootte 0,45µm), waarmee water reeds in het veld gefiltreerd wordt. Er zijn twee verschillende eDNA monstermethoden toegepast:

- Zak met filter: bij deze methode zijn schepjes water verspreid over het traject verzameld in een plastic zak (2 liter). Vervolgens is het in de zak verzamelde water door het eDNA filter gepompt.
- Pomp met filter: bij deze methode is middels een peristaltische pomp met een slang water verspreid over het hele traject door het eDNA-filter gepompt. Hiermee kan een groter volume gefiltreerd worden (tot 40 a 45 liter), afhankelijk van de troebelheid van het water (bij troebel water loopt het filter sneller vol).

In de (kleinere) stilstaande wateren Bijleveld, Polderhoofdkanaal en Tielerwaarden is de methode met de zak en filter ingezet. Eerder onderzoek heeft uitgewezen dat met deze methode in wateren kleiner dan 1 hectare goede resultaten behaald worden (o.a. Ficetola *et al.*, 2008, Herder *et al.*, 2012, 2013d, 2016 en Thomsen *et al.*, 2012b). Deze methode is minder arbeidsintensief dan de methode met pomp en filter waardoor het kostenefficiënter is deze toe te passen in kleinere wateren.

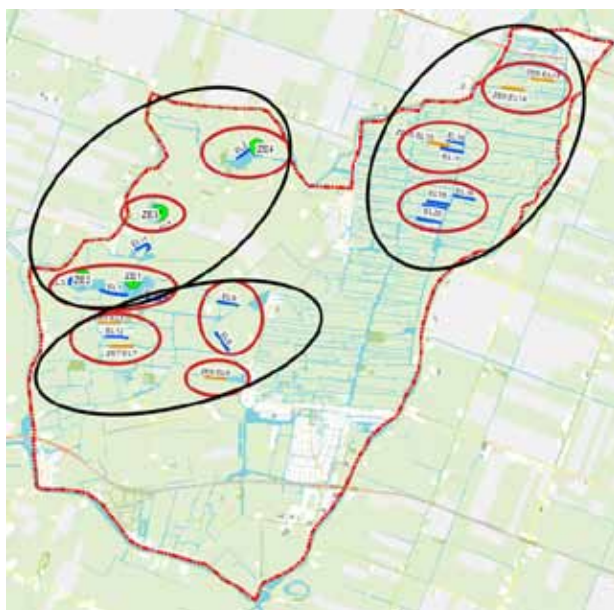


FIG 2.2 VOORBEELD MONSTERNAME LOSSE MONSTERS EN MENGMONSTERS EILANDSPOLDER.

De KRW-trajecten zijn weergegeven in blauw, groen en oranje. De rode cirkels (9x) zijn de gebieden waarbinnen de losse eDNA monsters zijn verzameld waarbij telkens meerdere KRW-trajecten met één eDNA monster gedekt worden. De zwarte cirkels (3x) zijn de eDNA mengmonsters, deze bestaan uit een mengmonster van de drie daarbinnen liggende losse eDNA-monsters/trajecten (rode cirkels).

In de stromende en in grotere wateren Regge, Boven Slinge, Vettenbroek, Kralingse Plas, Noorder IJplas en Eilandspolder, is bemonsterd met een peristaltische pomp en filter. De reden hiervoor is dat in stromende wateren en in grotere meren met windwerking eDNA sneller verdund wordt, mede door de veel grotere watervolumes, waardoor er naar verwachting minder eDNA op een locatie aanwezig is in vergelijking tot stilstaande wateren. Het filter met de peristaltische pomp heeft in dergelijke wateren de voorkeur vanwege het grotere monstervolume. Eerder onderzoek heeft uitgewezen dat deze methode in (grotere) stromende wateren succesvol is (Valentini *et al.*, 2016, Herder & Kranenbarg, 2016).

Monstername

In kleinere wateren zijn de monsters vanaf de oever verzameld, of wadend tegen de stroom in (om besmetting met eDNA vanaf het waadpak uit te sluiten). In grotere wateren zijn de monsters verzameld vanuit een varende boot waarbij voor de boot uit gemonsterd is om besmetting vanaf de boot uit te sluiten. Bij het verzamelen van de eDNA monsters zijn alle voorzorgsmaatregelen genomen om contaminatie van de monsters met eDNA van andere locaties te voorkomen (Herder *et al.*, 2014a). Zo is er op iedere locatie met nieuwe (disposable) DNA-vrije materialen gewerkt.

Conservering en verzending

Direct na de monstername zijn de filters voorzien van een conserveringsbuffer. Deze buffer stopt de verdere afbraak van eDNA. De filters zijn vervolgens op het RAVON kantoor in Nijmegen in de koelkast (bij ongeveer 7 °C) geplaatst tot aan verzending. Alle monsters zijn binnen een maand na monstername per 24 uren koerier naar het laboratorium in Frankrijk verstuurd.

2.3 ANALYSE eDNA MONSTERS

Gebruikte primers

In dit onderzoek zijn universele primers gebruikt die al het DNA van vissen vermeerderen. De primers richten zich op een kort mitochondriaal DNA-fragment (kleiner dan 95 basenparen) op het 12S gen. Het voordeel van mitochondriaal DNA is dat in elke cel meerdere kopieën aanwezig zijn waardoor het in veel hogere concentraties aanwezig is dan nucleair DNA. De primers worden uitgebreid beschreven in Valentini *et al.* (2016). Belangrijke eigenschappen van de primers zijn:

- De primers richten zich op een kort eDNA fragment (Taberlet, 2012; Turner *et al.*, 2014). Dit is belangrijk omdat eDNA in het water snel afbreekt en fragmenten typisch korter zijn dan 100 a 150 basenparen (Deagle *et al.*, 2006). Primers die zich op lange fragmenten richten hebben dus een lagere trefkans.
- De primers vermeerderen eDNA van alle vissoorten (en plassen die behoren tot een aparte groep: de kaakloze vissen) maar daarnaast van weinig andere soorten. Ze zijn dus erg specifiek voor vissen. Dit is belangrijk omdat als primers veel andere soorten zouden vermeerderen, deze andere soorten dan de resultaten voor de vissen kunnen gaan overschaduwen (maskeren).
- Het door de primers vermeerderde fragment is zeer variabel waardoor de meeste vissoorten op basis van dit fragment onderscheiden kunnen worden (bijna iedere vissoort heeft een unieke DNA-sequentie op dit fragment (zie Herder & Kranenbarg 2016 voor overzicht). Dit wordt ook wel een hoge 'resolutie' genoemd.

-
- De primers binden op een conservatief stukje DNA dat nagenoeg gelijk is gebleven tussen de verschillende vissoorten. Desalniettemin kan het zijn dat er bij bepaalde soorten enkele baseparen gemuteerd zijn. Dit geeft zogenaamde mismatches, de primer kan dan nog steeds binden maar iets minder goed wat kan leiden tot een verschil in vermeerdering tussen vissoorten. De gebruikte primers geven een laag percentage mismatches voor vissoorten in vergelijking tot andere voor vissen voorgestelde universele primers (bv die in de artikelen van Thomsen *et al.*, 2012a en Kelly *et al.*, 2014).

Extractie en PCR

Per monster is het DNA geëxtraheerd en zijn er vervolgens 12 afzonderlijke PCRs gedraaid met de universele primers voor vissen (zie hierboven). Dit hoge aantal PCRs per monster is noodzakelijk voor detectie van zeldzame soorten (Ficetola *et al.*, 2014). Hiermee is al het in de monsters aanwezige DNA van vissen vermeerderd. In de analyse zijn ook een aantal negatieve controles meegenomen (voor extractie en de PCR). Daarnaast wordt gecheckt of de PCR geslaagd is en of het aantal verkregen sequenties in de orde van grootte ligt van het verwachte aantal (DNA-opbrengst van de qPCR checken). Deze controles samen laten zien dat er geen besmetting is geweest tijdens de analyse en dat de analyse goed verlopen is. SPYGEN beschikt over een speciaal voor eDNA ingericht lab. Dit is noodzakelijk omdat bij het werken met dergelijk kleine hoeveelheden DNA de kans op besmetting van de monsters groot is.

Sequencing en Bio-informatica

De PCR producten zijn samengevoegd en uitgelezen met behulp van een Next Generation Sequencer. Dit is een apparaat dat van elk DNA fragment de sequentie bepaald. Het bij elkaar voegen van de PCR producten van verschillende monsters is mogelijk doordat aan de gebruikte primers per monster verschillende ‘tags’ zijn toegevoegd. Dit zijn korte stukjes DNA code. Op die manier kan achteraf gezien worden welk fragment bij welk monster hoorde. Een vermeerderd fragment bestaat namelijk uit de primers met de tag en daarna de sequentie van de doelsoort.

De ruwe databestanden zijn geanalyseerd op de computer met het open source software pakket OBITOOLS (<http://metabarcoding.org/obitools>; Boyer *et al.*, 2015). Allereerst zijn met het programma ILLUMINAPAIREDEND ‘forward en reverse reads’ van hetzelfde DNA-molecuul samengevoegd. Vervolgens zijn met het programma NGSFILTER de primers en tags geïdentificeerd en zijn de sequenties toegewezen aan het juiste monster. Met het programma OBISPLIT zijn de gegevens van één run vervolgens opgesplitst in bestanden per monster. In de volgende stap zijn met het programma OBIUNIQ gelijke sequenties geclusterd. Hierna zijn met de programma’s OBIGREP en OBICLEAN korte sequenties (kleiner dan 20 baseparen), sequencing errors (via een drempelwaarde) en sequenties die minder dan 100 keer voorkwamen in slechts een enkel monster verwijderd. Tot slot zijn per monster de gevonden DNA-codes met het programma ECOTAG gematched aan een door RAVON en SPYGEN aangelegde databank. In deze databank zitten DNA-sequenties van door RAVON en SPYGEN verzamelde (en ook gevalideerde) vissoorten (zie ook Herder *et al.*, 2012). Sequenties die niet in de eigen referentiedatabank gevonden konden worden zijn gematched in de online database Genbank. Alleen sequenties die een 98% match vormden zijn meegenomen (Ficetola *et al.*, 2010; Valentini *et al.*, 2016). De uiteindelijke output is een betrouwbaar databestand met daarin het aantal gevonden sequenties (DNA-fragmenten) per soort per monster. Gemiddeld zijn er per monster na het toepassen van de filters 400.000 sequenties overgebleven.



H3 RESULTATEN

3.1 IN BEELD BRENGEN VISGEMEENSCHAPS VariabeLEN

3.1.1 Aantal aangetroffen soorten

Op waterlichaamniveau is er een vergelijking gemaakt tussen de met eDNA gedetecteerde soorten en de in de KRW-bevissingen gevangen soorten. *Figuur 3.1* geeft per waterlichaam een overzicht van het totaal aantal gedetecteerde soorten (eDNA + KRW samen) en vervolgens het aantal gedetecteerde soorten in de eDNA bemonstering en de KRW-bevissing apart. In alle wateren, op de Eilandspolder na, zijn met eDNA meer soorten aangetoond dan in de KRW-bevissing.

In zeven van de negen waterlichamen zijn middels de eDNA-bemonstering alle soorten aangetoond die in de KRW-bevissing waren gevangen. In twee waterlichamen zijn er met eDNA soorten gemist die wel in de KRW-bevissing zijn gevangen (*tabel 3.1*). Het gaat om vijf soorten in de Eilandspolder (waar door het zeer troebele water slechts een kleiner volume water gefiltreerd kon worden) en één soort in de Kralingse plas. Van twee soorten is wel eDNA aangetroffen in het waterlichaam maar te weinig om als betrouwbare positieve waarneming mee te kunnen nemen (na toepassing bio-informatische filters, *zie onder paragraaf 2.3*). De soorten die gemist werden met eDNA kwamen in zeer lage dichtheden voor. De geschatte biomassa bedroeg 0,0001 kilo/ha (of minder). De geschatte aantallen per hectare lagen tussen de 0,0001 tot maximaal 6 kilo/ha.

FIG 3.1 AANTAL GEDETECTEERDE SOORTEN PER WATERLICHAAM PER STRATEGIE

In totaal (eDNA+KRW) en voor eDNA en de KRW-bevissing apart.

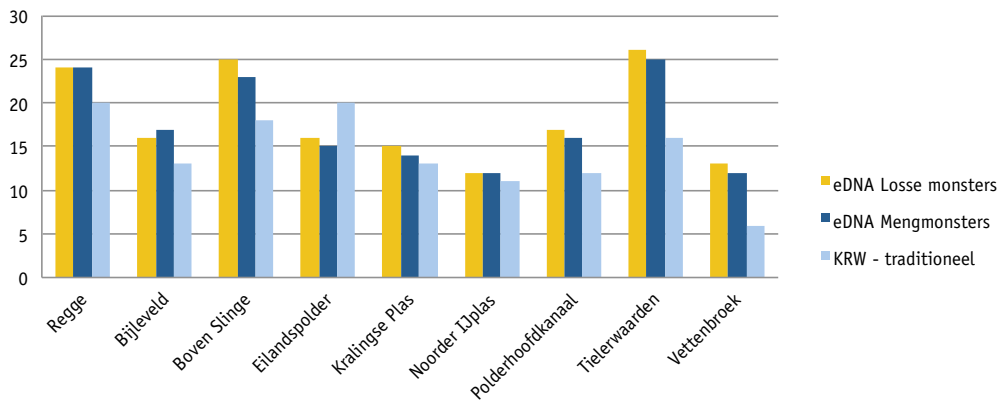


FIG 3.2 WATERLICHAAM EILANDSPOLDER

Een laagveen gebied met daarbinnen een netwerk van sloten en plassen met zeer troebel water.

TABEL 3.1 SOORTEN DIE IN DE KRW-VISBEMONSTERING GEVANGEN ZIJN MAAR ZIJN GEMIST MET eDNA

Gegeven zijn de soort, het betreffende waterlichaam, de geschatte biomassa en aantallen per hectare vanuit de KRW-visbemonstering en het totaal aantal bij de KRW-bevissing gevangen individuen in het waterlichaam.

SOORT	WATERLICHAAM	KILO/HA	AANTAL/HA	GEVANGEN INDIVIDUEN
Alver	Eilandspolder	0,0001	0,0001	1
Kleine modderkruiper	Eilandspolder	0,0001	3	3
Pos	Eilandspolder	0,0001	0,0001	1
Spiering	Eilandspolder	0,0001	6	18
Tiendornige stekelbaars*	Eilandspolder	0,0001	0,0001	1
Driedornige stekelbaars*	Kralingse Plas	0,0001	0,0001	1

* van deze soort is wel eDNA aangetroffen in het waterlichaam maar te weinig om als betrouwbare positieve waarneming mee te kunnen nemen (na toepassing bio-informatische filters).

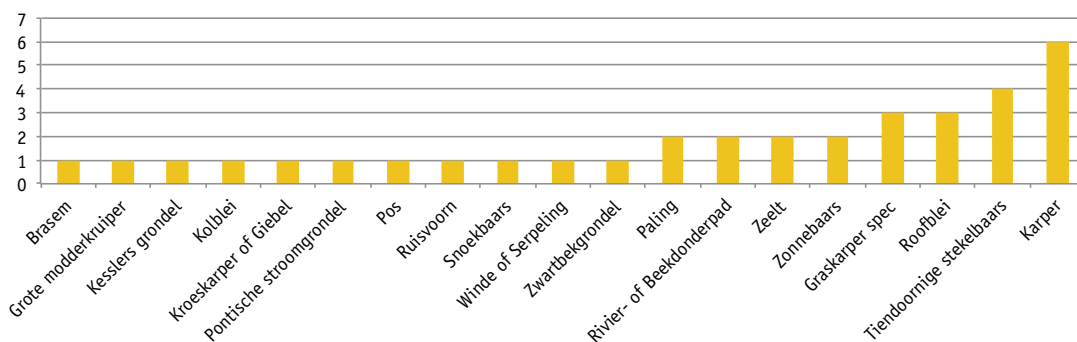
Soorten enkel met eDNA aangetoond in een waterlichaam

Met eDNA zijn in alle negen waterlichamen één of meerdere soorten aangetoond die niet in de KRW-bevissing zijn gevangen. In [figuur 3.3](#) staat weergegeven hoe vaak een soort wel met eDNA is aangetoond in een waterlichaam maar niet in de KRW-bevissing (het Vettenbroek is hierbij buiten-beschouwing gelaten). De meeste van de gemiste soorten zijn in één of enkele waterlichamen gemist met de KRW-bevissing. Enkele soorten zijn in een groot deel van de waterlichamen gemist zoals tiendornige stekelbaars (4 waterlichamen) en karper (6 waterlichamen).

[Bijlage 1](#) geeft een detailoverzicht van soorten die wel met eDNA zijn aangetoond in een waterlichaam maar niet in de KRW-bevissing zijn gevangen. In deze tabel is aangegeven hoe algemeen deze soorten waren in de eDNA monsters (aandeel in DNA-sequenties van de soort t.o.v. het totaal aan DNA-sequenties in het waterlichaam). Daaruit blijkt dat soorten die enkel met eDNA zijn aangetoond in een waterlichaam in zeer lage dichtheden voorkwamen: grofweg 1 procent of minder van het totaal aangetroffen aantal DNA-sequenties in het betreffende waterlichaam.

FIG 3.3 AANTAL KEER PER SOORT GEMIST IN KRW-VISBEMONSTERING

Per soort het aantal waterlichamen waarin de soort wel met eDNA maar niet in de KRW-bevissing is aangetoond. Het Vettenbroek is niet in de berekening meegenomen omdat hier geen volledige KRW-visbemonstering is uitgevoerd.



3.1.2 Verhoudingen tussen aangetroffen soorten

De correlatie tussen verhoudingen in aandelen in eDNA per soort en aandelen in biomassa, aantallen en in biomassa+aantallen is berekend middels lineaire regressie (tabel 3.2). Een dergelijke correlatie wordt uitgedrukt als R-kwadraat (R^2 , de verklaarde variantie). Dit is een waarde tussen de -1 en +1 waarbij een hoge R^2 aangeeft dat er een grote correlatie is en een lage R^2 (rond de nul) aangeeft dat er een lage correlatie is. Zo geeft een R^2 boven de 0,8 bijvoorbeeld aan dat er een zeer sterke correlatie 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, aantallen en biomassa+aantallen).

De correlatie tussen eDNA en de aantallen en dichtheden en een combinatie daarvan (berekend als aandeel in biomassa + aandeel in aantallen gedeeld door twee) uit de KRW-visbemonstering is voor acht waterlichamen bepaald. Het Vettenbroek is niet meegenomen in de vergelijking omdat daar geen volledige KRW-visbemonstering is uitgevoerd. De beste correlaties werden gevonden in de Kralingse Plas en het Polderhoofdkanaal (R^2 voor biomassa, aantallen en biomassa+aantallen allen boven de 0,6). De slechtste correlaties werden gevonden in Bijleveld en in de Regge. Voor de Tielerwaarden is de correlatie buiten beschouwing gelaten. Dit omdat de KRW-visbemonstering reeds in 2014 is uitgevoerd en de eDNA bemonstering pas in 2016. De correlatie was hier slecht (R^2 van 0,13 tot 0,19) door een zeer groot aandeel marmergrondel in het eDNA in 2016. Dit is een invasieve exoot die sterk in opkomst is. Het is aannemelijk dat de aantallen van deze soort in 2016 veel hoger lagen dan in 2014 (bijna niet gevangen) en dat een correlatie daardoor niet op gaat.

Wanneer gekeken wordt naar de gemiddelde correlatie tussen eDNA en biomassa, eDNA en aantallen en eDNA met een combinatie van biomassa en aantallen (= berekend als aandeel in biomassa + aandeel in aantallen gedeeld door 2) blijkt de correlatie het hoogst te zijn tussen aandeel in eDNA en de combinatie van biomassa en aantallen ($R^2 = 0,59$). Daarnaast blijkt net als uit het onderzoek uit 2015 (Herder en Kranenbarg, 2016) dat het aandeel in eDNA beter het aandeel in aantallen verklaart ($R^2 = 0,52$) dan het aandeel in biomassa ($R^2 = 0,44$) (zie tabel 3.2).

In de discussie wordt hier verder op ingegaan (zie paragraaf 4.1.2).

TABEL 3.2 CORRELATIE (R^2) PER WATERLICHAAM TUSSEN HET AANDEEL EDNA SEQUENTIES PER SOORT EN HET AANDEEL BIOMASSA, AANDEEL IN AANTALLEN EN AANDEEL IN AANTALLEN+BIOMASSA PER SOORT

Bij een R^2 van hoger dan 0,6 is er een hoge correlatie gevonden (groen), bij een R^2 van 0,3 tot 0,6 een matige correlatie (wit) en bij een R^2 van minder dan 0,3 een lage correlatie (rood). Onderaan is de gemiddelde correlatie (R^2) gegeven.

	R^2 BIOMASSA	R^2 AANTAL	R^2 AANTAL + BIOMASSA
Bijleveld	0,11	0,13	0,25
Eilandspolder	0,41	0,54	0,65
Kralingse Plas	0,68	0,92	0,87
Boven Slinge	0,59	0,82	0,84
Regge	0,04	0,31	0,20
Noorder IJplas	0,45	0,29	0,47
Polderhoofdkanaal	0,83	0,66	0,88
Gemiddeld	0,44	0,52	0,59

3.2 BENODIGD AANTAL MONSTERS VOOR HET BEPALEN VAN DE SOORTSAMENSTELLING

In de negen waterlichamen zijn per waterlichaam 6 tot 9 individuele monsters en 2 tot 3 mengmonsters verzameld. In acht van deze waterlichamen is een volledige KRW-bevissing uitgevoerd bestaande uit 5 tot 31 bemonsteringen met elektro, zegen en/of stortkuil (zie tabel 2.1). Zowel voor de eDNA bemonstering als de KRW-bevissing zijn zogenaamde accumulatiecurves voor soortdetectie berekend. De curves in de figuren 6 t/m 9 laten zien in hoeverre het nemen van extra monsters in een waterlichaam bijdraagt aan het detecteren van meer soorten.

Per waterlichaam zijn de accumulatiecurves gegeven voor respectievelijk de losse eDNA monsters (linker grafiek), de eDNA mengmonsters (grafiek midden) en de KRW-bemonsteringen (rechter grafiek). De stippellijn in de grafieken geeft de lijn van 95% van de (met alle methoden samen) gedetecteerde soorten in een waterlichaam aan.

Hieronder zijn de accumulatiecurves per watertype bij elkaar gezet: stromend water (figuur 3.4), plassen en meren (figuur 3.5), kleine lijnvormige stilstaande wateren (figuur 3.6) en een poldersysteem met sloten en plassen (figuur 3.7).

FIG 3.4 ACCUMULATIECURVES VOOR SOORTDETECTIE IN DE STROMENDE WATERLICHAMEN

Voor losse eDNA monsters (links), eDNA mengmonsters (midden) en de KRW-bevissing (rechts). De curves laten zien hoeveel nieuwe soorten een extra monster nog toevoegt. Wanneer de curve horizontaal loopt voegen meer monsters weinig meer toe aan het aantal soorten. Zo lang de curve oploopt voegen extra monsters nog wel extra soorten toe. Het blauw gearceerde gebied geeft de spreiding weer.

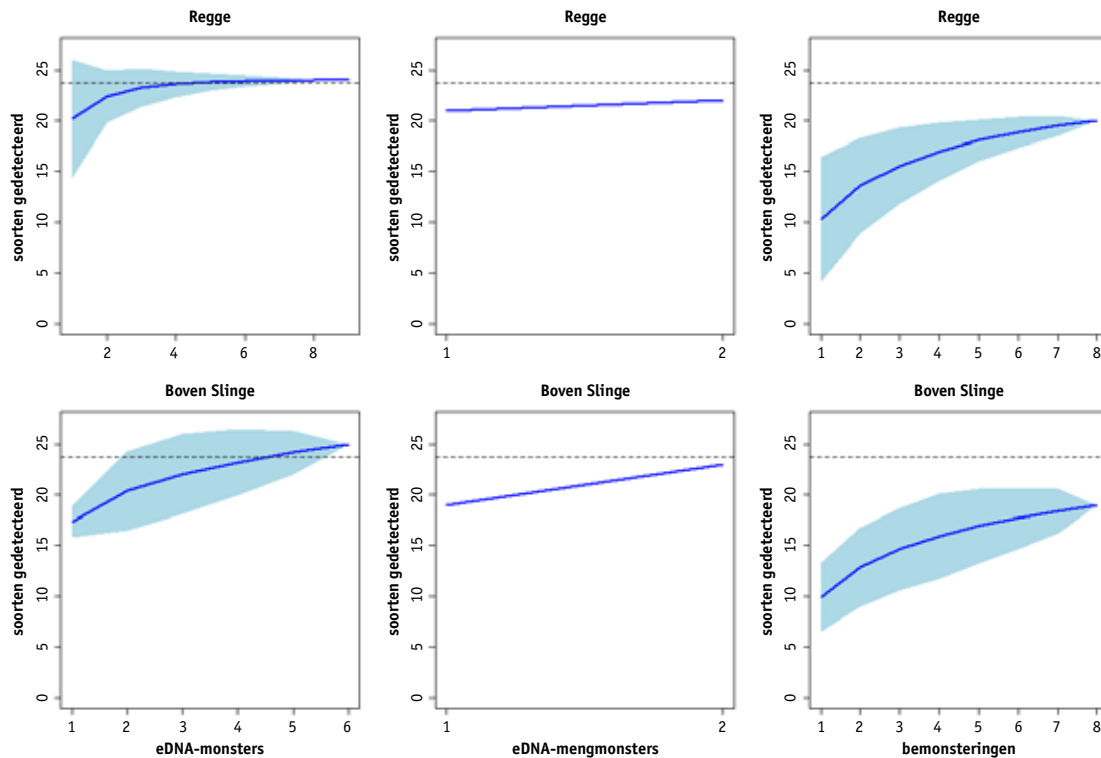


FIG 3.5 ACCUMULATIECURVES VOOR SOORTDETECTIE IN DE MEREN EN Plassen

Voor losse eDNA monsters (links), eDNA mengmonsters (midden) en de KRW-bevissing (rechts). De curves laat zien hoeveel nieuwe soorten een extra monster nog toevoegt. Wanneer de curve horizontaal loopt voegen meer monsters weinig meer toe aan het aantal soorten. Zo lang de curve oploopt voegen extra monsters nog wel extra soorten toe. Het blauw gearceerde gebied geeft de spreiding weer.

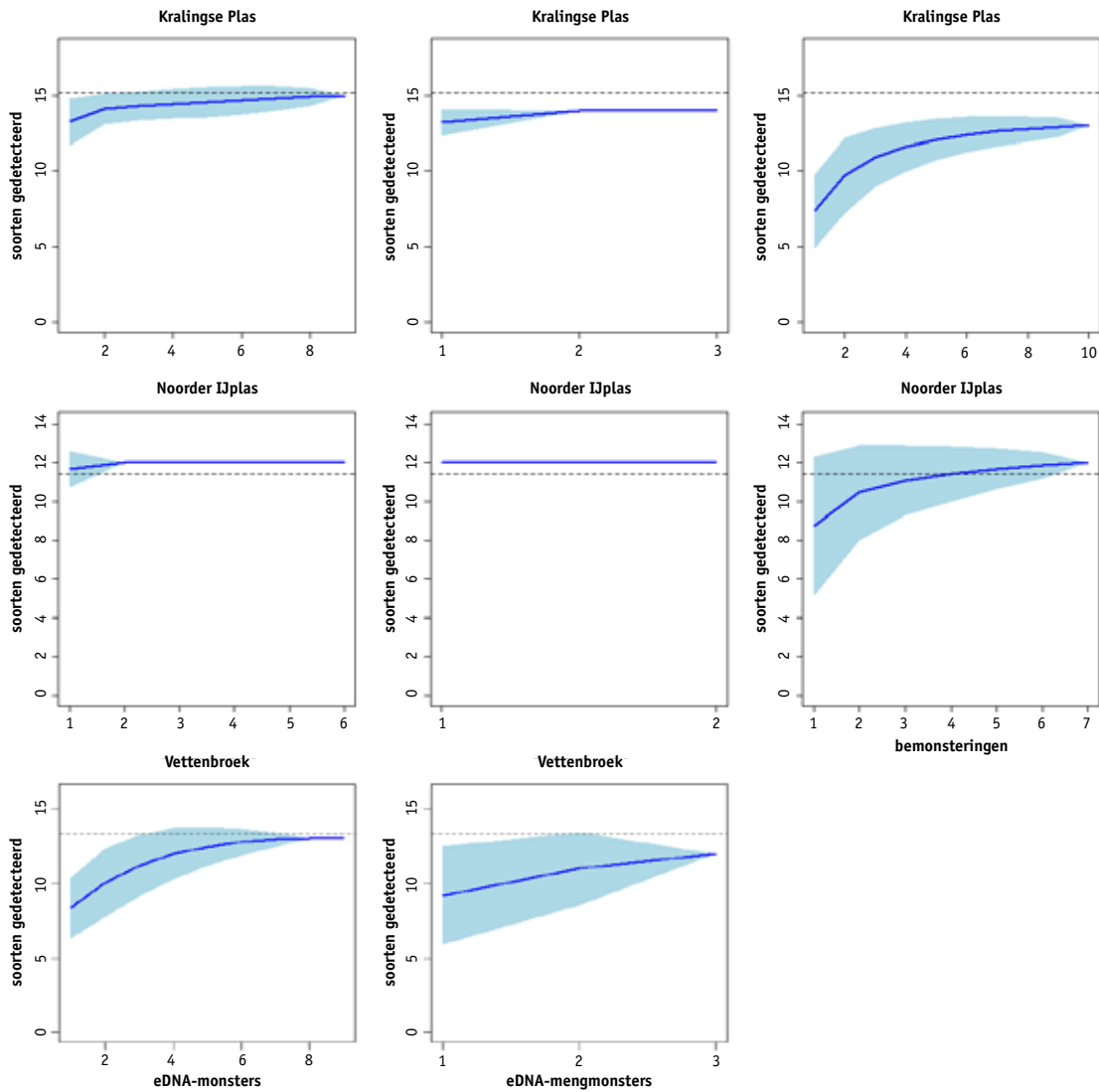


FIG 3.6 ACCUMULATIECURVES VOOR SOORTDETECTIE IN KLEINE STILSTAANDE LIJNVORMIGE WATEREN

Voor losse eDNA monsters (links), eDNA mengmonsters (midden) en de KRW-bevissing (rechts). De curves laat zien hoeveel nieuwe soorten een extra monster nog toevoegt. Wanneer de curve horizontaal loopt voegen meer monsters weinig meer toe aan het aantal soorten. Zo lang de curve oploopt voegen extra monsters nog wel extra soorten toe. Het blauw gearceerde gebied geeft de spreiding weer.

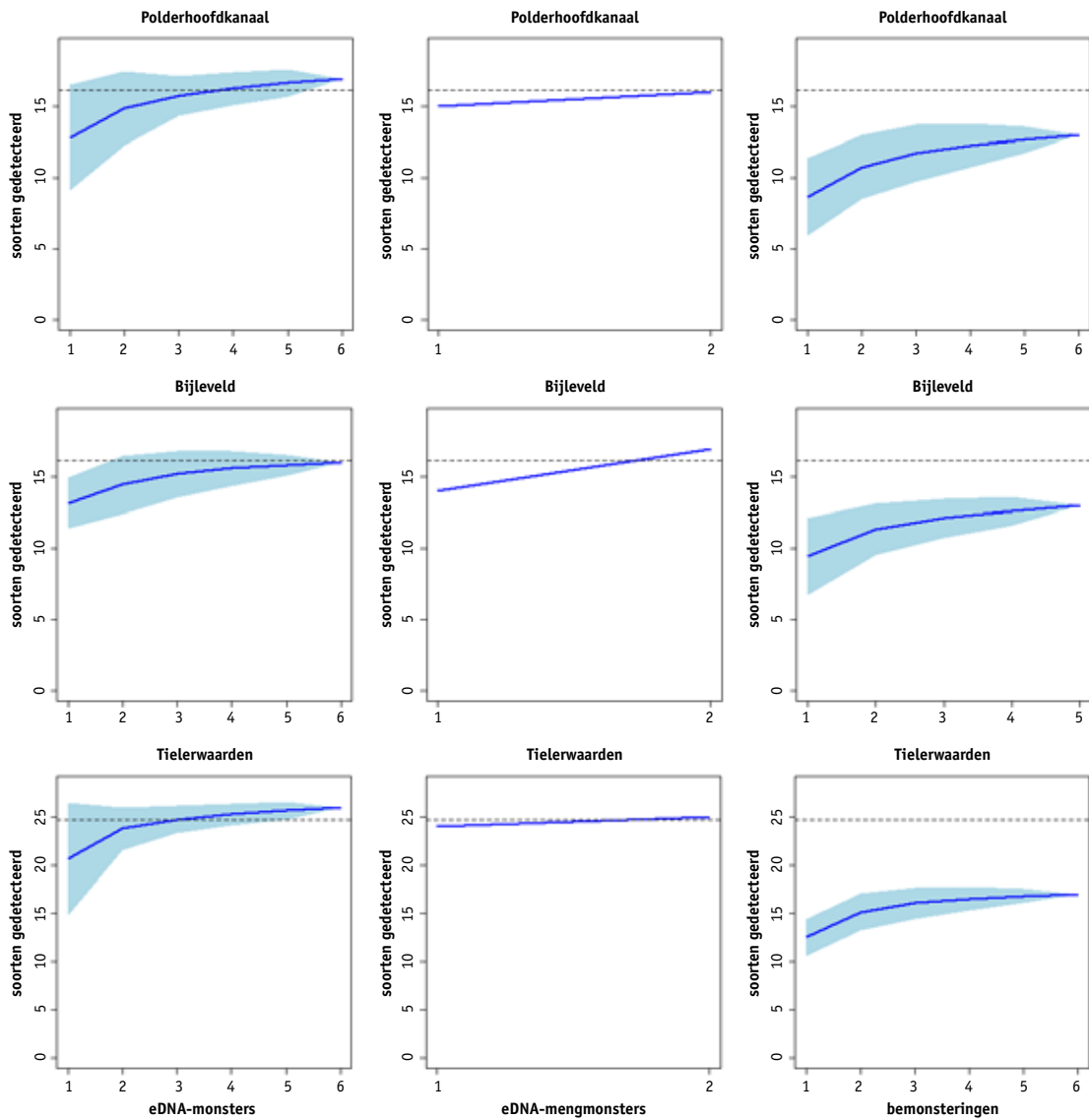
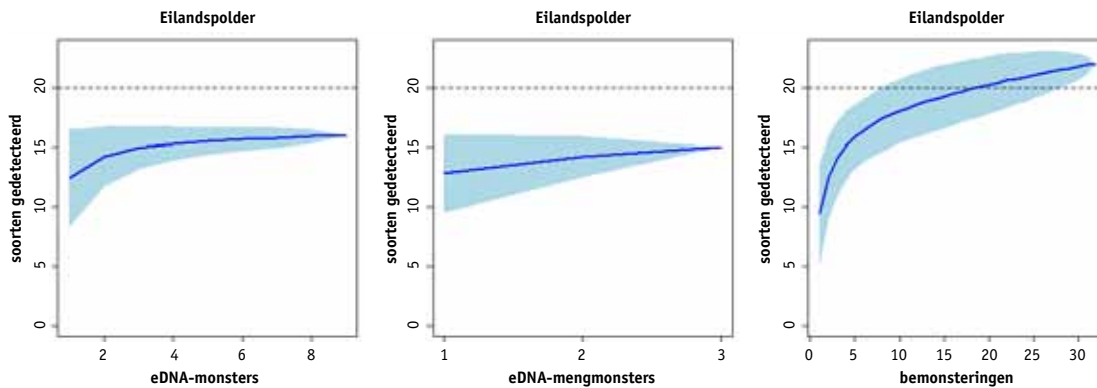


FIG 3.7 ACCUMULATIECURVES VOOR SOORTDETECTIE IN EEN POLDERSYSTEEM MET SLOTEN EN PLASSEN

Voor losse eDNA monsters (links), eDNA mengmonsters (midden) en de KRW-bevissing (rechts). De curves laat zien hoeveel nieuwe soorten een extra monster nog toevoegt. Wanneer de curve horizontaal loopt voegen meer monsters weinig meer toe aan het aantal soorten. Zo lang de curve oploopt voegen extra monsters nog wel extra soorten toe. Het blauw gearceerde gebied geeft de spreiding weer.

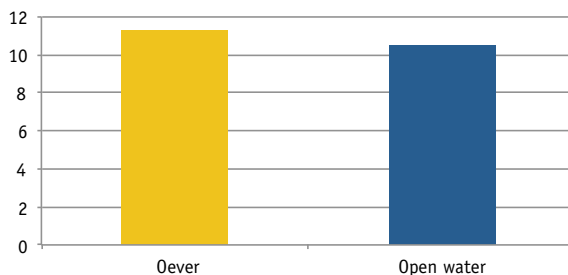


3.3 RUIMTELIJKE VERDELING VAN MONSTERS IN PLASSEN/MEREN

In het onderzoek zijn drie plassen opgenomen: Kralingse Plas, Vettenbroek en Noorder IJplas. In deze wateren is onderscheid te maken tussen monsters in de oevers (2/3e van de monsters) en monsters in open water (1/3e van de monsters). Gekeken is of er bij monsters in het open water andere soorten worden aangetoond dan bij monsters in de oever. Daarnaast is gekeken of er een verschil was tussen de oever en het open water in het gemiddelde aantal aangetroffen soorten (figuur 3.8) en in de verhoudingen in DNA tussen soorten (figuur 3.9). In het open water zijn geen soorten aangetroffen die niet ook in de oever waren gedetecteerd. In de oevers zijn zes soorten gedetecteerd die niet in het open water werden gedetecteerd (rood gearceerd in tabel 3.3). Deze soorten kwamen allen in (zeer) lage dichtheden voor: minder dan 0,5 procent van de totale hoeveelheid eDNA in de oevers. In de oevers werden net iets meer soorten aangetoond dan in het open water, respectievelijk 11,25 en 10,5 gemiddeld (geen significant verschil, $p=0,45$). De verhoudingen tussen soorten in het open water en in de oeverzone kwamen goed overeen voor de Kralingse Plas ($R^2 = 0,91$) en Noorder IJplas ($R^2 = 0,97$) en matig in het Vettenbroek ($R^2 = 0,49$).

FIG 3.8 AANTAL GEDECTEERDE SOORTEN IN OEVER VERSUS OPEN WATER

Gemiddeld aantal gedetecteerde soorten in de oeverzone t.o.v. het open water (gemiddelde van drie waterlichamen/plassen).



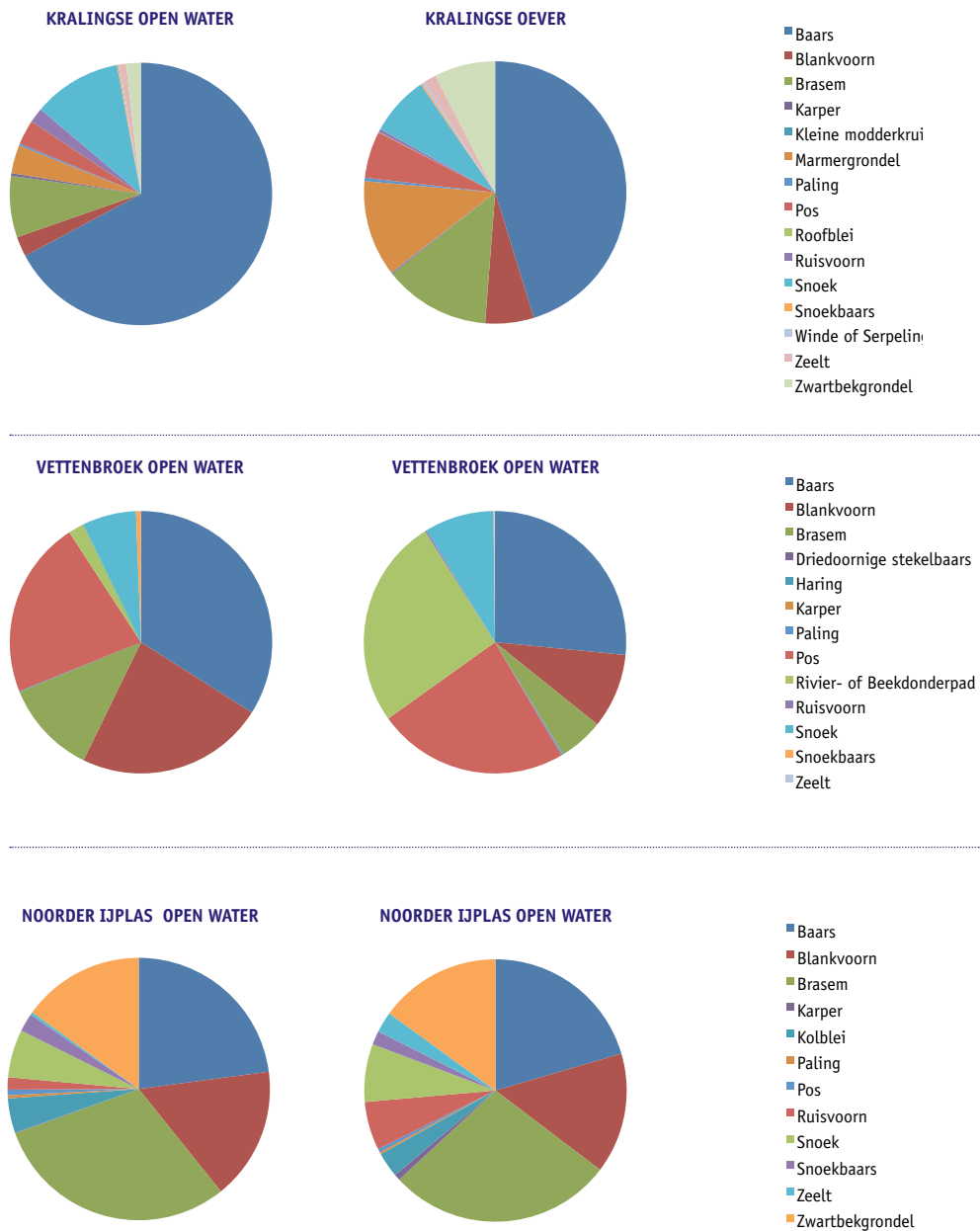
TABEL3.3 OVERZICHT VAN HET AANDEEL IN eDNA VAN SOORTEN IN DE OEVERZONE T.O.V. HET OPENWATER

Met rood gearceerd staan soorten die in een waterlichaam wel in de oeverzone maar niet in het openwater zijn gedetecteerd. Geel gearceerd staan soorten waarbij het aandeel in eDNA in de oever een groot verschil had met het aandeel in eDNA in het open water (een verschil in aandeel van 0,1 of meer).

OEVER	KRALINGSE PLAS		VETTENBROEK		NOORDER IJPLAS	
	OPEN WATER	OEVER	OPEN WATER		OEVER	OPEN WATER
Baars	0,45	0,67	0,27	0,34	0,20	0,23
Blankvoorn	0,06	0,02	0,09	0,23	0,15	0,16
Brasem	0,13	0,08	0,05	0,12	0,28	0,30
Driedoornige stekelbaars			< 0,01	< 0,01		
Karper	< 0,01	< 0,01	< 0,005	-	0,01	< 0,01
Kleine modderkruiper	< 0,005	-				
Kolblei					0,03	0,04
Marmergondel	0,12	0,03				
Paling	< 0,01	< 0,01	< 0,005	-	< 0,01	< 0,01
Pos	0,06	0,03	0,24	0,22	< 0,01	0,01
Rivierdonderpad			0,26	0,02		
Roofblei	< 0,005	-				
Ruisvoorn	< 0,01	0,02	< 0,005	-	0,06	0,02
Snoek	0,07	0,11	0,09	0,07	0,07	0,06
Snoekbaars	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,01	0,02	0,02
Winde of Serpeling	< 0,01	< 0,01				
Zeelt	0,02	0,01	< 0,005	-	0,03	< 0,01
Zwartbekgrondel	0,08	0,02			0,15	0,15

FIG 3.9 VERHOUDING DNA TUSSEN SOORTEN IN HET OPEN WATER EN DE IN DE OEVER

De overeenkomst is berekend via een lineaire regressie tussen het aandeel per soort. De overeenkomst was groot in de Kralingse plas ($R^2 = 0,91$) en Noorder IJplas ($R^2 = 0,97$) en matig in het Vettenbroek ($R^2 = 0,49$).



3.4 HET MENGEN VAN WATERMONSTERS VAN MEERDERE TRAJECTEN

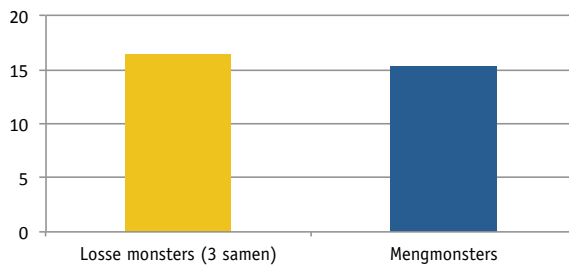
In de onderzoeksopzet zijn telkens op 3 trajecten losse eDNA monsters verzameld en daarnaast een mengmonster van deze 3 trajecten samen. Vergeleken is in hoeverre deze mengmonsters hetzelfde aantal soorten detecteren en de zelfde verhouding tussen soorten weergeven als de 3 losse monsters.

3.4.1 Effect van mengen op soortensamenstelling

Gemiddeld werden er in de 3 losse monsters samen één soort meer aangetoond dan in de mengmonsters, respectievelijk 16,32 om 15,36 soorten gemiddeld (figuur 3.10).

FIG 3.10 DRIE LOSSE MONSTERS VERSUS MENGMONSTERS

Gemiddeld aantal aangetoonde soorten in de 3 losse monsters en de mengmonsters van deze losse monsters. Het verschil was significant ($p < 0,002$, gepaarde t-toets).



Vervolgens is gekeken welke soorten 'gemist' werden in de mengmonsters en hoe algemeen deze soorten waren qua aandeel in eDNA-sequenties. Tabel 3.4 geeft een overzicht van de combinaties waarbij een soort wel is aangetoond in de 3 losse monsters maar niet in het mengmonster van de zelfde 3 trajecten. Vooral kleinere soorten worden relatief vaak gemist. Het gaat hierbij om soorten als driedoornige- en tiendoornige stekelbaars, bittervoorn en kleine modderkruiper. Wanneer gekeken wordt naar het aantal eDNA sequenties blijkt dat de gemiste soorten een zeer laag aandeel hadden in de losse monsters (< 1% van de DNA-sequenties).

TABEL 3.4 SOORTEN GEMIST IN MENGMONSTERS

Gegeven zijn combinaties waarbij een soort gemist is in een mengmonster wanneer deze wel is aangetoond in de losse monsters op dezelfde trajecten die in het mengmonster zijn gemengd. Gegeven zijn het waterlichaam, de soort die gemist is in de mengmonsters en het percentage eDNA sequenties van de 'gemiste soort' in de losse monsters. In waterlichamen die niet in de tabel staan zijn geen soorten gemist in de mengmonsters.

WATERLICHAAM	SOORT GEMIST IN MENGMONSTERS	% eDNA-SEQUENTIES IN LOSSE MONSTERS
Boven Slinge	Gras- Grootkop- of Zilverkarper	0,02%
Boven Slinge	Vetje	0,01%
Eilandspolder	Bittervoorn	0,26%
Eilandspolder	Bittervoorn	0,62%
Eilandspolder	Driedoornige stekelbaars	0,35%
Eilandspolder	Paling	0,14%
Eilandspolder	Winde of Serpeling	0,73%
Kralingse plas	Kleine modderkruiper	0,09%
Kralingse plas	Roofblei	0,09%
Kralingse plas	Winde of Serpeling	0,16%
Kralingse plas	Roofblei	0,03%
Noorder IJplas	Pos	0,51%
Polderhoofdkanaal	Grote modderkruiper	0,08%
Polderhoofdkanaal	Kleine modderkruiper	0,07%
Polderhoofdkanaal	Paling	0,01%
Regge	Gras- Grootkop- of Zilverkarper	0,02%
Regge	Tiendornige stekelbaars	0,01%
Regge	Tiendornige stekelbaars	0,01%
Tielerwaarden	Kroeskarper of Giebel	0,04%
Tielerwaarden	Tiendornige stekelbaars	0,03%
Tielerwaarden	Zwartbekgrondel	0,04%
Vettenbroek	Driedoornige stekelbaars	0,01%
Vettenbroek	Driedoornige stekelbaars	0,06%
Vettenbroek	Karper	0,01%
Vettenbroek	Karper	0,03%
Vettenbroek	Paling	0,31%
Vettenbroek	Ruisvoorn	0,08%
Vettenbroek	Snoekbaars	0,23%
Vettenbroek	Snoekbaars	0,24%

3.4.2 Vergelijking bemonsteringstrategieën voor bepalen soortsaamenstelling

Figuur 3.11 geeft een vergelijking van de verschillende bemonsteringstrategieën qua aantal gedetecteerde soorten per waterlichaam. De drie vergeleken strategieën zijn:

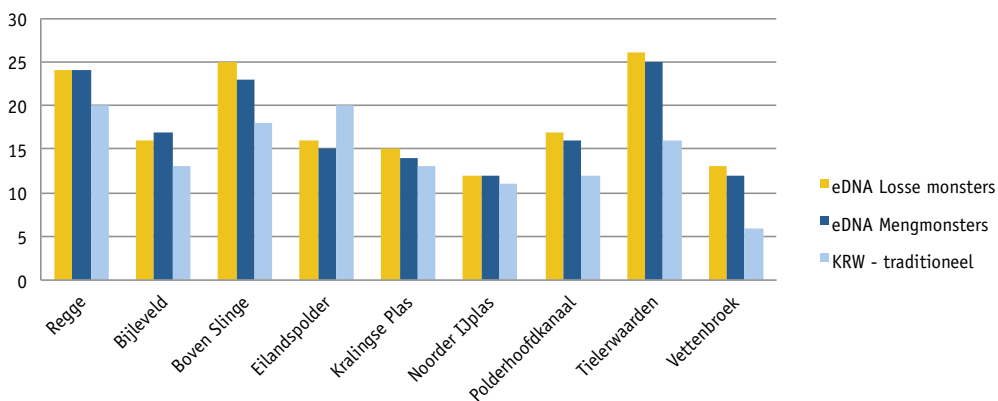
eDNA Losse monsters = 6 tot 9 losse eDNA monsters per waterlichaam (*zie tabel 2.1*)

eDNA Mengmonsters = 2 tot 3 mengmonsters per waterlichaam (*zie tabel 2.1*)

KRW = bevissing volgens handboek hydrobiologie: 4 tot ~31 trajecten/bevissingen per waterlichaam (*zie tabel 2.1*).

FIG 3.11 AANTAL SOORTEN PER WATERLICHAAM PER STRATEGIE

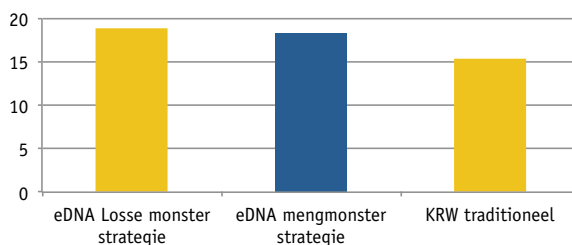
Aantal gedetecteerde soorten per monsterstrategie: bij eDNA losse monsters zijn 6 tot 9 trajecten met eDNA bemonsterd, bij eDNA mengmonsters zijn van diezelfde trajecten 2 of 3 mengmonsters verzameld (3 trajecten in 1 monster) en de KRW is uitgevoerd volgens het handboek hydrobiologie van de STOWA.



Ook is gekeken naar het gemiddelde aantal gedetecteerde soorten per strategie. Hiervoor is het Vettenbroek buiten beschouwing gelaten omdat daar geen volledige KRW-visbemonstering is uitgevoerd. Gemiddeld werden er dan in de overige 8 waterlichamen met de eDNA losse monsters 18,88 soorten aangetroffen, met de eDNA mengmonsters 18,25 soorten en in de KRW-visbemonsteringen 15,37 soorten (*zie figuur 3.12*).

FIG 3.12 GEMIDDELD AANTAL SOORTEN PER WATERLICHAAM PER STRATEGIE

Aantal gedetecteerde soorten per waterlichaam per monsterstrategie, de gevonden verschillen waren niet significant (paarsgewijs via t-test ($p=0,81$, $p=0,14$ en $p=0,21$)).



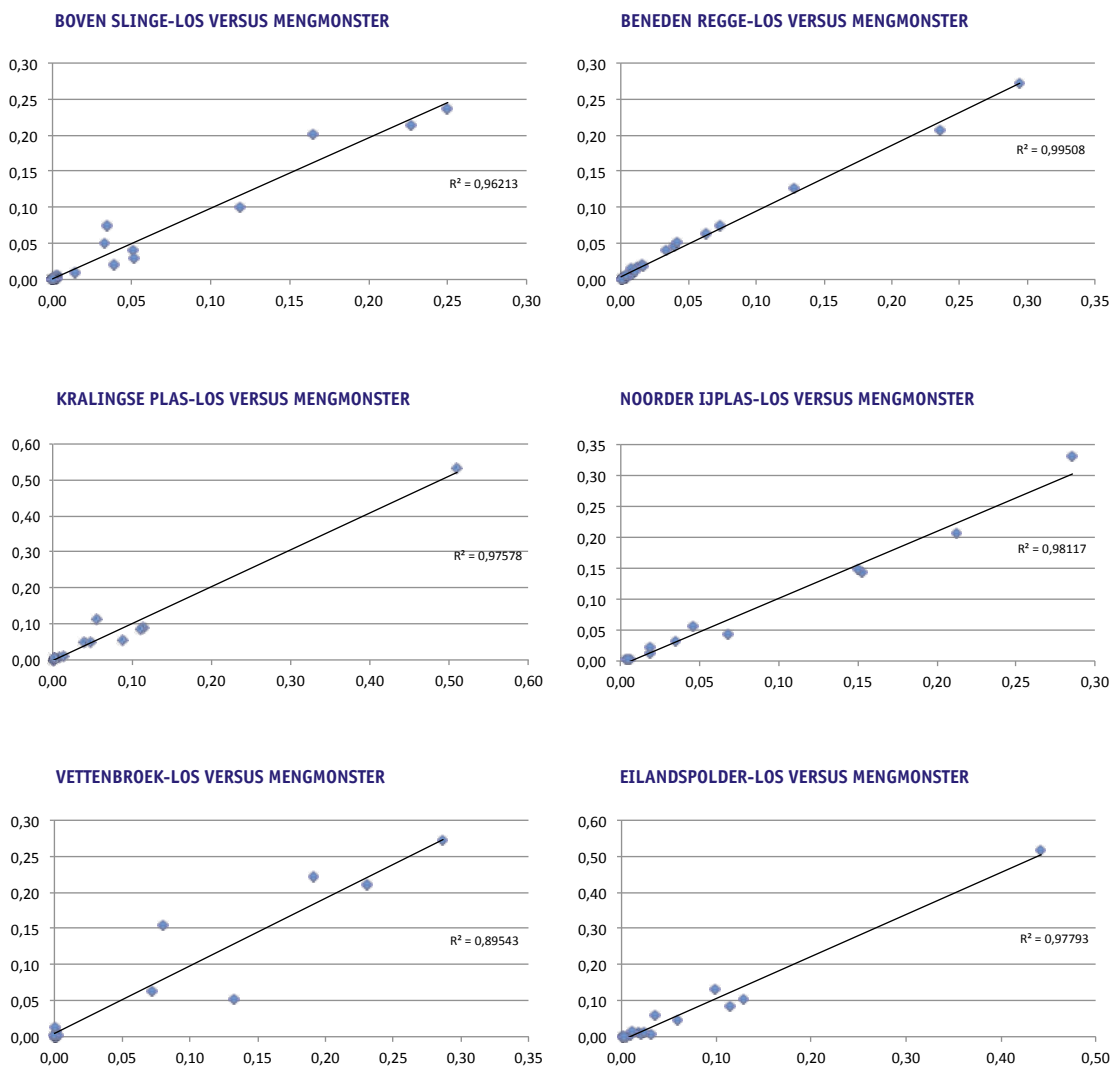
3.4.3 Effect mengen op verhoudingen tussen soorten

Mengmonsters per drie trajecten

Naast de soortdetectie is gekeken in hoeverre de mengmonsters (telkens 3 trajecten in 1 monster) per waterlichaam gezamenlijk dezelfde verhoudingen tussen DNA van soorten geven als de losse monsters (semi-kwantitatieve gegevens). Hiervoor zijn de percentages DNA-sequenties per soort uit de mengmonsters (2 of 3 per waterlichaam) uitgezet tegen de percentages in de losse monsters samen (6 tot 9 per waterlichaam). Zie figuur 3.13.

FIG 3.13 EFFECT MENGMONSTERS OP VERHOUDINGEN TUSSEN SOORTEN

Elke stip geeft een soort weer waarbij op de x-as het percentages van DNA-sequenties (t.o.v. totaal) in de losse monsters per waterlichaam is uitgezet tegen het percentage van DNA-sequenties (t.o.v. totaal) voor de soort in de mengmonsters per waterlichaam (y-as).



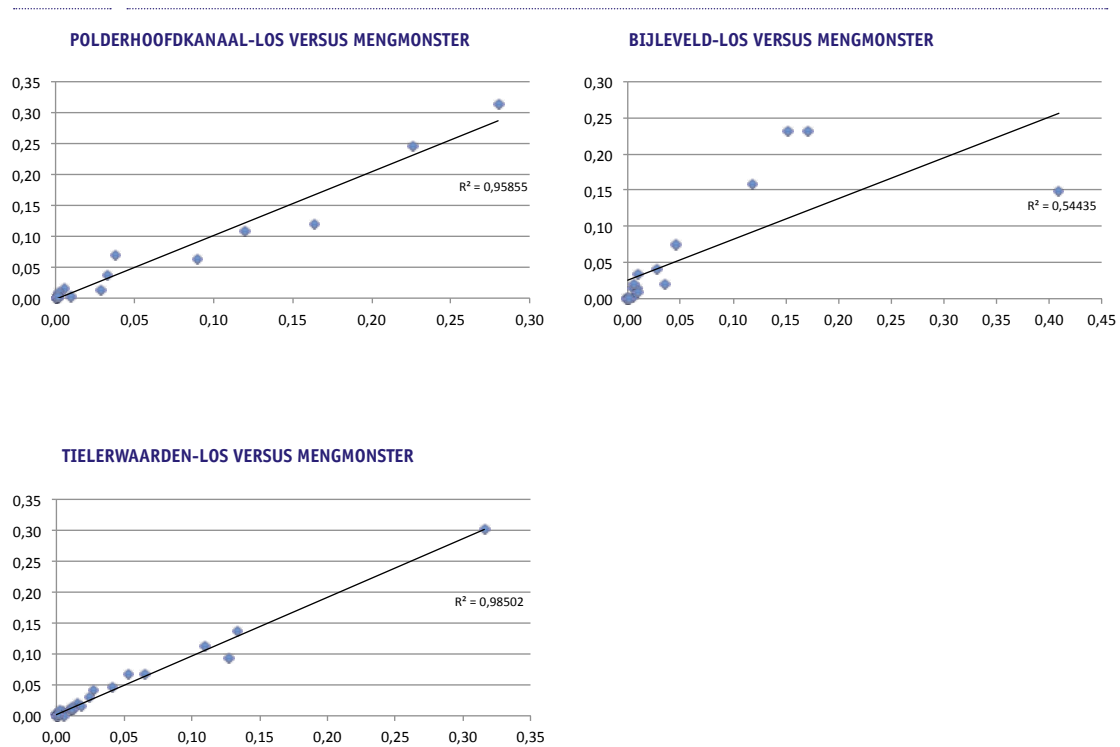


FIG 3.14 POLDERHOOFDKANAAL



Mengmonsters compleet waterlichaam

In twee waterlichamen is er naast de mengmonsters per drie trajecten ook nog één mengmonster verzameld van het hele waterlichaam om te kijken of dit voldoende zou zijn voor een compleet beeld. Dit is gedaan in de Kralingse Plas en Noorder IJplas. In beide waterlichamen werd met het totale mengmonster 1 soort gemist t.o.v. de 9 individuele eDNA monsters. In de Kralingse Plas ging het om de roofblei die een aandeel van 0,57% had in het eDNA uit de losse monsters. In de Noorder IJplas ging het om de pos die een aandeel van 0,51% had in het eDNA uit de losse monsters.

De verhoudingen tussen DNA van soorten in de mengmonsters van complete waterlichamen is ook vergeleken met die in de losse monsters samen (zie figuur 3.15). Hiervoor zijn de percentages DNA-sequenties per soort uit het mengmonsters (één enkel mengmonster per waterlichaam) uitgezet tegen de percentages in de losse monsters samen (9 per waterlichaam).

FIG 3.15 MENGMONSTERS COMPLEET WATERLICHAAM

Elke stip geeft een soort weer waarbij op de x-as het percentages van DNA-sequenties (t.o.v. totaal) in de losse monsters per waterlichaam is uitgezet tegen het percentage van DNA-sequenties (t.o.v. totaal) voor de soort in het mengmonsters per waterlichaam (y-as).

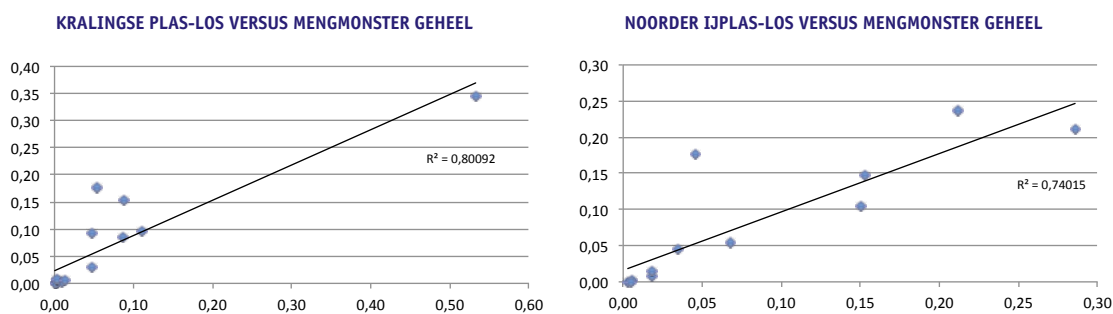


FIG 3.16 OVERZICHTSFOTO KRALINGSE PLAS





H4 DISCUSSIE, AANBEVELINGEN & CONCLUSIES

4.1 IN BEELD BRENGEN VISGEMEENSCHAPS VariabeLEN

4.1.1 Aantal gedetecteerde soorten in de visgemeenschap eDNA

In het onderzoek uit 2015 (Herder & Kranenbarg 2016) kwam naar voren dat gemiddeld per bemonsterd traject 1,6x keer meer soorten werden aangetoond met eDNA dan in de gelijktijdig uitgevoerde KRW-visbemonsteringen. In dit onderzoek is gekeken naar het aantonen van soorten op waterlichaamniveau middels eDNA-metabarcoding in relatie tot de complete KRW-visbemonstering volgens het STOWA handboek hydrobiologie.

In het Vettenbroek is geen volledige KRW-visbemonstering uitgevoerd (er is enkel met zegen gevist en niet elektrisch en met de stortkuil). Dit waterlichaam laten we daarom buiten beschouwing voor de vergelijking.

De resultaten laten zien dat er ook op waterlichaamniveau gemiddeld meer soorten worden gedetecteerd met eDNA (18,88 met losse monsters en 18,25 met mengmonsters) dan in de volledige KRW-visbemonstering (15,37). De verschillen waren niet significant (door de grote spreiding in aantallen soorten per waterlichaam). Dit gold voor alle waterlichamen op de Eilandspolder na. In dat waterlichaam werden er meer soorten gevangen in de KRW-visbemonstering (20) dan met eDNA werden gedetecteerd (16). Met eDNA werden hier alver, kleine modderkruiper, pos, spiering en tiendoornige stekelbaars gemist. Deze soorten kwamen in zeer lage dichtheden voor. Hierbij speelt dat het water in de Eilandspolder zo troebel was dat de gebruikte filters snel volliepen waardoor een minder groot volume bemonsterd kon worden in vergelijking tot de andere onderzochte waterlichamen. Daarnaast zijn in de Eilandspolder een zeer groot aantal KRW-bemonsteringen uitgevoerd met zegen of elektrovisen (31) wat de kans op het detecteren van zeldzame soorten vergroot.

Los van de Eilandspolder werd alleen in de Kralingse Plas een soort gemist met eDNA (driedoornige stekelbaars). Net als bij de tiendoornige stekelbaars (gemist in de Eilandspolder) is van deze soort wel een zeer lage eDNA concentratie aangetroffen in één van de eDNA monsters. Deze detecties zijn eruit gefilterd door de bio-informatische filters die bedoeld zijn om te voorkomen dat er valse positieven waarnemingen worden gedaan door PCR of sequencing fouten. We hebben ervoor gekozen deze soorten niet alsnog toe te voegen aan de soortenlijst van deze wateren op basis van het gegeven dat ze er wel voorkomen. Dit omdat het, het uitgangspunt is dat de bio-informatische filters een harde drempel zijn voor het al dan niet opnemen van soorten. Op deze manier wordt voorkomen dat soorten onterecht worden toegewezen aan een water.

Geconcludeerd mag worden dat met de gehanteerde eDNA-metabarcoding methode enkel soorten die ter plaatse in zeer lage dichtheden voorkomen gemist worden een de algemener voorkomende soorten altijd gedetecteerd worden.

KRW-bevissing

In alle onderzochte waterlichamen zijn één of meerdere soorten met eDNA aangetoond die niet zijn gevangen in de KRW-visbemonstering. In de meeste gevallen gaat het om soorten die

een laag aandeel in het eDNA hadden (<1%). Alleen karper, tiendoornige stekelbaars, graskarper spec. en roofblei werden relatief vaak gemist (figuur 3.3). Dit komt overeen met het onderzoek uit 2015 op trajectniveau waarin deze soorten ook vaak gemist werden (Herder & Kranenbarg, 2016). Een mogelijke verklaring voor het relatief vaak missen van karper en graskarper op waterlichaamniveau ligt in het feit dat dit veelal grote volwassen vissen betreft die regelmatig voorkomen in lagere dichtheden en die goed kunnen vluchten (zeker in helder water). Ook volwassen roofblei is alert en lastiger te vangen. De tiendoornige stekelbaars is een kleine soort die met elektrovisserij nauwelijks wordt aangetroffen.

4.1.2 Aandeel van vissoorten in de visgemeenschap

In paragraaf 3.1.2 zijn de resultaten besproken van een lineaire regressie analyse waarbij per waterlichaam de correlatie bepaald is van het aandeel in eDNA sequenties van een soort met het aandeel in de biomassa, aantallen en een combinatie van aantallen en biomassa binnen de KRW-visbemonstering.

De gemiddelde correlatie tussen eDNA en aantallen ($R^2 = 0,52$) blijkt hoger dan die tussen eDNA en biomassa ($R^2 = 0,44$) op waterlichaamniveau. Dit werd op trajectniveau ook gevonden tijdens het onderzoek van 2015 (Herder en Kranenbarg, 2016) (eDNA versus aantallen was toen $R^2 = 0,44$ en eDNA versus biomassa $R^2 = 0,26$).

Het aandeel eDNA sequenties is echter niet één op één te relateren aan aantallen of biomassa. Kleinere vissen hebben relatief meer lichaamsoppervlak en laten daardoor per kg biomassa meer eDNA achter dan grote vissen. Er is daarom ook gekeken naar de combinatie van het aandeel biomassa en het aandeel aantallen in vergelijking tot het aandeel eDNA. Dit is gedaan door het aandeel biomassa en het aandeel aantallen op te tellen en door twee te delen. De correlatie tussen het aandeel eDNA en de combinatie van het aandeel biomassa en aandeel aantallen bleek nog hoger ($R^2 = 0,59$).

Daarnaast is een belangrijke kanttekening bij deze vergelijking dat de bestandsschattingen vanuit de KRW-bevissingen ook onderhevig zijn aan de beperkte vangstefficiëntie van de toegepaste vistuigen en toevalsprocessen door een beperkte steekproef. De eDNA uitkomsten worden hier dus vergeleken met de beste gegevens die voorhanden zijn maar niet met de exacte werkelijkheid. Verschillen in verhoudingen tussen soorten in de eDNA-bemonsteringen en in de KRW-bevissingen kunnen daardoor veroorzaakt worden door afwijkingen in beide methoden.

Wanneer naar individuele waterlichamen wordt gekeken valt op dat in enkele waterlichamen de correlatie tussen eDNA, biomassa en aantallen hoog was en in andere wateren matig of laag (zie tabel 3.2). Zo waren de correlaties in de Kralingse Plas, het Polderhoofdkanaal en de Boven Slinge hoog. In een aantal waterlichamen was er een matige of lage correlatie. Veelal werd dit veroorzaakt door een enkele 'outlier' die de correlatie scheef trok. Alle outliers zijn op basis van ecologische kennis over de soort en de ingezette methoden bij de KRW-bevissing te verklaren (zie bijlage 2). Zo komt het in veel gevallen voor dat de biomassa van een soort in de KRW-bevissing erg hoog wordt geschat op basis van slechts enkele grote individuen in de vangst, bijvoorbeeld bij snoek en karper. Omgekeerd is in een aantal gevallen het aandeel in biomassa van kleine soorten zoals bittervoorn en vetje vaak laag ingeschat in de KRW-bevissing terwijl het aandeel in eDNA groter is.

4.1.3 Onverwachte soorten met eDNA-metabarcoding

PCR en sequentiefouten worden middels bio-informatische tools eruit gefilterd uit de ruwe data die verkregen is vanuit de sequencing. Hierdoor wordt een betrouwbaar databestand verkregen met positieve detecties per soort waarvan met zeer grote zekerheid gesteld kan worden dat er eDNA van de soort in de monsters aanwezig was.

Op deze dataset is vervolgens een grondige validatie uitgevoerd op basis van de volgende punten:

- Vangsten in de KRW-bevissing (in het zelfde waterlichaam).
- Verspreiding op basis van de Nationale Databank Flora en Fauna.
- Habitatieisen van de soorten.

Van de 1304 soort detecties met eDNA verdeeld over de 9 waterlichamen werden slechts drie onverwachte en/of opvallende detecties gedaan:

- In het Vettenbroek werd eDNA van haring aangetroffen in 3 losse eDNA monsters. Zoals reeds beschreven in Herder & Kranenburg (2016) zou de mogelijke bron kunnen liggen in sporen van menselijke consumptie van haring of het gebruik als aasvis voor sportvisserij.
- In de Boven Slinge werd eDNA van het geslacht *Clarius* (kieuwzakmeervallen) aangetroffen in een los monster en in het mengmonster (van het zelfde traject). Tot dit geslacht behoort de Afrikaanse meerval (*Clarius gariepinus*), een uitheemse soort die in Nederland op meerdere plaatsen gekweekt wordt en in het recente verleden in verschillende wateren terecht is gekomen (bron: Sportvisserij Nederland).
- In het Vettenbroek werd in één mengmonster eDNA van spiering aangetroffen. Er zijn historische waarnemingen van spiering bekend uit deze plas (1975 en 1989) maar de soort is recent niet meer waargenomen. Het is niet onmogelijk dat de soort nog steeds aanwezig is maar aannemelijker lijkt het dat het DNA afkomstig is van aasvissen (dode spiering wordt veel gebruikt bij het snoekbaarsvissen).

Deze detecties van onverwachte soorten in deze studie zijn niet te relateren aan potentiële contaminatie maar betreffen detecties van eDNA dat werkelijk aanwezig was in de monsters. De resultaten laten zien dat de in dit onderzoek toegepaste methode betrouwbare resultaten oplevert. Dan gaat het om de hele workflow van monsternamen, analyse, speciaal voor eDNA ingerichte lab faciliteiten en de bio-informatische filters die PCR en sequentiefouten verwijderen.

4.2 BENODIGD AANTAL MONSTERS

Met accumulatiecurves is het mogelijk een inschatting te maken hoeveel monsters er verzameld dienen te worden voor een compleet beeld van een waterlichaam qua soortensamenstelling. Dit is uiteraard afhankelijk van de grootte van het waterlichaam en het type waterlichaam, bijvoorbeeld stromend water, stilstaand water, diep of ondiep.

In [paragraaf 3.2](#) zijn de accumulatie curves gegeven voor de verschillende onderzochte watertypen (stromend water, plassen en meren, lijnvormig stilstaand water en een poldersysteem met sloten). De accumulatiecurves zijn bepaald voor de drie bemonsteringstrategieën: losse eDNA monsters (linker grafiek), eDNA mengmonsters (grafiek midden) en de KRW-bevissing (rechter grafiek).

In de grafieken is ervoor gekozen een stippellijn te plaatsen ter hoogte van 95% van het totaal aantal aangetroffen soorten (eDNA + KRW) in het waterlichaam. De huidige KRW-protocollen

zijn niet ingericht op een compleet beeld van de soortensamenstelling maar zo ontworpen dat algemenere soorten goed in kaart worden gebracht. De 95% grens is hier dan ook arbitrair en het is de vraag of deze moet worden nagestreefd. Door de zeer hoge trefkans met eDNA hebben we deze wel als uitgangspunt genomen. Daarnaast zal er bij de keuze voor het totaal aantal monsters rekening moeten worden gehouden met de grootte van het waterlichaam en de habitatdiversiteit binnen het waterlichaam. Hierbij kan het huidige KRW-trajecten een indicatie geven (als dit er heel veel zijn dan is het aan te raden ook meer eDNA mengmonsters te verzamelen. Hieronder wordt het aantal benodigde eDNA mengmonsters voor de in deze studie onderzochte waterlichamen (en vergelijkbare waterlichamen) gegeven.

In de *stromende wateren* (Regge en Boven Slinge) blijkt een viertal losse eDNA monsters nodig voor de detectie van 95% van de soorten. In de Regge vlakt de curve daarna sterk af wat aangeeft dat er niet veel nieuwe soorten te verwachten zijn bij het nemen van extra monsters. In de Boven Slinge loopt de curve nog steeds op wat aangeeft dat meer monsters waarschijnlijk tot een nog hoger aantal soorten leidt. Dit zal mede veroorzaakt zijn door de diversiteit in monsterpunten in de Boven Slinge: van relatief snel stromend bovenstrooms deel tot een meer stagnant benedenstrooms deel met andere vissoorten.

De mengmonsters, slechts 2 in de Boven Slinge en 3 in de Regge komen net niet aan de 95% grens. De KRW-visbemonstering blijft steken op ongeveer 80% van de soorten. De curves lopen in beide grafieken nog op wat aangeeft dat meer KRW-bemonsteringen naar verwachting tot meer soorten zal leiden.

In de *meren en plassen* valt op dat bij de ondiepe plassen (Kralingse Plas en Noorder Ijplas) de curves bij de losse eDNA monsters al vrij snel, na 2 a 3 monsters, (vrijwel) horizontaal gaan lopen. Dit laat zien dat meer monsters nemen weinig nieuwe soorten toevoegt. Bij de mengmonsters is dit na 2 monsters al het geval. Voor de diepe plas Vettenbroek blijft de curve veel langer steil oplopen, zowel bij de losse eDNA monsters als bij de mengmonsters (nieuwe monsters voegen nieuwe soorten toe). Daarnaast is ook de spreiding (blauw gearceerde deel) groter wat komt door meer variatie in soortensamenstelling tussen de monsters.

In de *kleine stilstaande lijnvormige wateren* lijken grofweg 3 losse eDNA monsters of 2 eDNA mengmonsters genoeg om 95% van de soorten te detecteren. Opvallend is dat de curves bij de KRW-bevissing bij het Polderhoofdkanaal en Bijleveld nog steeds oplopen (meer bemonsteringen geven naar verwachting meer soorten) terwijl deze bij de Tielerwaarden reeds horizontaal loopt (de verwachting is dan dat meer bemonsteringen niet veel meer soorten opleveren). Dit terwijl het aantal gevangen soorten nog ver onder de 95% blijft.

Het *poldersysteem met sloten en plassen* (Eilandspolder) is het enige waterlichaam waar met de eDNA bemonsteringen niet aan de 95% van de aangetroffen soorten wordt gekomen. De accumulatiecurves met eDNA vlakken bij zowel de losse monsters als bij de mengmonsters sterk af na 3 monsters. De curve van de KRW-bevissing blijft oplopen, zelfs na 30 bemonsteringen. Dit laat zien dat er tussen de individuele bemonsteringen voor de KRW flinke verschillen zaten qua soorten. De 95% grens wordt bij de KRW ook pas gehaald na 17 a 18 bemonsteringen.

Over het geheel gezien blijken 3 a 4 losse eDNA monsters of 2 a 3 eDNA mengmonsters voldoende voor het detecteren van 95% van de soorten. Een waarde die middels de huidige KRW-bevissingen zelden wordt gehaald. Wanneer enkel gekeken wordt naar een globaal beeld van

de aanwezige soorten (algemeenste soorten) kan met een zeer beperkte eDNA-bemonstering reeds volstaan worden. Wanneer het doel is ook goed inzicht te krijgen in de soorten die in hele lage dichtheden voorkomen en de onderlinge verhoudingen tussen soorten is een groter aantal eDNA-mengmonsters aan te raden.

4.3 RUIMTELIJKE VERDELING VAN MONSTERS IN GROTE WATEREN

Voor het verkrijgen van een goed beeld van een waterlichaam is inzicht nodig in de verspreiding van eDNA over een waterlichaam. Is een bemonstering in de oever afdoende, of moeten er ook monsters in open water worden verzameld voor een compleet beeld? Binnen dit onderzoek zijn drie plassen/meren opgenomen waarbij dit onderzocht is. Er zijn in deze waterlichamen zowel monsters in de oeverzone als in het open water verzameld. In de onderzochte stromende wateren en kleinere wateren is door hun geringe breedte niet echt sprake van 'open water' of grote verschillen in diepte.

Bij onderzoek uit Engeland in drie hele grote diepe meren (Windermere, Bassenthwaite Lake en Derwent Water) werden er meer soorten in de oeverzone aangetroffen dan in het open water (Hänfling *et al.*, 2016). In enkele van deze meren troffen ze echter ook sommige soorten enkel in open water aan (Atlantische zalm, beekridder, paling en elrits). De schaal van deze meren is echter niet te vergelijken met de hier onderzochte meren. Daarnaast speelt ook stratificatie van waterlagen een rol in deze meren. In de zomer mengt het water niet of nauwelijks. Daarom kiezen ze daar voor bemonstering in de winter wanneer er geen stratificatie is en water goed mengt (pers. med. Bernd Hänfling).

Uit het in Nederland uitgevoerde onderzoek (Kralingse Plas, Noorder IJplas en het Vettenbroek) komt eveneens naar voren dat er in de oevers iets meer soorten worden aangetoond (11,25 gemiddeld) dan in het open water (10,5 gemiddeld). Hierbij dient de kanttekening geplaatst te worden dat er twee keer zoveel monsters in de oeverzone zijn verzameld dan in het open water. In tegenstelling tot Engeland zijn hier geen soorten gemist in de oeverzone die wel werden aangetoond in het open water. Omgekeerd werden in het open water wel enkele soorten gemist die wel in de oeverzone werden gedetecteerd. Het ging daarbij om soorten die typisch zijn voor de oeverzone waar het water ondieper is en er meer vegetatie of andere vormen van structuur aanwezig zijn: kleine modderkruiper, ruisvoorn en zeelt. Ook werden paling, karper en roofblei gemist in het open water terwijl ze wel werden aangetoond in de oeverzone. Wanneer gekeken wordt naar het aandeel in eDNA van deze soorten in de monsters in de oeverzone bleek dat dit heel laag was (minder dan 0,25%). Het gaat dus om soorten die in zeer lage dichtheden voorkomen in de oeverzone of hier mogelijk af en toe foerageren.

Voorkeurshabitat

Naast soortdetectie is er ook gekeken naar de verhoudingen tussen soorten. Zo zou het bijvoorbeeld kunnen dat soorten afhankelijk van hun voorkeurshabitat meer of minder in de oeverzone voorkomen t.o.v. het open water. Wanneer naar de globale verhouding van eDNA-sequenties tussen soorten gekeken wordt blijkt deze goed overeen te komen in de Kralingse Plas ($R^2 = 0,91$) en Noorder IJplas ($R^2 = 0,97$) en matig in het Vettenbroek ($R^2 = 0,49$). Wanneer ingezoomd wordt op de soorten zelf vallen verschillen op. Zo wordt er relatief meer eDNA van de rivierdonderpad, marm grondel en zwartbek grondel gevonden in de oeverzone in vergelijking met het open water. Dit komt overeen met het voorkeurshabitat (stortsteen in de oeverzone) van deze soorten. In het Vettenbroek en de Noorder IJplas werd relatief meer eDNA van karper, zeelt en ruisvoorn aangetroffen in de oeverzones. In de Kralingse Plas werd juist rela-

tief meer eDNA van karper en ruisvoorn in het open water aangetroffen. De Kralingse Plas betreft echter een zeer ondiepe plas waar het ook in het open water relatief ondiep is met een goede onderwatervegetatie. In het Vettenbroek (een diepere plas) werd in het open water relatief meer eDNA van generalisten aangetroffen als baars, brasem, blankvoorn en snoekbaars.

Wanneer de onderzoeksvraag zich richt op voorkomende soorten volstaat een oeverbemonstering in plassen en meren van vergelijkbare grootte als de Kralingse Plas. Wanneer er ook semi-kwantitatieve uitspraken gedaan moeten worden, wat wenselijk is in het kader van de KRW, dan verdient het de aanbeveling om aparte traject(en) mee te nemen voor het open water.

4.4 EFFECT VAN MENGMONSTERS

Een belangrijke onderzoeksvraag van dit onderzoek was wat het effect is op de uitkomsten qua soorten en verhoudingen tussen soorten van het in het mengen van meerdere eDNA monsterlocaties tot een enkel eDNA (meng)monster. Dit is onderzocht door in alle waterlichamen per 3 losse eDNA monsters/trajecten ook een mengmonster van deze 3 trajecten te verzamelen. Er is vervolgens een vergelijking gemaakt tussen de resultaten verkregen uit de losse monsters (6 of 9 per waterlichaam) en de resultaten van de mengmonsters (2 of 3 per waterlichaam). Daarnaast is er in twee waterlichamen een compleet mengmonster van het hele waterlichaam verzameld.

4.4.1 Mengmonsters van drie trajecten

Met de losse monsters samen werden gemiddeld ongeveer 6% meer soorten aangetoond per waterlichaam dan met de mengmonsters samen (gemiddeld 16,32 om 15,36 soorten, [zie figuur 3.10](#)). De soorten die gemist werden in de mengmonsters t.o.v. de losse monsters bleken zonder uitzondering een zeer laag aandeel eDNA te hebben in de oevermonsters (vaak veel minder dan 1 procent van het totaal). Geconcludeerd kan worden dat de mengmonsters zeer beperkt inleveren op soortdetectie (6% minder soorten). Daar komt bij dat ook de mengmonsters nog steeds ruim meer soorten (19%) detecteren t.ov. de volledige KRW-bevissing ([zie figuur 3.11 en 3.12](#)).

Wanneer gekeken wordt naar de verhoudingen in eDNA tussen de verschillende soorten in de losse monsters en de mengmonsters blijkt dat die nagenoeg hetzelfde beeld geven in acht van de negen waterlichamen ([zie figuur 3.13](#)). In het Bijleveld was de correlatie matig ($R^2 = 0,544$) door een outlier van blankvoorn. Deze outlier werd veroorzaakt door een extreem hoog aandeel blankvoorn in 2 van de 6 losse eDNA monsters. Mogelijk dat er stukjes weefsel in de monsters terecht zijn gekomen of precies naast een school blankvoorns gemonsterd is. Wanneer we de blankvoorn weglaten uit de resultaten is de correlatie net als in de andere waterlichamen nagenoeg volledig ($R^2 = 0,978$).

De mengmonsters geven dus nagenoeg exact dezelfde verhoudingen in eDNA-sequenties tussen soorten als de individuele monsters. Dit duidt erop aan dat de mengmonsters volstaan voor een goed beeld van de verhoudingen in eDNA tussen soorten.

4.4.2 Mengmonsters van een compleet waterlichaam

In de Kralingse Plas en de Noorder IJplas is onderzocht of er een representatief beeld verkregen kon worden op basis van één mengmonster waarin alle verschillende habitats uit de plas gemengd werden. Qua soortdetectie was er weinig verschil, in beide waterlichamen werd slechts één soort gemist t.o.v. de 9 losse monsters. De gemiste soort had een zeer laag aandeel in het DNA in de losse monsters (0,57% en 0,51%).

Daarnaast is ook gekeken naar de verhoudingen in DNA tussen de soorten in het mengmonster en in de losse monsters. Deze kwamen minder goed overeen met de losse monsters dan bij de mengmonsters per drie trajecten. De R^2 tussen losse monsters en de mengmonsters van de plas (R^2 van 0,8 en 0,74) lag beduidend lager dan die tussen de losse monsters en de mengmonsters per 3 trajecten (gemiddelde R^2 van 0,92). Daarnaast is in [figuur 3.15](#) ook duidelijk te zien dat er meer spreiding is tussen de punten wat inhoudt dat percentages in eDNA per soort minder goed overeenkomen tussen beide bemonsteringen.

De steekproef is erg klein met slechts twee waterlichamen. Maar uit de resultaten kan voorzichtig geconcludeerd worden dat een enkel mengmonster te mager is voor een representatief beeld van een waterlichaam. Qua soortdetectie komt een enkel mengmonster nog een heel eind maar qua verhoudingen in DNA tussen soorten volstaat het niet. Dit komt doordat toeval een te grote rol gaat spelen t.o.v. meerdere mengmonsters waarbij uitschieters uitmidelen.

4.5 CONCLUSIES

- De eDNA-methode kan goed worden ingezet voor het bepalen van de soortensamenstelling. Gemiddeld werden per waterlichaam 1,23 keer meer soorten gedetecteerd met de losse eDNA monsters en 1,19 keer meer soorten met de mengmonsters t.o.v. van de volledige KRW-visstandbemonstering ([paragraaf 4.1.1](#)).
- In een beperkt aantal gevallen werden met eDNA barcoding soorten gemist t.o.v. de KRW-bevissing, het ging in alle gevallen om soorten die in zeer lage dichtheden in het betreffende waterlichaam waren aangetroffen (bestandschatting 0,0001 kilo/hectare) ([paragraaf 4.1.2](#)).
- Afhankelijk van de grootte van het waterlichaam lijken 3 a 4 losse eDNA monsters of 2 a 3 eDNA mengmonsters voldoende voor het bepalen van de soortensamenstelling en de verhoudingen tussen soorten ([paragraaf 4.2 en 4.4](#)).
- De bio-informatische filters werken en zorgen voor een betrouwbaar databestand met positieve detecties per soort waarvan met zeer grote zekerheid gesteld kan worden dat er eDNA van de soort in de monsters aanwezig was ([paragraaf 4.1.3](#)).
- In de eDNA-monsters in de oeverzone werden iets meer soorten aangetroffen dan in de eDNA-monsters uit open water en de relatieve verhoudingen in eDNA verschilden enigszins (overeenkomstig met de natuurlijke verdeling van soorten in een waterlichaam). Aanbevolen wordt daarom in plassen en meren zowel monsters in de oever als in het open water te verzamelen ([paragraaf 4.3](#)).
- Middels het verzamelen van enkele eDNA mengmonsters kan een waterlichaam op een kostenefficiëntere manier bemonsterd worden zonder dat dit grote effecten heeft op de uitkomsten qua soortensamenstelling en verhoudingen tussen soorten.
 - Mengmonsters van drie trajecten samen geven grofweg hetzelfde beeld qua soorten als losse monsters (6% meer soorten). Er werden enkel soorten gemist die een zeer laag aandeel in het eDNA van de losse monsters hadden ([paragraaf 4.4.1](#)).
 - Mengmonsters (2 of 3) gaven qua relatieve verhouding in DNA sequenties tussen soorten nagenoeg exact hetzelfde beeld als de losse monsters (6 of 9) ([paragraaf 4.4.1](#)).
- Mengmonsters van een heel waterlichaam in een enkel monster geven een onvoldoende representatief beeld van de visgemeenschap. Qua soortdetectie komen ze een heel eind, qua verhoudingen in DNA tussen soorten is de steekproef te klein voor een goed beeld ([paragraaf 4.4.2](#)).



H5 HOE VERDER

5.1 ONDERZOEKSTRAJECT, IDEEËN VOOR EEN MAATLAT

Het doel van het onderzoekstraject dat RAVON in 2013 samen met de STOWA en de waterschappen gestart is, is onderzoeken of eDNA metabarcoding een goed alternatief is voor de huidige KRW-visbemonsteringen. Op basis van de resultaten uit deze en voorgaande studies (Herder *et al.*, 2014b, Herder & Kranenbarg, 2016) en uit de wetenschappelijke literatuur (Valentini *et al.*, 2016; Hänfling 2016) Blijkt dat de toepassing van eDNA metabarcoding methoden een goed alternatief kan zijn voor het bepalen van de soortensamenstelling in een water. De resultaten uit deze studie laten tevens zien dat er middels eDNA een goed beeld verkregen kan worden van de verhoudingen in eDNA tussen soorten. Daarmee kunnen semi-kwantitatieve visgemeenschapsindicatoren gebaseerd op de mate van algemeenheid van bepaalde soorten of soortgroepen bepaald worden via eDNA.

In 2016 zijn een aantal te nemen stappen geformuleerd die nodig zijn voor de implementatie van eDNA metabarcoding als bemonsterings-methodiek voor de KRW (Herder & Kranenbarg, 2016):

- Vaststellen meetprotocollen voor verschillende watertypen;
- Vervolgonderzoek kwantificering ;
- Verscherpen bio-informatische filters ;
- Uitbreiden referentiedatabase;
- Vaststellen referentiesituaties, aanpassen vissenmaatlaten en intercalibratie;
- Implementatie bij Nederlandse laboratoria.

Het is hierbij op termijn wenselijk om een (internationale) projectgroep samen te stellen van (vis)specialisten op het gebied van verschillende watertypen en experts op het gebied van environmental DNA, data-analyses en statistische toetsing. Hieronder wordt beschreven wat de voortgang met betrekking tot deze stappen is en wat er nog gedaan moet worden.

Vaststellen meetprotocollen voor verschillende watertypen

Op dit punt zijn met huidig onderzoek grote stappen gemaakt. Afhankelijk van de grootte van het te onderzoeken waterlichaam kan bepaald worden hoeveel mengmonsters nodig zijn voor een compleet beeld. Dit kan afgeleid worden uit het huidige aantal KRW-trajecten die momenteel per waterlichaam bevestigd worden middels traditionele methoden. In het onderzoek uit 2016 hebben we 9 waterlichamen onderzocht (7 verschillende KRW-watertypen). De steekproef is nog klein met veelal 1 waterlichaam per watertype, daarnaast zijn er ook nog een groot aantal KRW-watertypen dat nog niet onderzocht is. Bijvoorbeeld echt grote meren, grote kanalen, brakke overgangswateren, verschillende stromende KRW-watertypen (R-typen).

- Vervolg actie: het verdient de aanbeveling in het vervolgtraject meer waterlichamen te onderzoeken. Zowel ontbrekende watertypen als watertypen waarvan nog maar een enkel waterlichaam bemonsterd is.

Vervolgonderzoek kwantificering

De relatie tussen biomassa en of aantallen vissen en de hoeveelheid eDNA is reeds in een aantal studies onderzocht. In aquarium- en mesocosmexperimenten is deze relatie meerdere

malen aangetoond middels soortspecifieke benadering met qPCR (o.a. Thomsen *et al.*, 2012b; Takahara *et al.*, 2012, Klymus *et al.*, 2015 en Eichmiller *et al.*, 2016) en middels eDNA-metabarcoding (Evans *et al.*, 2015). Daarnaast zijn er beschrijvende studies uit het veld waarbij de precieze biomassa/aantallen van soorten op een locatie niet bekend waren (onderhavige studie, Takahara *et al.*, 2012). SPYGEN en het INBO in Vlaanderen hebben een studie uitgevoerd met visvijvers waaruit de daadwerkelijke biomassa en aantallen vissen bekend was. In deze studie zijn dezelfde primers en protocollen gebruikt als in onderhavige studie. In deze studie is voor de meeste soorten een goede correlatie gevonden tussen eDNA en biomassa (pers. med. INBO).

De resultaten uit ons onderzoek uit 2016 laten zien dat met de hier toegepaste bemonsteringsmethode een nauwkeurig beeld verkregen kan worden van de verhoudingen in eDNA tussen soorten. Voor eventuele soortspecifieke relaties tussen de hoeveelheid eDNA die een soort achterlaat (lichaamsgrootte, ecologie etc.) en eventuele verschillen in vermeerdering door de primers zou aanvullend onderzoek gedaan kunnen worden.

Verscherpen bio-informatische filters

Zowel bij de PCR's (waarbij eDNA inclusief primers en tags vermeerderd worden) als bij het sequencen zelf (uitlezen van de sequenties) zijn er kansen op fouten (dit is onvermijdelijk). Aan de primers zitten bijvoorbeeld zogenaamde 'tags'. Dit zijn korte stukjes DNA-code die corresponderen voor het monster. Op deze manier kunnen meerdere monsters worden samengevoegd in één run op de next generation sequencer waarna ze aan de hand van deze 'tags' achteraf weer aan monsters kunnen worden toegekend. Door PCR fouten en fouten bij het uitlezen kunnen de codes van de tags onbedoeld wijzigen met als gevolg dat de waargenomen soort aan een verkeerd monster wordt toegekend. Daarnaast zijn er instellingen voor het toekennen van een sequentie aan een soort (voor dit onderzoek wordt een ondergrens van 99% overeenkomst, dus maximaal 1 basepaar verschil gehanteerd). Tot slot kan een drempelwaarde worden ingesteld voor het aantal sequenties waarbij een bepaalde soort als betrouwbare positief wordt meegenomen (zo kunnen bijvoorbeeld de meeste sporen van geconsumeerde vissen worden weggefiltert omdat deze in de regel zeer weinig sequenties achterlaten (Herder & Kranenbarg 2016). Deze zogenaamde bio-informatische filters bepalen de betrouwbaarheid van de uiteindelijk verkregen dataset.

In huidig onderzoek zijn opnieuw grote stappen gemaakt, met de huidig toegepaste filters worden alle PCR en sequencing errors er betrouwbaar uitgefilterd (zie paragraaf 4.1.5) terwijl er weinig concessies worden gedaan aan de detectie van soorten die in zeer lage dichtheden voorkomen.

Uitbreiden referentiedatabase

Voor deze studie is gebruik gemaakt van een eigen referentiedatabase aangevuld met publieke databases zoals Genbank. Van sommige soorten zijn geen sequenties bekend van het 12S gen waar de primers zich op richten. Dit betekent dat het eDNA van deze soorten wel wordt gedetecteerd in de analyse maar dat de gevonden sequenties niet gematched kunnen worden aan een soort. Dit jaar zijn opnieuw enkele soorten toegevoegd aan de referentiedatabase (o.a. spiering). De zoetwatervissen zijn goed gedekt, brakwater en mariene soorten moeten nog verder worden aangevuld. Door de referentiedatabase aan te vullen met de nog ontbrekende soorten kunnen deze soorten in de toekomst (en met terugwerkende kracht!) alsnog gematched worden.

Aanpassen en kalibreren KRW-vissemaatlaten

Als visbemonsteringen op basis van eDNA metabarcoding uitgevoerd gaan worden dan zullen de huidige maatlaten hiervoor aangepast en gekalibreerd moeten worden. Om dit te kunnen doen moet er een database samengesteld worden met eDNA bemonsteringsgegevens van de verschillende watertypen die zich in verschillende toestanden van degradatie bevinden. Op basis van een dergelijke database kan bepaald worden hoe de relatie is tussen de verschillende indicatoren voor soortensamenstelling en abundantie en abiotische waterkwaliteitsfactoren.

In dit onderzoek hebben we reeds van 9 waterlichamen eDNA informatie verzameld voor deze database. Een vervolg stap is deze database uitbreiden door op dezelfde manier meer waterlichamen te onderzoeken die zich in verschillende toestanden van degradatie bevinden (dus ook referentiewateren).

In de volgende stap kunnen geschikte indicatoren met hun klassengrenzen voor verschillende EKR's opgesteld worden. Voor veel watertypen kunnen de huidige deelmaatlaten en indicatoren waarschijnlijk gehandhaafd blijven. De klassengrenzen zullen moeten worden aangepast aan de eDNA methodiek. Zo zal eDNA naar verwachting een nauwkeuriger beeld geven van de soortensamenstelling waardoor mogelijk ook de klassengrenzen waaraan scores zijn verbonden aangepast moeten worden (omdat de resultaten anders door verandering van methode anders kunnen worden). Een andere mogelijkheid is het maken van nieuwe maatlaten op basis van de sterke punten van de eDNA-metabarcoding methode (zoals de hoge trefkans voor soorten en een zeer reproduceerbaar beeld van de verhoudingen tussen soorten).

Niet alleen in Nederland wordt gewerkt aan eDNA-metabarcoding toepassingen maar ook in andere Europese landen. Internationale samenwerking op dit onderwerp is gewenst

- Vervolg actie: het verdient de aanbeveling in het vervolgtraject meer waterlichamen te onderzoeken in verschillende mate van degradatie en zo de eDNA-database uit te bouwen. Uiteindelijk zullen dan voor de verschillende KRW-watertypen referenties beschikbaar zijn op basis van eDNA. Vervolgens kan gekeken worden in hoeverre de huidige maatlaten kunnen worden gebruikt met de eDNA-data (ook daarin zit de verhouding tussen soorten en kunnen aantallen soorten van bepaalde gildes bepaald worden).

Implementatie bij Nederlandse laboratoria

Voor het implementeren van de eDNA-metabarcoding methode voor de KRW-vismonitoring is het van belang dat er voldoende analysecapaciteit in Nederland beschikbaar komt. Het is daarom van belang om in een vroeg stadium geïnteresseerde labs klaar te stomen voor de analyses. Om tot vergelijkbare en betrouwbare resultaten te komen dient gewerkt te worden in laboratoria die voldoen aan de eisen om contaminatie met eDNA te voorkomen (Willerslev en Cooper, 2005; Herder *et al.*, 2014a).

5.2 TIJDSPAD

Gerritsen (2015) geeft aan dat het voor een gevalideerde maatlat vereist is om de eDNA methode minstens 2 jaar toe te passen volgens gestandaardiseerde protocollen. Dit betekent dat, mocht er voor gekozen worden om de huidige bemonsteringsmethodiek te vervangen door eDNA metabarcoding, er ruim van te voren met de voorbereidingen gestart moet worden. Bijvoorbeeld bij implementatie in 2021 zal er al in 2018 gestart moeten worden met een operationele eDNA-vismonitoring naast de gangbare vismethode. Hier is in deze studie reeds een

start mee gemaakt maar nog niet voor alle watertypen en de steekproef is nog klein. Op basis van de meetresultaten kan dan in 2020 de nieuwe maatlat gekalibreerd worden. De vraag is of dit nog haalbaar is voor alle watertypen in Nederland. Wanneer 2021 niet gehaald wordt zal de implementatie na de volgende KRW-cyclus in 2027 plaats vinden. Een lange tijdsperiode die de mogelijkheid geeft de eDNA-methode uitvoerig te valideren. Bij voorkeur gebeurt dit met/binnen meerdere Europese landen. RAVON deelt reeds kennis en werkt samen met organisaties uit België, Frankrijk, Engeland en Noorwegen die aan de lat staan voor de implementatie van eDNA-metabarcoding voor vissen in hun eigen land.

5.3 VERWACHTE KOSTENREDUCTIE

eDNA metabarcoding kan kosten besparen t.o.v. de huidige KRW-visbemonstering. Een eDNA monster kan door een enkel persoon verzameld worden en kost in de regel minder tijd dan de huidige bemonsteringswijze die vaak met twee of drie personen wordt uitgevoerd. De totale kosten van een eDNA bemonstering bestaan uit de tijd voor het nemen van de monsters en de kosten voor het analyseren van deze monsters. Het grootste deel van de kosten ligt in de Next Generation Sequencing van de monsters. In dit veld volgen de ontwikkelingen elkaar in rap tempo op. Nieuwe apparaten komen met regelmaat op de markt en kunnen grotere hoeveelheden DNA sequenzen tegen lagere monster kosten. De verwachting is dat de kosten van de eDNA analyses daarmee de komende jaren sterk omlaag gaan.

Uit de resultaten van 2016 blijkt dat voor een compleet(er) beeld van een waterlichaam in de meeste gevallen (veel) minder eDNA monsters verzameld hoeven te worden dan dat er KRW-trajecten bevestigd moeten worden. Dit zal leiden tot een lagere tijdsinspanning in het veld en lagere analyses-kosten (minder monsters noodzakelijk).



H6 LITERATUUR

- Civade R., T. Dejean, A. Valentini, N. Roset, J Raymond, A. Bonin, P. Taberlet and D. Pont. Spatial representativeness of environmental DNA metabarcoding signal for fish biodiversity assessment in a natural freshwater system. PLoS ONE, in press.
- Deagle, B.E., Eveson, J.P., Jarman, S.N., 2006. Quantification of damage in DNA recovered from highly degraded samples - a case study on DNA in faeces. *Front. Zool.* 3, 11.
- De Bruin, A., Spikmans, F., Kranenbarg, J., Herder, J.E., 2014. Soortmanagementplan grote modderkruiper Waterschap Rivierenland fase 1: actualisatie verspreiding 2013. (No. 2013.074). RAVON, Nijmegen.
- De Nie, H., 1996. Atlas van de Nederlandse zoetwatervissen. Media Publishing Int BV, Doetinchem.
- Boyer F, Mercier C, Bonin A *et al.* (2015) obitools: a unixinspired software package for DNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*, doi:10.1111/1755-0998.12428
- Eichmiller, J. J., Miller, L. M. and Sorensen, P. W. (2016), Optimizing techniques to capture and extract environmental DNA for detection and quantification of fish. *Mol Ecol Resour*, 16: 56–68. doi:10.1111/1755-0998.12421
- Ficetola, G.T., Miaud, C., Pompanon, F., Taberlet, P., 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol. Lett.* 4, 423–425. doi:10.1098/rsbl.2008.0118
- Ficetola GT, Coissac E, Zundel S *et al.* (2010) An in silico approach for the evaluation of DNA barcodes. *BMC Genomics*, 11, 434.
- Ficetola, G. F., Pansu, J., Bonin, A., Coissac, E., Giguët-Covex, C., De Barba, M., Gielly, L., Lopes, C. M., Boyer, F., Pompanon, F., Rayé, G. and Taberlet, P., 2015, Replication levels, false presences and the estimation of the presence/absence from eDNA metabarcoding data. *Molecular Ecology Resources*, 15: 543–556. doi: 10.1111/1755-0998.12338
- Gerritsen, A., 2015. Notitie Pilot eDNA vismonitoring. Rijkswaterstaat.
- Gustavson, M.S., P.C. Collins, J.A. Finarelli, D. Egan, R.O. Conchuir, G.D. Wightman, J.J. King, D.T. Gauthier, K. Whelan, J.E. Carlsson and J. Carlsson, 2015. An eDNA assay for Irish *Petromyzon marinus* and *Salmo trutta* and field validation in running water. *Journal of Fish*
- Hänfling B, L. Lawson Handley, D.S. Read, C. Hahn, J. Li, P. Nichols, R.C. Blackman, A. Oliver en I.J. Winfield 2016. Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. *Molecular Ecology*; 25(13):3101-19. doi: 10.1111/mec.13660
- Herder, J.E., Valentini, A., Kranenbarg, J., 2012. Detectie van grote modderkruipers met behulp van Environmental DNA. *H 2 O* 45, 25.
- Herder, J.E., Kranenbarg, J., De Bruin, A., Valentini, A., 2013b. Op jacht naar DNA Effectief zoeken naar grote modderkruipers. *Visionair* 8–11.
- Herder, J.E., Van Delft, J.J.C.W., Bellemain, E., Valentini, A., 2013. Environmental DNA, krachtig gereedschap voor het monitoren van fauna. *Levende Nat.* jaargang 114, 108–113.
- Herder, J.E., A. Valentini, E. Bellemain, T. Dejean, J.J.C.W. Van Delft, P.F. Thomsen en P. Taberlet, 2014a. Environmental DNA - toepassingsmogelijkheden voor het opsporen van (invasieve) soorten. Stichting RAVON, Nijmegen. Rapport 2013-104.
- Herder, J.E., M. Schiphouwer & J. Kranenbarg, 2014b. Pilot vergelijking visbemonsteringen volgens KRW-methode met uitkomsten environmental DNA metabarcoding voor R en M typen. Stichting RAVON, Nijmegen. Rapport 2013-078
- Herder J.E., en J. Kranenbarg, 2016. eDNA metabarcoding vissen – Verkennend onderzoek naar de mogelijke toepassing van eDNA voor de KRW vismonitoring, RAVON/STOWA rapport 2016-19.
- Herder, J.E., K. van Bochove & J. Kranenbarg 2016. Genetisch onderzoek kleine modderkruipers Nederland – Voorkomen *Cobitis taenia* en hybriden. Rapportnummer 2015-103, Stichting RAVON.

-
- Jerde, C.L., Mahon, A.R., Chadderton, W.L., Lodge, D.M., 2011. 'Sight-unseen' detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conserv. Lett.* 4, 150–157.
- Kelly RP, Port JA, Yamahara KM, Crowder LB, 2014. Using environmental DNA to census marine fishes in a large mesocosm. *PLoS ONE*, 9, e86175.
- Klymus, K.E., Richter, C.A., Chapman, D.C., Paukert, C., 2015. Quantification of eDNA shedding rates from invasive bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis* and silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Biol. Conserv.* 183, 77–84.
- Melis, J. en M. Koopmans, 2015. Fiskatlas Fryslân, verspreiding en ecologie van zoetwatervissen in Fryslân. Bronmeer, Gorredijk.
- Rees, H. C., Maddison, B. C., Middleditch, D. J., Patmore, J. R.M., Gough, K. C. 2014. REVIEW: The detection of aquatic animal species using environmental DNA – a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology*, 51: 1450–1459. doi: 10.1111/1365-2664.12306
- STOWA, 2010. Handboek hydrobiologie.
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., Rieseberg, L.H., 2012. Environmental DNA. *Molecular Ecology*. 21, 1789–1793.
- Takahara, T., Minamoto, T., Yamanaka, H., Doi, H., Kawabata, Z., 2012. Estimation of Fish Biomass Using Environmental DNA. *PloS One* 7, e35868.
- Takahara T, Minamoto T, Doi H, 2013. Using Environmental DNA to Estimate the Distribution of an Invasive Fish Species in Ponds. *PLoS ONE* 8(2): e56584.
- Thomsen, P.F., Kielgast, J., Iversen, L.L., Møller, P.R., Rasmussen, M., Willerslev, E., 2012a. Detection of a Diverse Marine Fish Fauna Using Environmental DNA from Seawater Samples. *PLoS ONE* 7, e41732. doi:10.1371/journal.pone.0041732
- Thomsen, P.F., Kielgast, J., Iversen, L.L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M.T.P., Orlando, L., Willerslev, E., 2012b. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Mol. Ecol.*
- Trautner J., 2006. Rapid identification of European (*Anguilla anguilla*) and North American eel (*Anguilla rostrata*) by polymerase chain reaction. *Inf. Fischereiforsch.* 53, 2006, 49–51. Bundesforschungsanstalt für Fischerei, Hamburg
- Turner, C.R., Barnes, M.A., Xu, C.C.Y., Jones, S.E., Jerde, C.L., Lodge, D.M., 2014. Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. *bioRxiv*. doi:10.1101/001941
- Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P. F., Bellemain, E., Besnard, A., Coissac, E., Boyer, F., Gaboriaud, C., Jean, P., Poulet, N., Roset, N., Copp, G. H., Geniez, P., Pont, D., Argillier, C., Baudoin, J.-M., Peroux, T., Crivelli, A. J., Olivier, A., Acqueberge, M., Le Brun, M., Møller, P. R., Willerslev, E. and Dejean, T. (2016), Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Mol Ecol*, 25: 929–942. doi:10.1111/mec.13428
- Willerslev, E., Cooper, A., 2005. Ancient DNA. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* 272, 3–16.

BIJLAGE 1 | MET eDNA EXTRA AANGETROFFEN SOORTEN TEN OPZICHTE VAN KRW

TABEL I MET eDNA EXTRA AANGETROFFEN SOORTEN TEN OPZICHTE VAN KRW

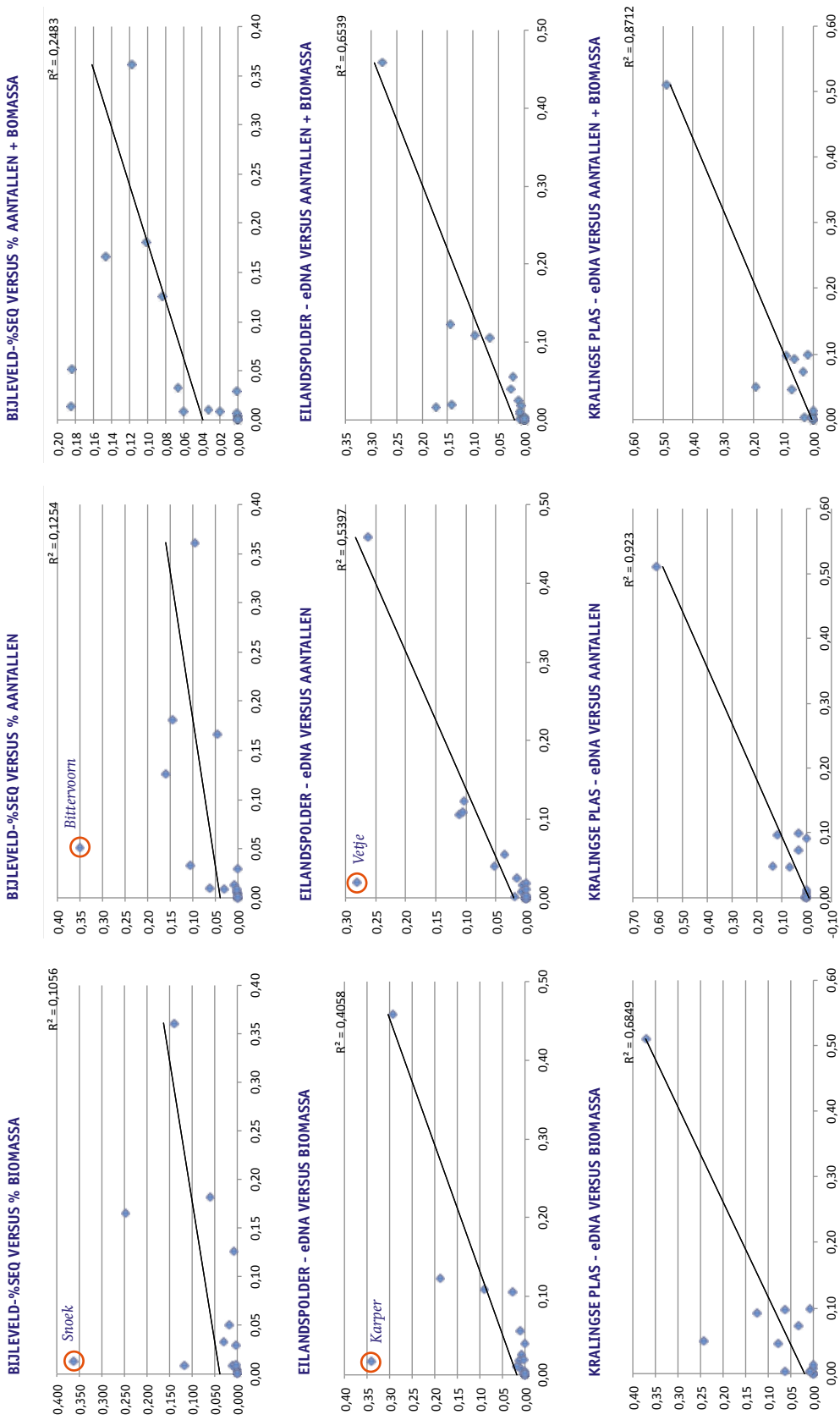
De tabel geeft per waterlichaam welke soorten gemist zijn in de KRW-visbemonstering en welke absoluut aantal en percentage sequenties werd gevonden van deze soorten in de eDNA bemonstering.

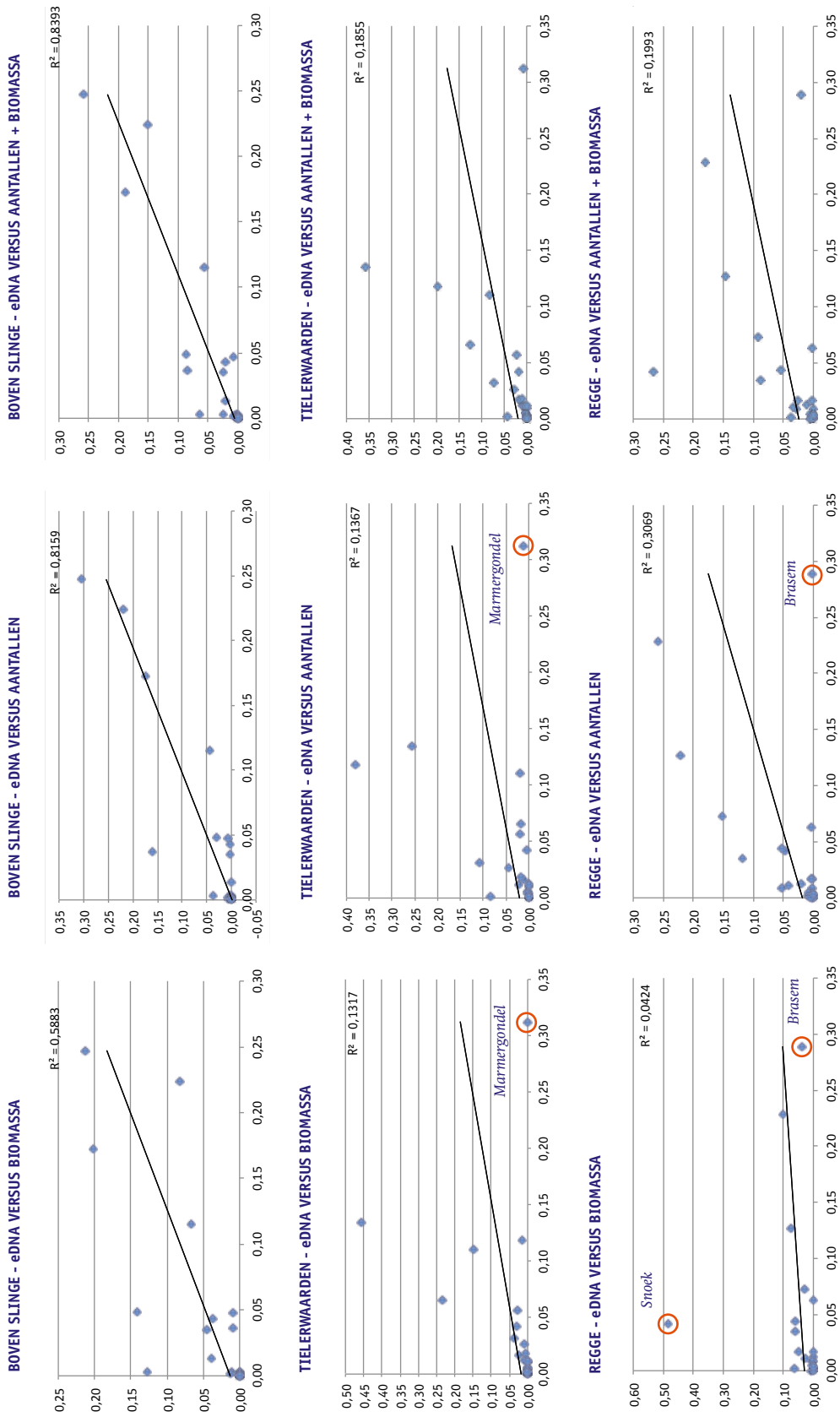
WATERLICHAAM	SOORT	AANTAL eDNA	PERCENTAGE eDNA
		SEQUENTIES GEVONDEN WANNEER GEMIST IN KRW	SEQUENTIES GEVONDEN WANNEER GEMIST IN KRW
Bijleveld	Roofblei	523	0,01%
Bijleveld	Karper	1054	0,02%
Bijleveld	Tiendornige stekelbaars	2294	0,05%
Bijleveld	Snoekbaars	2660	0,06%
Boven Slinge	Graskarper spec	233	0,01%
Boven Slinge	Zeelt	318	0,01%
Boven Slinge	Kolblei	595	0,02%
Boven Slinge	Zonnebaars	2024	0,06%
Boven Slinge	Ruisvoorn	4385	0,13%
Boven Slinge	Brasem	6588	0,19%
Eilandspolder	Winde of Serpeling	8357	0,19%
Kralingse Plas	Roofblei	1051	0,02%
Kralingse Plas	Karper	9838	0,19%
Kralingse Plas	Zeelt	64394	1,24%
Noorder IJplas	Karper	11499	0,42%
Polderhoofdkanaal	Grote modderkruiper	1175	0,03%
Polderhoofdkanaal	Paling	1182	0,03%
Polderhoofdkanaal	Rivier- of Beekdonderpad	4419	0,11%
Polderhoofdkanaal	Tiendornige stekelbaars	5043	0,13%
Polderhoofdkanaal	Karper	32860	0,84%
Regge	Tiendornige stekelbaars	607	0,01%
Regge	Rivier- of Beekdonderpad	2589	0,06%
Regge	Karper	5940	0,14%
Regge	Graskarper spec	13885	0,33%
Regge	Zonnebaars	16799	0,40%
Tielerswaarden	Kroeskarper of Giebel	507	0,02%
Tielerswaarden	Graskarper spec	980	0,03%
Tielerswaarden	Paling	1051	0,04%
Tielerswaarden	Karper	2714	0,10%
Tielerswaarden	Tiendornige stekelbaars	3061	0,11%
Tielerswaarden	Pos	4547	0,16%
Tielerswaarden	Roofblei	5086	0,18%
Tielerswaarden	Kesslers grondel	11424	0,40%
Tielerswaarden	Pontische stroomgrondel	28498	1,01%
Tielerswaarden	Zwartbekgrondel	32694	1,15%

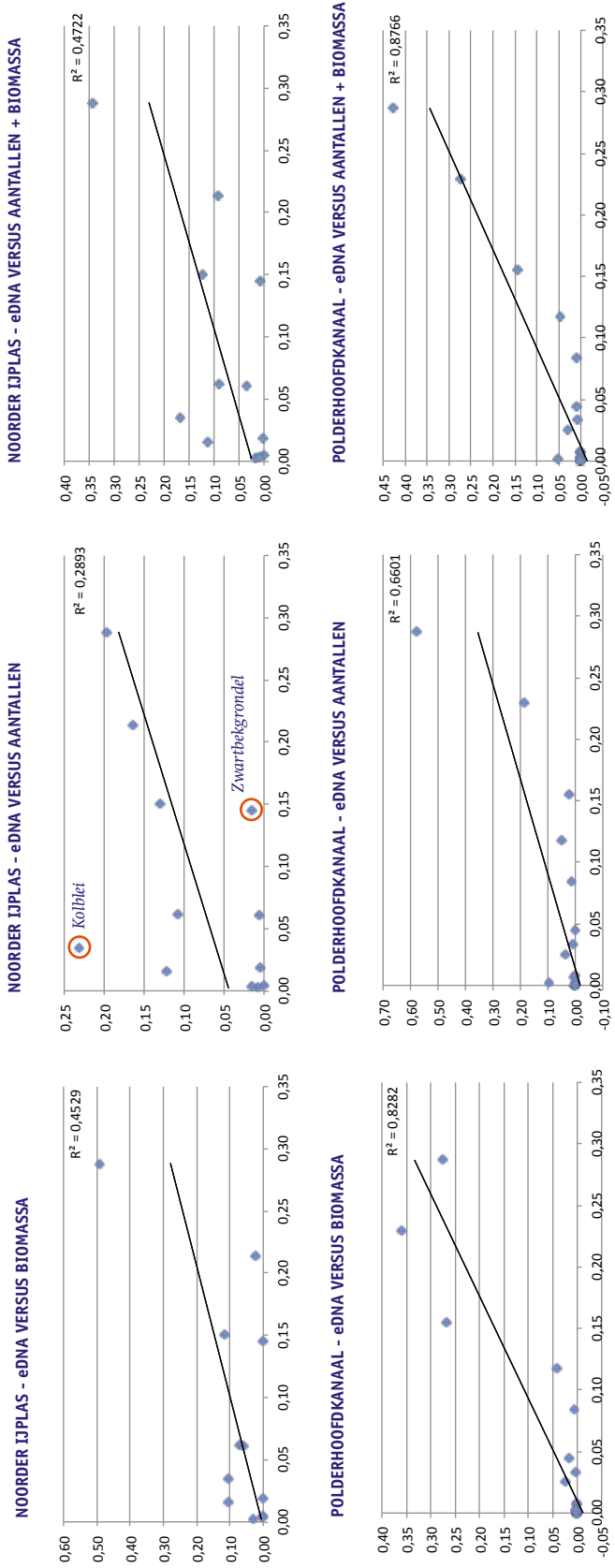
BIJLAGE 2 | CORRELATIE TUSSEN AANDEEL eDNA EN BIOMASSA, AANTALLEN EN BIOMASSA + AANTALLEN

Hierna volgende grafieken geven per waterlichaam de correlatie tussen het aandeel eDNA per soort en respectievelijk het aandeel in biomassa, aandeel in aantallen en aandeel in biomassa + aantallen (berekend als aandeel biomassa + aandeel aantal gedeeld door 2). De R^2 geeft de mate van correlatie aan. Op de X-as staat het aandeel in sequenties, op de Y-as het aandeel in biomassa, aantallen of biomassa + aantallen.

Wanneer de correlatie een R^2 van 0,3 of lager had (lage correlatie) zijn de outliers die deze slechte correlatie veroorzaken rood omcirkeld met rechts daarnaast de soortnaam. Deze outliers worden hieronder besproken.







Hieronder worden de outliers voor de gevallen waarbij de correlatie tussen eDNA en biomassa of eDNA en aantallen lager was dan $R^2 = <0,3$ individueel besproken.

Bijleveld

Bij de biomassa zorgde de snoek voor een outlier. Het aandeel eDNA van de snoek was laag (1%) van de snoek aangetroffen maar het aandeel van de snoek in de biomassa was hoog (36%). Er zijn 27 snoeken gevangen (op 3493 vissen) maar er zaten enkele grote snoeken met hoge biomassa tussen waardoor het biomassa aandeel mogelijk overschat is. Het weglaten van de snoek zorgt voor een betere correlatie ($R^2 = 0,4$).

Bij de aantallen zorgt de bittervoorn voor een outlier. Het aandeel eDNA van de bittervoorn was relatief laag (5%) terwijl het aandeel in aantallen erg hoog was (35%). In de bemonstering zijn waarschijnlijk grote scholen kleine bittervoorns gevangen waardoor het aantalsaandeel groot was. Het weglaten van de bittervoorn zorgt voor een betere correlatie ($R^2 = 0,4$).

Eilandspolder

Bij de biomassa zorgde de karper voor een outlier. Er zijn in de gehele bemonstering maar 15 karpers gevangen (op 11103 vissen). De karpers waren gemiddeld bijna 60 cm waardoor hun biomassa aandeel mogelijk overschat is. Het weglaten van de karper zorgt voor een zeer goede correlatie ($R^2 = 0,86$).

Bij de aantallen zorgt het vetje voor een outlier. Het aandeel eDNA van de vetje was relatief laag (2%) terwijl het aandeel in aantallen erg hoog was (27%). In de bemonstering zijn waarschijnlijk grote scholen kleine vetjes gevangen waardoor het aantalsaandeel groot was. Het weglaten van het vetje en de karper zorgt voor een zeer goede correlatie van correlatie ($R^2 = 0,94$).

Tielerwaarden

Bij zowel de biomassa als de aantallen zorgt de marmergrondel voor een outlier. De KRW-vis-bemonstering is echter reeds in 2014 uitgevoerd en de eDNA bemonstering in 2016. Het is aannemelijk dat deze invasieve exoot in de tussentijd flink in aantallen is toegenomen waardoor de vergelijking scheef gaat. Het weglaten van de marmergrondel zorgt voor zowel bij de biomassa ($R^2 = 0,54$) als bij de aantallen ($R^2 = 0,56$) voor een betere correlatie.

Regge

In de Regge is enkel elektrisch gevisd wat voor een goede schatting van de biomassa onvoldoende wordt geacht. Bij de biomassa zorgden de brasem en snoek voor outliers. De brasem werd heel weinig gevangen (biomassa aandeel van 4%) terwijl de brasem een hoog aandeel had in het eDNA op (29%). Dit valt verklaren doordat grote brasems met elektrovissern moeilijk te vangen zijn en daarmee het aandeel brasem waarschijnlijk onderschat is. Voor de snoek speelt hetzelfde als bij Bijleveld (aandeel in biomassa mogelijk overschat door vangst relatief grote exemplaren). Het weglaten van brasem en snoek zorgt voor een betere correlatie ($R^2 = 0,57$).

Ook bij de correlatie tussen aandeel eDNA en aandeel aantallen zorgt de brasem voor een outlier. Wanneer deze soort wordt weggelaten zorgt dat voor een goede correlatie ($R^2 = 0,81$).

Noorder IJplas

Bij de aantallen zorgde de zwartbekgrondel en kolbei voor outliers. Zwartbekgrondels hadden een relatief groot aandeel in eDNA (14%) tegenover een laag aandeel in de gevangen aantallen (2%). De kolblei had een klein aandeel in het eDNA (4%) maar een relatief groot aandeel in de aantallen (23%). De zwartbekgrondel komt zeer talrijk voor in de oeverzones en wordt mogelijk onder bemonsterd met elektrisch vissen. Het grote aantalsaandeel van de kolblei komt voor rekening van één enkele zegentrek waarbij 367 individuen zijn gevangen (t.o.v. gemiddeld 12 individuen in de andere drie zegentrekken). Het weglaten van kolblei en zwartbekgrondel zorgt voor een betere correlatie ($R^2 = 0,71$)

STOWA IN HET KORT

STOWA is het kenniscentrum van de regionale waterbeheerders (veelal de waterschappen) in Nederland. STOWA ontwikkelt, vergaart, verspreidt en implementeert toegepaste kennis die de waterbeheerders nodig hebben om de opgaven waar zij in hun werk voor staan, goed uit te voeren. Deze kennis kan liggen op toegepast technisch, natuurwetenschappelijk, bestuurlijk-juridisch of sociaalwetenschappelijk gebied.

STOWA werkt in hoge mate vraaggestuurd. We inventariseren nauwgezet welke kennisvragen waterschappen hebben en zetten die vragen uit bij de juiste kennisleveranciers. Het initiatief daarvoor ligt veelal bij de kennisvragende waterbeheerders, maar soms ook bij de kennisinstellingen en het bedrijfsleven. Dit tweerichtingsverkeer stimuleert vernieuwing en innovatie. Vraaggestuurd werken betekent ook dat we zelf voortdurend op zoek zijn naar de 'kennisvragen van morgen'- de vragen die we graag op de agenda zetten nog voordat iemand ze gesteld heeft - om optimaal voorbereid te zijn op de toekomst.

STOWA ontzorgt de waterbeheerders. Wij nemen de aanbesteding en begeleiding van de gezamenlijke kennisprojecten op ons. Wij zorgen ervoor dat waterbeheerders verbonden blijven met deze projecten en er ook 'eigenaar' van zijn. Dit om te waarborgen dat de juiste kennisvragen worden beantwoord. De projecten worden begeleid door commissies waar regionale waterbeheerders zelf deel van uitmaken. De grote onderzoekslijnen worden per werkveld uitgezet en verantwoord door speciale programmacommissies. Ook hierin hebben de regionale waterbeheerders zitting.

STOWA verbindt niet alleen kennisvragen en kennisleveranciers, maar ook de regionale waterbeheerders onderling. Door de samenwerking van de waterbeheerders binnen STOWA zijn zij samen verantwoordelijk voor de programmering, zetten zij gezamenlijk de koers uit, worden meerdere waterschappen bij één en het zelfde onderzoek betrokken en komen de resultaten sneller ten goede van alle waterschappen.

DE GRONDBEGINSELEN VAN STOWA ZIJN VERWOORD IN ONZE MISSIE:

Het samen met regionale waterbeheerders definiëren van hun kennisbehoeften op het gebied van het waterbeheer en het voor en met deze beheerders (laten) ontwikkelen, bijeenbrengen, beschikbaar maken, delen, verankeren en implementeren van de benodigde kennis.

stowa

STICHTING
TOEGEPAST ONDERZOEK WATERBEHEER

stowa@stowa.nl www.stowa.nl
TEL 033 460 32 00
Stationsplein 89 3818 LE Amersfoort
POSTBUS 2180 3800 CD AMERSFOORT

