

# eDNA-METABARCODING VISSSEN

Onderzoek naar de mogelijke  
toepassing van eDNA voor de KRW  
vismonitoring (2018-2021)



# **eDNA-METABARCODING VISSSEN**

Onderzoek naar de mogelijke  
toepassing van eDNA voor de KRW  
vismonitoring (2018-2021)



# COLOFON

---

**STOWA-nummer** 2022-30

**ISBN** 978.90.5773.991.0

**Download**

Dit rapport is beschikbaar als pdf op [www.stowa.nl](http://www.stowa.nl)

Check Bibliotheek > Publicaties > STOWA 2022-30

**Publicatie**

STOWA | P.O. Box 2180 | 3800 CD Amersfoort

Oktober 2022 © STOWA

### **Samenstellers**

Jelger Herder, Mark Groen & Jan Kranenburg

### **Projectleider**

Jelger Herder

### **Opdrachtgevers**

STOWA, Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier, Hoogheemraadschap van Delfland, Waternet, Waterschap Aa en Maas, Waterschap Brabantse Delta, Waterschap Drents Overijsselse Delta, Waterschap Hollandse Delta, Waterschap Rijn & IJssel, Waterschap Rivierenland, Waterschap Scheldestromen, Waterschap Vechtstromen, Waterschap Zuiderzeeland, Wetterskip Fryslân

### **Fotografie**

Jelger Herder

### **Design**

Shapeshifter.nl | Utrecht

### **Wijze van citeren**

Herder, J.E, M. Groen & J. Kranenburg, 2022. eDNA-metabarcoding vissen. Onderzoek naar de mogelijke toepassing van eDNA voor de KRW vismonitoring (2018-2021). RAVON/STOWA rapport 2022-30.

### **Copyright**

The information in this publication may be used, provided the source is acknowledged. The knowledge in this report, developed or accumulated, is available free of charge. Costs STOWA charges for publications, are only costs for design, printing and shipping.

### **Disclaimer**

This report is based on current insights and has been put together with care. Nevertheless, the results should be critically considered during application. The authors and STOWA may not be held liable for any damages resulting from the application of the information in this report.



## **INHOUDSOPGAVE**

2 | **COLOFON**

66 | **STOWA IN HET KORT**

6	<b>TEN GELEIDE</b>	27	
8	<b>1 INLEIDING</b>	31	
8	1.1 Kader	32	
10	1.2 Doelen en onderdelen project 2018-2021	32	
12	<b>2 MATERIAAL EN METHODEN</b>	34	
12	2.1 Selectie waterlichamen	38	
13	2.1.1 Watertype categorieën	41	
13	2.1.2 Gekozen waterlichamen		
14	2.2 Opbouw KRW-maatlatten		
15	2.3 KRW-visbemonsteringen		
15	2.4 eDNA bemonsteringen en monsterstrategie		
16	2.5 eDNA analyses		
16	2.6 Handmatige validatie eDNA gegevens		
16	2.7 Toewijzing soorten eDNA		
20	2.8 Berekening EKR-scores		
21	2.9 Analyses		
21	<b>3 RESULTATEN</b>		
21	3.1 In beeld brengen visgemeenschap		
22	3.1.1 Trefkans per soort		
23	3.1.2 Soorten gemist met eDNA		
24	3.1.3 Soorten gemist in de KRW-bevissing		
25	3.2 Aantal aangetroffen soorten per KRW-waterlichaam		
26	3.3 Vergelijking EKR-scores		
26	3.3.1 Totaalscores		
27	3.3.2 Deelmaatlatten lijnvormige stilstaande wateren		
28	3.3.3 Deelmaatlatten Meren en Plassen		
			3.3.4 Deelmaatlatten brakke wateren
			3.3.5 Deelmaatlatten stromende wateren
			3.4 De potentie van eDNA voor karakterisering van de visgemeenschap
			3.4.1 Clusteranalyses naar watertype-categorie
			3.4.2 Clusteranalyse naar EKR-klasse
			3.4.3 Paarsgewijze vergelijking
			3.5 Uitwisseling van kennis
			<b>4 DISCUSSIE</b>
			4.1 Trefkans van voor soorten met eDNA en KRW-bevissing
			4.2 Aantal soorten per waterlichaam
			4.2.1 Soortdetectie in lijnvormig stilstaand water
			4.2.2 Soortdetectie in brakke wateren
			4.2.3 Soortdetectie in meren en plassen
			4.2.4 Soortdetectie in stromend water
			4.3 EKR-scores berekend met gegevens eDNA en KRW-bevissing
			4.3.1 Lijnvormige stilstaande wateren
			4.3.2 Brakke wateren
			4.3.3 Meren en plassen
			4.3.4 Stromende wateren
			4.4 Potentie van de eDNA-methode voor karakterisering van de visgemeenschap
			4.5 Potentie van de eDNA-methode voor EKR-beoordeling
			<b>5 CONCLUSIES</b>
			<b>LITERATUUR</b>
			<b>BIJLAGEN</b>



# ➔ TEN GELEIDE

**eDNA-analyse heeft de potentie om in de toekomst de samenstelling van de visgemeenschap eenvoudiger, vollediger én goedkoper in beeld te brengen.**

Om een beeld te krijgen van de ecologische toestand van watersystemen monitoren waterbeheerders de visstand, één van de 'kwaliteitselementen' van de Kaderrichtlijn Water (KRW). Momenteel gebeurt dit voornamelijk met behulp van sleepnetten en elektrovisserij. Nadelen van deze methoden zijn dat de effectiviteit ervan beïnvloed wordt door lokale en weersomstandigheden zoals de waterdiepte, de aanwezigheid van structuur (o.a. waterplantenbedekking), het doorzicht, de mate van stroming, de temperatuur en wind-kracht/richting.

Sinds 2013 is onderzocht in hoeverre het mogelijk is om via het achtergelaten DNA de samenstelling van de visgemeenschap in beeld te brengen. In dit rapport is beschreven in hoeverre de environmental DNA (eDNA) methode een alternatief kan zijn voor het vissen met traditionele vangtuigen.

De methode blijkt potentie te hebben. De samenstelling van de visgemeenschap is, zeker in stromende wateren, nauwkeurig te analyseren. In stilstaande wateren zijn er soms nog omstandigheden (humuszuren, zwevende stof) die de analyse vertroebelen.

Toepassing van de techniek brengt in de meeste situaties zelfs meer soorten in beeld dan via de traditionele bemonstering.

Het aantal DNA-analyses in het milieuonderzoek neemt snel toe de laatste jaren, waardoor de kosten per analyse sterk gedaald zijn. Die kosten zullen in de komende jaren verder dalen. Dat wekt de verwachting dat in de toekomst bij gelijkblijvend budget meer monsters genomen kunnen worden, waardoor het mogelijk wordt de kwaliteit van de visstand zowel in de ruimte, als in de tijd beter in beeld te brengen. Dat biedt de waterbeheerders inzicht en helpt hen bij het kiezen van nieuwe verbeteringsmaatregelen en bij het volgen van het effect van reeds genomen maatregelen.

Niet onbelangrijk is ook dat toepassing van de DNA-techniek veel minder verstorend is dan het vissen met de traditionele vangtuigen.

De inzet van DNA-technieken past nog niet als methode voor gegevensverzameling bij de huidige KRW-maatlatten. De STOWA is gestart met een onderzoek waarin wordt gezien of de techniek, in combinatie met nieuwe ecologische maatlatten, wel kan worden benut bij de monitoring na 2027. In 2023 zullen daartoe een of enkele pilots worden uitgevoerd.

**JOOST BUNTSMA,  
DIRECTEUR STOWA**





# ➤ 1 INLEIDING

## 1.1 KADER

Om een beeld te krijgen van de ecologische toestand van watersystemen monitoren waterbeheerders de visstand, één van de 'kwaliteitselementen' van de Kaderichtlijn Water (KRW). Momenteel gebeurt dit voornamelijk met behulp van sleepnetten en elektrovisserij, volgens de methode van het Handboek Hydrobiologie. Nadelen van deze methoden zijn dat de effectiviteit ervan beïnvloed wordt door lokale en weersomstandigheden zoals de waterdiepte, de aanwezigheid van structuur (o.a. waterplantenbedekking), het doorzicht, de mate van stroming, de temperatuur en windkracht/richting. Sinds 2013 wordt onderzocht in hoeverre de innovatieve environmental DNA (eDNA) methode een alternatief kan zijn voor het

vissen met traditionele vangtuigen. Middels eDNA-metabarcoding is het mogelijk alle vissoorten in een enkel watermonster te analyseren. Eerder onderzoek met behulp van de methode is uitgevoerd door RAVON met cofinanciering van STOWA en 15 waterschappen (Herder *et al.*, 2014; Herder & Kranenbarg 2017). De gehanteerde methoden en een deel van de resultaten zijn daarnaast in 2016 wetenschappelijk gepubliceerd in *Molecular Ecology* (Valentini *et al.*, 2016).

De innovatieve eDNA methode, die de aanwezigheid van soorten bepaalt op basis van DNA sporen in het water, heeft de volgende voordelen (zie Herder & Kranenbarg, 2017):

- Een hoge mate van standaardisering. De trefkans van eDNA, wordt in vergelijking tot het vissen met traditionele vangtuigen, minder beïnvloed door lokale omstandigheden.
- Een zeer hoge trefkans. Op traject- en waterlichaamniveau worden met eDNA gemiddeld meer vissoorten aangetroffen dan in de KRW-visstandbemonstering.
- Verhoudingen in eDNA tussen soorten zijn nauwkeurig en reproduceerbaar te meten. Dit biedt potentie om ook het relatieve voorkomen van soorten in beeld te brengen.
- Relatief geringe kosten: 2 a 4 eDNA monsters zijn voldoende om een waterlichaam te bemonsteren (0,5-1 mandag werk en analysekosten), terwijl bij een visbemonstering vaak 2 tot 3 mensen één of meerdere dagen aan het vissen zijn.
- Diervriendelijk: vissen hoeven niet gevangen te worden waardoor bij eDNA geen verstoring en/of beschadigingen aan vissen optreedt.
- Identificatie: in enkele gevallen zijn soorten op basis van eDNA te onderscheiden waarbij dat op basis van uiterlijke kenmerken lastig of niet mogelijk is.

De kans is daarom aanwezig dat de eDNA methode in de toekomst geïntegreerd zal worden in de KRW-monitoring voor vissen en mogelijk ook voor de andere aquatische soortgroepen. Sinds 2017 participeert Nederland in het Europese onderzoeksnetwerk DNAqua.net. Eén van de thema's binnen dit netwerk is het ontwikkelen van standaarden voor eDNA-toepassingen (zie kader).

#### **KADER: EUROPESE SAMENWERKING IN DNAQUA.NET**

*Gefinancierd door de Europese Commissie loopt sinds 2017 het Europese project DNAqua.net. Een hoofddoel van dit project is het identificeren van een standaard voor eDNA-toepassingen bij monitoring. Het betreft een samenwerking tussen wetenschappers, waterbeheerders, politici en andere belanghebbenden. Tijdens symposia en in werkgroepen wordt kennis gedeeld en wordt contact onderhouden met ECOSTAT (voor de maatlatten) en CEN (voor Europese standaardisatie).*

*Er zijn vijf werkgroepen: WG1: Barcode referenties (voor herkenning DNA-sequenties), WG2: Maatlatten, WG3: monster en analyse protocollen, WG4: gegevensanalyse & -opslag en WG5: Implementatiestrategie & juridische kwesties. Nederland vervult een voortrekkersrol op het gebied van eDNA en vissen. Naturalis en STOWA zijn vertegenwoordigers van Nederland in het 'Management Committee' en RAVON leidt de sub-werkgroep eDNA maatlatten vissen (en daarnaast participeert RAVON in andere werkgroepen). Binnen deze subwerkgroep wordt onder andere in overleg met andere landen verkend of het mogelijk is de huidige maatlatten met beperkte aanpassingen gebruikt kunnen worden met eDNA data of dat er grote aanpassingen nodig zijn. Door de participatie in DNAqua.net kan Nederland inbreng en sturing geven aan het proces van Europese standaardisatie.*

## 1.2 DOELEN EN ONDERDELEN PROJECT 2018-2021

Het hoofddoel van het project van 2018-2021 is: het beoordelen van de geschiktheid van de huidige maatlatten voor eDNA gegevens. Hiervoor is gekeken naar de volgende onderzoeksvragen:

1. Kunnen de met eDNA verkregen gegevens in de huidige maatlatten worden gebruikt voor het verkrijgen van vergelijkbare EKR-scores?
2. Welke eDNA-parameters zijn het meest verklarend voor de EKR scores (gradiënt in degradatie van wateren) en zouden daarmee gebruikt kunnen worden voor op eDNA-gebaseerde maatlatten.

Om dit te onderzoeken is het van belang voldoende gegevens uit verschillende watertypen te verzamelen. Hiertoe is de dataset in de periode 2018-2021 uitgebreid zodat alle regio's en watertypen vertegenwoordigd zijn met daarbinnen de gradient van wateren met een hoge tot een lage ecologische kwaliteit.

Tot slot was uitwisseling van kennis en gegevens met andere Europese landen en afstemming van methoden en maatlatten via [DNAqua.net](https://DNAqua.net).





## 2 MATERIAAL EN METHODEN

### 2.1 SELECTIE WATERLICHAMEN

Bij het selecteren van de waterlichamen is rekening gehouden met een goede vertegenwoordiging van alle regio's en watertypen met daarin een gradiënt van wateren van een hoge tot een lage EKR-score. Hiervoor is bij de deelnemende waterschappen opgevraagd welke waterlichamen er in 2018, 2019 en 2020 voor de KRW bemonsterd werden op vis. Hierbij is ook informatie opgevraagd/opgezocht over de bijbehorende KRW-watertypen en de meest recente EKR-scores voor vissen. EKR staat voor Ecologische Kwaliteit Ratio en is een score die berekend wordt via zogenaamde maatlatten. De EKR geeft een beoordeling voor de ecologische kwaliteit van een waterlichaam.

### 2.1.1 Watertype categorieën

Er zijn ruim twintig verschillende KRW-watertypen (bv, M1, M30, R5, etc.). Omdat het niet mogelijk is om per individueel KRW-waertype een voldoende grote dataset te verzamelen, is ervoor gekozen om de watertypen te aggregeren op basis van vorm (lijnvormig vs. meren), stroomsnelheid (stilstaand vs. stromend) en zoutgehalte (brakke wateren apart). Hierbij is onderscheid gemaakt in de volgende watertype-categorieën:

- Lijnvormig stilstaand water (Sloten, Kanalen en poldersystemen)
- Meren/plassen
- Brakke wateren
- Stromende wateren (R-typen (langzaam) stromende beken/rivieren)

Een bijkomend voordeel is dat de vismaatlatten van de watertypen binnen de watertype-categorieën op dezelfde manier zijn opgebouwd, waardoor ze gezamenlijk geanalyseerd kunnen worden. Paragraaf 2.2 geeft een overzicht van de deelmaatlatten die gebruikt worden binnen de watertype-categorieën en een toelichting op de berekeningswijze van de EKR-scores.

### 2.1.2 Gekozen waterlichamen

Per watertype-categorie (zie paragraaf 2.1.1) zijn over alle waterschappen gezamenlijk 12 tot 30 KRW-waterlichamen geselecteerd. De waterlichamen zijn geselecteerd op basis van de hierboven beschreven criteria en gekozen in overleg met de waterschappen. Hierbij is gebruik gemaakt van de meest recente EKR-scores (vorige bemonstering). Dit gaf de beste kans op een goede verdeling over de gradiënt van EKR-scores. In totaal zijn er 72 waterlichamen geselecteerd en bemonsterd in de periode 2018-2020. Hiernaast zijn ook de gegevens van acht waterlichamen uit 2016, die op vergelijkbare wijze bemonsterd zijn, gebruikt. Evenals de gegevens van de Oude IJssel uit 2019, welke verzameld zijn in het kader van een ander project van Waterschap Rijn & IJssel. Het totaal aantal waterlichamen in de dataset komt hiermee op 81. Tabel 1 geeft een overzicht van het aantal bemonsterde waterlichamen per watertype-categorie en EKR-klasse (verkregen uit de laatste bemonstering die parallel was aan de eDNA bemonstering).

**TABEL 1**

*Verdeling van de binnen het project bemonsterde waterlichamen over de watertype-categorieën en verschillende EKR-klassen. Gegeven zijn het aantal onderzochte waterlichamen per EKR-klasse voor de vier watertype categorieën Zie bijlage 6 voor een overzicht van alle waterlichamen en bijbehorende KRW-typen.*

Lijnvormig stilstaand water	
slecht	0
ontoereikend	2
matig	10
goed	12
zeer goed	6

Brak water	
slecht	1
ontoereikend	9
matig	2
goed	0
zeer goed	0

Meren/plassen	
slecht	2
ontoereikend	7
matig	3
goed	4
zeer goed	1

Stromend water	
slecht	8
ontoereikend	12
matig	1
goed	1
zeer goed	0

Voor deze EKR-klasse is de volgende indeling gehanteerd: tot <0,2 = slecht, 0,2-0,4 = ontoereikend, 0,4-0,6 = matig, 0,6-0,8 = goed en vanaf 0,8 = zeer goed (\* zie voetnoot). Figuur 1 geeft een kaart met het overzicht van de bemonsterde waterlichamen waarbij de spreiding over Nederland zichtbaar is.

## 2.2 OPBOUW KRW-MAATLATTEN

Voor het berekenen van de EKR-scores voor vissen zijn maatlatten ontwikkeld. Het type maatlat dat gebruikt wordt komt overeen binnen de vier watertype-categorieën en lijnvormige stilstaande wateren, meren/plassen, brakwater en stromende wateren. De klassengrenzen en bijbehorende scores kunnen wel verschillen tussen de watertypen binnen een watertype-categorie. Bijvoorbeeld doordat er minder vissoorten voorkomen in kleine beken in vergelijking tot rivieren. Hieronder beschrijven we per watertype-categorie de deelmaatlatten:

### Lijnvormig stilstaand water (M1, M1a, M3, M6, M6a, M6b en M7)

Bestaat uit drie deelmaatlatten waarvan één gebaseerd op aantal soorten en twee op abundantie:

- Totaal aantal plantminnende en migrerende soorten
- Biomassa aandeel karper/brasem
- Biomassa aandeel plantminnende soorten

### Meren/Plassen (M14, M20 en M27)

Bestaat uit vier deelmaatlatten gebaseerd op abundantie:

- Biomassa aandeel karper/brasem
- Biomassa aandeel plantminnende soorten
- Biomassa aandeel baars en blankvoorn als percentage van alle eurytopen
- Biomassa aandeel zuurstoftolerante soorten

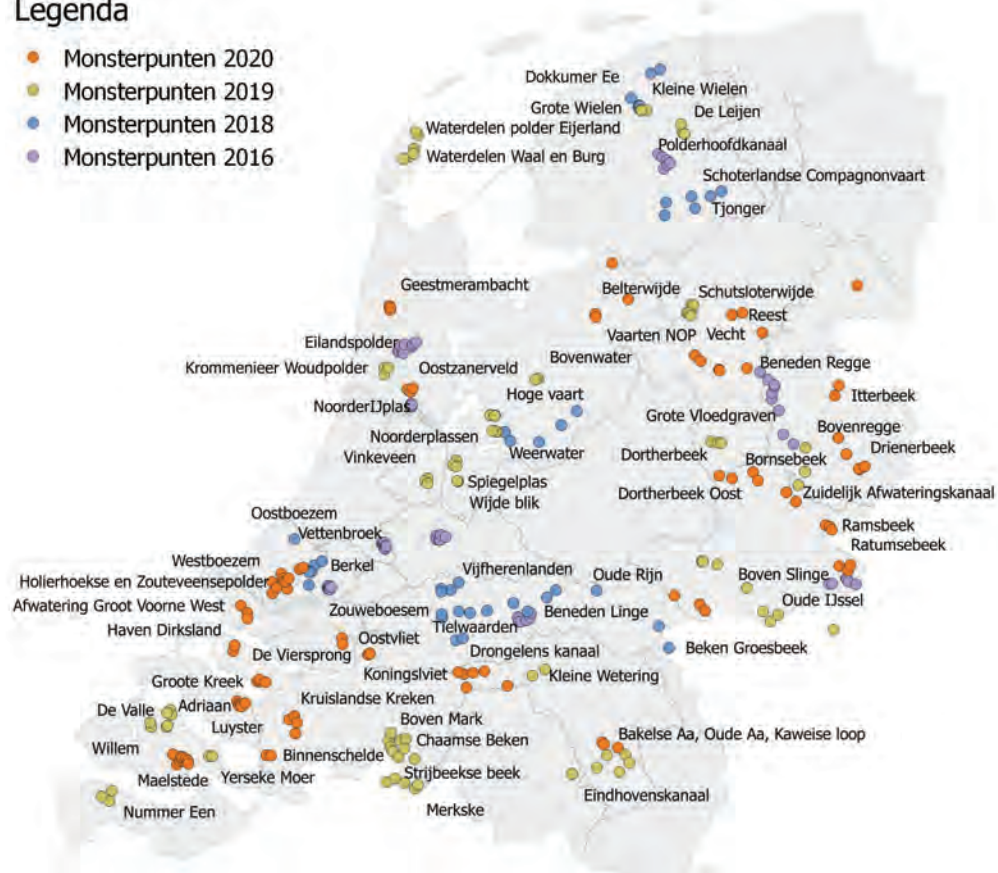
\* Dit betreft de indeling voor wateren met de status natuurlijk en de default voor kunstmatige wateren. Bij kunstmatige wateren wordt echter alles boven de 0,6 als goed beoordeeld en ontbreekt de klasse zeer goed. Voor de sterk veranderde wateren wijken de grenzen van de daadwerkelijke, afgeleide doelen, de GEP's (meestal) af en dat geldt ook voor een deel van de kunstmatige wateren.

FIGUUR 1

De in 2016 en 2018 t/m 2020 bemonsterde waterlichamen.

### Legenda

- Monsterpunten 2020
- Monsterpunten 2019
- Monsterpunten 2018
- Monsterpunten 2016



### Brakke wateren (M30 en M31)

Bestaat uit twee keer vier (M31) of vijf (M30) deelmaatlatten gebaseerd op zowel het aantal soorten als abundantie:

- Migratie zoet-zout: aantal soorten en biomassa CA (diadroom)
- Brakwater als habitat: aantal soorten en biomassa ER (estuariën resident)
- Verbinding met de zee: aantal soorten en biomassa MJ (mariën juveniel) + MS (mariën seizoensgast)
- Verbinding met zoet: aantal soorten en biomassa Z1 (matig brak) + Z2-(licht brak)
- Plantenrijkdom (zwak-brak): aantal soorten en biomassa Z3\_ZOET (enkel M30)

### Stromende wateren (R4, R5, R6, R7, R12 en R20)

De meeste stromende wateren bestaan uit vier deelmaatlatten waarvan drie gebaseerd op aantal soorten en één op abundantie:

- Aantal rheofiele soorten
- Aantal migrerende soorten
- Relatieve aantal plantminnende soorten
- Aantalsaandeel rheofielen

De moerasbeek (R20) bestaat uit 5 deelmaatlatten waarvan 3 gebaseerd op aantal soorten (rheofiele, migrerende en plantminnende soorten) en twee op abundantie (relatieve aantalsabundantie plantminnende en rheofiele soorten)

### Berekeningswijze EKR

Voor de meren/plassen en brakke wateren worden de vangsten per waterlichaam geaggregeerd tot soortenlijsten, aantallen en biomassa per hectare waarna de EKR-score voor het waterlichaam als geheel wordt berekend. Voor de lijnvormige

stilstaande wateren en stromende wateren worden EKR-scores per monsterpunt berekend waarna deze (gewogen) worden gemiddeld voor de EKR-score voor het waterlichaam.

### 2.3 KRW-VISBEMONSTERINGEN

De KRW-visbemonsteringen zijn uitgevoerd door de adviesbureaus ATKB, Bureau Waardenburg, Stichting Zeeschelp, Visadvies, Visserij Service Nederland of door het waterschap zelf (Waterschap Rijn & IJssel). De toegepaste methodieken betroffen doorgaans elektrisch vissen (met Deka, Brettschneider of aggregaat) of zegen en in de helft van de gevallen een combinatie van beiden. Op enkele locaties is daarnaast ook gevist met een stortkuil of fuiken. De KRW-visbemonsteringen zijn uitgevoerd volgens het Handboek Hydrobiologie (STOWA, 2014).

De gegevens zijn door RAVON verkregen van de uitvoerende partijen en geüniformeerd:

1. Ruwe vangstgegevens: de gevangen soorten, lengtes, aantallen per locatie, datum en vangtuig.
2. Visbestandschattingen: hiervoor is gebruik gemaakt van de door de adviesbureaus en waterschappen aangeleverde visbestandschattingen. Deze zijn uitgevoerd conform het Handboek Hydrobiologie waarbij rekening is gehouden met de weging van deelwaterlichamen en methoden.

### 2.4 eDNA BEMONSTERINGEN EN MONSTERSTRATEGIE

#### Timing

De eDNA bemonsteringen zijn allemaal uitgevoerd in dezelfde periode die beschreven staat voor het uitvoeren van de KRW-visstandbemonsteringen (tussen juli en eind oktober). Op een enkele uitzondering na zijn ze uitgevoerd voorafgaand aan de KRW-bevissingen in overleg met de uitvoerende partijen. 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 een enkel geval zijn de eDNA-bemonsteringen uitgevoerd

---

\* Zie voor de soorten behorende bij de deelmaatlatten bijlage 11 van het rapport referenties en maatlatten voor natuurlijke watertypen voor de kaderrichtlijn water 2021-2027 (STOWA 2021).



na de KRW-bevissing. Deze zijn dan minimaal een week na de visbemonstering uitgevoerd om te voorkomen dat deze de resultaten kon beïnvloeden.

### Aantal monsters per waterlichaam

Het onderzoek uit 2016 (Herder & Kranenbarg, 2017) heeft laten zien dat een monsterstrategie met twee tot drie eDNA-mengmonsters voldoende informatie geeft over de voorkomende soorten (17% meer soorten aangetoond dan in visstandbemonstering) en verhouding in eDNA-sequenties tussen soorten (zeer vergelijkbare verhoudingen t.o.v. drie keer zo veel losse eDNA monsters). In het onderzoek van 2016 ontbraken echter zeer grote waterlichamen, bij dergelijke waterlichamen zou een steekproef van drie eDNA-monsters onvoldoende representatief zijn t.o.v. het grote oppervlak. Daarom zijn voor zeer grote waterlichamen richtlijnen aangehouden vanuit het handboek hydrobiologie voor het minimaal te bemonsteren percentage oppervlak voor de KRW. Er is in dit

onderzoek uiteindelijk uitgegaan van drie eDNA mengmonsters per waterlichaam met daarop drie uitzonderingen:

1. Zeer grote waterlichamen -> wanneer 3 eDNA mengmonsters gezamenlijk minder dan 7,5% van een waterlichaam besloegen (bv bij zeer lange vaarten) dan is aangehouden dat minimaal 7,5% van het oppervlakte bemonsterd wordt conform de KRW-richtlijnen.
2. In stromende wateren is naast opname van alle representatieve habitats in de bemonstering ook rekening gehouden met verschillende stuwpannen. Hierdoor zijn in enkele gevallen meer dan 3 monsters verzameld.
3. Zeer kleine waterlichamen -> voor waterlichamen waarbinnen twee of minder KRW-trajecten lagen is uitgegaan van een bemonstering vergelijkbaar met de geplande KRW-visstandbemonstering. Hier zijn in enkele gevallen slechts twee eDNA mengmonsters verzameld waarmee het gehele waterlichaam gedekt werd.

### Bemonsteringsstrategie / trajecten

Voor de bemonsteringsstrategie is onderscheid gemaakt tussen kleine stilstaande lijnvormige wateren, grote stilstaande lijnvormige wateren, meren/plassen en stromend water. Er is geen onderscheid gemaakt tussen brak en zoet water, enkel dus op de vorm van het waterlichaam en de stroming. Hieronder worden de monster strategieën beschreven:

#### Kleine stilstaande lijnvormige wateren

Dit gaat om kleine ondiepe sloten en watergangen waar met een boot moeilijk te bemonsteren is. In deze watergangen bestaat een eDNA mengmonster uit 10 liter water verzameld middels kleine schepjes in een grote emmer met daarin een steriele verzamelzak.

#### Grote stilstaande lijnvormige wateren

Dit gaat om kanalen, vaarten, brede sloten en poldersystemen. Deze zijn bemonsterd met een boot. Per eDNA mengmonster is een traject van 1600 meter bemonsterd waarbij 45 liter water is verzameld in een ton met daarin een 60 liter steriele verzamelzak. Het water is al varend continu opgepompt voor de boot uit. Hierbij is om de 100 meter gewisseld tussen rechteroever, midden, linkeroever en vice versa. Op deze manier worden de oever en middenzone representatief bemonsterd (25% rechteroever, 50% midden en 25% linkeroever). Zie het schema hieronder in figuur 2 waarin de bemonsteringsstrategie wordt weergegeven.

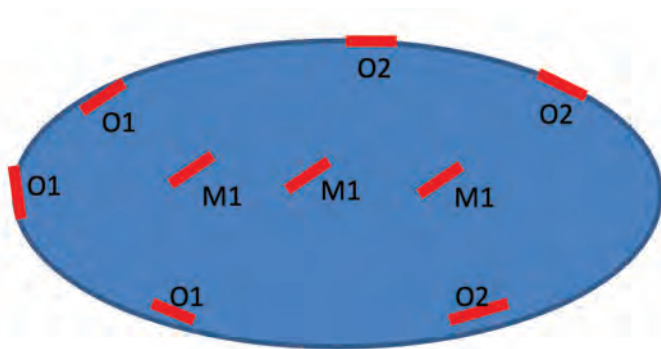
### FIGUUR 2

*Bemonsteringsstrategie grote stilstaande lijnvormige wateren met een boot. Om en om wordt om de 100 meter één van beide oevers of het midden bemonsterd. Gegeven is het schema voor de eerste 800 meter, de tweede 800 meter volgt hetzelfde schema.*



### FIGUUR 3

Bemonsteringsstrategie meren/plassen met een boot. In totaal zijn 3 eDNA mengmonsters verzameld van ieder 3 subtrajecten van 750 meter (= 2250 meter per mengmonster). Hierbij gaat het om twee mengmonsters in de oevers (O1 en O2: met ieder 3 subtrajecten) en eentje in het open water (M1: met 3 subtrajecten).



#### Meren en plassen

Meren/plassen zijn bemonsterd met een boot. Er zijn per meer/plas drie eDNA mengmonsters verzameld waarvan twee langs de oever en één in open water. Per eDNA mengmonster is in totaal een traject van 2250 meter bemonsterd, bestaande uit drie subtrajecten van 750 meter. Hierbij is in totaal 45 liter water verzameld in een ton met daarin een steriele verzamelzak van 60 liter. Het water is al varend continu voor de boot opgepompt. Zie het schema hieronder in figuur 3 waarin de bemonsteringsstrategie schematisch wordt weergegeven.

#### Stromend water

R-typen die in werkelijkheid niet of nauwelijks stroomden en de zeer grote (langzaam) stromende wateren (zoals de Vecht) zijn bemonsterd met dezelfde

methode als stilstaande lijnvormige wateren. Voor de overige stromende wateren (beken en kleine rivieren) is vanaf de oever of wadend per mengmonster van 2 of 3 subtrajecten van ieder 250 meter 10 liter water met kleine schepjes verzameld in een emmer met steriele verzamelzak van 20 liter (afhankelijk van de grootte van de beek en het aantal stuwpannen). De totale 20 a 30 liter water is vervolgens gefilterd als één mengmonster. De binnen de mengmonsters verzamelde trajecten zijn vergelijkbaar aan elkaar. Over het algemeen is er één mengmonster met trajecten uit de benedenloop verzameld, één mengmonster uit de middenloop en één mengmonster uit de bovenloop. Hierbij is rekening gehouden met opname van verschillende stuwpannen en een representatieve bemonstering over het waterlichaam. Bij het waden is altijd vanaf benedenstrooms naar bovenstrooms bemonsterd om eventuele contaminatie uit te sluiten. Zie het schema hieronder in figuur 4 waarin de bemonsteringsstrategie schematisch wordt weergegeven.

#### Monstermethode

Het water uit de verzamelde mengmonsters is direct in het veld gefiltreerd middels een peristaltische pomp en speciaal voor eDNA ontwikkelde VigiDNA filters (poriegrootte 0,45µm). Deze filters kunnen grote volumes aan water filtreren. In schoon water is de volledige 45 liter gefiltreerd, in troebel water minder, maar vaak nog altijd boven de 8 liter. In een enkel geval sloeg het filter al dicht bij slechts 1 a 2 liter (Eilandspolder en Binnenschelde). Door het water eerst in de verzamelzak te verzamelen en goed te mengen is dan toch een representatieve bemonstering van het hele traject verkregen wanneer niet al het water gefiltreerd kan worden.

#### Conservering en verzending

Direct na de filtratie zijn de filters voorzien van een conserveringsbuffer. Deze buffer stopt de verdere afbraak van eDNA. De filters worden in kartonnendoosjes gedaan (geen licht meer van buiten). De filters zijn vervolgens op het RAVON kantoor bij kamertemperatuur bewaard tot aan verzending. Alle monsters zijn binnen een maand na monsternamen per koerier naar het laboratorium in Frankrijk verstuurd.

## 2.5 eDNA ANALYSES

### Gebruikte primers

In dit onderzoek zijn universele primers gebruikt die al het DNA van vissen vermeerderen (eDNA-metabarcoding). 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 prikken 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 aan weerszijden van het frag-

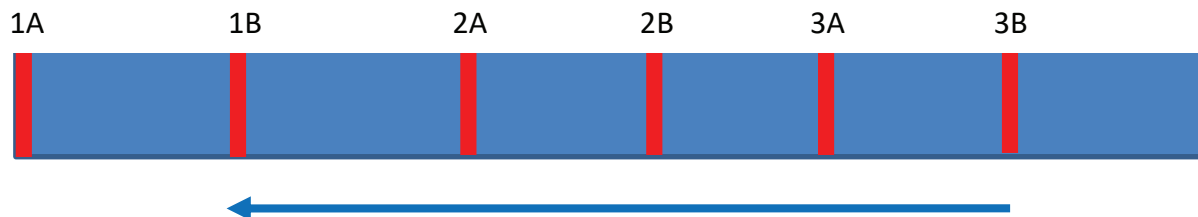
ment dat vermeerderd wordt op conservatieve stukjes DNA die nagenoeg gelijk zijn gebleven tussen de verschillende vissoorten. Desalniettemin kan het zijn dat er bij bepaalde soorten enkele baseparen gemuteerd zijn. Dit geeft zogenaamde mismatches, de primer kan dan nog steeds binden maar iets minder 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 (bijvoorbeeld Thomsen *et al.*, 2012 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). Door gebruik te maken van tags op de primers is het mogelijk aan het eind van de analyse per individuele PCR (dus 12 per monster) de resultaten te krijgen. Dit hoge aantal PCRs per monster is noodzakelijk voor detectie van zeldzame soorten (Ficetola *et al.*, 2015). 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) waarmee gecheckt wordt op eventueel aanwezige contaminatie. 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

### FIGUUR 4

Bemonsteringsstrategie stromende R-typen. Schematisch voorbeeld met drie mengmonsters (pijl eronder geeft de stroomrichting). Ieder mengmonster bestaat uit twee (of drie) subtrajecten van 250 meter. Subtrajecten 1A en 1B vormen het benedenstroomse mengmonster, 2A en 2B het middenstroomse mengmonster en 3A en 3B het bovenstroomse mengmonster.



controles samen laten zien dat er geen besmetting is geweest tijdens de analyse en dat de analyse goed verlopen is. De analyses zijn uitgevoerd door het Franse SPYGEN dat 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 individuele PCR (dus 12 verschillende per monster) unieke “tags” zijn toegevoegd. Dit zijn korte stukjes DNA code. Op die manier kan achteraf gezien worden welk fragment bij welke PCR 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 10 keer voorkwamen in een enkele PCR 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 minimaal 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 PCR, per monster. Gemiddeld zijn er per monster na het toepassen van de filters 400.000 sequenties overgebleven.

### 2.6 HANDMATIGE VALIDATIE EDNA GEGEVENS

Naast het toepassen van de onder paragraaf 2.5 beschreven bioinformatische filters is de overgebleven dataset handmatig gevalideerd. Bekend is dat soorten die veel geconsumeerd worden zoals regenboogforel, zalm, kabeljauw etc. ook eDNA sporen achterlaten. Voor deze soorten is op basis van expert judgement bepaald of een detectie met eDNA wijst op het werkelijk voorkomen van de soort. Detecties van soorten op locaties waarvan niet verwacht wordt dat de soorten er werkelijk voorkomen (bijvoorbeeld kabeljauw in zoetwater) zijn uit de dataset gehaald. Hiervoor is gebruik gemaakt van de kennis over de verspreiding van vissoorten in Nederland en ook de vangsten uit de KRW-bevissingen als directe vergelijking.

### 2.7 TOEWIJZING SOORTEN EDNA

Enkele soorten zijn niet van elkaar te onderscheiden op basis van het eDNA fragment waar de primers zich op richten en daardoor niet op soort te brengen maar bijvoorbeeld enkel tot op geslacht. Veelal komt maar één van de soorten uit zo een geslacht voor op de locaties en konden de eDNA-sequenties toch aan een soort worden toegewezen. In het ruwe databestand zitten deze originele gegevens. Om toch de EKR-berekeningen te kunnen uitvoeren zijn de volgende toewijzingen zijn gedaan in het werkbestand:

- *Cobitis elongatoides* -> dit betreffen de bastaardmodderkruipers (hybride kleine modderkruipers) die op basis van uiterlijke kenmerken nagenoeg niet te onderscheiden zijn van de kleine modderkruiper. In de KRW-bevissingen worden deze ook allemaal genoteerd als kleine modderkruiper. Gekozen is om deze sequenties dan ook allemaal toe te wijzen aan kleine modderkruiper.
- *Gobio sp* -> dit betreft het geslacht van de riviergrondel. In Nederland komt enkel de riviergrondel voor uit dit geslacht (witvinriviergrondel behoort tot het ge-

- slacht *Romanogobio*). De sequenties zijn dan ook toegewezen aan de riviergrondel.
- *Cottus sp* -> in dit geslacht komen in Nederland enkel de rivierdonderpad en beekdonderpad voor. De beekdonderpad komt slechts voor in Zuid-Limburg en enkele plaatsen in Gelderland. Op basis van verspreiding konden de eDNA-detecties in dit project worden toegekend aan rivierdonderpad.
  - *Lampetra sp* -> in dit geslacht komen in Nederland enkel de beekprik en rivierprik voor. Op basis van de locaties (waar enkel beekprik voorkomt) konden de detecties uit dit project worden toegekend aan de beekprik.
  - *Pomatoschistus sp.* -> in dit geslacht komen in Nederland meerdere soorten grondels voor waaronder brakwatergrondel, dikkopje en Lozano's grondel. Op basis van de locaties en vergelijking met de KRW-vangsten zijn de detecties hier toegekend aan brakwatergrondel (de andere soorten zijn soorten met een voorkeur voor zoutwater en niet te verwachten op de onderzochte locaties).
  - *Coregonus sp.* -> in dit geslacht komen in Nederland de Noordzeehouting en kleine marene voor (nota bene: grote marene blijkt uit genetisch onderzoek dezelfde soort te zijn als Noordzeehouting). Op basis van de verspreiding van beide soorten zijn de waarnemingen in dit project toegekend aan Noordzeehouting.
  - Graskarper/zilverkarper -> deze zijn niet te onderscheiden op basis van het onderzochte eDNA-fragment. In dit onderzoek zijn de detecties toegewezen aan graskarper op basis van de KRW-vangsten en het algemenere voorkomen van deze soort (voor de berekening van de EKR-scores spelen deze soorten geen rol).
  - Giebel/Kroeskarper/Goudvis zijn niet te onderscheiden op basis van het eDNA-fragment waarnaar gekeken is. Voor dit project moest een keuze worden gemaakt aan welke soort deze sequenties worden toegewezen voor het berekenen van de EKR-scores. Hierbij is als uitgangspunt genomen dat de eDNA gegevens onafhankelijk van de KRW-bevissingen gebruikt zouden moeten kunnen worden. Er is dus niet gekeken naar welke soort(en) er gevangen zijn in de KRW-bevissing. Een tweede uitgangspunt was dat de toewijzingen niet tot onterecht hogere EKR-scores mochten leiden, er is daarom gekozen voor toewijzing naar de soort die het minste scoort voor de EKR. Zowel giebel als kroeskarper zijn limnofiele soorten. Kroeskarper scoort daarnaast ook als zuurstoftolerante soort in meren en plassen. De sequenties toewijzen aan kroeskarper zou daarom onjuist zijn om-

dat deze dan onterecht tot een hogere EKR-score kan leiden. Er is daarom gekozen de sequenties voor de EKR-berekeningen toe te wijzen aan giebel. Dit kan wel tot een iets lagere EKR-score leiden wanneer de sequenties eigenlijk van kroeskarper afkomstig waren of van beide soorten.

- Winde/Serpeling -> deze zijn niet te onderscheiden op basis van het onderzochte eDNA fragment. Waar op basis van verspreiding van de soorten een soort was toe te wijzen is dit gedaan. Op locaties waar beide soorten voorkomen is de detectie toegewezen aan winde en niet aan beide soorten. Dit opnieuw vanwege het uitgangspunt dat toewijzingen niet onterecht tot hogere EKR-scores mogen leiden (beide soorten tellen namelijk als rheofiel en migrerend op de deelmaatlaten).

## 2.8 BEREKENING EKR-SCORES

Voor de vergelijking tussen de conventionele KRW-bevissingen en de eDNA bemonsteringsgegevens zijn de EKR-scores berekend met het programma QBWat (Pot, 2021). QBWat maakt gebruik van de nieuwste maatlaten (2021). Om zeker te zijn van een gelijke berekeningswijze voor zowel de gegevens van de conventionele KRW-bevissingen als voor de eDNA-gegevens zijn voor beiden opnieuw EKR-scores berekend in dezelfde versie van QBWat. Hiervoor is gekozen vanwege het volgende:

1. De door de uitvoerders aangeleverde KRW-scores dateerden soms al van enkele jaren terug. Wijzigingen in de berekeningswijze van maatlaten of toewijzingen van waterlichamen aan andere watertypen zouden daardoor tot verschillen in EKR-scores kunnen leiden.
2. In enkele gevallen zijn met eDNA deelwaterlichamen bemonsterd waarvoor geen EKR-scores beschikbaar waren vanuit de uitvoerders.
3. Van de uitvoerders zijn veelal enkel de totale EKR-scores verkregen en niet die van de onderliggende deelmaatlaten. Deze waren wel nodig voor de vergelijkingen in deze rapportage.

Voor het opnieuw berekenen van de EKR-scores gebaseerd op de conventionele KRW-bevissingen is gebruik gemaakt van de bestandschattingen die zijn aangeleverd door de uitvoerende partijen of in enkele gevallen van de ruwe data wanneer bestandschattingen ontbraken.

Voor lijnvormige stilstaande wateren ontbrak de informatie in de ruwe data over monsterpunten, beviste oppervlakten en weging. Bij de berekening worden eerst EKR-scores per monsterpunt berekend die vervolgens gemiddeld worden. Het werken met bestandschattingen als invoer was daardoor niet mogelijk. Er is daarom enkel voor lijnvormige stilstaande wateren gebruik gemaakt van de door de uitvoerders aangeleverde EKR-scores op waterlichaamniveau. Bij stromende wateren zat er in de ruwe data wel informatie over de monsterpunten maar is geen weging toegepast omdat dit voor de eDNA monsters ook niet gedaan is.

## 2.9 ANALYSES

De resultaten van de eDNA-bemonsteringen en de KRW-bevissingen zijn op drie hoofdonderdelen met elkaar vergeleken:

- 1) Op **soorten(rijkdom)** die met een methode kan worden achterhaald. Deze heeft een namelijk een directe invloed op de uiteindelijke EKR-scores. Dit doordat een groot aantal van de deelmaatlatten gebaseerd zijn op aantallen soorten van bepaalde groepen (bijvoorbeeld aantal stromingsminnende soorten). Hierbij is gekeken naar:
  - a. Trefkans per soort met de eDNA-bemonstering en de KRW-bevissing (soortniveau). Dit geeft inzicht in of specifieke soorten vaker of vergelijkbaar worden aangetroffen met de eDNA-bemonstering t.o.v. de KRW-bevissing.
  - b. De (gemiddelde) soortenrijkdom per waterlichaam en watertype-categorie. Dit geeft inzicht of de eDNA-bemonstering een gelijkwaardig, hoger of lager aantal soorten aantoont t.o.v. de KRW\_bevissing. Om te corrigeren voor natuurlijke variatie in soortenrijkdom tussen waterlichamen is het gemiddelde getoetst met een gepaarde t-test.
- 2) Op **EKR-scores**: hierbij is geanalyseerd of de met de eDNA-methode en KRW-bevissing verkregen gegevens vergelijkbare EKR-scores geven. Gekeken is naar de totaalscores en de deelmaatlatten. Door de scores van de deelmaatlatten te berekenen kunnen eventuele verschillen beter verklaard worden.
- 3) Op **visgemeenschap**: hierbij is geanalyseerd of de eDNA gegevens visgemeenschappen op vergelijkbare manier kunnen karakteriseren als de gegevens vanuit de KRW-bevissing. Zo wordt verkend of de met eDNA verkregen gegevens op zichzelf potentie hebben voor het bepalen van de EKR-scores.
  - a. Om de vergelijkbaarheid in visgemeenschappen tussen eDNA en KRW-bevissingen te toetsen zijn er diverse clusteranalyses toegepast. De visgemeenschap is toebedeeld aan watertype-categorie en EKR-klassen verkregen vanuit de KRW-bevissing (inherent aan een watertype-categorie). Elke combinatie is getoetst op basis van drie verschillende eenheden: presentie (aan- of afwezigheid van soorten), aantalsaandeel en biomassa aandeel. Voor de eDNA gegevens is het aandeel in eDNA-sequenties gebruikt aangezien deze methode geen aantallen of biomassa geeft. De clusteranalyses zijn uitgevoerd in R-studio met de package *vegan* (Oksanen *et al.*, 2007). Verschil in groepen (EKR-beoordeling en/of watertype-categorie) is getest door een ongelijkheidsmatrix van de visgemeenschap tussen de waterlichamen te genereren. De aanwezigheid en/of relatieve abundantie van (specifieke) soorten tussen waterlichamen worden uitgedrukt in één getal, ook wel afstanden genoemd. Tussen de 0 (=gelijk) en 1 (=ongelijk) De afstanden zijn verkregen via de formule: Jaccard (voor presentie) en Bray-Curtis (voor aandeel aantallen, biomassa en eDNA-sequenties). Modelvalidatie is uitgevoerd met stress-waardes en plots. Stress wordt gedefinieerd als een vergelijking tussen de gemodelleerde ongelijkheid(afstand)-gegevens en ruwe gegevens. De verkregen (on)gelijkheidsmatrixen van de visgemeenschappen zijn in NMDS-plots als clusters gevisualiseerd (non-metric multidimensional scaling). Hiermee kunnen relaties uit de complexe (on)gelijkheidsmatrixen tussen visgemeenschappen en strata worden weergegeven.
  - b. Bovenstaande clusteranalyses vergelijken de visgemeenschap per groep op een hoog aggregatieniveau. Vergelijkbaar met het aantal soorten bij punt 1, dient ook hier gecorrigeerd te worden voor “natuurlijke” variatie tussen waterlichamen binnen dezelfde groep. Hiervoor zijn de ongelijkheidsgetallen van dezelfde waterlichamen met elkaar vergeleken (eDNA met referentie KRW).

An underwater photograph showing a large school of small, dark fish swimming in clear, greenish water. In the foreground, there are green aquatic plants with long stems and leaves. The water surface is visible at the top, with light reflecting off it. On the left side, there are white, overlapping circular graphic elements.

## 3 RESULTATEN

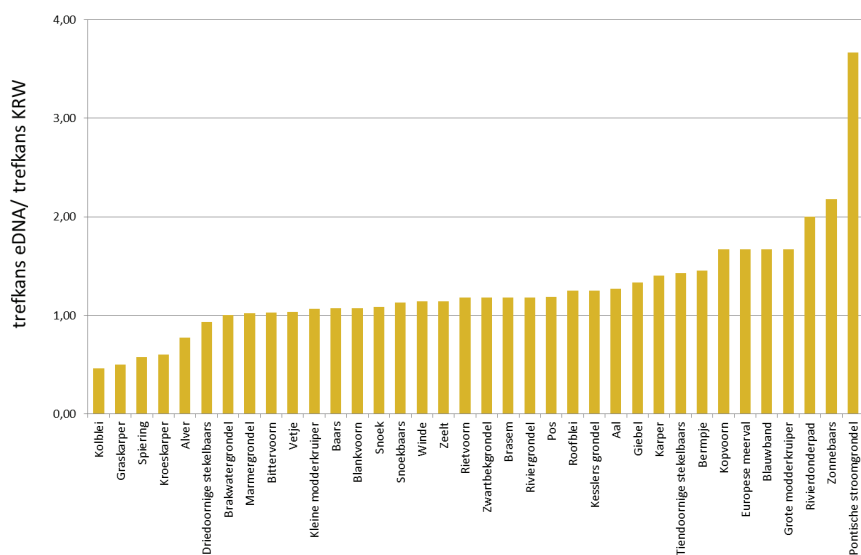
### 3.1 IN BEELD BRENGEN VISGEMEENSCHAP

#### 3.1.1 Trefkans per soort

Hieronder maken we een vergelijkingen tussen de trefkans met eDNA en de KRW-bevissing op waterlichaamniveau voor de verschillende soorten. Allereerst zijn de trefkansen per soort per methode berekend. Dit is gedaan door eerst te berekenen in hoeveel onderzochte waterlichamen een soort voorkwam op basis van de KRW-bevissing en eDNA-bemonstering samen. Vervolgens is per methode gekeken in hoeveel procent van de waterlichamen waar een soort voorkomt deze soort ook is aangetoond met de methode (zie figuur in bijlage 1). Daarna is voor soorten die in meer dan 5 waterlichamen voorkwamen de trefkans met eDNA gedeeld door de trefkans in de KRW-be-

**FIGUUR 5**

Detectie per soort uitgedrukt als trefkans met eDNA gedeeld door trefkans in de KRW-bevissing (per waterlichaam). In de grafiek zijn enkel soorten opgenomen die op 5 of meer locaties voorkwamen. Een waarde van 1 staat voor gelijke trefkans, een waarde van twee staat voor een tweemaal zo hoge trefkans met eDNA enz..

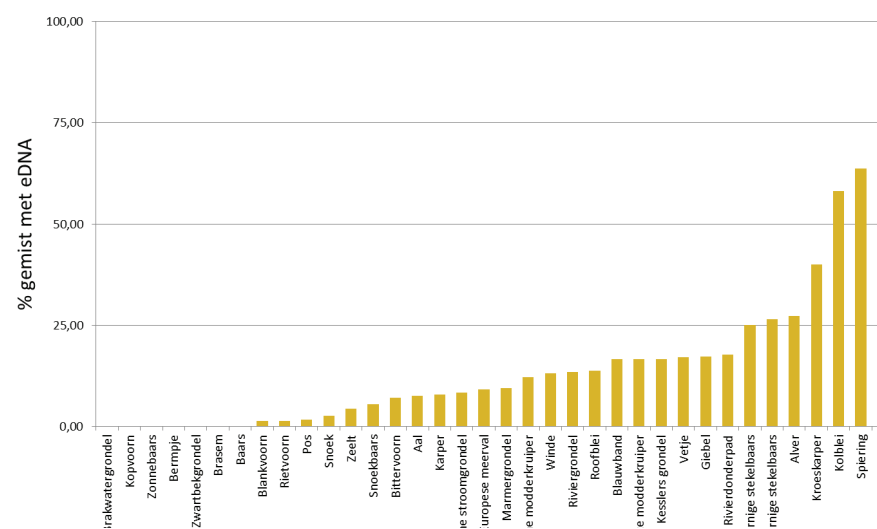


vissing om zo de verschillen tussen beide methoden inzichtelijk te maken. Een score van 1 geeft een gelijke trefkans, een score hoger dan 1 staat voor een hogere trefkans met eDNA en een score lager dan 1 staat voor een hogere trefkans in de KRW-bevissing (zie figuur 5).

Voor kolblei, graskarper, spiering, kroeskarper, alver en driedoornige stekelbaars was de trefkans hoger in de KRW-bevissing dan met eDNA. Voor brakwatergron-

**FIGUUR 6**

Soorten gemist met eDNA. Gegeven is het percentage van het totaal aantal waterlichamen waarin een soort voorkwam (aangetoond met eDNA of in de KRW-bevissing) waarin een soort niet gedetecteerd (gemist) is met eDNA.



del hebben beide methoden een even hoge trefkans. Voor alle overige op meer dan 5 trajecten aangetroffen soorten (29 in totaal) is de trefkans met eDNA hoger dan die in de KRW-bevissing.

### 3.1.2 Soorten gemist met eDNA

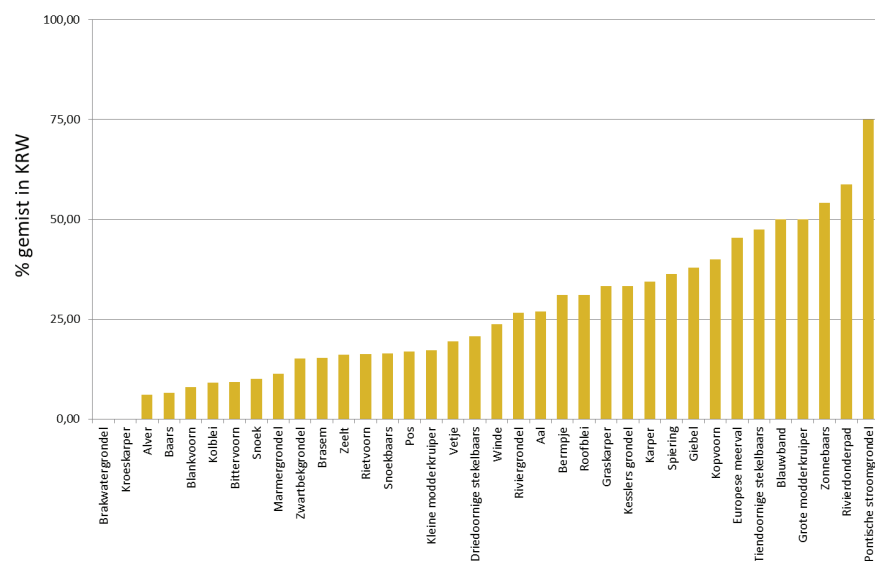
Figuur 6 geeft een overzicht van de mate waarin soorten gemist zijn met de eDNA bemonstering als percentage van het aantal waterlichamen waarin de soort met



één van de beide methoden aangetoond is. Een zevental soorten (brakwatergrondel, kopvoorn, zonnebaars, bermpje, zwartbekgrondel, brasem en baars) is in geen enkel waterlichaam gemist met eDNA. Dan is er een groot deel van de soorten dat tussen de 1% en de 27% van de gevallen gemist is met eDNA. Vier soorten zijn in meer dan 40% van de gevallen gemist met eDNA, te weten kroeskarper (40%/5 waterlichamen), kolblei (58%/55 waterlichamen), spiering (63%/11 waterlichamen) en graskarper (67%/6 waterlichamen).

**FIGUUR 7**

Soorten gemist in de KRW-bevissing. Gegeven is het percentage van het totaal aantal waterlichamen waarin een soort voorkwam (aangetoond met eDNA of in de KRW-bevissing) waarin een soort niet gevangen is in de KRW-bevissing (gemist).



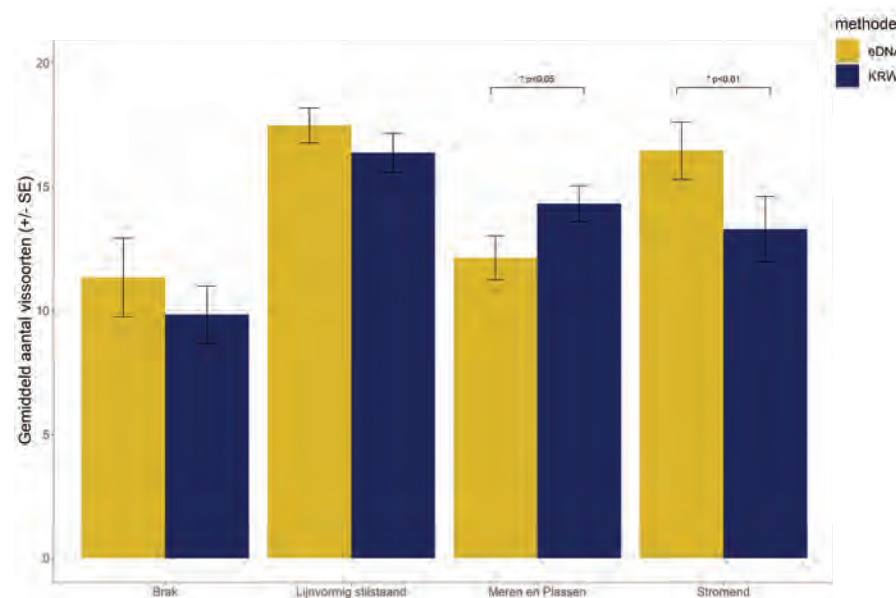
Vervolgens is gekeken hoeveel soorten in meer dan 20% van de waterlichamen waarin ze voorkwamen (berekend op basis van de KRW-bevissing en eDNA-bemonstering samen) gemist zijn met eDNA. Dat ging om 19% van de soorten, namelijk 6 van de 36 soorten.

### 3.1.3 Soorten gemist in de KRW-bevissing

Figuur 7 geeft een overzicht van de mate waarin soorten gemist zijn in de KRW-bevissing als percentage van het aantal waterlichamen waarin de soort met één van

**FIGUUR 8**

Gemiddeld aantal gedetecteerde soorten per KRW-waterlichaam met beide methoden (eDNA en KRW-bevissing) voor de vier watertype-categorieën. De verschillen zijn getoetst met een gepaarde t-test (een \* geeft aan dat het verschil significant was).



de beide methoden is aangetoond. Een tweetal soorten (brakwatergrondel en kroeskarper) is in geen enkel waterlichaam gemist. Dan is grofweg de helft van de soorten tussen de 6% en 25% van de gevallen gemist in de KRW-bevissing. Acht soorten zijn in meer dan 40% van de gevallen gemist in de KRW-bevissing, te weten kopvoorn (40%/5 waterlichamen), Europese meerval (45%/11 waterlichamen), tiendoornige stekelbaars (48%/40 waterlichamen), blauwband (50%/6 waterlichamen), grote modderkruiper (50%/6 waterlichamen), zonnebaars (54%/24 waterlichamen), rivierdonderpad (59%/17 waterlichamen) en Pontische stroomgrondel (75%/12 waterlichamen).

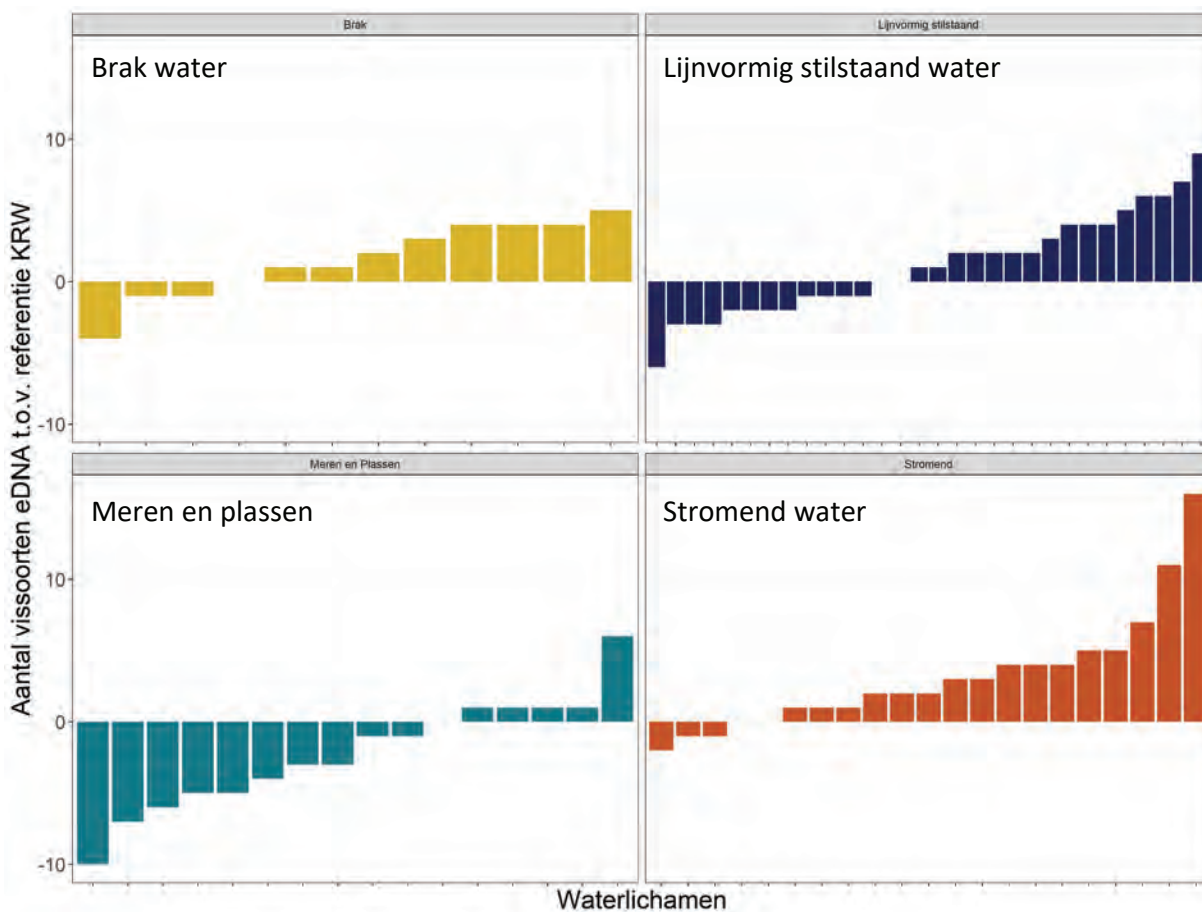
Vervolgens is gekeken hoeveel soorten in meer dan 20% van de waterlichamen waarin ze voorkwamen (berekend op basis van de KRW-bevissing en eDNA-bemonstering samen) gemist in de KRW-bevissing. Dat ging om 53% van de soorten, namelijk 19 van de 36 soorten.

### 3.2 AANTAL AANGETROFFEN SOORTEN PER KRW-WATERLICHAAM

Gemiddeld zijn er per KRW-waterlichaam 8% meer soorten aangetroffen met eDNA dan met de KRW-bevissing. Hieronder is de vergelijking gemaakt tussen beide methoden wat betreft het gemiddeld aantal aangetroffen soorten per KRW-waterlichaam, waarbij onderscheid is gemaakt tussen de vier watertype-categorieën. In drie van de vier watertype-categorieën zijn er gemiddeld

**FIGUUR 9**

*Verskil in aantal gedetecteerde soorten per KRW-waterlichaam tussen beide methoden (eDNA en KRW-bevissing) voor de vier watertype-categorieën. Een negatieve waarde geeft aan dat er meer soorten zijn aangetroffen in de KRW-bevissing en een positieve waarde dat er meer soorten zijn aangetroffen met eDNA.*



meer soorten per waterlichaam aangetroffen met eDNA dan met de KRW-bevissing: in lijnvormig stilstaand water 7% meer, in brak water 15% meer en in stromend water 24% meer. In meren/plassen zijn er gemiddeld 18% minder soorten aangetroffen met eDNA in vergelijking tot de KRW-bevissing. De verschillen zijn getoetst met een gepaarde t-test en waren alleen significant voor stromend water en meren/plassen.

Figuur 9 zoomt per watertype-categorie verder in op de verschillen in het aantal gedetecteerde soorten per waterlichaam tussen beide methoden. Hierin valt op dat in stromend water en brak water het grootste deel (respectievelijk 79% en 67%) van de waterlichamen meer soorten zijn gedetecteerd met eDNA. In meren/plassen zijn juist in het grootste deel (63%) van de waterlichamen meer soorten gedetecteerd in de KRW-bevissing. In lijnvormige stilstaand water zijn er iets meer waterlichamen waar meer soorten met eDNA worden gedetecteerd (53%) dan waterlichamen waar meer soorten in de KRW-bevissing zijn gedetecteerd (40%).

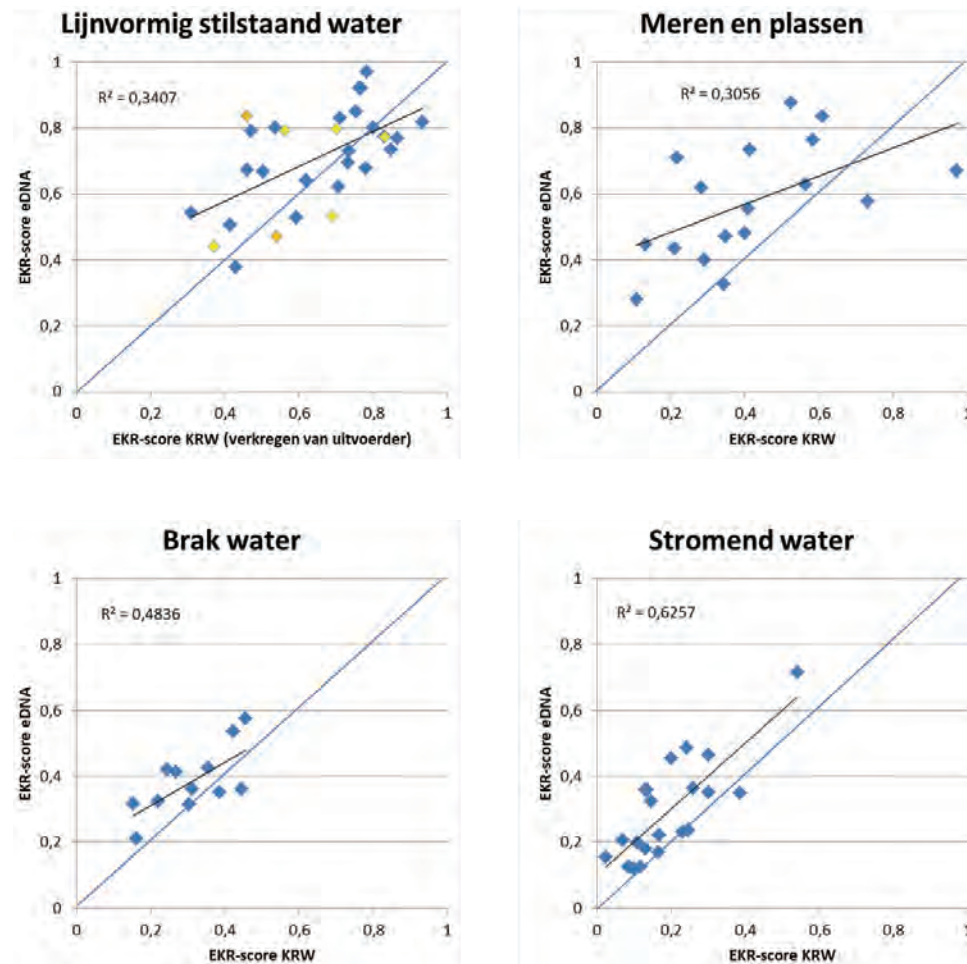
### 3.3 VERGELIJKING EKR-SCORES

#### 3.3.1 Totalscores

Onderstaande figuren geven een vergelijking tussen de EKR-scores op waterlichaamniveau berekend met de eDNA gegevens en de KRW-bevissing. De overeenkomst in EKR-scores is het hoogst (hoogste R<sup>2</sup>) in stromende wateren (waar de EKR-score met eDNA standaard iets hoger lijkt te liggen) en

**FIGUUR 10**

Vergelijking EKR-scores berekend met de eDNA gegevens en vanuit de KRW-bevissing. De blauwe lijn geeft ter indicatie een gelijke score met eDNA en KRW weer. Voor lijnvormig stilstaande wateren konden de KRW-scores niet opnieuw berekend worden vanuit de ruwe data en zijn de scores verkregen van de uitvoerder gebruikt. Deze waren niet altijd uit hetzelfde jaar (gele stippen) en betroffen soms een compleet waterlichaam terwijl met eDNA een deelwaterlichaam is bemonsterd (oranje stippen).



brakke wateren. In meren/plassen zit er veel verschil in EKR-scores. Deze liggen globaal ook hoger met eDNA. In lijnvormig stilstaand water is het beeld meer variabel, hier speelt wellicht ook mee dat de EKR-scores niet opnieuw berekend konden worden (zie toelichting in bijschrift figuur 10 en paragraaf 2.8).

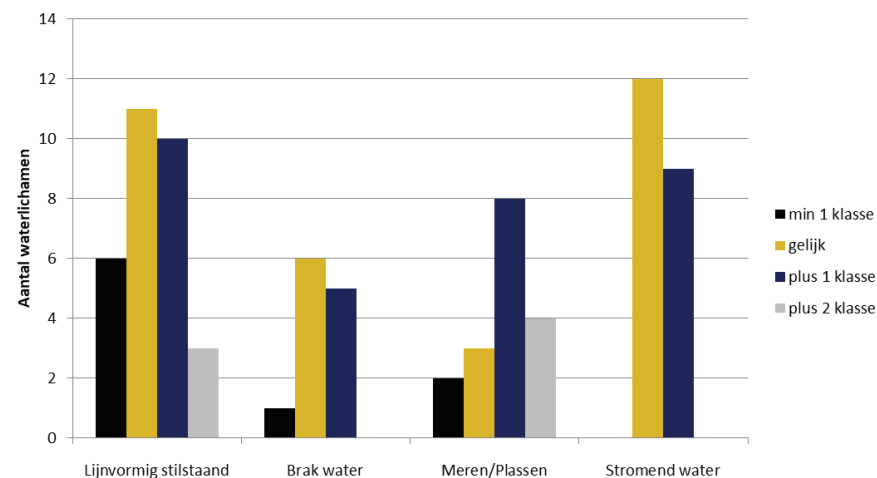
De EKR-scores leiden voor natuurlijke wateren uiteindelijk tot een oordeel in een EKR-klasse: slecht (0 - 0,2), ontoereikend (0,2-0,4), matig (0,4-0,6), goed (0,6-0,8) en zeer goed (0,8-1). Waterbeheerders hebben voor sterk veranderde en kunstmatige waterlichamen afwijkende doelen en klassen. Voor de vergelijking in deze analyse worden echter de klassen van de maatlatten voor natuurlijke wateren aangehouden. In figuur 11 is per watertype categorie weergegeven voor hoeveel waterlichamen de beoordeling in klassen veranderde tussen beide methoden. In de categorie lijnvormig stilstaand water verandert bijna twee derde van de waterlichamen van EKR-klasse. Dat betreft dat voor het overgrote deel slechts 1 klasse verschil (vaker positiever met eDNA dan negatiever). In drie waterlichamen was het verschil met eDNA twee klassen positiever. In brak water scoort de helft van de waterlichamen gelijk en daarna een groot deel 1 klasse positiever en één waterlichaam een klasse negatiever. In de categorie Meren/plassen zit een grotere variatie tussen de uitkomsten, slechts 3 waterlichamen scoren een gelijke EKR-klasse, slechts 2 waterlichamen scoren negatiever met eDNA en het grootste deel van de waterlichamen scoort 1 of zelfs 2 klassen positiever met eDNA. Voor stromend water is de gelijkenis in beoordeling tussen beide methoden het grootst. Meer dan de helft van de wateren scoort gelijk (12), de overige waterlichamen scoren 1 klasse positiever.

### 3.3.2 Deelmaatlatten lijnvormige stilstaande wateren

Onderstaande figuren zoomen in op de deelmaatlatten van de lijnvormige stilstaande wateren om te zien waar de grootste verschillen liggen tussen de EKR-scores berekend met de gegevens van de eDNA-bemonstering en met de gegevens van de KRW-bevissing. De maatlat voor lijnvormige wateren is opgebouwd uit drie deelmaatlatten waarvan één op basis van aangetroffen soorten (plantminnende en migrerende soorten) en twee op basis van biomassa aandeel (karper/brasem &

**FIGUUR 11**

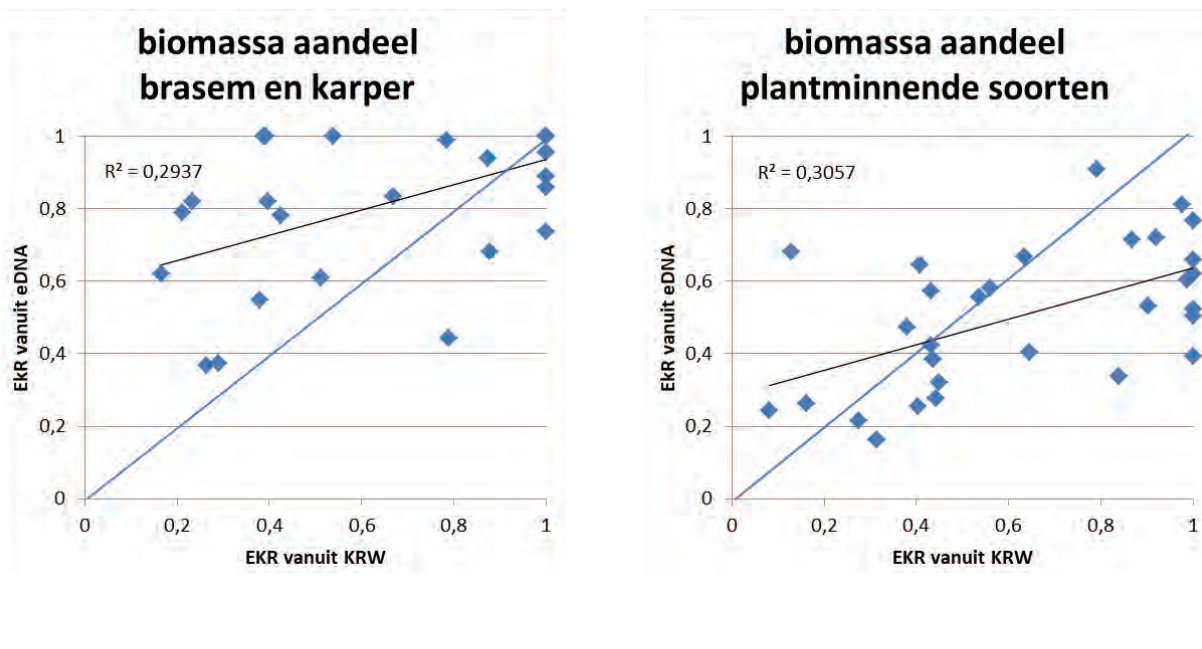
*Verskil in EKR-klasse verkregen met eDNA t.o.v. van de KRW-bevissing. Gegeven zijn per watertype-categorie het aantal wateren dat 1 klasse lager, gelijk, 1 klasse hoger of 2 klassen hoger scoorde met eDNA t.o.v. de KRW-bevissing.*



plantminnende soorten). Doordat de ruwe data ontbrak zijn de deelmaatlatten berekend vanuit de bestandschattingen. Voor de deelmaat op basis van het aantal aangetroffen soorten loopt dit vanzelfsprekend scheef doordat de scores per monsterpunt berekend hadden moeten worden en vervolgens hadden moeten worden gemiddeld. Bij het gebruik van de totale visbestandschatting scoort de deelmaatlat daardoor vanzelfsprekend hoog. Nota bene: in de visbestandschatting van een geheel waterlichaam zitten bijna altijd meer soorten dan per monsterpunt. Deze deelmaatlat wordt hier daarom niet weergegeven omdat de uitkomsten niet representatief zijn. Voor de deelmaatlatten die op biomassa aandeel zijn gebaseerd geeft de visbestandschatting wel een redelijke indicatie.

**FIGUUR 12**

Vergelijking van EKR-scores berekend met de eDNA gegevens en vanuit de KRW-bevissing voor de deelmaatlatten van lijnvormige stilstaande wateren. De blauwe lijn geeft ter indicatie een gelijke score met eDNA en KRW weer.



Gemiddeld genomen geeft de eDNA-bemonstering een hogere EKR-score op de deelmaatlat biomassa aandeel brasem en karper. Met name bij de lage EKR-scores op basis van de KRW-bevissing is de correlatie met de EKR-score verkregen met eDNA laag (eDNA scoort flink hoger). Bij hoge EKR-scores voor de KRW-bevissing is de correlatie met de

EKR-scores vanuit eDNA goed. Op de deelmaatlat biomassa aandeel plantminnende soorten geeft de eDNA-bemonstering gemiddeld een lagere score dan de KRW-bevissing. Dat komt vooral door een lage correlatie tussen hoge EKR-scores vanuit de KRW en de EKR-score vanuit eDNA (die zijn dan structureel lager).

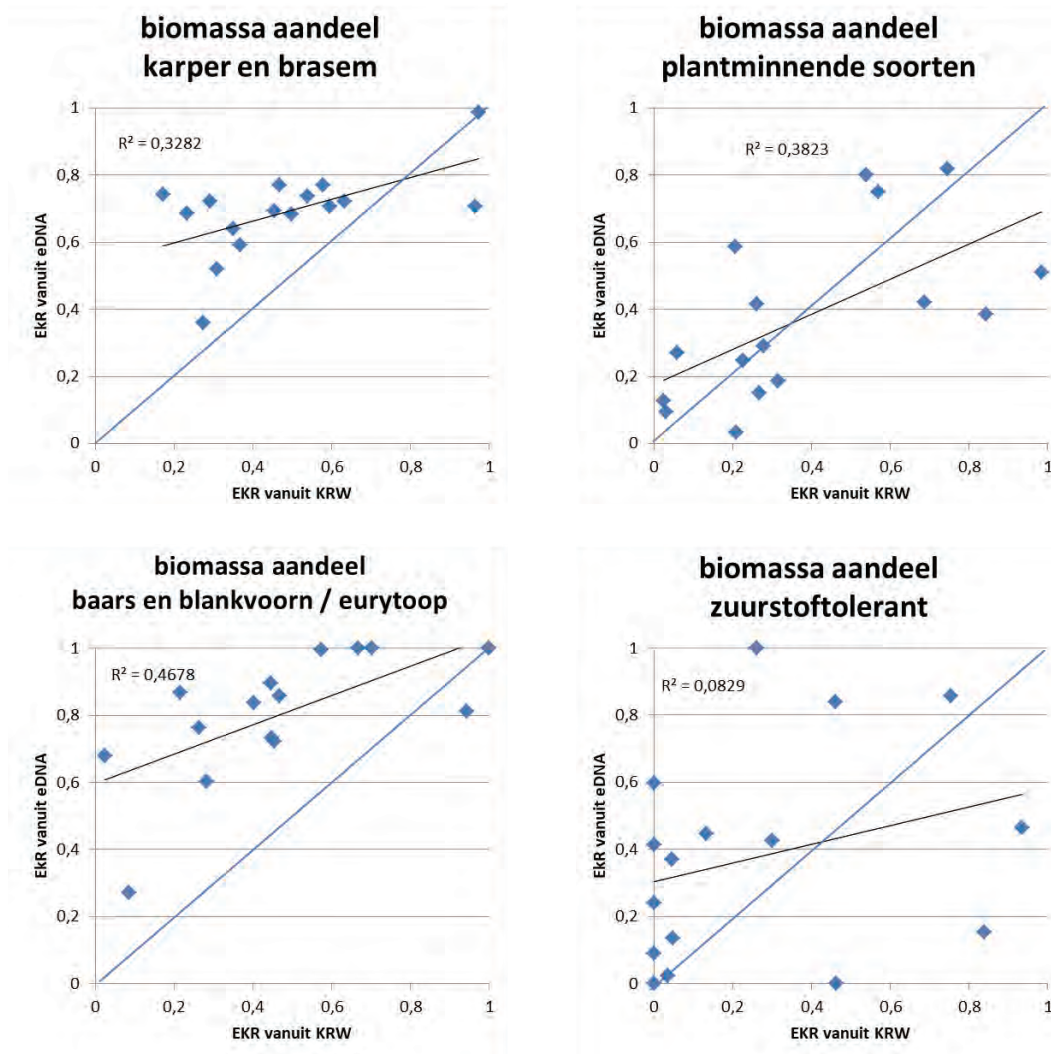
### 3.3.3 Deelmaatlatten Meren en Plassen

Onderstaande figuren zoomen in op de deelmaatlatten van de meren en plassen om te zien waar de grootste verschillen liggen tussen de eDNA-bemonstering en KRW-bevissing. Voor meren/plassen zijn er vier deelmaatlatten die allemaal gebaseerd zijn op biomassa aandeel van een bepaalde groep vissen (brasem/karper, plantminnende soorten, baars/blankvoorn en zuurstoftolerante soorten). Bij de deelmaatlat voor biomassa aandeel karper en brasem geeft de eDNA bemonstering gemiddeld genomen een (flink) hogere EKR-score. Voor de deelmaatlat plantminnende soorten zijn de verschillen meer variabel, zowel hogere als lagere EKR-scores met eDNA t.o.v. de KRW-bevissing. Bij de deelmaatlat baars+blankvoorn/eurytopen geeft de eDNA bemonstering nagenoeg structureel een hogere ERK-score.

Bij de deelmaatlat zuurstoftolerante soorten zijn er grote verschillen tussen beide methoden. Opvallend is dat in een redelijk aantal gevallen eDNA een EKR-score geeft van tussen de 0,1 en 0,6 terwijl die uit de KRW-bevissing op 0 staat, in deze gevallen waren er geen of zeer lage biomassa-aandelen zuurstoftolerante soorten gevangen in de KRW-bevissing terwijl het aandeel van zuurstoftolerante soorten in de eDNA-bemonstering hoger lag.

**FIGUUR 13**

Vergelijking EKR-scores berekend met de eDNA gegevens en vanuit de KRW-bevissing voor de deelmaatlatten van meren en plassen. De blauwe lijn geeft ter indicatie een gelijke score met eDNA en KRW weer.



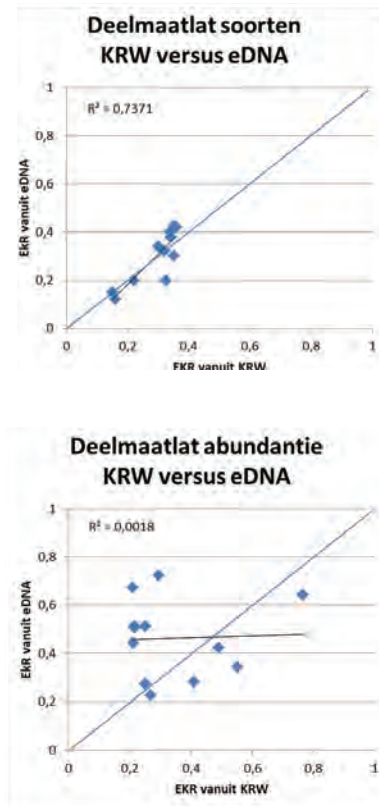
### 3.3.4 Deelmaatlatten brakke wateren

Onderstaande figuren zoomen in op de deelmaatlatten van brakke wateren om te zien waar de grootste verschillen liggen tussen de eDNA-bemonstering en KRW-bevissing. Voor brakke wateren zijn er in totaal 10 (M30) of 8 (M31) deelmaatlatten waarvan de helft gebaseerd zijn op aantallen soorten en de andere helft op abundantie (biomassa aandeel van soorten). Figuur 14 geeft de gemiddelde EKR-scores voor de deelmaatlatten gebaseerd op aantallen soorten en de deelmaatlatten gebaseerd op abundantie. Duidelijk is te zien dat de scores op de deelmaatlatten die kijken naar soorten zeer goed correleren tussen de eDNA bemonstering en KRW-bevissing.

Daarentegen is er geen correlatie op de gezamenlijke deelmaatlatten op basis van abundantie (biomassa aandeel). Op de volgende pagina worden in figuur 15 de vergelijkingen van de individuele deelmaatlatten gebaseerd op aantal soorten gegeven. Deze vijf deelmaatlatten vertonen allen een goede correlatie tussen de EKR-scores verkregen uit de eDNA-bemonstering en die uit de KRW-bevissing. In figuur 16 worden de individuele deelmaatlatten gebaseerd op abundantie gegeven. Deze vertonen op de deelmaatlat aandeel mariene soorten allemaal een lage correlatie tussen de EKR-scores verkregen uit de eDNA-bemonstering en die uit de KRW-bevissing.

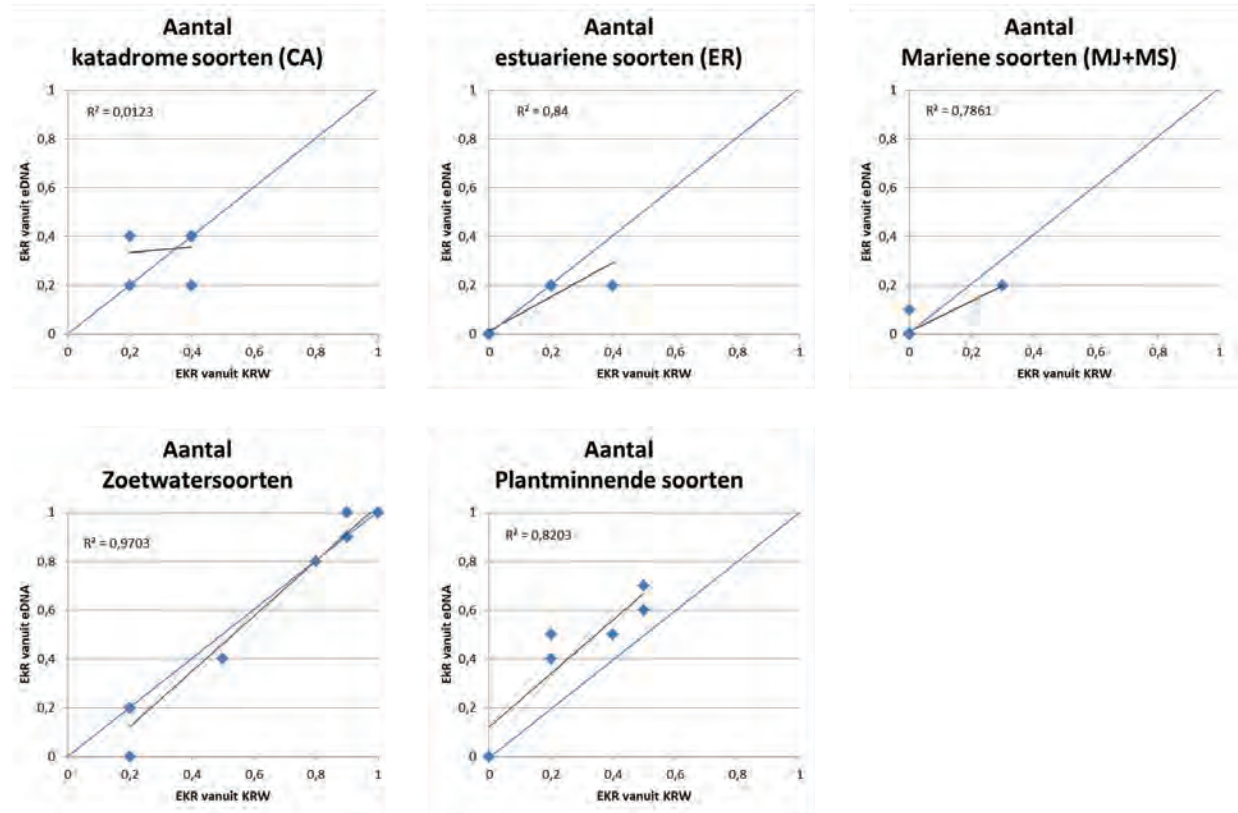
**FIGUUR 14**

Vergelijking gemiddelde EKR-scores van de deelmaatlaten soorten (4 of 5) en abundantie (4 of 5) berekend met de eDNA gegevens en vanuit de KRW-bevissing voor de brakke wateren. De blauwe lijn geeft ter indicatie een gelijke score met eDNA en KRW weer.



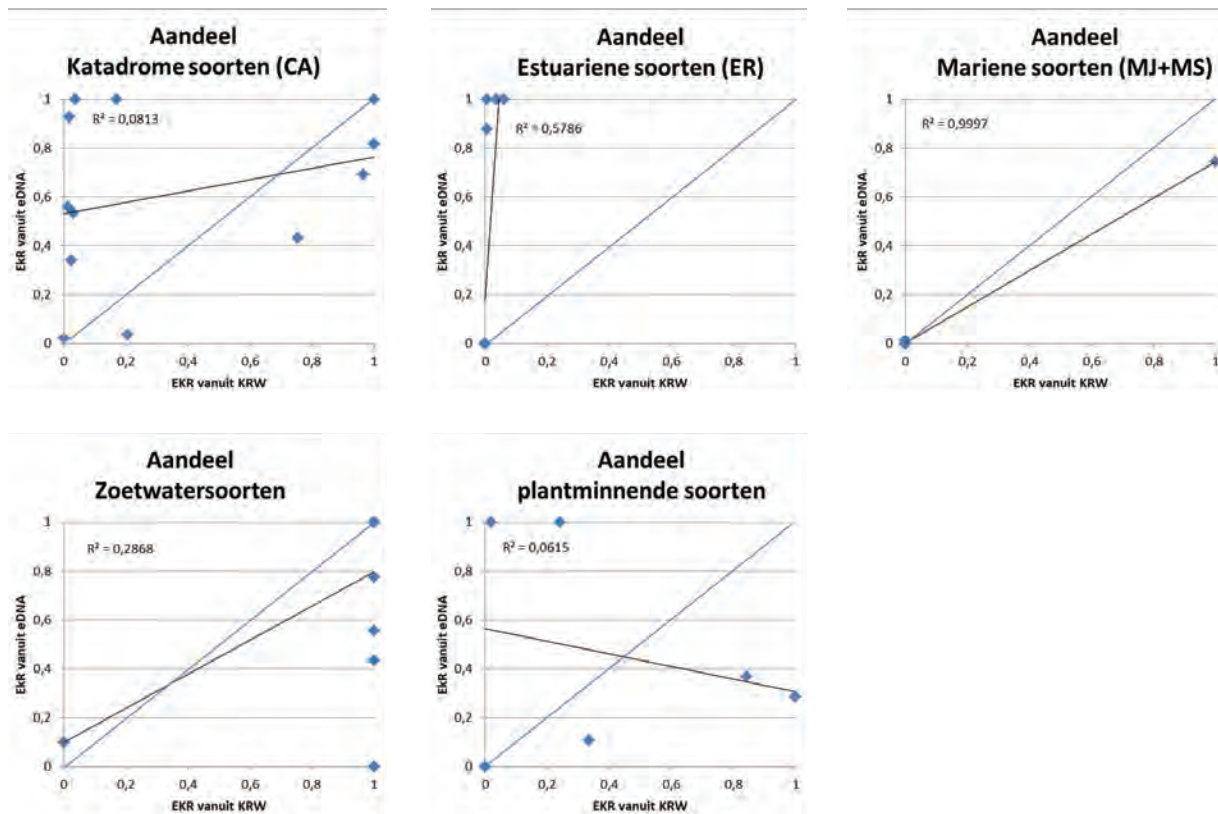
**FIGUUR 15**

Vergelijking gemiddelde EKR-scores van de deelmaatlaten gebaseerd op soorten berekend met de eDNA gegevens en vanuit de KRW-bevissing voor de brakke wateren. De blauwe lijn geeft ter indicatie een gelijke score met eDNA en KRW weer.



**FIGUUR 16**

Vergelijking gemiddelde EKR-scores van de deelmaatlaten gebaseerd op abundantie berekend met de eDNA en vanuit de KRW-bevissing voor de brakke wateren. De blauwe lijn geeft ter indicatie een gelijke score met eDNA en KRW weer.



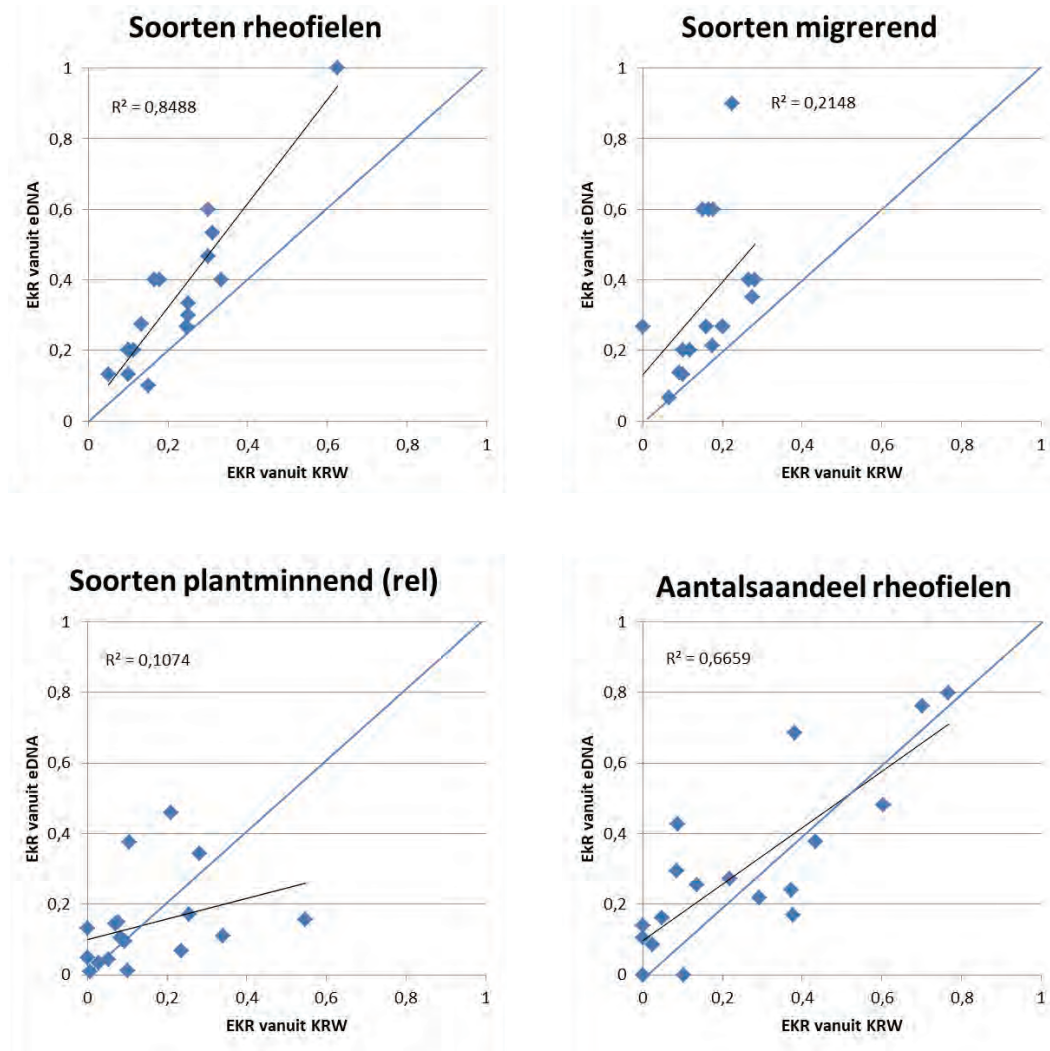
### 3.3.5 Deelmaatlaten stromende wateren

Onderstaande figuren zoomen in op de deelmaatlaten van stromende wateren om te zien waar de grootste verschillen liggen tussen de eDNA-bemonstering en de KRW-bevissing (exclusief de R20 omdat dat watertype andere deelmaatlaten heeft). Voor stromende wateren zijn er drie deelmaatlaten gebaseerd op aantal soorten (rheofielen, migrerend en plantminnend (relatief)) en één deelmaatlat op abundantie (aantalsaandeel rheofielen). De EKR-scores op de deelmaatlat aantal soorten rheofielen vertonen een sterke correlatie tussen de eDNA-bemonstering en KRW-bevissing. Globaal genomen worden er met de eDNA-methode net iets meer rheofiele soorten gedetecteerd dan in de KRW-bevissing waardoor de EKR-scores met eDNA net iets hoger zijn. Voor de deelmaatlat aantal migrerende soorten is de correlatie lager doordat er in enkele gevallen flink meer migrerende soorten aangetroffen wat leidt tot flink hogere EKR-scores. De EKR-scores met eDNA liggen hier structureel hoger. De deelmaatlat relatief aantal plantminnende soorten laat een meer variabel beeld zien met soms hogere en soms lagere EKR-scores vanuit de eDNA bemonstering t.o.v. de KRW-bevissing. De deelmaatlat aantalsaandeel rheofielen laat een relatief goede correlatie zien tussen de eDNA bemonstering en KRW-bevissing.



**FIGUUR 17**

Vergelijking EKR-scores berekend met de eDNA gegevens en vanuit de KRW-bevissing voor de deelmaatlaten van meren/plassen  
De blauwe lijn geeft ter indicatie een gelijke score met eDNA en KRW weer.



### 3.4 DE POTENTIE VAN eDNA VOOR KARAKTERISERING VAN DE VISGEMEENSCHAP

#### 3.4.1 Clusteranalyses naar watertype-categorie

Om te onderzoeken of de visgemeenschappen verkregen vanuit de eDNA-bemonsteringen op een vergelijkbare manier karakteriseren als die op basis van de KRW-bevissingen zijn clusteranalyses op waterlichaamniveau uitgevoerd. In de clusteranalyses is onderscheid gemaakt in de vier watertype-categorieën (brak water, lijnvormig stilstaand water, meren/plassen en stromend water) en is gekeken of zowel de eDNA-gegevens als gegevens van de KRW-bevissing op vergelijkbare wijze clusteren. Dit wijst op vergelijkbare visgemeenschappen wat laat zien dat de eDNA-methode een vergelijkbare potentie heeft om visgemeenschappen te karakteriseren als de KRW-bevissingen. Iets wat kansen biedt voor nieuwe op eDNA gebaseerde maatlaten.

Er zijn clusteranalyses uitgevoerd op basis van:

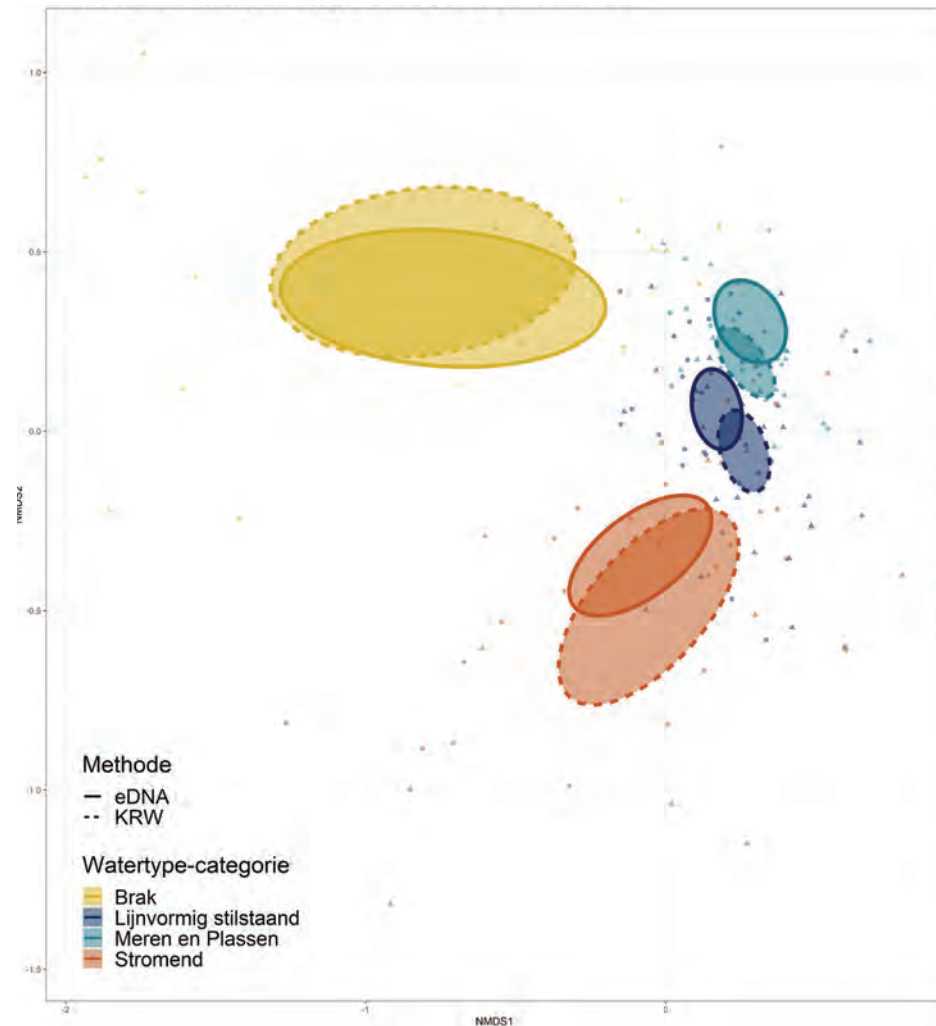
- Presentie (het voorkomen van soorten: aan- of afwezigheid)
- Aantallen: aantalsaandeel van een soort in de KRW-bevissing t.o.v. aandeel in eDNA-sequenties van een soort met eDNA
- Biomassa: biomassa-aandeel van een soort in de KRW-bevissing t.o.v. aandeel in eDNA-sequenties van een soort met eDNA

Figuur 18 geeft de clusteranalyse op basis van presentie. De gegevens verkregen met eDNA en de KRW-bevissingen karakteriseren de visgemeenschappen op een zeer vergelijkbare wijze. De waterlichamen uit dezelfde watertype-categorieën clusteren op vergelijkbare wijze samen: er is een grote overlap (zie overlappende cirkels). De overlap is het grootst in brakke en stromende wateren en minder in de lijnvormige stilstaande wateren en meren/plassen. Ook is zichtbaar dat deze twee laatste watertype-categorieën dicht bij elkaar liggen wat ook verwacht werd op basis van de karakteristieken van deze wateren (habitats) en bijbehorende visgemeenschappen.

Figuur 19 geeft de clustering op basis van aantalsaandeel en aandeel in eDNA sequenties weer. Te zien is dat in vergelijking met de clustering op basis van presentie de visgemeenschappen op basis van aandeel in aantallen of sequenties nog steeds goed clusteren op Meren en Plassen na. Voor brakke en stromende wateren is de overlap groot, voor lijnvormig stilstaande wateren minder goed en voor meren/plassen is er bijna geen overlap meer. Wanneer enkel wordt gekeken naar de KRW-gegevens t.o.v. elkaar en de eDNA-gegevens t.o.v. elkaar is te zien dat beide methoden goed in staat zijn de visgemeenschappen voor de watertype-categorieën te onderscheiden op basis van aantalsaandeel en aandeel in eDNA-sequenties.

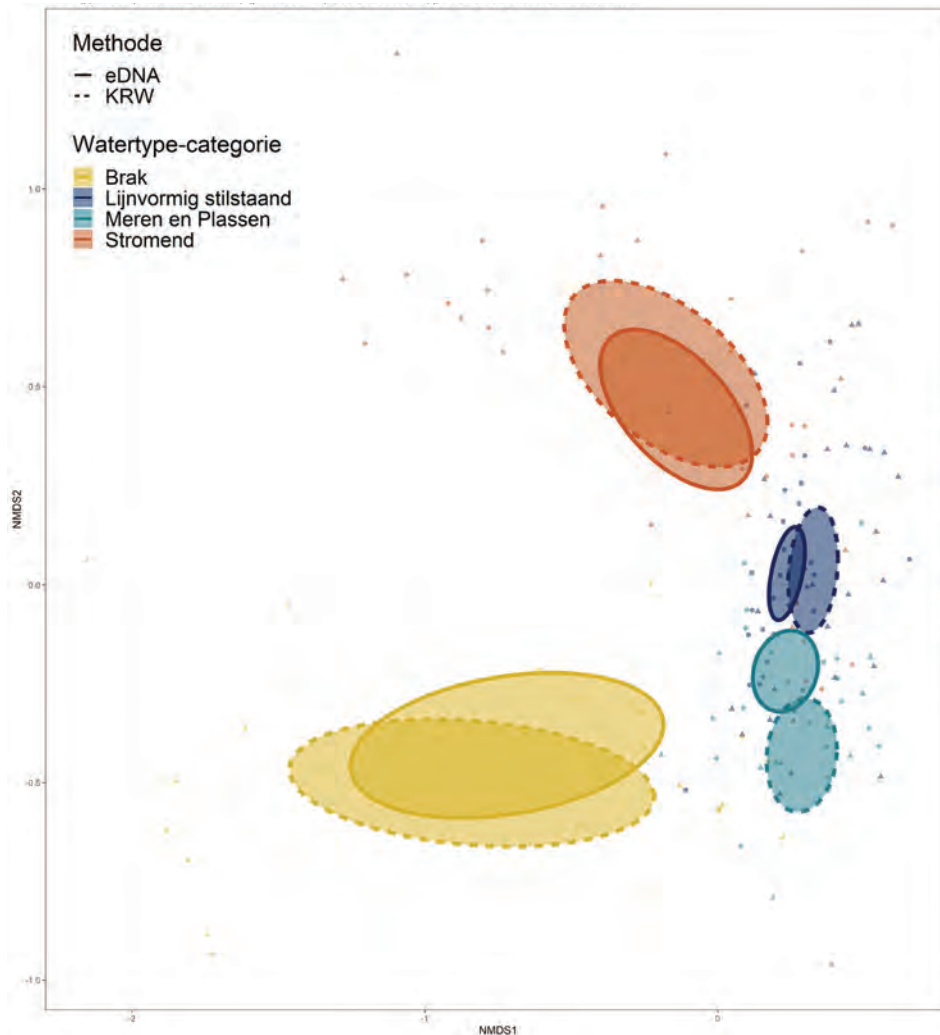
**FIGUUR 18**

Clusteranalyse op basis van presentie van soorten per waterlichaam met onderverdeling in de vier watertype categorieën verkregen met de eDNA bemonstering (dichte lijnen) en KRW-bevissing (stippellijnen).



**FIGUUR 19**

Clusteranalyse op basis van aantalsaandeel en aandeel in eDNA-sequenties van soorten per waterlichaam met onderverdeling in de vier watertype categorieën verkregen met de eDNA bemonstering (dichte lijnen) en KRW-bevissing (stippellijnen).



Figuur 20 geeft clustering op basis van biomassa-aandeel en aandeel in eDNA sequenties. Te zien is dat in vergelijking met de clustering op basis van presentie en aantalsaandeel de visgemeenschappen op basis van aandeel in biomassa of sequenties minder goed clusteren dan op basis van presentie en aandeel in aantallen. Dit geeft aan dat het aandeel in biomassa het slechtst overeenkomt met het aandeel in eDNA-sequenties. Voor brakke en stromende wateren is er nog enigszins redelijke overlap. Voor lijnvormig stilstaande wateren en meren/plassen is er geen overlap meer. Wanneer enkel wordt gekeken naar de KRW-gegevens t.o.v. elkaar en de eDNA-gegevens t.o.v. elkaar is te zien dat beide methoden wel goed in staat zijn de visgemeenschappen voor de watertype-categorieën te onderscheiden op basis van biomassa-aandeel en aandeel in eDNA-sequenties.

### 3.4.2 Clusteranalyse naar EKR-klasse

Om te onderzoeken of de gegevens verkregen met eDNA visgemeenschappen op een vergelijkbare manier kunnen beoordelen in EKR-klasse als de gegevens verkregen met de KRW-bevissing zijn clusteranalyses gedaan. De clusteranalyses zijn per watertype-categorie uitgevoerd (lijnvormig stilstaand water, meren/plassen, brak water en stromend water) gebruik makend van de beoordeling in EKR-klassen verkregen vanuit de KRW-bevissing dat dient als referentie. Hiervoor is gekozen omdat de hoofdvraag is of met eDNA vergelijkbare beoordelingen kunnen worden verkregen. De clusterin-

**FIGUUR 20**

Clusteranalyse op basis van biomassa-aandeel en aandeel in eDNA-sequenties van soorten per waterlichaam met onderverdeling in de vier watertype categorieën verkregen met de eDNA bemonstering (dichte lijnen) en KRW-bevissing (stippellijnen).



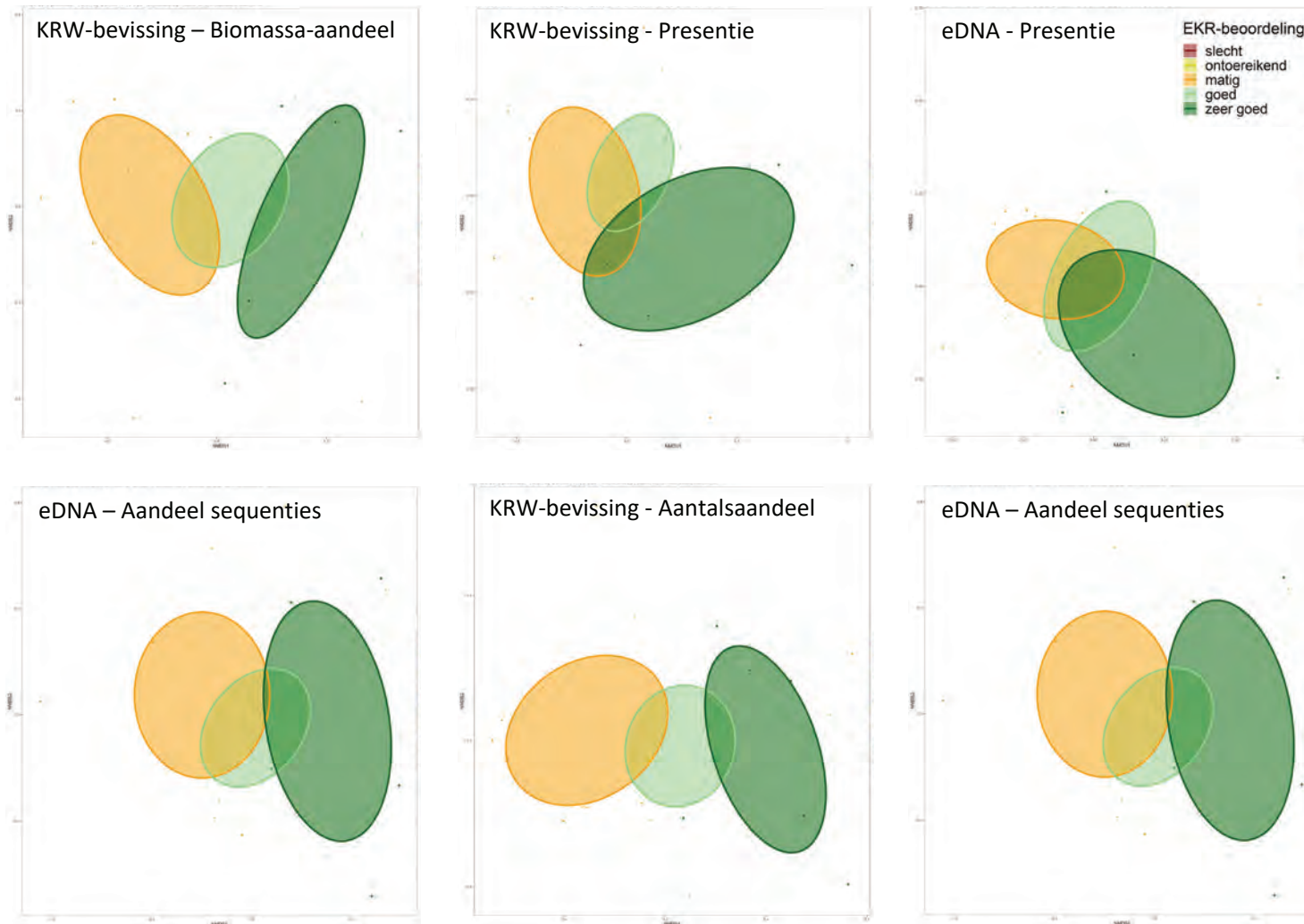
gen zijn gedaan met als input presentie (aan- of afwezigheid van soorten), aantalsaandeel en biomassa aandeel voor de KRW-bevissing en presentie en aandeel in eDNA-sequenties voor eDNA.

In figuur 21 worden de clusteranalyse voor lijn- of stilstaande wateren gegeven. Te zien is dat bij de KRW-bevissing de gegevens op basis van aantalsaandeel en biomassa-aandeel het meest voorspellend zijn voor de EKR-klasse. Bij enkel presentie is de overlap tussen de klassen groter. Dit ligt in de lijn der verwachting met één deelmaatlat op basis van presentie van soorten en twee deelmaatlaten op basis van biomassa-aandeel van specifieke soorten. Voor de eDNA gegevens is te zien dat de gegevens minder voorspellend zijn voor de EKR-klasse. Enkel kijkend naar presentie van soorten zit er voor een deel overlap tussen drie klassen (matig, goed en zeer goed). Het aandeel eDNA-sequenties heeft een grotere voorspellende waarde voor de EKR-klasse, er is dan nagenoeg geen overlap meer tussen de klassen matig en zeer goed.

In figuur 22 worden de clusteranalyse voor meren/ plassen gegeven. Opvallend is dat bij de KRW-bevissing de gegevens op basis van presentie, aantalsaandeel en biomassa-weinig voorspellende waarde hebben voor de EKR-klassen. Er zit grote overlap tussen de drie klassen. Voor eDNA gegevens geldt hetzelfde, er is weinig voorspellende waarde. Bij meren/plassen worden enkel vier deelmaatlaten op basis van biomassa-aandeel gebruikt.

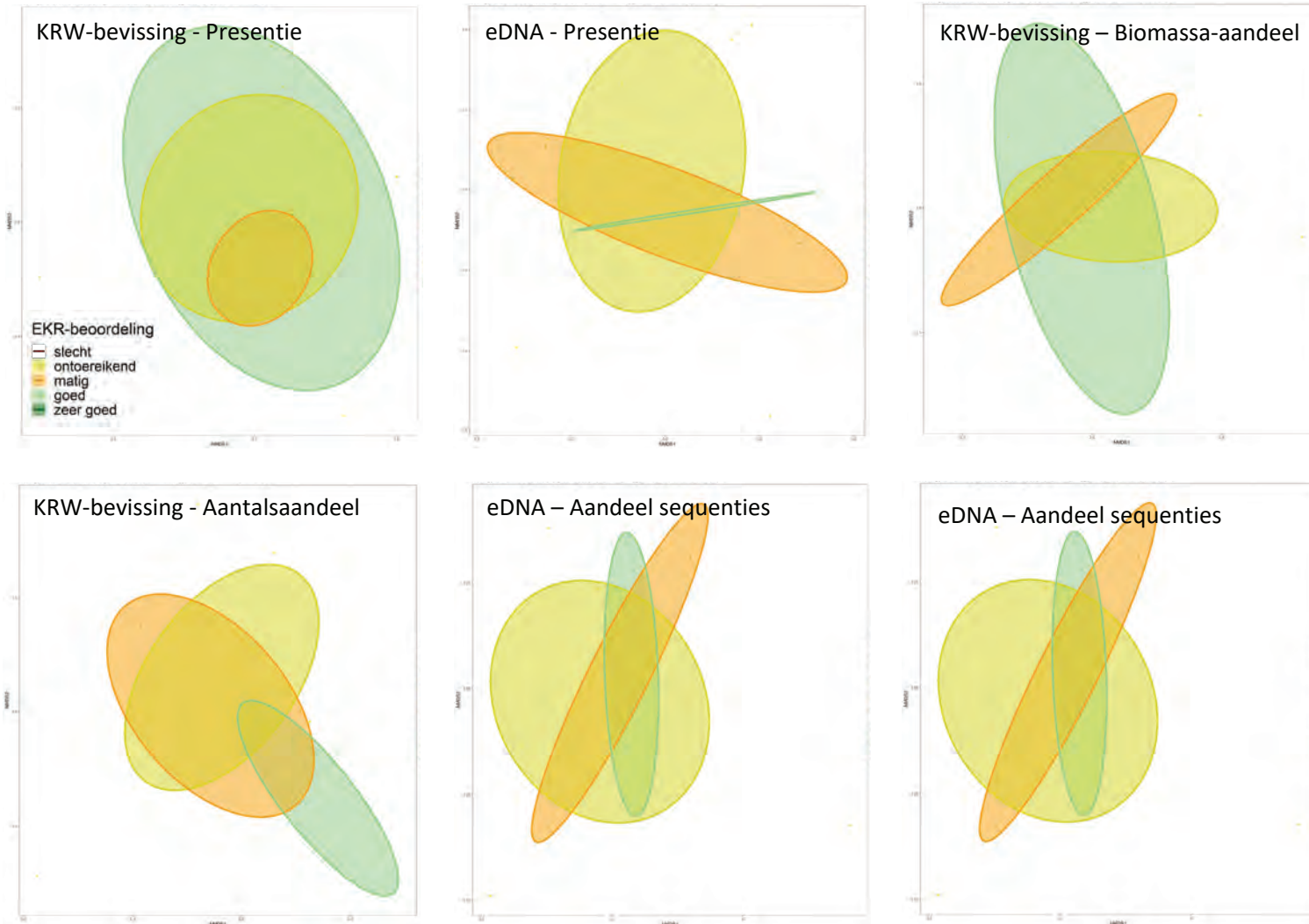
**FIGUUR 21**

Clusteranalyse naar EKR-klasse voor lijnvormige stilstaande wateren. Op basis van presentie, aantalsaandeel, biomassa aandeel of aandeel in eDNA-sequenties van soorten per waterlichaam. Links staan de analyses op basis van KRW-bevissingen en rechts die op basis van eDNA.



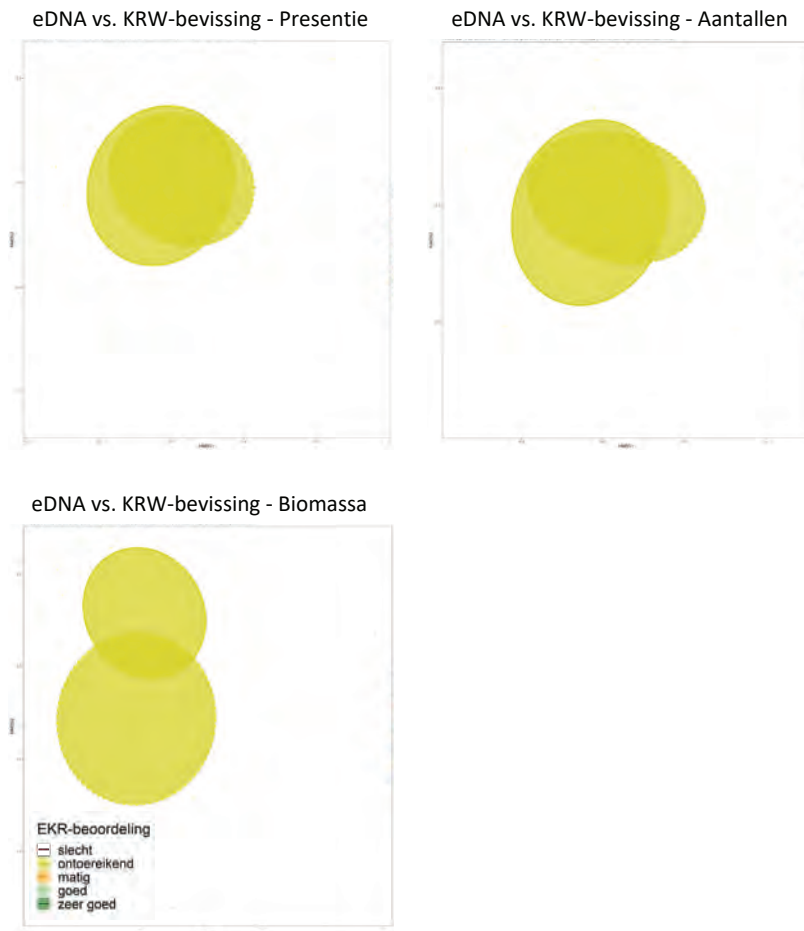
**FIGUUR 22**

Clusteranalyse naar EKR-klasse voor meren/plassen. Op basis van presentie, aantalsaandeel, biomassa aandeel of aandeel in eDNA-sequenties van soorten per waterlichaam. Links staan de analyses op basis van KRW-bevissing en rechts die op basis van eDNA.



### FIGUUR 23

Clusteranalyse met vergelijking tussen eDNA gegevens en KRW-bevissing voor brakke wateren op basis van presentie, aantalsaandeel vs. aandeel eDNA-sequenties en biomassa-aandeel vs. aandeel eDNA-sequenties. De cirkels met dichte lijnen zijn de gegevens op basis van eDNA en de cirkels met stippellijnen de gegevens op basis van de KRW-bevissingen.



Voor brakke wateren was het niet mogelijk een vergelijkbare clusteranalyse uit te voeren naar EKR-klasse. Dit komt doordat vanuit de KRW-beoordeling bijna alle waterlichamen de klasse ontoereikend (9) en slechts 2 matig en 1 slecht hadden. Er waren daarom te weinig gegevens om de klassen matig en slecht te kunnen clusteren. Als alternatief zijn in figuur 23 directe vergelijkingen voor de visgemeenschappen verkregen met eDNA en de KRW-bevissing op basis van presentie, aantalsaandeel en biomassa-aandeel toegevoegd. De visgemeenschappen komen het best overeen op basis van presentie, minder goed op basis van aantalsaandeel t.o.v. aandeel eDNA-sequenties en het slechts op basis van aandeel biomassa t.o.v. aandeel eDNA-sequenties.

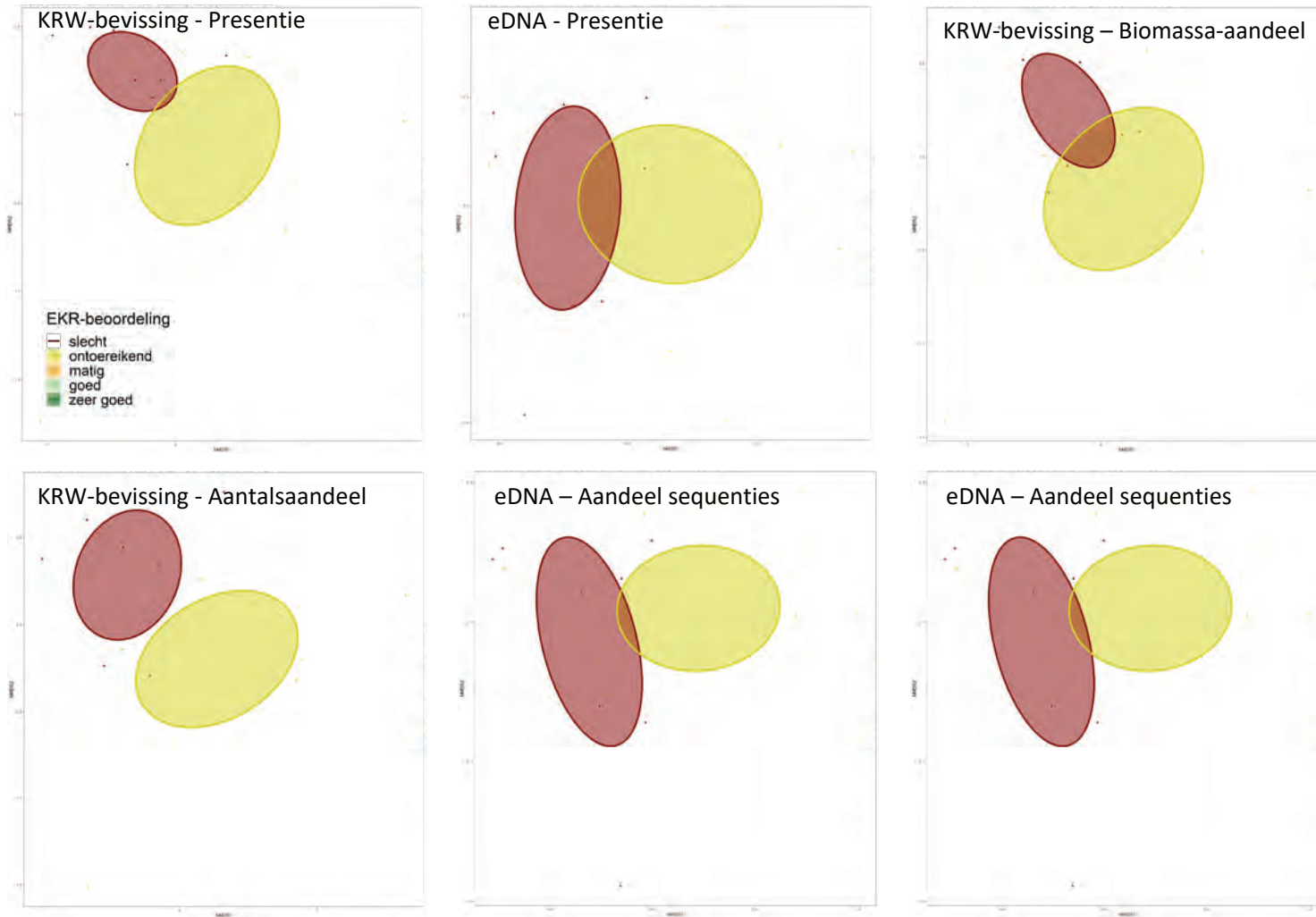
In figuur 24 worden de clusteranalyse voor stromende wateren gegeven. Hierbij waren er enkel voldoende wateren met de EKR-klassen slecht en ontoereikend voor de analyse. Te zien is dat bij de KRW-bevissing de gegevens op basis van presentie een goede voorspellende waarde geven (de clusters overlappen amper). Op basis van aantalsaandeel is de voorspellende waarde het hoogst (geen overlap clusters) en op basis van biomassa iets lager (kleine overlap). Ook de eDNA-gegevens hebben hier een goede voorspellende waarde. Op basis van aandeel in sequenties is er met nauwelijks overlap een hoge voorspellende waarde. Op basis van presentie is er een kleine overlap. De beoordeling van stromende wateren bestaat uit 3 deelmaatlaten gebaseerd op presentie van soorten en 1 deelmaatlat gebaseerd op aantalsaandeel. In de clusteranalyse op basis van aantalsaandeel hebben zowel de verschillende soorten (presentie) als het aantalsaandeel van deze soorten invloed op de positionering. Dit verklaart de beste overeenkomst met aantalsaandeel in de KRW-bevissing. Hetzelfde is te zien voor de eDNA gegevens voor het aandeel in sequenties wat meer voorspellende waarde heeft dan de presentie van soorten.

#### 3.4.3 Paarsgewijze vergelijking

Om de visgemeenschappen per waterlichaam paarsgewijs te vergelijken tussen de KRW-bevissing en eDNA-bemonstering zijn ongelijkheidsindexen berekend (zie figuur 25). Hierbij is per watertypecategorie de gemiddelde ongelijkheid per

**FIGUUR 24**

Clusteranalyse naar EKR-klasse voor stromende wateren. Op basis van presentie, aantalsaandeel, biomassa aandeel of aandeel in eDNA-sequenties van soorten per waterlichaam. Links staan de analyses op basis van KRW-bevissing en rechts die op basis van eDNA.





waterlichaam tussen de KRW-bevissing en eDNA-bemonstering berekend. Dit is gedaan met als input presentie (aan- of afwezigheid van soorten), aantalsaandeel t.o.v. aandeel in eDNA-sequenties en biomassa-aandeel t.o.v. aandeel in eDNA-sequenties.

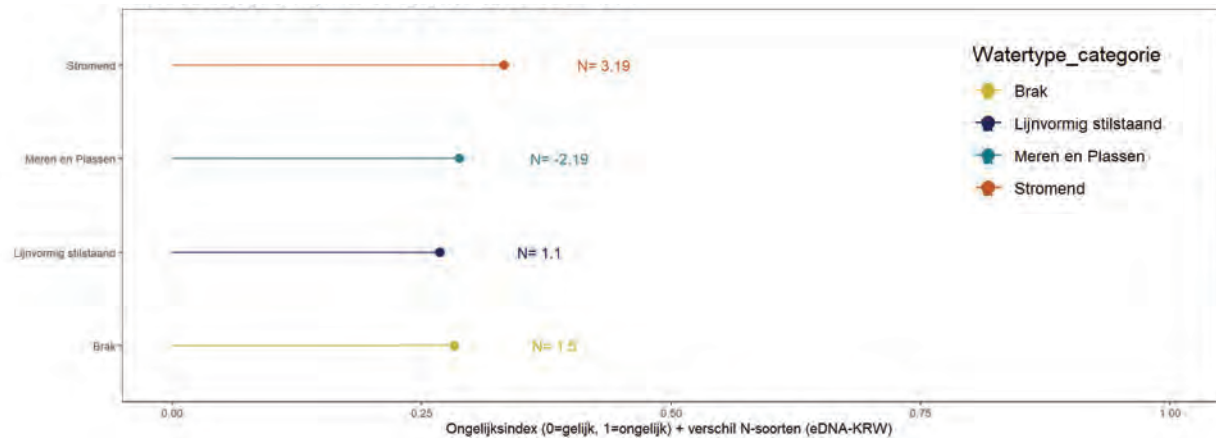
De gelijkheid is het grootst op basis van presentie, wat overeenkomt met de eerder beschreven vergelijkbare (of iets hogere) trefkansen met eDNA t.o.v. de KRW. Soorten die in wat hogere dichtheden voorkomen worden doorgaans met beide methoden aangetroffen. De gelijkheid was iets lager op basis van aantallen en nog lager op basis van biomassa t.o.v. eDNA-sequenties. Ook dit komt overeen met eerdere vondsten die laten zien dat het aandeel in eDNA sequenties niet één op één te vertalen is naar aantals- of biomassa-aandeel.

Wanneer wordt gekeken naar de gelijkheid per watertypecategorie valt op dat deze gemiddeld het grootst is in de stilstaande wateren (meren/plassen en lijnvormige stilstaande wateren), lager in brak water en het laagst in stromend water. Tussen waterlichamen zit echter wel veel spreiding. De gepaarde vergelijkingen per waterlichaam zijn weergegeven in bijlage 3 (presentie), bijlage 4 (aantallen) en bijlage 5 (biomassa).

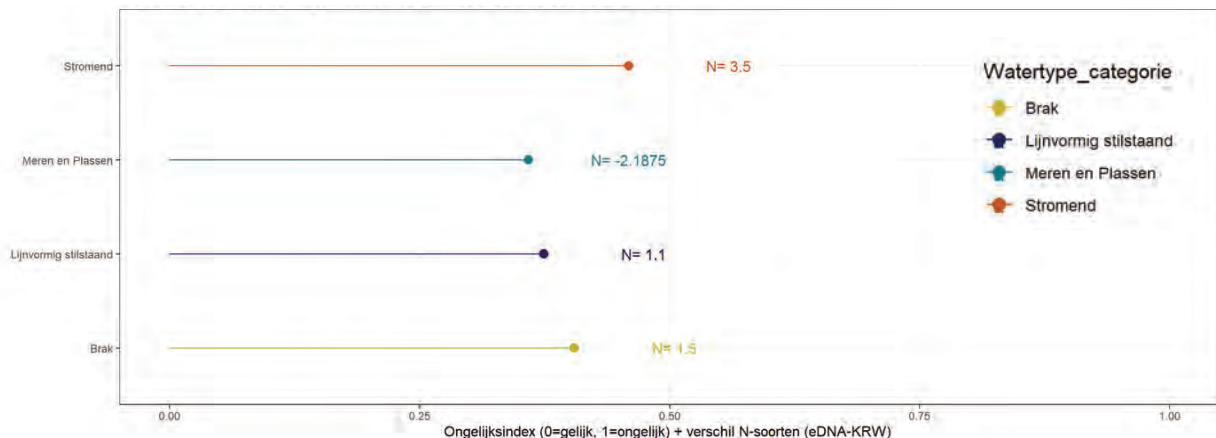
**FIGUUR 25**

*Gepaarde vergelijkingen van de visgemeenschappen verkregen met de KRW-bevissing en eDNA. Getoond wordt de gemiddelde ongelijkheid per waterlichaam voor de verschillende watertype-categorieën waarbij 0 is gelijk is en 1 zeer ongelijk. De vergelijkingen zijn gemaakt op basis van presentie (aan/afwezigheid van soorten), op basis van aantalsaandeel vs. aandeel in eDNA-sequenties en op basis van biomassa-aandeel vs. aandeel in eDNA-sequenties.*

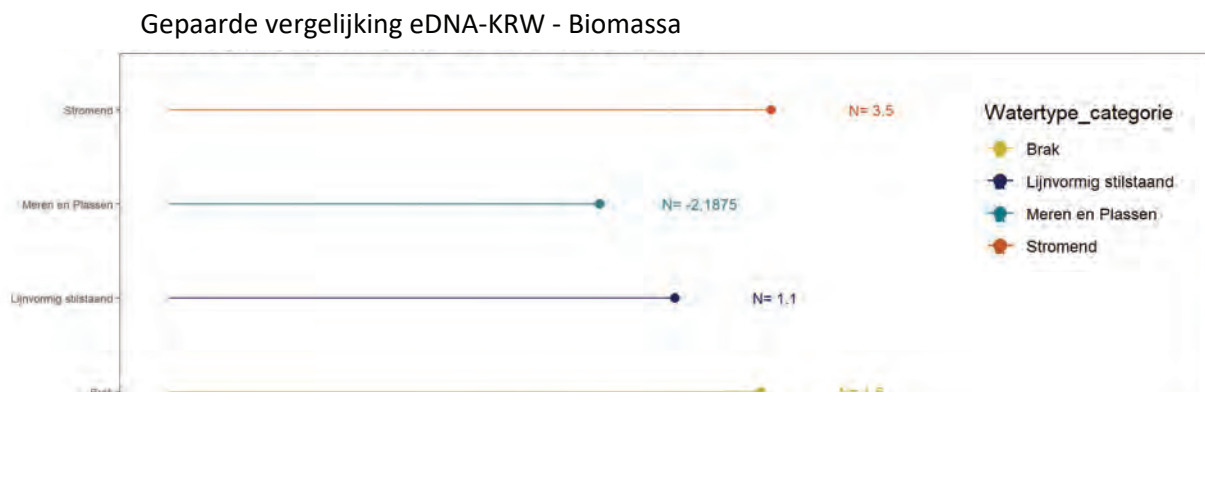
**Gepaarde vergelijking eDNA-KRW - presentie**



**Gepaarde vergelijking eDNA-KRW - Aantallen**



## VERVOLG FIGUUR 25



### 3.5 UITWISSELING VAN KENNIS

#### DNAqua.net congres

Van 15 tot 17 september 2020 zou het congres van DNAqua.net plaatsvinden in Evian (Frankrijk). Door de covid-19 pandemie is dit gecancelld. Het is daarom verplaatst naar 10 tot 12 maart 2021 en heeft online plaatsgevonden. RAVON heeft daar op 11 maart een presentatie verzorgt over het eDNA-metabarcoding vissen project in Nederland voor ruim 450 online deelnemers.

De COST subsidie vanuit de EU voor DNAqua.net is afgelopen in 2021. Het project scoorde hoog op verschillende EU succescriteria, waaronder

op de kwaliteit van de wetenschappelijke output. Overwogen wordt om een jaar verlenging aan te vragen. Het netwerk rond DNAqua.net zal in ieder geval in stand gehouden worden door jaarlijkse bijeenkomsten te organiseren, mogelijk gelinkt aan andere congressen. Nederland loopt voorop wat betreft het onderzoeken naar de mogelijkheid om eDNA-technieken te implementeren voor de KRW-beoordeling. In het Verenigd Koninkrijk ontwikkelen ze eDNA-maatlatten voor vissen in meren die tot op heden nog niet bevestigd werden (dus geen vergelijking). In Frankrijk vindt onderzoek plaats naar eDNA-maatlatten voor grote rivieren. Deelnemers aan DNAqua.net uit andere landen

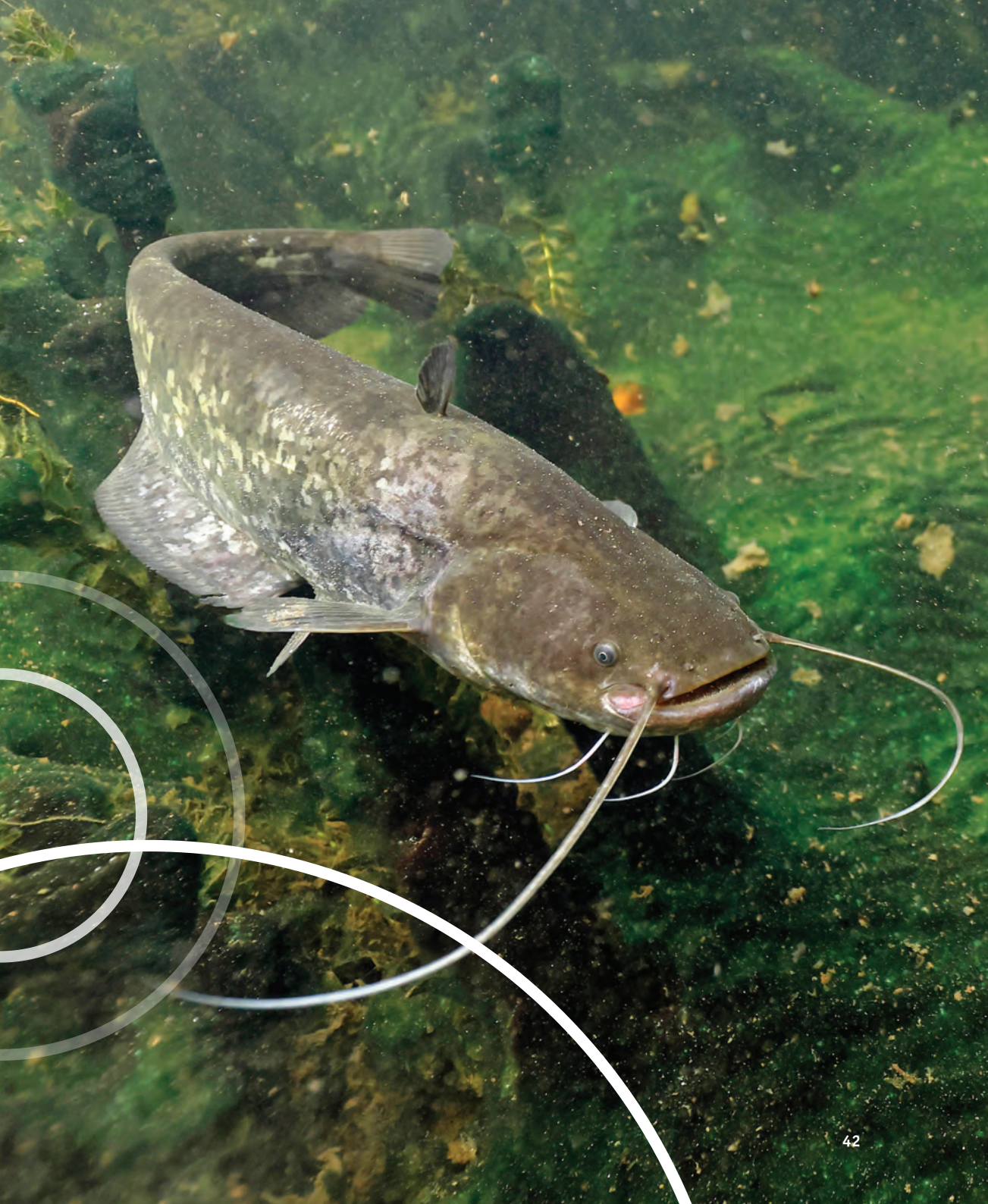
waren nog niet in het stadium de toepassing van eDNA voor de KRW-beoordeling te onderzoeken. In 2023 wordt er een nieuw congres van DNAqua.net verwacht.

#### NEN

RAVON is gevraagd om deel te nemen aan standaardisatie via de NEN normsubcommissie ecologie. Er is een nieuwe werkgroep opgericht "DNA en eDNA Methodes" die zich ook richt op het standaardiseren van eDNA technieken. Vanuit deze werkgroep is er een projectgroep opgericht waaraan RAVON ook deelneemt die werkt aan een update van de Nederlandse Praktijk Richtlijn (NPR) 7394: "Water - Algemene principes bij kwaliteitsborging van moleculairbiologisch onderzoek". Doel van deze projectgroep is het updaten en uitbreiden van NPR 7394 met eDNA technieken (daar de insteek fundamenteel anders is dan voor ander moleculair werk). Tot slot heeft RAVON deelgenomen aan de overkoepelende normsubcommissie Ecologie. Deze zijn in verband met de covid19 pandemie digitaal geweest.

#### Artikel in Visionair

We hebben in 2020 een artikel over het eDNA-metabarcoding vissen project in relatie tot de KRW geschreven voor Visionair. Dit is in het juni-nummer verschenen ([zie de PDF hier](#)). Dit artikel gaat in op de resultaten van de voorloper van het huidige project (2016) en beschrijft de werkzaamheden en doelen uit het onderhavige project.



## ➔ 4 DISCUSSIE

### 4.1 TREFKANS VAN SOORTEN MET eDNA EN KRW-BEVISSING

Om eventuele verschillen in trefkans tussen de eDNA-bemonstering en KRW-bevissing inzichtelijk te maken zijn de trefkansen per soort voor beide methoden vergeleken. In figuur 5 is in één oogopslag te zien of soorten een gelijke trefkans hadden met beide methoden (waarde 1), een lagere trefkans met eDNA (waarde lager dan 1) of een hogere trefkans hadden met eDNA (waarde hoger dan 1). Een zestal soorten had een lagere trefkans met eDNA t.o.v. de KRW-bevissing: kolblei, graskarper, spiering, kroeskarper, alver en driedoornige stekelbaars. Voor driedoornige stekelbaars verschilde de trefkans minimaal. Voor alver en spiering was het verschil iets groter, dit

zijn beiden soorten van het open water die ook regelmatig in lage dichtheden voorkomen. De kroeskarper is in 5 waterlichamen gevangen met de KRW-bevissing en in slechts 3 van die 5 waterlichamen ook met eDNA aangetoond. Het gaat dan om het aantonen van eDNA van kroeskarper/giebel omdat deze soorten niet van elkaar te onderscheiden zijn. Dat zorgt er ook voor dat kroeskarper niet is gedetecteerd in waterlichamen waar wel eDNA van kroeskarper/giebel is aangetroffen maar geen kroeskarper is gevangen. Dit zorgt daardoor mogelijk voor een onderschatting van de trefkans met eDNA. De trefkans voor graskarper was ook beduidend lager met eDNA. Dit is te verklaren doordat van deze soort enkel grote volwassen exemplaren in wateren aanwezig zijn. Die laten dan relatief weinig eDNA achter t.o.v. soorten waarvan ook juvenielen en kleinere exemplaren rondzwemmen. De veel lagere detectie van kolblei is opvallend en niet te verwachten op basis van de ecologie en het voorkomen van de soort. De oorzaak hiervan ligt in de sterke gelijkenis met brasem op het eDNA-fragment dat onderzocht wordt. eDNA van de kolblei is daarom in de analyses regelmatig niet toe te wijzen aan de soort maar komt in een verzamelgroep die SPYGEN rapporteert als “Cyprinidae Complex 3” maar die verder uit de analyses voor dit rapport is gelaten, omdat deze niet aan een soort te koppelen zijn. Mogelijk dat dit op te lossen is door het toevoegen van meer sequenties van kolblei aan de referentiedatabase waardoor duidelijker kan worden welke haplotypes (variaties van een sequentie voor een bepaald stuk DNA van een soort) tot kolblei behoren. Hiervoor hebben we meer tissuesamples uit Nederland aangeleverd.

Voor de brakwatergrondel lag de trefkans met eDNA en de KRW-bevissing gelijk. Voor de overige 28 soorten lag de trefkans met eDNA hoger. Soorten waarvoor de trefkans met eDNA meer dan anderhalf keer hoger lag dan in de KRW-bevissing waren Pontische stroomgrondel, zonnebaars, rivierdonderpad, grote modderkruiper, blauwband, Europese meerval en kopvoorn. Het betreft enkele soorten van stromend water waar eDNA ook van iets stroomopwaarts van een traject kan komen en daarnaast ook moeilijker te vangen soorten als grote modderkruiper en rivierdonderpad.

Wanneer ingezoomd wordt op enkel de trefkans met eDNA is te zien dat een zevental soorten in geen enkel waterlichaam waarin ze voorkwamen (gevangen in de KRW-bevissing of aangetoond met eDNA) zijn gemist (zie figuur 6). Dan volgt er een grote groep soorten die tussen 1% tot 20% van de locaties is gemist met eDNA (tot en met rivierdonderpad). Dat gaat dus om het missen van een soort in minder dan 1 op de vijf waterlichamen waarin een soort voorkwam. Een zevental soorten (19%) is in meer dan 20% van de waterlichamen waarin ze voorkomen gemist met eDNA. Verklaringen hiervoor worden reeds hierboven gegeven.

Ingezoomd op enkel de trefkans in de KRW-bevissing zijn er slechts 2 soorten in geen enkel waterlichaam gemist (brakwatergrondel en kroeskarper). Dan volgt er een grote groep soorten die op 1% tot 20% van de locaties is gemist met de KRW-bevissing (tot en met vetje). Meer dan de helft van de soorten (53%) is in meer dan 20% van de waterlichamen waarin ze voorkomen gemist met de KRW-bevissing. Dit is een aanzienlijk hoger aandeel van de soorten dan in de eDNA-bemonsteringen.

Nu is de KRW-bevissing niet opgezet om een compleet beeld te geven van alle aanwezige vissoorten omdat dat een te grote inspanning zou vergen. De maatlaten houden hier rekening middels de klassengrenzen. Doordat bekend is dat het onwaarschijnlijk is dat alle rheofiele soorten vangen worden zijn de klassengrenzen waarbij een bepaalde score wordt verkregen hierop aangepast.

Het feit dat beide methoden soorten missen die wel met de andere methoden gevangen worden laat zien dat geen van beide methoden een perfect beeld geeft van de werkelijkheid. Dit is iets om in het achterhoofd te houden met het oog op de vergelijking van de verkregen maatlatscores met beide methoden.

#### 4.2 AANTAL SOORTEN PER WATERLICHAAM

Uit eerdere onderzoeken kwam naar voren dat er gemiddeld meer soorten worden aangetoond met eDNA dan in de gelijktijdig uitgevoerde KRW-bevissingen. Op trajectniveau bedroeg het gemiddeld 60% meer soorten met eDNA (Herder & Kranenbarg

2016) en op waterlichaamniveau gemiddeld 18% meer soorten (Herder & Kranenbarg 2017). Dit wordt bevestigd in het huidige onderzoek, waarin een veel groter aantal waterlichamen zijn onderzocht, wel lag het percentage meer aangetroffen soorten lager. Dit lagere percentage is grotendeels te wijten aan de slechte resultaten met eDNA in een aan aantal meren/plassen (zie 4.2.3). Gemiddeld genomen werden er 8% meer soorten aangetoond met eDNA dan in de complete KRW-bevissing conform het handboek Hydrobiologie van de STOWA (zie figuur 8). Hiermee wordt onderschreven dat eDNA in potentie een goede methode is om de aanwezige vissoorten vast te stellen.

#### 4.2.1 Soortdetectie in lijnvormig stilstaand water

Wanneer er ingezoomd wordt op de watertype-categorieën blijkt dat binnen de lijnvormige stilstaande wateren gemiddeld 7% meer soorten gedetecteerd zijn met eDNA dan met de KRW-bevissing. Hiermee liggen de eDNA-bemonstering en KRW-bevissing in lijnvormige stilstaande wateren qua aantal soorten het dichtst bij elkaar van alle watertype-categorieën. Gemiddeld zijn er in lijnvormige stilstaande waterlichamen 20 unieke soorten aangetroffen met beide methoden samen. In 40% van de waterlichamen werden meer soorten gedetecteerd in de KRW-bevissing (zie figuur 9). Dit verschil lag tussen de 1 en 3 soorten en in een enkel geval 6 soorten (Eilandspolder). De Eilandspolder is een waterlichaam uit het onderzoek van 2016 en het verschil in soorten is uitgebreid besproken in de vorige rapportage en is veroorzaakt doordat er een zeer groot aantal trajecten bevist is in de KRW-bevissing t.o.v. slechts drie eDNA-mengmonsters. In de KRW-bevissing zijn daarbij enkele soorten in zeer lage dichtheden gevangen, bijvoorbeeld een enkele tiendoornige stekelbaars, soorten in hogere dichtheden zijn hier niet gemist met eDNA (Herder & Kranenbarg, 2017). In 53% van de lijnvormige stilstaande wateren zijn 1 tot 9 soorten (Tielerwaarden) meer gedetecteerd met eDNA dan in de KRW-bevissing (zie figuur 9). Wat opvalt is dat er t.o.v. wateren waarin meer soorten zijn gevangen in de KRW-bevissing het vaak om een groter verschil gaat dan wanneer er meer soorten gedetecteerd zijn met eDNA. In de helft van die waterlichamen gaat het om 4 of meer soorten meer in vergelijking tot de KRW-bevissing. Geconcludeerd kan worden dat de eDNA methode in lijnvormige stilstaande wateren een vergelijkbaar of net iets hoger aantal soorten weet te detecteren dan in de KRW-bevissing.

#### 4.2.2 Soortdetectie in brakke wateren

Wanneer er ingezoomd wordt op brakke wateren blijkt dat er hier gemiddeld 15% meer soorten gedetecteerd zijn met eDNA t.o.v. de KRW-bevissing. De visdiversiteit in brakke waterlichamen is het laagst met gemiddeld 12 unieke soorten aangetroffen met beide methoden samen. In 79% van de brakke waterlichamen zijn meer soorten aangetoond met eDNA dan in de KRW-bevissing (zie figuur 9). In een drietal waterlichamen werden meer soorten gedetecteerd met de KRW-bevissing waarbij het twee keer om 1 soort ging en in een enkel geval om 4 soorten (de Valle, waar in totaal 10 soorten gedetecteerd zijn). In de waterlichamen waar met eDNA meer soorten werden gedetecteerd ging het om 1 tot 5 soorten meer. Een mogelijke verklaring is dat in brakke wateren doorgaans niet elektrisch gevestigd kan worden en een combinatie van leusnet en fuiken minder efficiënt is voor het vaststellen van alle soorten. Geconcludeerd kan worden dat de eDNA methode in brakke wateren een goed of zelfs iets beter beeld geeft van de aanwezige soorten dan de KRW-bevissing.



#### 4.2.3 Soortdetectie in meren en plassen

Wanneer er ingezoomd wordt op meren/plassen blijkt dat er hier gemiddeld 18% minder soorten gedetecteerd zijn met eDNA t.o.v. de KRW-bevissing. Dit verschil was significant. Hiermee betreffen meren/plassen de enige watertype-categorie waarin er gemiddeld minder soorten worden gedetecteerd met eDNA t.o.v. de KRW-bevissing. Gemiddeld zijn er in meren/plassen 16 unieke soorten aangetroffen met beide methoden samen. In 63% van de meren/plassen zijn minder soorten aangetoond met eDNA dan in de KRW-bevissing (zie figuur 9). De grootste verschillen lagen in de Grote Wielen (10 soorten minder), Kleine Wielen (7 soorten minder) en Vinkeveense Plassen (6 soorten minder). Dit betreffen allen veenplassen. Ook andere veenplassen scoorden relatief slecht met eDNA t.o.v. de KRW bevissing (Schutsloterwijde, Belterwijde en de Leijen (respectievelijk 4, 3 en 3 soorten minder met eDNA). Vrij in het water opgelost eDNA kan binden aan organisch materiaal. Mogelijk dat dit een rol speelt in veenplassen waarbij eDNA gebonden wordt aan het organisch materiaal en daardoor moeilijk is op te pikken. Met name het grote aantal gemiste soorten in de Grote Wielen en Kleine Wielen wijst hierop. Verder werden er ook in de Spiegelplas en het Bovenwater relatief veel soorten gemist met eDNA (5 soorten minder). Mogelijk dat de gehanteerde bemonsteringsinspanning met drie mengmonsters waarvan twee in de oever en één in het open water onvoldoende is voor grotere diepere meren, ondanks dat deze succesvol getest is op een drietal meren in het project van 2016 (Herder & Kranenbarg, 2017). In de Viersprong werden juist 6 soorten meer aangetroffen met eDNA t.o.v. de KRW-bevissing. Hoewel dit waterlichaam tot het KRW-type M14 behoort lijkt het in de praktijk meer op een breed lijnvormig stilstaand water dan op een meer of plas. Over het geheel genomen kan geconcludeerd worden dat de eDNA methode met de hier toegepaste bemonsteringsstrategie in meren/plassen minder goed in staat was een beeld te geven van de aanwezige vissoorten dan de KRW-bevissing.

#### 4.2.4 Soortdetectie in stromend water

Wanneer er ingezoomd wordt op stromend water blijkt dat er hier gemiddeld 24% meer soorten gedetecteerd zijn met eDNA t.o.v. de KRW-bevissing. Dit ver-

schil is significant en het hoogst van alle watertype-categorieën. Gemiddeld zijn er stromende waterlichamen 18 unieke soorten aangetroffen met beide methoden samen. In 67% van de waterlichamen werden meer soorten gedetecteerd met eDNA in vergelijking tot de KRW-bevissing. Dit verschil in aantal soorten lag meestal tussen de 1 en 4 soorten, maar in een drietal gevallen hoger (Chaamse beek (5 soorten), Ramsbeek (10 soorten) en Bornse Beek, deel Elsbeek (16 soorten). In de Bornse Beek (deel Elsbeek) is uiteindelijk maar 1 traject bevist in de KRW-bevissing t.o.v. 3 eDNA-monsters. In de Ramsbeek ging het om 2 beviste trajecten t.o.v. 3 eDNA-monsters terwijl in de Chaamse beek meer KRW-trajecten waren bevist, namelijk 9, t.o.v. 3 eDNA-monsters. In drie waterlichamen zijn er 1 of 2 soorten minder aangetoond met eDNA dan in de KRW. De hoge detectie met eDNA in stromend water is te verklaren doordat eDNA goed mengt in stromend water en daardoor beter wordt opgepikt. Daarnaast kan eDNA afkomstig van vissen stroomopwaarts van het traject ook opgepikt worden waardoor in feite een groter deel van het stroomgebied bemonsterd wordt. De eDNA gegevens zijn daarom niet één op één te relateren aan de exacte locatie van de bemonstering. Geconcludeerd kan worden dat de eDNA methode in stromende wateren gemiddeld een hoger aantal soorten weet te detecteren dan met de KRW-bevissing.

#### 4.3 EKR-SCORES BEREKEND MET GEGEVENS EDNA EN KRW-BEVISSING

In paragraaf 3.3 wordt een vergelijking gegeven tussen de EKR-scores berekend vanuit de eDNA-bemonstering en de KRW-bevissing. Op hoofdlijnen zie je dat de verkregen EKR-scores met beide methoden het best overeenkomen in stromend- en brak water. Dit geldt in iets mindere mate bij lijnvormige stilstaande wateren en nog minder bij meren en plassen. Bij lage EKR-scores uit de KRW-bevissing zijn de EKR-scores met eDNA in de regel ook laag en bij hoge scores uit de KRW-bevissing zijn de scores uit de eDNA-bevissing in de regel ook hoog. Voor meren/plassen gaat dit minder op en is er veel variatie. Hieronder wordt per watertype-categorie de vergelijking tussen de EKR-scores vanuit de KRW-bevissing en eDNA-bemonstering beschreven voor de totale EKR-scores en voor de deelmaatlaten om in te kunnen zoomen op waar de verschillen vandaan komen.

#### 4.3.1 Lijnvormige stilstaande wateren

Voor lijnvormige stilstaande wateren was het door het ontbreken van detailinformatie over beviste trajecten en oppervlaktes niet mogelijk de ERK-scores van de totale waterlichamen en deelmaatlaten opnieuw te berekenen (zie toelichting paragraaf 3.3.2). Voor de totale EKR-scores is gebruik gemaakt van de door de uitvoerder of het waterschap aangeleverde EKR-scores (zie figuur 10). Voor enkele waterlichamen betrof dit een totale score voor het waterlichaam, terwijl met eDNA slechts een deelwaterlichaam bemonsterd was. Dit kan een vertekend beeld geven wanneer het deelwaterlichaam afwijkt van de rest van het waterlichaam. Bijvoorbeeld doordat er andere soorten worden waargenomen, of het aandeel in biomassa van soorten verschilt. In een aantal gevallen zijn er EKR-scores verkregen uit een ander jaar dan de bemonstering met eDNA. Hierdoor kunnen ook verschillen optreden doordat de omstandigheden en daarmee de visgemeenschap kan verschillen tussen jaren. De verwachting is echter dat die verschillen niet heel groot zullen zijn. De EKR-scores kwamen over het algemeen redelijk overeen in lijnvormige stilstaande wateren. Bij lage EKR-scores uit de KRW-bevissing kwamen er over het algemeen ook lage scores uit de eDNA-bevissing en hetzelfde gold voor hoge scores (zie figuur 10). Wanneer gekeken wordt naar de overeenkomst in EKR-klasse (figuur 11) hadden elf waterlichamen een gelijke EKR-klasse, zes waterlichamen kwamen één klasse lager uit met eDNA, elf waterlichamen één klasse hoger en twee waterlichamen twee klassen hoger. Een verschil van een enkele klasse kan reeds veroorzaakt worden door relatief kleine afwijkingen wanneer de EKR-score van de KRW-bevissing dichtbij een klasse grens (0,2 /0,4 /0,6 /0,8) ligt. Een verschil van twee klassen is wel groot. Het ging om de Oostboezem waar met eDNA een deelwaterlichaam is bevist, wat een verklaring kan zijn voor het grotere verschil. Daarnaast ging het om de Linge en Kanalen Nederbetuwe. Hier is het grotere verschil veroorzaakt door het hoge biomassa aandeel karper/brasem in de KRW (66%) t.o.v. het aandeel in eDNA sequenties (13%), wat tot een verschil in score leidt op de deelmaatlat aandeel karper/brasem. In eDNA gegevens hadden bittervoorn (13%) en marm grondel (22%) een groot aandeel in de sequenties. Bekend is dat deze kleine soorten, wanneer ze in grote aantallen voorkomen veel eDNA kunnen achterlaten. Ook laten kleine soorten per kilo biomassa relatief

veel eDNA achter doordat ze een relatief groter oppervlak hebben t.o.v. hun biomassa (Maruyama *et al.*, 2014). Hierdoor scoort de deelmaatlat biomassa aandeel brasem/karper scoorde eigenlijk vrijwel altijd hoger met eDNA. Op de deelmaatlat aandeel plantminnende soorten scoorde eDNA gemiddeld ook iets lager maar waren de uitkomsten meer variabel.

De deelmaatlaten zijn berekend vanuit de bestandschattingen. Dit had per monsterpunt gemoeten, maar daarvoor ontbraken de benodigde gegevens in de ruwe data. Daardoor was de deelmaatlat aantal plantminnende en migrerende soorten niet eerlijk te vergelijken en is deze weggelaten. Dit omdat in de complete bestandschatting altijd meer soorten zitten dan per individueel monsterpunt en het berekenen van de deelmaatlatscore voor aantal soorten vanuit de bestandschatting daardoor een te hoge score zou geven. De deelmaatlaten gebaseerd op biomassa wijken bij het berekenen vanuit de bestandschatting naar verwachting minder af ten opzichte van de juiste berekening vanuit het gemiddelde per monsterpunt.

#### 4.3.2 Brakke wateren

De EKR-scores verkregen vanuit de KRW-bevissing en eDNA-bemonstering komen bij brakke wateren redelijk goed overeen (figuur 10). Wanneer ingezoomd wordt op de deelmatten valt op dat de EKR-scores op de deelmaatlaten die gebaseerd zijn op aantallen waargenomen soorten heel goed overeenkomen en die gebaseerd zijn op biomassa aandeel van soorten slecht overeenkomen (zie figuur 14 en 15). Uit eerdere onderzoeken en vergelijkingen tussen eDNA en KRW-bevissingen is reeds naar voren gekomen dat de aandelen in biomassa niet één op één overeenkomen met aandelen in eDNA sequenties (Herder & Kranenbarg 2017). Daarnaast speelt bij brakke wateren dat voor de bestandschatting in veel gevallen enkel gebruik wordt gemaakt van de vangstgegevens van het leusnet. Dit omdat de wateren te brak zijn om elektrisch te bevissen. De gegevens uit de ingezette fuiken worden wel gebruikt voor de deelmaatlaten over aantal soorten maar niet in de deelmaatlaten voor abundantie omdat de fuikvangsten niet te kwantificeren zijn naar oppervlak per hectare. Zo komt het veel voor dat er bijvoorbeeld



een flinke hoeveelheid paling is gevangen in de fuiken maar deze met het leusnet zijn gemist en de paling daardoor niet mee doet in de bestandschatting en op de deelmaatlatten op basis van biomassa. Dit kan mede een verklaring zijn voor de lage correlatie tussen eDNA en de KRW-bevissingen op de deelmaatlatten die gaan over biomassa. Wanneer gekeken wordt naar de overeenkomst in EKR-klasse (figuur 11) hadden zes waterlichamen een gelijke EKR-klasse, één waterlichaam kwam één klasse lager uit met eDNA en vijf waterlichamen één klasse hoger. Een verschil van een enkele klasse kan reeds veroorzaakt worden door relatief kleine afwijkingen wanneer de EKR-score van de KRW-bevissing dichtbij een klasse grens (0,2/ 0,4 /0,6 /0,8) ligt. Geconcludeerd kan worden dat in brakke wateren de eDNA bemonsteringen een redelijke overeenkomstige inschatting geven van de EKR-scores gebaseerd op de KRW-bevissing en verschillen met name veroorzaakt worden op door de deelmaatlatten op basis van abundantie.

#### 4.3.3 Meren en plassen

De EKR-scores verkregen van uit de KRW-bevissing en eDNA-bemonstering kwamen bij meren/plassen van alle watertype-categorieën het slechtst overeen. In de meeste gevallen werd er op basis van eDNA een (flink) hogere EKR-score verkregen dan vanuit de KRW-bevissing. De belangrijkste oorzaak hiervoor is dat maatlat voor meren/plassen is opgebouwd uit vier deelmaatlatten die allen zijn gebaseerd op abundantie (biomassa aandeel) van verschillende groepen. Uit eerdere onderzoeken en vergelijkingen tussen eDNA en KRW-bevissingen is reeds naar voren gekomen dat de aandelen in biomassa niet één op één overeenkomen met aandelen in eDNA sequenties (Herder & Kranenborg 2017). Het aandeel in sequenties brasem/karper is veelal lager dan het aandeel in biomassa. Dit speelt vooral voor de karper waarvan vaak enkel grote volwassen exemplaren rondzwemmen doordat de soort zich slecht voortplant in Nederland. Deze hebben wel een hoge biomassa, maar laten relatief weinig eDNA achter per kilo lichaamsgewicht. Soorten met veel kleine exemplaren laten relatief veel eDNA achter per kilo lichaamsgewicht (bijvoorbeeld bittervoorn). Deze verschillen werken sterk door in de deelmaatlatten bij meren/plassen die allemaal gebaseerd zijn op biomassa aandeel van soorten (zie figuur 13). Zo scoort de deelmaatlat biomassa aandeel karper/brasem vrijwel standaard hoger op basis van eDNA in vergelijking tot de KRW. Ook de deelmaatlat biomassa aandeel baars en blankvoorn scoort vrijwel standaard hoger met eDNA in vergelijking tot de KRW-bevissing. De deelmaatlatten biomassa aandeel plantminnende soorten en biomassa aandeel zuurstoftolerante soorten laten een meer variabel beeld zien. Bij de deelmaatlat voor biomassa aandeel zuurstoftolerante soorten valt op dat deze in een redelijk aantal gevallen nog EKR-scores van 0,1 tot 0,6 heeft met eDNA, terwijl deze 0 scores in de KRW-bevissing. Dit komt dan doordat zeelt niet of in zeer lage aantallen is gevangen in de KRW-bevissing, maar wel een groter aandeel had in de eDNA-sequenties. De klassengrenzen zijn op deze deelmaatlat ook laag tot zeer laag wat al snel tot verschillen in EKR-score kan leiden. De slecht overeenkomende aandelen in biomassa uit de KRW-bevissing en in eDNA-sequenties vertalen zich in een slechte overeenkomst in EKR-klasse (figuur 11).





In totaal hadden drie waterlichamen een gelijke EKR-klasse, twee waterlichamen kwamen één klasse lager uit met eDNA, acht waterlichamen één klasse hoger en vier waterlichamen twee klassen hoger. Geconcludeerd kan worden dat de eDNA bemonsteringen niet voldoen voor het vaststellen van de EKR-scores of klassen gebruikmakend van de huidige maatlatten. De bemonsteringsinspanning met eDNA lijkt onvoldoende groot voor het bepalen van de visgemeenschap en in laagveenplassen lijkt eDNA minder goed opgepikt te worden. Zoals in paragraaf 4.2.3 is beschreven zijn in meren, opnieuw als enige watertype-categorie, minder soorten gedetecteerd met eDNA.

#### 4.3.4 Stromende wateren

De EKR-scores verkregen van uit de KRW-bevissing en eDNA-bemonstering hebben een sterke correlatie bij stromende wateren (figuur 10), de beste correlatie van de vier watertype-categorieën. Wat opvalt is dat de EKR-scores verkregen met eDNA structureel een fractie hoger lijken te liggen dan die verkregen vanuit de KRW-bevissing. Dit is te verklaren door de hogere soortdetectie met eDNA in stromend water (zie figuur 8 en paragraaf 4.2.1). Daarnaast zijn met eDNA vaak subtrajecten in een enkel monster verwerkt, hierdoor is er een groter oppervlakte bemonsterd wat tot meer soorten kan leiden. Doordat de iets hogere EKR-scores structureel zijn zou hiervoor gecompenseerd kunnen worden door het aanpassen van de klassengrenzen.

Wanneer ingezoomd wordt op de deelmaten (zie figuur 17) valt op dat drie van de vier deelmaatlatten in stromend water gebaseerd zijn op aantal soorten van een bepaalde categorie. De vierde deelmaatlat is gebaseerd op abundantie in aantallen. Bekend is dat eDNA door hogere trefkansen in stromend water goed in staat is soorten in kaart te brengen. Daarnaast zijn er in de eDNA-bemonstering mengmonsters genomen van trajecten en kan ook eDNA van iets bovenstrooms van een monsterpunt worden opgepikt. Dit leidt tot meer soorten per monster. Dit is duidelijk zichtbaar bij de deelmaatlatten aantal soorten rheofielen en aantal migrerende soorten. Hier scoort de eDNA-methode standaard een iets hogere EKR-score dan de KRW-bevissing door het aantonen van meer soorten. Voor

de deelmaatlat relatief aantal plantminnende soorten is het beeld variabel. Doordat de deelmaatlat relatief is kunnen ook detecties van andere soorten van invloed zijn omdat het gaat om het aantal plantminnende soorten t.o.v. andere soorten. Opvallend is dat ook de vierde deelmaatlat, die gebaseerd is op het aantalsaandeel rheofielen, goed correleert met het aandeel in eDNA-sequenties rheofielen. Mogelijk dat door de stroming eDNA beter mengt en daardoor een nauwkeuriger beeld geeft van de verhoudingen tussen soorten. Ook bleek uit de voorgaande studie dat de correlatie tussen eDNA en aantallen iets beter is dan tussen eDNA en biomassa (Herder & Kranenbarg, 2017) De EKR-klassen kwamen redelijk goed overeen in stromende wateren (figuur 11) In totaal hadden twaalf waterlichamen een gelijke EKR-klasse en negen waterlichamen één klasse hoger met eDNA. Een verschil van een enkele klasse kan reeds veroorzaakt worden door relatief kleine afwijkingen wanneer de EKR-score van de KRW-bevissing dichtbij een klasse grens (0,2 /0,4 /0,6 /0,8) ligt. Geconcludeerd kan worden dat in stromende wateren de vanuit de eDNA-bemonsteringen en KRW-bevissing verkregen EKR-scores een sterke correlatie hebben waarbij de eDNA methode in de regel net iets hogere EKR-scores geeft.

#### 4.4 POTENTIE VAN DE EDNA METHODE VOOR KARAKTERISERING VAN DE VISGEMEENSCHAP

De clusteranalyses uit paragraaf 3.4 maken inzichtelijk in welke mate de gegevens verkregen met eDNA en de KRW-bevissingen visgemeenschappen vergelijkbaar karakteriseren. Hierbij zijn zowel de gegevens van eDNA als van de KRW-bevissing geclusterd naar de vier watertype-categorieën. Daarbij is te zien dat de visgemeenschappen verkregen met eDNA en vanuit de KRW-bevissing dicht bij elkaar liggen en zeer vergelijkbaar zijn. Tussen de watertype-categorieën valt op dat lijnvormig stilstaand water en plassen/meren dicht bij elkaar liggen. Dit ligt in de lijn der verwachting omdat in plassen en meren vergelijkbare habitats aanwezig zijn als in lijnvormig stilstaand water en het beide zoete stilstaande wateren betreffen. Hierdoor komen er globaal genomen dezelfde vissoorten voor. Stromende en brakke wateren liggen hier duidelijk verder vanaf, wat te verklaren is door de aanwezigheid van respectievelijk stromingsminnende en estuariene soorten.

Wanneer gekeken wordt hoe vergelijkbaar de gegevens vanuit de eDNA-bemonstering en KRW-bevissing clusteren op basis van presentie (aan- of afwezigheid van soorten), aantallen of biomassa komt naar voren dat de overlap op basis van presentie tussen beide methodes het sterkst is. Op basis van aantalsaandeel en aandeel eDNA-sequenties is er iets meer ongelijkheid tussen de visgemeenschappen, met name bij de meren/plassen (figuur 19). Op basis van biomassa-aandeel en aandeel eDNA-sequenties is de vergelijkbaarheid het minste waarbij er in lijnvormig stilstaand water en meren/plassen geen overlap meer is in de verkregen visgemeenschappen. Dit komt overeen met eerdere vergelijkingen tussen de KRW-bevissingen en eDNA-bemonsteringen, waaruit naar voren komt dat de aangetoonde soorten (presentie) zeer vergelijkbaar zijn maar het aandeel in eDNA-sequenties minder goed overeenkomt met aandelen in aantallen of biomassa (Herder & Kranenbarg 2016). Dit wordt ook onderschreven door de paarsgewijze vergelijking tussen de verkregen visgemeenschappen met eDNA en de KRW-bevissing per waterlichaam. Hier is de ongelijkheid het kleinst op basis van presentie, iets groter op basis van aantalsaandeel t.o.v. aandeel eDNA sequenties en het grootst op basis van biomassa-aandeel t.o.v. aandeel eDNA sequenties (zie figuur 25).

#### 4.5 POTENTIE VAN DE EDNA-METHODE VOOR EKR-BEOORDELING

Een belangrijke vraag is in hoeverre de middels de eDNA-methode verkregen gegevens potentie hebben om waterlichamen op een vergelijkbare manier te beoordelen als de huidige KRW-bevissingen en daarbij behorende maatlaten. In paragraaf 4.3 wordt besproken in hoeverre de eDNA-gegevens middels de huidige maatlaten tot dezelfde EKR-scores en EKR-klasse bepaling komen. In deze paragraaf wordt besproken in hoeverre de eDNA-gegevens een voorspellende waarde hebben voor de EKR-klasse. Daarbij is voor ieder waterlichaam gebruik gemaakt van de EKR-klasse verkregen vanuit de KRW-bevissing. Dit is namelijk de beoordeling die op vergelijkbare manier gereproduceerd zou moeten worden met eDNA om een trendbreuk bij eventuele wijziging van bemonsteringsmethode te voorkomen. De kanttekening die hierbij gemaakt dient te worden is dat de KRW-bevissingen ook niet altijd een goed beeld geven van de aanwezige visgemeenschap. Het net wel of net niet vangen van bepaalde soorten of een school

soorten kan voor grote afwijkingen in de beoordeling zorgen. Om een vergelijking te maken hoe voorspellend de gegevens verkregen met beide methoden zijn voor de EKR-klasse zijn er apart voor de gegevens verkregen met eDNA en gegevens verkregen met de KRW-bevissing clusteranalyses uitgevoerd naar de EKR-klassen. De verwachting hierbij was dat de gegevens van de KRW-bevissing een zeer goede voorspelbare waarde hadden voor de clustering op EKR-klasse. Deze EKR-klassen zijn namelijk rechtstreeks afgeleid vanuit dezelfde gegevens via de maatlatten. De eDNA gegevens staan op zich en worden dus vergeleken met de beoordelingen in EKR-klassen vanuit de KRW-bevissing.

Voor lijnvormig stilstaande wateren hadden de KRW-gegevens zoals verwacht een goede voorspelbare waarde voor de EKR-klasse. Alleen op basis van presentie was er relatief veel overlap tussen de EKR-klassen, maar op basis van aantallen en biomassa was er relatief weinig overlap en een logische clustering te zien van matig tot zeer goed met daartussenin goed. Op basis van eDNA was de clustering op basis van presentie redelijk vergelijkbaar met die van de KRW-bevissing maar met iets meer overlap tussen de EKR-klassen. De clustering op basis van aandeel in eDNA sequenties gaf een betere clustering naar EKR-klassen dan op basis van presentie. Dit laat zien dat het aandeel eDNA sequenties per soort een voorspellende waarde heeft voor de EKR-klasse. Dit is ook wat verwacht was gezien het feit dat twee van de drie deelmaatlatten gebaseerd zijn op biomassa-aandeel.

Voor meren/plassen hadden zowel de KRW-gegevens als de eDNA-gegevens weinig voorspellende waarde voor de EKR-klassen. Er zat grote overlap in de clusters. Dat de clustering op basis van presentie (enkel aan-/afwezigheid van soorten) minder voorspellende waarde zou hebben lag in de lijn der verwachting. Meren/plassen hebben namelijk enkel deelmaatlatten gebaseerd op biomassa aandeel. Dat ook de clustering gebruik makend van aantals- en biomassa-aandeel slecht zou zijn is onverwacht. Zeer waarschijnlijk komt dit doordat bij de clustering de aandelen van alle vissoorten meetellen terwijl voor de EKR-beoordeling op de deelmaatlatten gefocust wordt op de aandelen van bepaalde soorten (karper/brasem of plantminnende soorten).

Voor brakke wateren kon doordat er te weinig replica's waren in de EKR-klassen matig en slecht geen clusteranalyse worden uitgevoerd naar EKR-klasse.

Voor stromende wateren hadden de KRW-gegevens zoals verwacht een goede voorspelbare waarde voor de EKR-klasse (figuur 24). Op basis van presentie was er slechts verwaarloosbare kleine overlap tussen de clusters voor slecht en ontoereikend. Op basis van aantalsaandeel was er geen overlap en op basis van biomassa-aandeel was er een iets grotere, maar nog steeds zeer kleine overlap. Op basis van eDNA was de clustering op basis van presentie redelijk voorspellend, met kleine overlap tussen de klassen slecht en ontoereikend. De clustering op basis van eDNA-sequenties laat zien dat deze een nog hogere voorspellende waarde hebben voor de EKR-klasse met verwaarloosbare overlap tussen beide klassen. In de dataset zaten niet genoeg waterlichamen om ook wateren met een matige, goede of zeer goede EKR-score mee te nemen. De verwachting is dat deze ook met eDNA goed beoordeeld kunnen worden doordat de maatlatten en klassengrenzen gebaseerd zijn op basis van presentie van soorten, iets wat met eDNA goed in beeld is te brengen.





## ➔ 5 CONCLUSIES

- De trefkans is voor de meeste soorten hoog met eDNA. eDNA is goed in staat de aanwezige soorten in kaart te brengen. Vijf soorten hadden een hogere trefkans in de KRW-bevissing, één soort een gelijke trefkans en 29 soorten hadden een hogere trefkans met eDNA. Een zevental soorten is in meer dan 20% van de waterlichamen waarin ze voorkwamen gemist met eDNA terwijl dit gold voor 19 soorten in de KRW-bevissing. (zie paragraaf 4.1).
- Per waterlichaam zijn gemiddeld 8% meer soorten aangetroffen met eDNA. In lijnvormig stilstaand water, brak water en stromend water zijn gemiddeld respectievelijk 7%, 15% en 24% meer soorten aangetroffen met eDNA. In meren en plassen zijn gemiddeld 18% minder soorten aan-

getroffen met eDNA, waarbij opviel dat de methode slecht scoorde in veenplassen (mogelijk door binding eDNA aan organisch materiaal) en in enkele grote diepe meren (mogelijk te lage bemonsteringsinspanning) (zie paragraaf 4.2 en sub paragrafen).

- EKR-scores berekend via de huidige maatlatten op basis van gegevens verkregen met de eDNA-methode en de KRW-bevissing hadden de grootste overeenkomst in stromend- en brak water. In lijnvormige stilstaande wateren was de overeenkomst iets minder en in meren en plassen was de overeenkomst slecht (paragraaf 4.3).
- De scores van deelmaatlatten gebaseerd op absolute (of relatieve) aantallen soorten vertonen over het algemeen een hoge correlatie tussen eDNA en de KRW-bevissing. Dit komt doordat beide methoden goed in staat zijn soorten te detecteren, de scores met eDNA liggen in enkele gevallen (stromend water) wel iets hoger door de iets hogere trefkans (zie paragraaf 4.3.1 t/m 4.3,4).
- De scores van deelmaatlatten gebaseerd op abundantie (biomassa- of aantalsaandeel van soorten) vertonen over het algemeen een lage correlatie tussen eDNA en de KRW-bevissing. Dit komt doordat het aandeel in eDNA-sequenties niet één op één overeenkomt met het aandeel in biomassa of aantallen. Daarnaast is bij brakke wateren de bestandschatting incompleet, doordat fuikvangsten niet meegenomen worden. (zie paragraaf 4.3.1 t/m 4.3,4).
- Het gebruikte type deelmaatlatten (gebaseerd op presentie of abundantie) is bepalend voor hoe goed de EKR-scores tussen de eDNA-bemonstering en KRW-bevissing overeen komen. Bij de stromende wateren, die bestaan uit drie deelmaatlatten op soorten en één op aantalsaandeel, komen de EKR-scores verkregen met beide methoden het beste overeen (in de regel iets hoger voor eDNA, waarvoor te corrigeren is door aanpassing van de klassengrenzen). In brakke wateren komen EKR's op de deelmaatlatten op basis van soorten zeer goed overeen en die op basis van abundantie slecht. In de meren en plassen zijn alle deelmaatlatten op basis van abundantie (biomassa) en is de correlatie het slechtst (zie paragraaf 4.3.1 t/m 4.3,4).
- De met eDNA en middels de KRW-bevissing verkregen gegevens karakteriseren visgemeenschappen op vergelijkbare wijze wanneer geclusterd wordt naar wa-

tertype-categorie. De vergelijkbaarheid is het hoogst op basis van presentie (aan- of afwezigheid van soorten) en lager op basis van aantals- of biomassa-aandeel t.o.v. aandeel in eDNA-sequenties. Dit laat zien dat de eDNA gegevens op zichzelf de potentie hebben een visgemeenschap te karakteriseren (zie paragraaf 4.4).

- Tot slot is onderzocht in hoeverre de eDNA gegevens (op basis van presentie of eDNA-sequenties) en KRW-gegevens (op basis van presentie, aantallen en biomassa) een voorspellende waarde hadden voor de vanuit de KRW-bevissing verkregen EKR-klasse van waterlichamen. Hierbij waren er verschillen tussen de watertype-categorieën (zie paragraaf 4.5):
  - In lijnvormige stilstaande wateren hadden zowel de gegevens uit de eDNA-bemonstering als KRW-bevissing een goede voorspellende waarde voor de EKR-klasse. De voorspellende waarde was bij eDNA het hoogst op basis van aandeel eDNA-sequenties en bij de KRW-gegevens op basis van aantallen en biomassa. Dat laatste komt overeen met de deelmaatlatten die voor 2/3e gebaseerd zijn op abundantie.
  - In meren en plassen hadden zowel de uit de eDNA-bemonstering als KRW-bevissing weinig voorspellende waarde voor de EKR-klasse. Dit was onverwacht voor de KRW-gegevens, omdat deze zelf aan de basis staan van de berekende EKR-klassen.
  - In brakke wateren waren er te weinig replica's voor bepaalde EKR-klassen om te kunnen clusteren.
  - In stromende wateren hadden zowel de gegevens uit de eDNA-bemonstering als KRW-bevissing een goede voorspellende waarde voor de EKR-klasse. De voorspellende waarde was bij eDNA het hoogst op basis van aandeel eDNA-sequenties. Bij de KRW-gegevens was de voorspellende waarde het hoogst op basis aantalsaandeel (wat ook een deelmaatlat is), gevolgd door presentie (andere 3 deelmaatlatten) en het minst op basis van biomassa.



## LITERATUUR

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

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.

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

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., M. Schiphouwer & J. Kranenbarg, 2014. 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., en J. Kranenbarg, 2017. eDNA metabarcoding vissen - Onderzoek naar de mogelijke toepassing van eDNA voor de KRW vismonitoring (2016), RAVON/STOWA rapport 2017-38

Kelly RP, Port JA, Yamahara KM, Crowder LB , 2014. Using environmental DNA to census marine fishes in a large mesocosm. *PLoS ONE*, 9, e86175.

Maruyama A, Nakamura K, Yamanaka H, Kondoh M, Minamoto T, 2014. The Release Rate of Environmental DNA from Juvenile and Adult Fish. *PLoS ONE* 9(12): e114639. doi:10.1371/journal.pone.0114639

Oksanen, J., Kindt, R., Legendre, P., & O'Hara, R., 2007. *Vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.5-5. <https://www.rdocumentation.org/packages/vegan>

Pot, R. 2021. QBWat, programma voor beoordeling van de biologische waterkwaliteit volgens de Nederlandse maatlatten voor de Kaderrichtlijn Water. Versie 7.00;. <http://www.roelfpot.nl/qbwat>.

Stowa, 2021. Referenties en maatlatten voor natuurlijke watertypen voor de kaderrichtlijn water 2021-2027. STOWA rapport 2018-49.

Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., Rieseberg, L.H., 2012. Environmental DNA. *Molecular Ecology*. 21, 1789-1793.

Thomsen, P.F., Kielgast, J., Iversen, L.L., Møller, P.R., Rasmussen, M., Willerslev, E., 2012. Detection of a Diverse Marine Fish Fauna Using Environmental DNA from Seawater Samples. *PLoS ONE* 7, e41732. doi:10.1371/journal.pone.0041732

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.

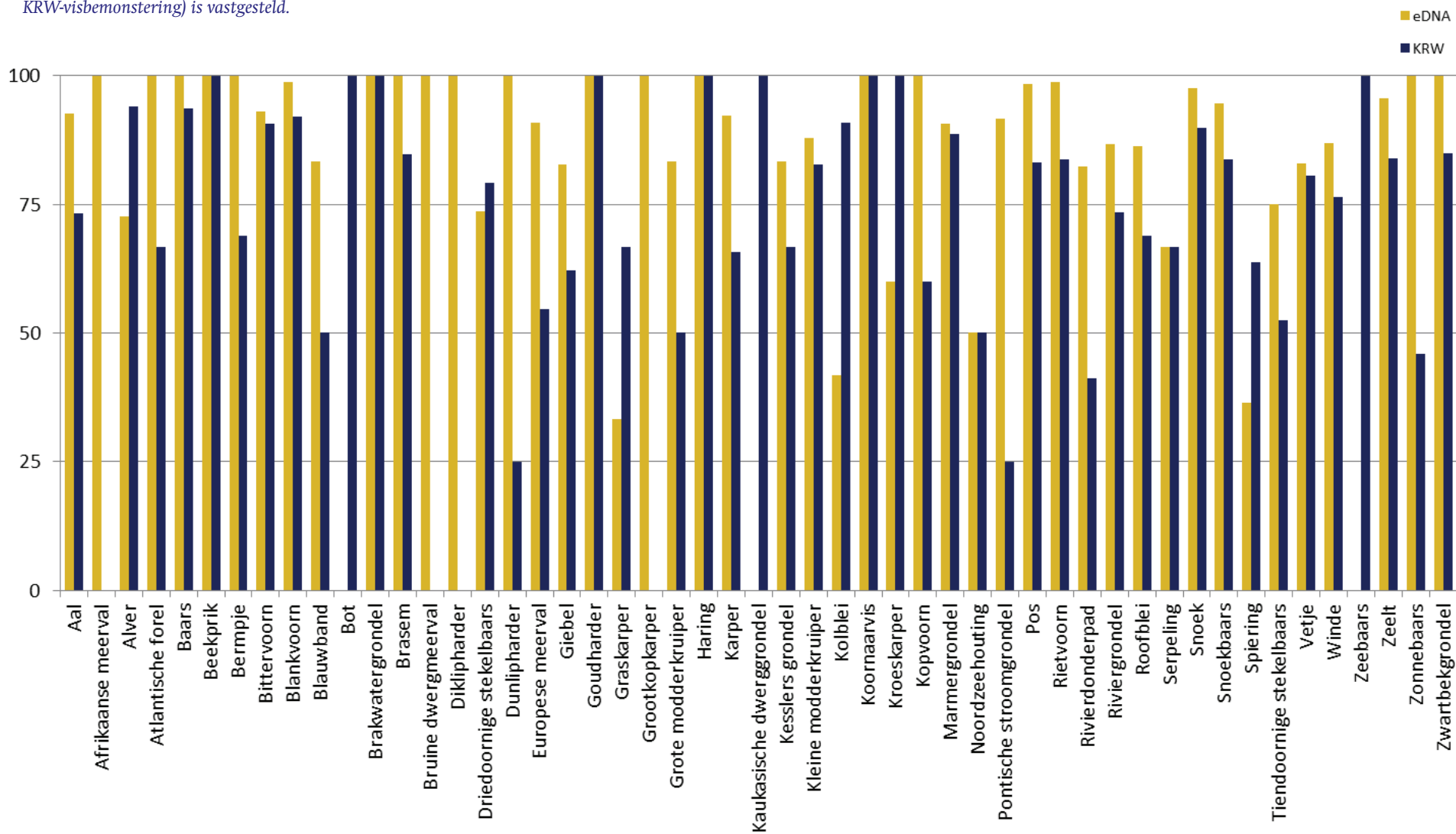




## **BIJLAGEN**

## BIJLAGE 1

Trefkans per soort met eDNA en in de KRW-visbemonstering (per waterlichaam). Uitgedrukt als het percentage van alle waterlichamen waarin de soort met één van beide (eDNA en KRW-visbemonstering) is vastgesteld.

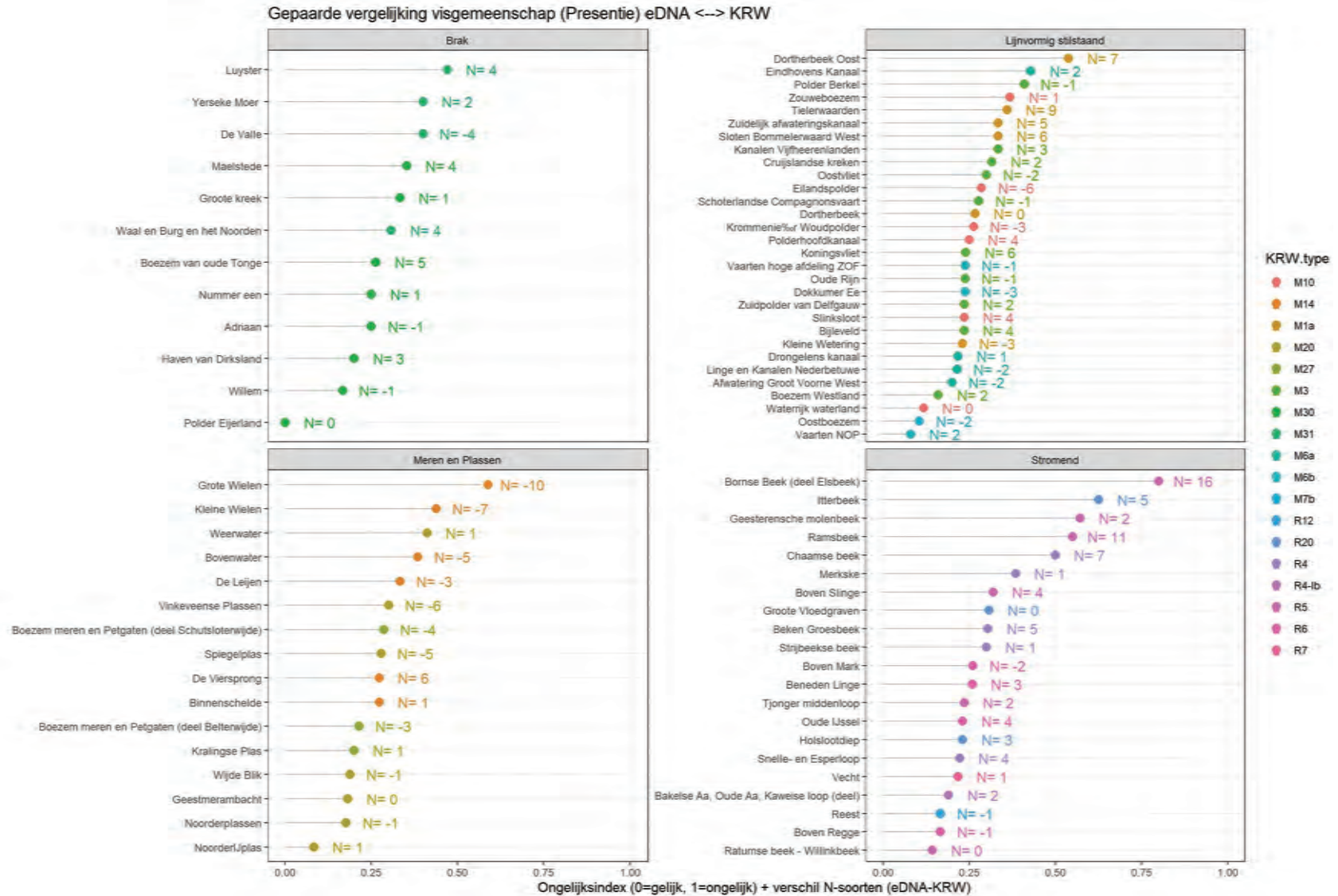


BIJLAGE 2



**BIJLAGE 3**

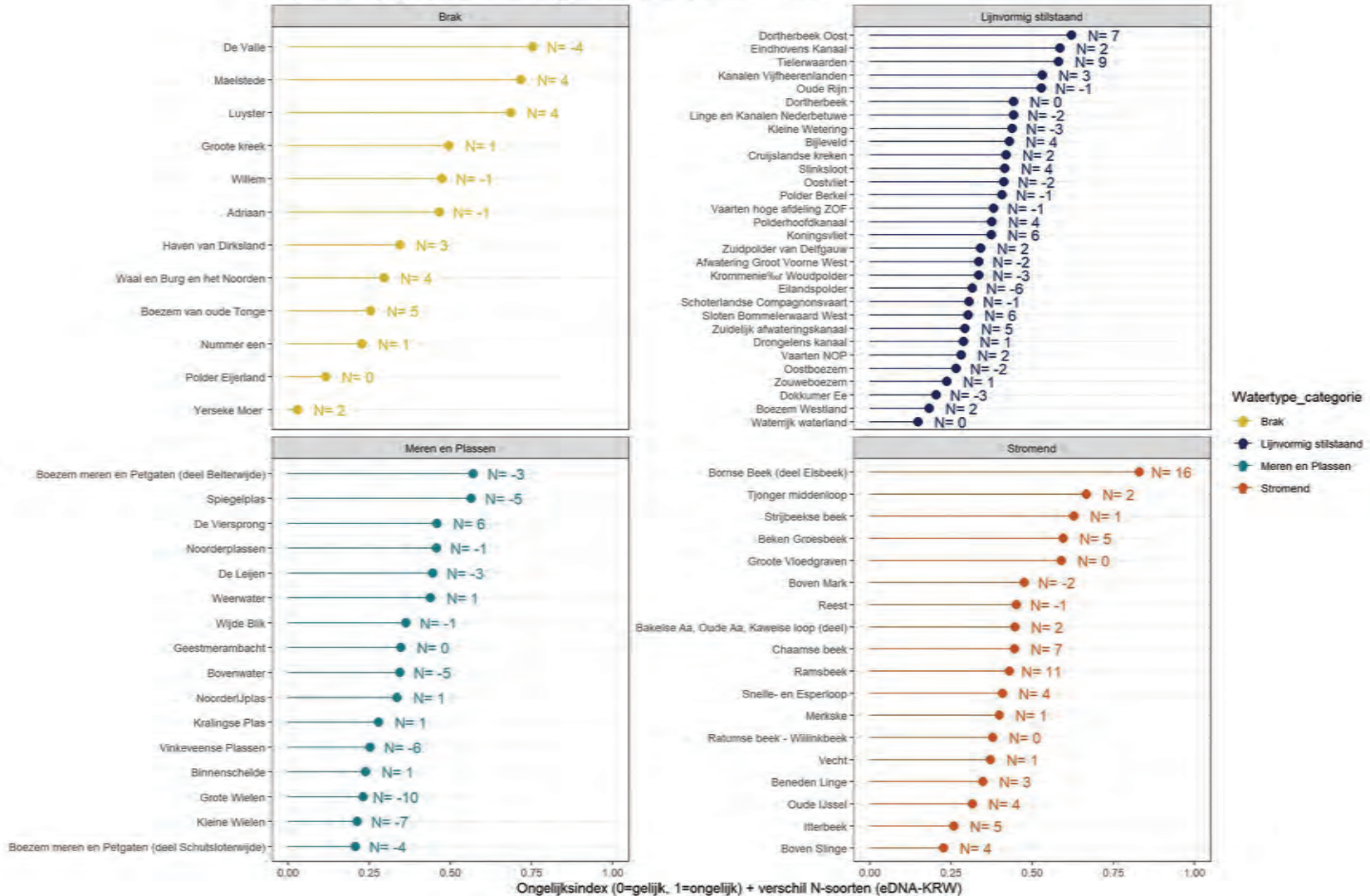
gepaarde vergelijking op basis van presentie



**BIJLAGE 4**

*Gepaarde vergelijking op basis van aantallen*

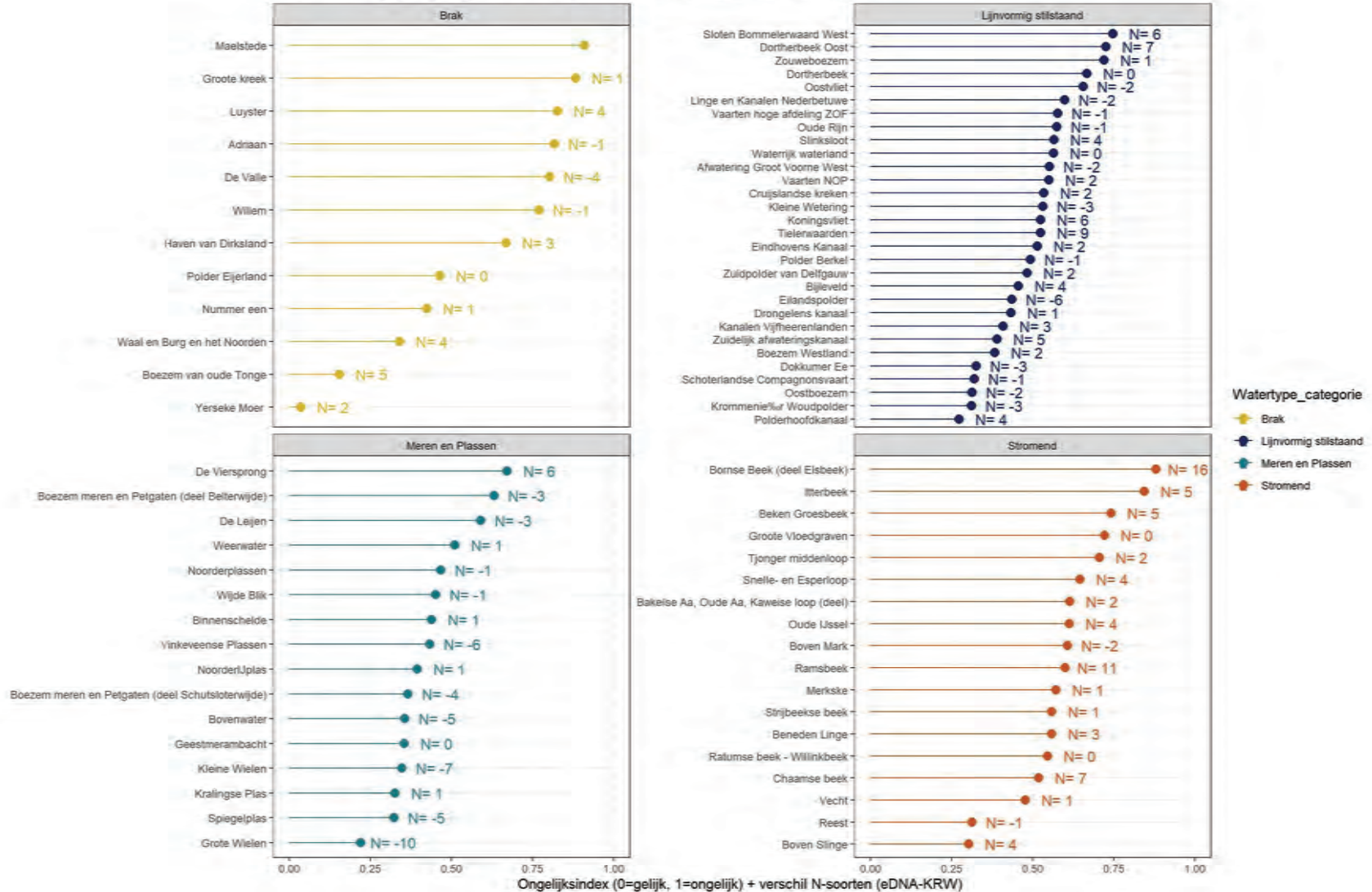
Gepaarde vergelijking visgemeenschap (aandeel aantal) eDNA <--> KRW



**BIJLAGE 5**

*Gepaarde vergelijking op basis van biomassa*

Gepaarde vergelijking visgemeenschap (aandeel biomassa) eDNA <--> KRW



## BIJLAGE 6

### Waterlichamen, KRW-types en EKR-scores

Watertichaam	Waterschap	Hoofdwatertype <sup>^ ^ ^ ^</sup>	KRW-type	KRW-score <sup>^ ^ ^</sup>	EKR-score eDNA	EKR-klasse KRW <sup>^ ^ ^</sup>	EKR-klasse eDNA
Drongelens Kanaal	Aa en Maas	L	M6a	0,414	0,505	matig	matig
Eindhovens Kanaal	Aa en Maas	L	M6a	0,620	0,642	goed	goed
Kleine Wetering	Aa en Maas	L	M1a	0,780	0,678	goed	goed
Koningsvliet	Aa en Maas	L	M3	0,762	0,922	goed	zeer goed
Bakelse Aa, Oude Aa, Kaweise loop	Aa en Maas	S	R4-lb	0,232	0,231	ontoereikend	ontoereikend
Snelle- en Esperloop	Aa en Maas	S	R4	0,145	0,324	slecht	ontoereikend
Cruislandse kreken	Brabantse Delta	L	M3	0,461	0,674	matig	goed
Binnenschelde	Brabantse Delta	M	M14	0,209	0,435	ontoereikend	matig
Boven Mark	Brabantse Delta	S	R6	0,165	0,170	slecht	slecht
Merkske	Brabantse Delta	S	R4	0,386	0,348	ontoereikend	ontoereikend
Strijbeekse beek	Brabantse Delta	S	R4	0,302	0,352	ontoereikend	ontoereikend
Chaanse beek	Brabantse Delta	S	R4	0,301	0,464	ontoereikend	matig
Slinksloot	Delfland	L	M10	0,847	0,734	zeer goed	goed
Polder Berkel	Delfland	L	M3	0,732	0,695	goed	goed
Boezem Westland	Delfland	L	M3	0,310	0,543	ontoereikend	matig
Zuidpolder van Delfgauw	Delfland	L	M3	0,504	0,669	matig	goed
Oostboezem (deel)	Delfland	L	M7b	<sup>^^</sup> 0,458	<sup>^^</sup> 0,838	matig	zeer goed
Belterwijde	DOD	M	M27	0,408	0,555	matig	matig
Schutsloterwijde	DOD	M	M27	0,291	0,401	ontoereikend	matig
Vecht	DOD	S	R7	0,131	0,178	slecht	slecht
Reest	DOD	S	R12	0,247	0,235	ontoereikend	ontoereikend
Grote vloedgraven	DOD	S	R20	0,169	0,222	slecht	ontoereikend
Bijleveld	HDSR	L	M3	<sup>^</sup> 0,700	0,798	goed	goed`z
Waal en Burg en het Noorden	HHNK	B	M31	0,455	0,574	matig	matig
Polder Eijerland	HHNK	B	M30	0,268	0,413	ontoereikend	matig

Watertichaaam	Waterschap	Hoofdwatertype ^^^^	KRW-type	KR-score KRW ^^^	EKR-score eDNA	EKR-klasse KRW ^^^	EKR-klasse eDNA
Krommenieër Woudpolder	HHNK	L	M10	0,429	0,379	matig	ontoereikend
Oostzanderveld (Waterrijk waterland)	HHNK	L	M10	^^ 0,539	0,472	matig	matig
Eilandspolder	HHNK	L	M10	^ 0,370	0,442	ontoereikend	matig
Geestmerambacht	HHNK	M	M20	0,524	0,877	matig	zeer goed
Kralingse Plas	HHSK	M	M27	0,563	0,629	matig	goed
Haven van Dirksland	Hollandse Delta	B	M30	0,445	0,362	matig	ontoereikend
Groote Kreek	Hollandse Delta	B	M30	0,304	0,313	ontoereikend	ontoereikend
Boezem van oude Tonge	Hollandse Delta	B	M30	0,385	0,350	ontoereikend	ontoereikend
Oostvliet	Hollandse Delta	L	M3	0,831	0,774	zeer goed	goed
Afwatering Groot Voorne West	Hollandse Delta	L	M6a	0,735	0,731	goed	goed
De Viersprong	Hollandse Delta	M	M14	0,216	0,711	ontoereikend	goed
Oude Rijn	Rijn & IJssel	L	M3	0,865	0,770	zeer goed	goed
Dortherbeek Oost	Rijn & IJssel	L	M1a	0,800	0,802	zeer goed	zeer goed
Zuidelijk afwateringskanaal	Rijn & IJssel	L	M1a	0,933	0,819	zeer goed	zeer goed
Dortherbeek	Rijn & IJssel	L	M1a	^ 0,561	0,794	matig	goed
Oude IJssel	Rijn & IJssel	S	R6	0,109	0,200	slecht	slecht
Ratumse beek - Willinkbeek	Rijn & IJssel	S	R5	0,259	0,364	ontoereikend	ontoereikend
Ramsbeek	Rijn & IJssel	S	R5	0,136	0,359	slecht	ontoereikend
Boven Slinge	Rijn & IJssel	S	R5	0,541	0,714	matig	goed
Vettenbroek	Rijnland	M	M20	0,583	0,765	matig	goed
Tielerwaarden	Rivierenland	L	M1a	^ 0,830	0,775	zeer goed	goed
Zouweboezem	Rivierenland	L	M10	0,592	0,529	matig	matig
Kanalen Vijfheerenlanden	Rivierenland	L	M3	0,755	0,851	goed	zeer goed
Sloten Bommelerwaard West	Rivierenland	L	M1a	0,766	0,922	goed	zeer goed
Linge en Kanalen Nederbetuwe	Rivierenland	L	M6a	0,537	0,802	matig	zeer goed



Watertichaam	Waterschap	Hoofdwatertype <sup>^ ^ ^ ^</sup>	KRW-type	KR-score KRW <sup>^ ^ ^</sup>	EKR-score eDNA	EKR-klasse KRW <sup>^ ^ ^</sup>	EKR-klasse eDNA
Beneden Linge	Rivierenland	S	R6	0,098	0,120	slecht	slecht
Beken Groesbeek	Rivierenland	S	R4	0,130	0,360	slecht	ontoereikend
Willem	Scheldestromen	B	M30	0,221	0,323	ontoereikend	ontoereikend
Luyster	Scheldestromen	B	M31	0,312	0,362	ontoereikend	ontoereikend
Maelstede	Scheldestromen	B	M30	0,423	0,536	matig	matig
Yerseke Moer	Scheldestromen	B	M31	0,162	0,212	slecht	ontoereikend
Adriaan	Scheldestromen	B	M30	0,153	0,316	slecht	ontoereikend
De Valle	Scheldestromen	B	M31	0,244	0,420	ontoereikend	matig
Nummer een	Scheldestromen	B	M30	0,354	0,426	ontoereikend	matig
Boven Regge	Vechtstromen	S	R6	0,117	0,124	slecht	slecht
Bornse Beek (deel Elsbeek)	Vechtstromen	S	R5	0,025	0,153	slecht	slecht
Geesterensche molenbeek	Vechtstromen	S	R5	0,071	0,207	slecht	ontoereikend
Holslootdiep	Vechtstromen	S	R20	0,202	0,454	ontoereikend	matig
Itterbeek	Vechtstromen	S	R20	0,243	0,486	ontoereikend	matig
Drienerbeek-Koppelleiding	Vechtstromen	S	R5	<sup>^</sup> 0,240	0,101	ontoereikend	slecht
Vinkeveense Plassen	Waternet	M	M20	0,731	0,577	goed	matig
Spiegelplas	Waternet	M	M20	0,970	0,670	zeer goed	goed
NoorderIJplas	Waternet	M	M20	0,411	0,735	matig	goed
Wijde Blik	Waternet	M	M20	0,608	0,835	goed	zeer goed
Polderhoofdkanaal	Wetterskip	L	M10	<sup>^</sup> 0,690	0,533	goed	matig

Watertlichaam	Waterschap	Hoofdwatertype <sup>^</sup> <sup>^^</sup> <sup>^^^</sup> <sup>^^^</sup>	KRW-type	KRW-score <sup>^^^</sup>	EKR-score eDNA	EKR-klasse KRW <sup>^^^</sup>	EKR-klasse eDNA
Schoterlandse Compagnonsvaart	Wetterskip	L	M3	0,707	0,621	goed	goed
Dokkumer ee	Wetterskip	L	M6b	0,783	0,970	goed	zeer goed
Grote Wielen	Wetterskip	M	M14	0,107	0,281	slecht	ontoereikend
Kleine Wielen	Wetterskip	M	M14	0,347	0,472	ontoereikend	matig
de Leijen	Wetterskip	M	M14	0,132	0,446	slecht	matig
Tjonger middenloop	Wetterskip	S	R5	0,085	0,125	slecht	slecht
Vaarten hoge afdeling ZOF	Zuiderzeeland	L	M6b	0,470	0,791	matig	goed
Vaarten NOP	Zuiderzeeland	L	M6b	0,710	0,830	goed	zeer goed
Bovenwater	Zuiderzeeland	M	M14	0,342	0,327	ontoereikend	ontoereikend
Noorderplassen	Zuiderzeeland	M	M20	0,400	0,481	matig	matig
Weerwater	Zuiderzeeland	M	M20	0,282	0,620	ontoereikend	goed

<sup>^</sup> EKR-score uit ander jaar dan eDNA-bemonstering

<sup>^^</sup> EKR-score KRW heel waterlichaam t.o.v. deelwaterlichaam met eDNA

<sup>^^^</sup> EKR-score berekend vanuit de KRW-gegevens behalve voor Lijnvormige wateren plus de Drienerbeek-Koppelleiding waar de KRW-scores verkregen van de uitvoerder zijn gebruikt

<sup>^^^</sup> Hoofdwatertype: B = Brak water, L = Lijnvormig stilstaand water, M = Meren en Plassen en S = Stromend water



➔ **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 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 kennisvragers 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 én met deze beheerders (laten) ontwikkelen, bijeenbrengen, beschikbaar maken, delen, verankeren en implementeren van de benodigde kennis.

#### **STOWA**

Postbus 2180  
3800 CD Amersfoort

#### **Bezoekadres**

Stationsplein 89, vierde etage  
3818 LE Amersfoort

033 460 32 00  
[stowa@stowa.nl](mailto:stowa@stowa.nl)  
[www.stowa.nl](http://www.stowa.nl)

**stowa**

STICHTING  
TOEGEPAST ONDERZOEK WATERBEHEER



[stowa@stowa.nl](mailto:stowa@stowa.nl) [www.stowa.nl](http://www.stowa.nl)  
TEL 033 460 32 00 FAX 033 460 32 01  
Stationsplein 89 3818 LE Amersfoort  
POSTBUS 2180 3800 CD Amersfoort

