

Auteurs:

Stijn Bruneel , Charlotte Van Driessche 

Reviewers:

Lore Vandamme 

Het INBO is het onafhankelijk onderzoeksinstituut van de Vlaamse overheid dat via toegepast wetenschappelijk onderzoek, data- en kennisontsluiting het biodiversiteitsbeleid en -beheer onderbouwt en evalueert.

Vestiging:

INBO Brussel

Herman Teirlinckgebouw, Havenlaan 88, 1000 Brussel

vlaanderen.be/inbo

e-mail:

stijn.bruneel@inbo.be

Wijze van citeren:

Bruneel, S. & Van Driessche, C. (!!!! ONTBREKEND: year !!!!). Ecohydrologische studie SBZ-deelzone Kesterbeekvallei (Hallerbos). Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek !!!! ONTBREKEND: year !!!! (!!!! ONTBREKEND: reportnr !!!!!). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel. DOI: !!! missing DOI !!!

!!!! ONTBREKEND: depotnr !!!!

Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek !!!! ONTBREKEND: year !!!! (!!!!

ONTBREKEND: reportnr !!!!!)

ISSN: 1782-9054

Verantwoordelijke uitgever:

Hilde Eggermont

Foto cover:

!!!! ONTBREKEND: coverdescription !!!!

Dit onderzoek werd uitgevoerd in opdracht van:

VLM



Dit werk valt onder een [Creative Commons Naamsvermelding 4.0 Internationaal-licentie](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

ECOHYDROLOGISCHE STUDIE SBZ-DEELZONE
KESTERBEEKVALLEI (HALLERBOS)

Stijn Bruneel, Charlotte Van Driessche

Voorwoord

De tekst voor het optionele voorwoord.

De tekst voor de verplichte samenvatting. Hou het [Heerlijk Helder](#).

Aanbevelingen voor beheer en/of beleid

Verplicht wanneer relevant.

Résumé français

Ajoutez éventuellement une traduction du résumé ici.

Dankwoord	1
Voorwoord	2
Samenvatting	3
Aanbevelingen voor beheer en/of beleid	4
English abstract	5
Résumé français	6
Inhoudsopgave	7
Lijst van figuren	8
Lijst van tabellen	8
1 Inleiding	10
2 Methodologie abiotiek	11
3 Methodologie elektrisch vissen	12
4 Methodologie eDNA vissen	13
4.1 Staalname in het veld	13
4.2 Labo analyses: gebruikte metabarcoding protocol	16
5 Resultaten abiotiek	17
6 Resultaten elektrisch vissen	18
7 Resultaten eDNA vissen	23
A Appendix	26
A.1 Project-specifiek protocol	26

Lijst van figuren

Figuur 4.1	Schematische weergave van het principe van eDNA analyses om gehele gemeenschappen te onderzoeken (eDNA metabarcoding). (A) Een poel waarin op één plek een bepaalde vissoort (ruisvoorn bij wijze van voorbeeld of andere doelsoorten) zouden kunnen rondhangen die voortdurend DNA afgeven aan de omgeving. (B) Het water waarin de vissen vermoedelijk verblijven wordt door middel van een gestandaardiseerd staalnameprotocol verzameld in een emmer. Deze emmer bevat dan het mengstaal van 0.5 liter grote substalen verzameld rondom de oever van het onderzochte waterlichaam. (C) Naast het eDNA van deze vissoort (oranje), zit ook het eDNA afkomstig van andere soorten die in het waterlichaam voorkomen vervat. Al dit eDNA wordt op de filter gecapteerd. (D) In het labo wordt dan al het aanwezige eDNA van de filter gehaald en klaargestoomd voor verdere analyses (extractie). (E) De DNA-fragmenten van alle aanwezige soorten (vissoorten, maar ook amfibieën, zoogdieren, etc.) in het extract worden vervolgens vermenigvuldigd met behulp van een genetische merker en geanalyseerd.	14
Figuur 6.1	Verdeling van de aantallen en totaal gewicht (g) per vissoort in de verschillende trajecten.	19
Figuur 6.2	Lengteverdeling voor de verschillende gevangen soorten	20
Figuur 6.3	Cumulatieve lengteverdeling voor de verschillende gevangen soorten	21
Figuur 6.4	Boxplots die de gemiddelde lengte voorstellen in functie van het traject. Gepaarde wilcoxon ranks sum testen met Bonferroni correctie werden gebruikt. p-waarden werden geclassificeerd als niet-significant of ns (>0.05), * (0.05-0.01), ** (0.01-0.001), *** (0.001-0.0001), **** (0.0001-0).	22
Figuur 7.1	Principal Component Analyse (PCA) plot van de verschillende eDNA metabarcoding stalen. De verschillende kleuren vertegenwoordigen de locaties waar de stalen werden genomen. De clustering van de technische replicaten binnen dezelfde locatie liggen binnen de verwachtingen en duiden op een goede reproduceerbaarheid van de metingen.	24
Figuur 7.2	Barplot of staafdiagram van de gemiddelde (van de technische replicaten) relatieve sequentie-abundanties per staal. De verschillende kleuren vertegenwoordigen de gedetecteerde vissoorten, waarbij de relatieve abundantie per soort per locatie wordt weergegeven. Let wel, op twee locaties werden twee eDNA filters genomen, die elk gelden als biologische, dan wel als veldreplicaten.	25

Lijst van tabellen

Tabel 6.1	Aantal vissen per traject en vissoort	18
Tabel 6.2	Totaal gewicht vissen (gram) per traject en vissoort	18
Tabel 6.3	Soortenaantal per sectie en jaar.	18

1 INLEIDING

Een concreet voorbeeld van de broncode van dergelijk rapport vind je op https://github.com/inbo/inbomd_examples onder het mapje source/inbo_rapport. Hoe zo een rapport er finaal uit kan zien, vind je op https://inbo.github.io/inbomd_examples.

2 METHODOLOGIE ABIOTIEK

3 METHODOLOGIE ELEKTRISCH VISSSEN



Figuur 4.1: Schematische weergave van het principe van eDNA analyses om gehele gemeenschappen te onderzoeken (eDNA metabarcoding). (A) Een poel waarin op één plek een bepaalde vissoort (ruisvoorn bij wijze van voorbeeld of andere doelsoorten) zouden kunnen rondhangen die voortdurend DNA afgeven aan de omgeving. (B) Het water waarin de vissen vermoedelijk verblijven wordt door middel van een gestandaardiseerd staalnameprotocol verzameld in een emmer. Deze emmer bevat dan het mengstaal van 0.5 liter grote substalen verzameld rondom de oever van het onderzochte waterlichaam. (C) Naast het eDNA van deze vissoort (oranje), zit ook het eDNA afkomstig van andere soorten die in het waterlichaam voorkomen vervat. Al dit eDNA wordt op de filter gecapteerd. (D) In het labo wordt dan al het aanwezige eDNA van de filter gehaald en klaargestoomd voor verdere analyses (extractie). (E) De DNA-fragmenten van alle aanwezige soorten (vissoorten, maar ook amfibieën, zoogdieren, etc.) in het extract worden vervolgens vermenigvuldigd met behulp van een genetische merker en geanalyseerd.

bepकर्ter is (enkele honderden meters), waarbij een signaal van een lokale visgemeenschap een eventueel restant van eDNA dat in stroomafwaartse richting naar de staalnamelocatie getransporteerd werd, compleet naar de achtergrond verdwijnt. Dit laat toe de eDNA-metabarcoding techniek in te schakelen om de visgemeenschappen aanwezig op verscheidene staalnamelocaties binnen eenzelfde stromende waterlichaam onafhankelijk van elkaar in kaart te brengen.

4.2 LABO ANALYSES: GEBRUIKTE METABARCODING PROTOCOL

Het eDNA dat op de filters achtergebleven is, werd met behulp van een extractiekit (Qiagen Blood & Tissue) geëxtraheerd volgens het protocol van de fabrikant (Fig. 4.1D), waarna dat geëxtraheerde eDNA de metabarcoding-methodiek onderging (Fig. 4.1E).

Tijdens de laboprocedure werden steeds een reeks controlestappen ingebouwd die toelaten de kwaliteit van de eDNA-stalen en de efficiëntie van zowel de DNA-extractie als de PCR-reacties te beoordelen. Dit geeft ons inzicht in de kwaliteit van de gegenereerde data voordat tot effectieve interpretatie van de resultaten wordt overgegaan. Zo worden bijvoorbeeld negatieve controles ingebouwd. Deze laboblanco's zijn stalen zonder DNA die identiek worden behandeld als de eDNA-stalen. Met deze controle kunnen we nagaan of doorheen het laboproces geen vals positieve detectie plaatsvindt (d.w.z. foutief vaststellen dat de doelsoort aanwezig is), wat een gevolg zou kunnen zijn van genetische contaminatie, zowel op het niveau van de DNA-extractie als op het niveau van de amplificatie van het DNA-extract.

Voor de metabarcoding-techniek heeft INBO een fijngevoelig protocol ontwikkeld en beschreven, waarin verschillende herhalingen worden opgenomen en controlestappen vervat zitten (zie Brys et al., 2021). Hierbij wordt gebruik gemaakt van een generalistische vertebraat primer (Riaz primers), gelegen op het mitochondriaal 12S locus, waarvoor INBO een eigen referentiedatabank heeft uitgebouwd (Halfmaerten et al., 2023). Deze referentiedatabank laat toe om alle inheemse, West-Europese alsook reeds eerder waargenomen en dus te verwachten uitheemse zoogdieren, amfibieën en zoetwater vissen accuraat te detecteren en op naam te brengen. Het ontwikkelde protocol maakt gebruik van een DNA fragment dat ~142-bp lang is en dat wordt geamplificeerd door middel van de Riaz primers (12S_F1, 5'-ACTGGGATTAGATACCCC-3'; 12S_R1, 5'-TAGAACAGGCTCCTCTAG-3') (Riaz et al., 2011).

Per staal worden vervolgens standaard drie herhalingen van de verdere labo analyses uitgevoerd, waarvan, na opschonen van de ruwe data, verder wordt gewerkt met het gemiddelde resultaat van deze drie technische replicaten voor visualisatie en interpretatie. Het gebruikte labo- en bio-informatische protocol staat in detail beschreven in Brys et al. (2021) alsook verder uitgelegd en toegepast in Van Driessche et al. (2024). Binnen deze studie werd vervolgens enkel verder gewerkt met de gedetecteerde vissoorten. Finaal worden enkel de sequenties weerhouden die een 100 % match vertonen met één van de soorten in de referentiedatabank. Deze opgeschoonde data, de zogenaamde gesommeerde sequenties per soort voor elk staal, worden in een volgende stap getransformeerd naar de relatieve abundantie van elke soort t.o.v. alle andere soorten die voorkomen binnen dat betreffende staal. Hierbij werd een normalisatiestap via de Hellinger transformatie toegepast (zie ook Van Driessche et al., 2024). Dit maakt dat het eindproduct van metabarcoding data steeds een proportioneel aandeel van de betreffende soorten weergeeft binnen elk genomen eDNA staal, en dus niet als absolute eDNA meting kan worden aanzien. Van elk staal worden drie onafhankelijke replica's geanalyseerd, en na controle van de data uitgemiddeld om te komen tot een gemiddelde samenstelling van de visgemeenschap van elk staal.

Naast de mogelijkheid en het voordeel om in één analyse verschillende soorten simultaan in kaart te kunnen brengen, is een kanttekening die hierbij wel dient gemaakt te worden dat de detectieresolutie van eDNA metabarcoding resultaten wat lager ligt dan soort-specifieke eDNA drople digital PCR (ddPCR) methode (zoals bijvoorbeeld kan worden uitgevoerd om heel zeldzame soorten op te sporen). Hierdoor is eDNA metabarcoding vaak iets minder gevoelig en dus minder geschikt om een erg zeldzame of laag abundante soort in het landschap op te sporen. Experimenteel onderzoek in kweekvijvers van het INBO heeft anderzijds reeds aangetoond, dat in relatief kleine waterpartijen, we via eDNA metabarcoding de aanwezigheid van één tot enkele individuen bittervoorn kunnen opsporen. Enkel in erg grote waterpartijen kan het soms zijn dat zulke lage dichtheden door verdunningseffecten kunnen worden gemist. Anderzijds zijn soorten die in deze metabarcoding analyses naar voor komen, naar alle waarschijnlijkheid soorten die in grotere aantallen aanwezig zijn binnen het studiegebied.

5 RESULTATEN ABIOTIEK

6 RESULTATEN ELEKTRISCH VISSSEN

er werden weinig vissen gevangen.

Tabel 6.1: Aantal vissen per traject en vissoort

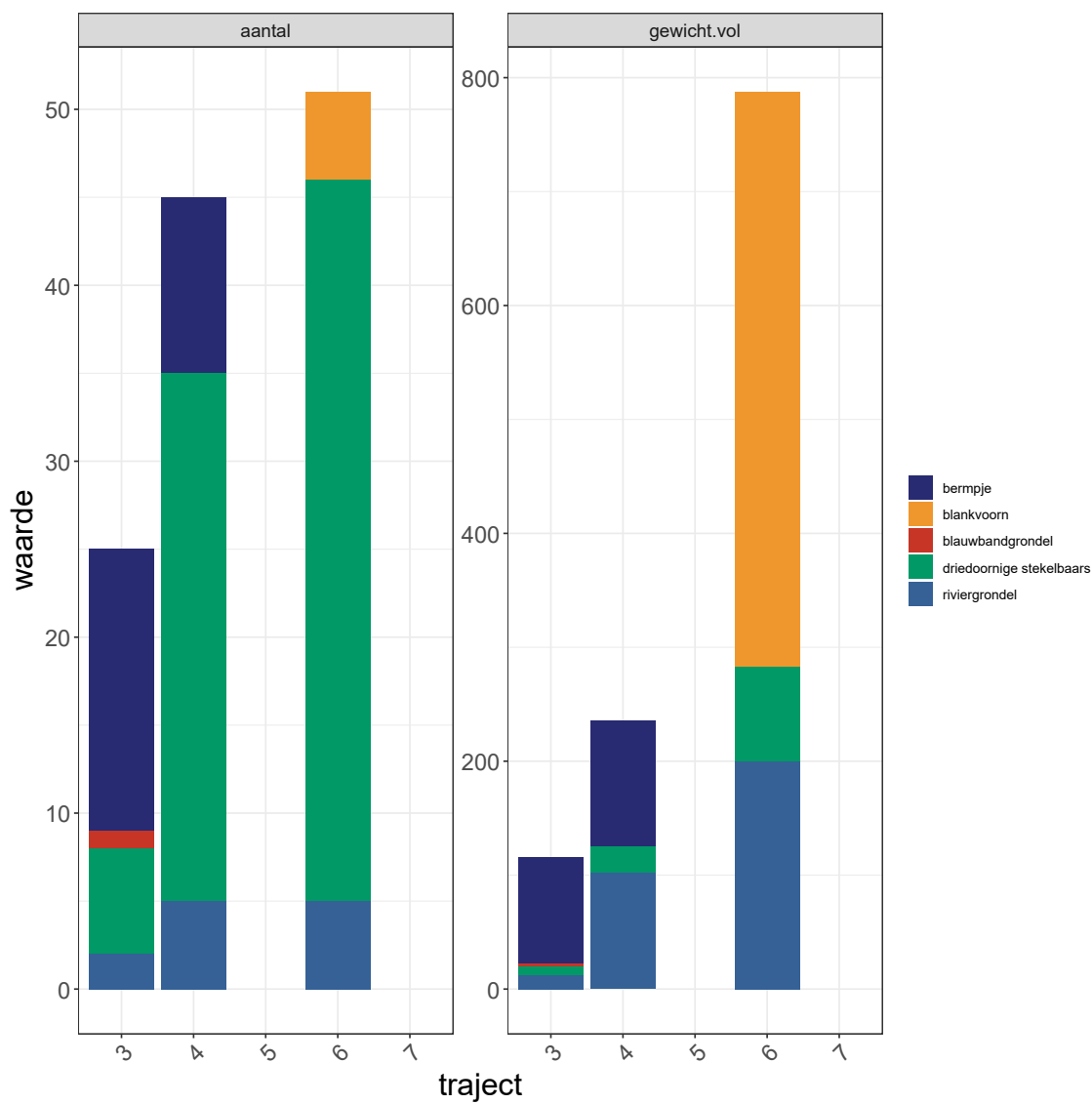
vissoort	3	4	5	6	7
bermpje	16	10	0	0	0
blankvoorn	0	0	0	5	0
blauwbandgrondel	1	0	0	0	0
driedoornige stekelbaars	6	30	0	41	0
riviergrondel	2	5	0	5	0

Tabel 6.2: Totaal gewicht vissen (gram) per traject en vissoort

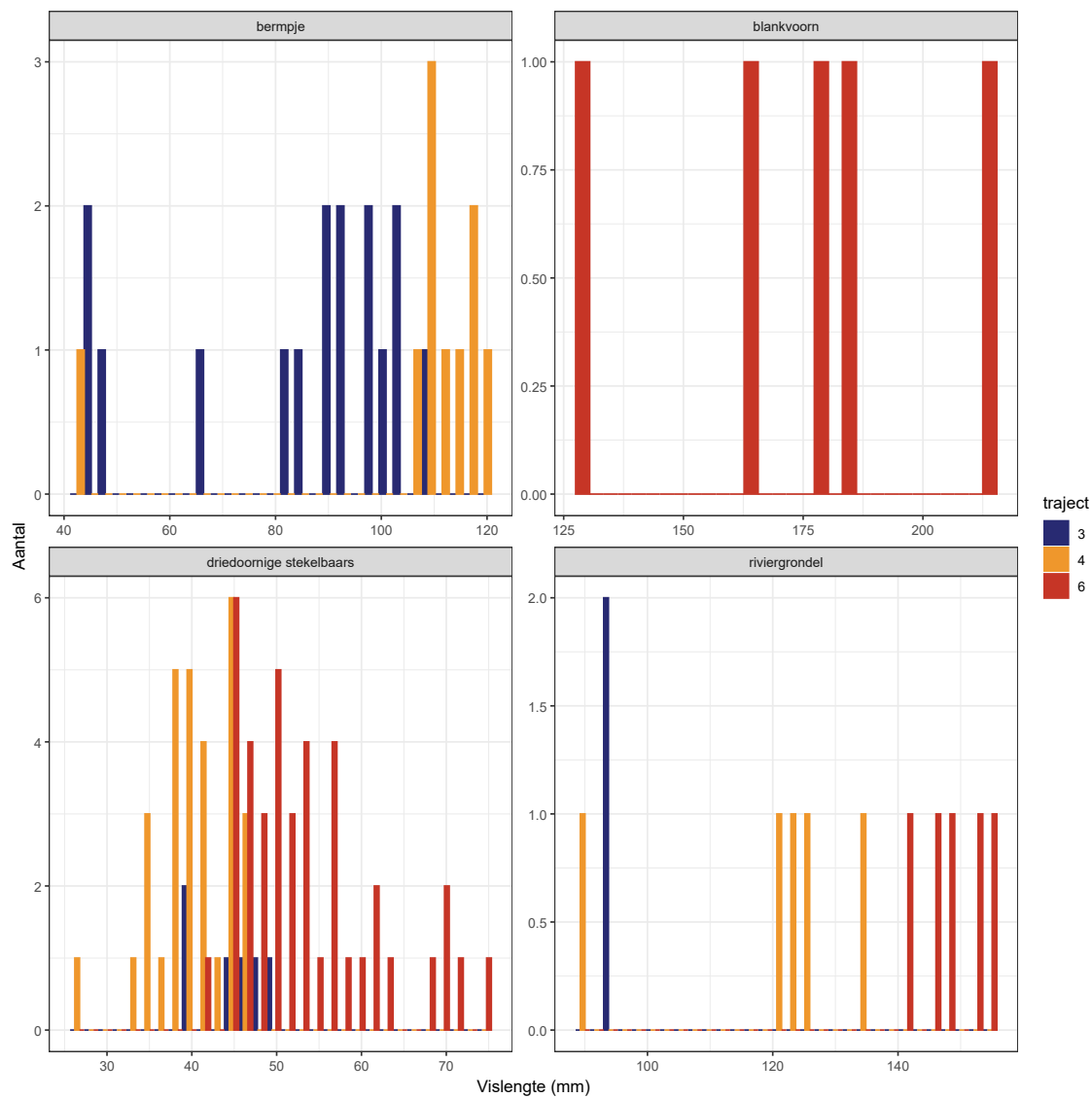
vissoort	3	4	5	6	7
bermpje	94.1	110.5	0	0.0	0
blankvoorn	0.0	0.0	0	505.0	0
blauwbandgrondel	2.2	0.0	0	0.0	0
driedoornige stekelbaars	7.7	23.4	0	82.7	0
riviergrondel	12.1	101.8	0	200.0	0

Tabel 6.3: Soortenaantal per sectie en jaar.

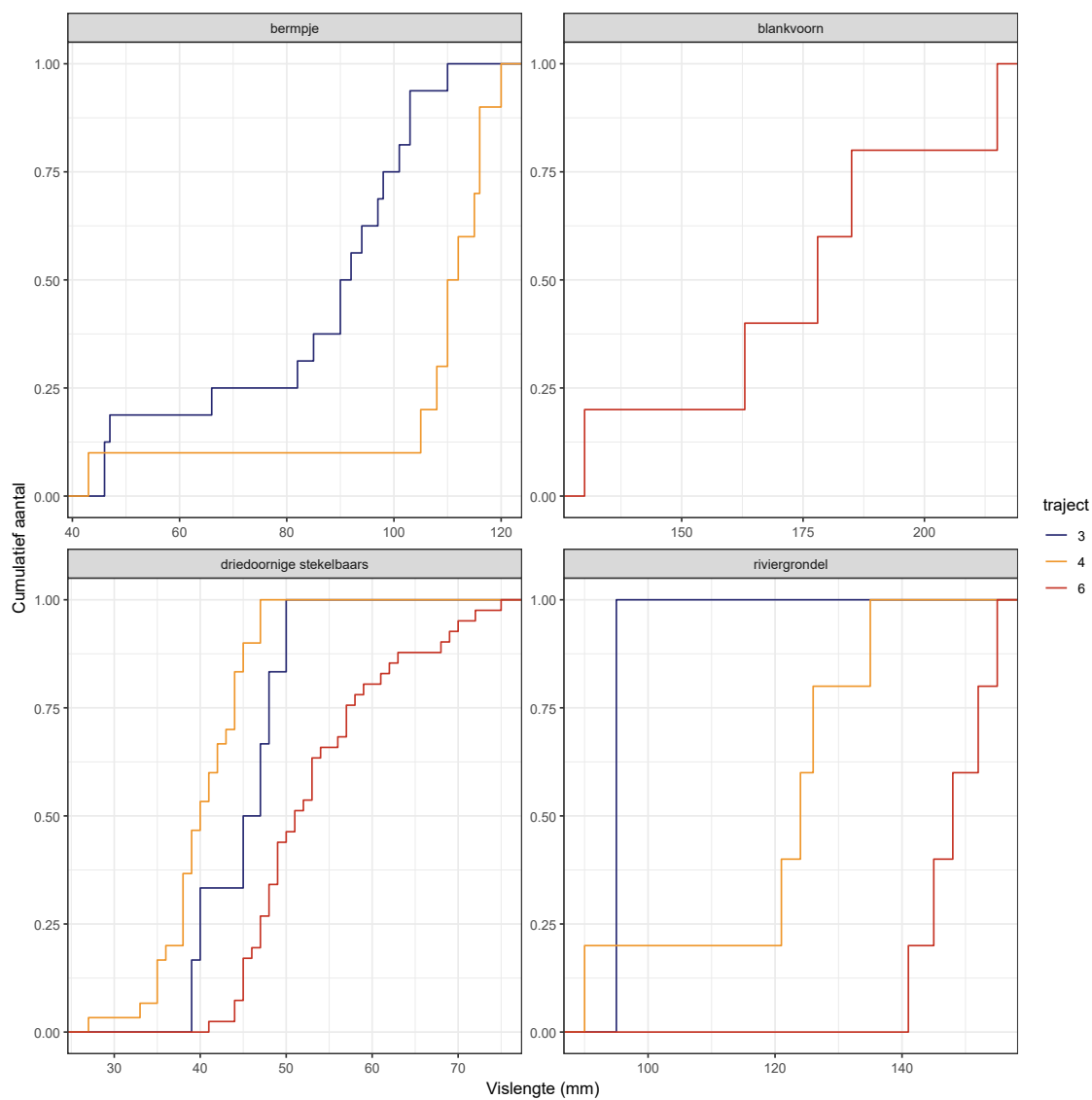
3	4	6
4	3	3



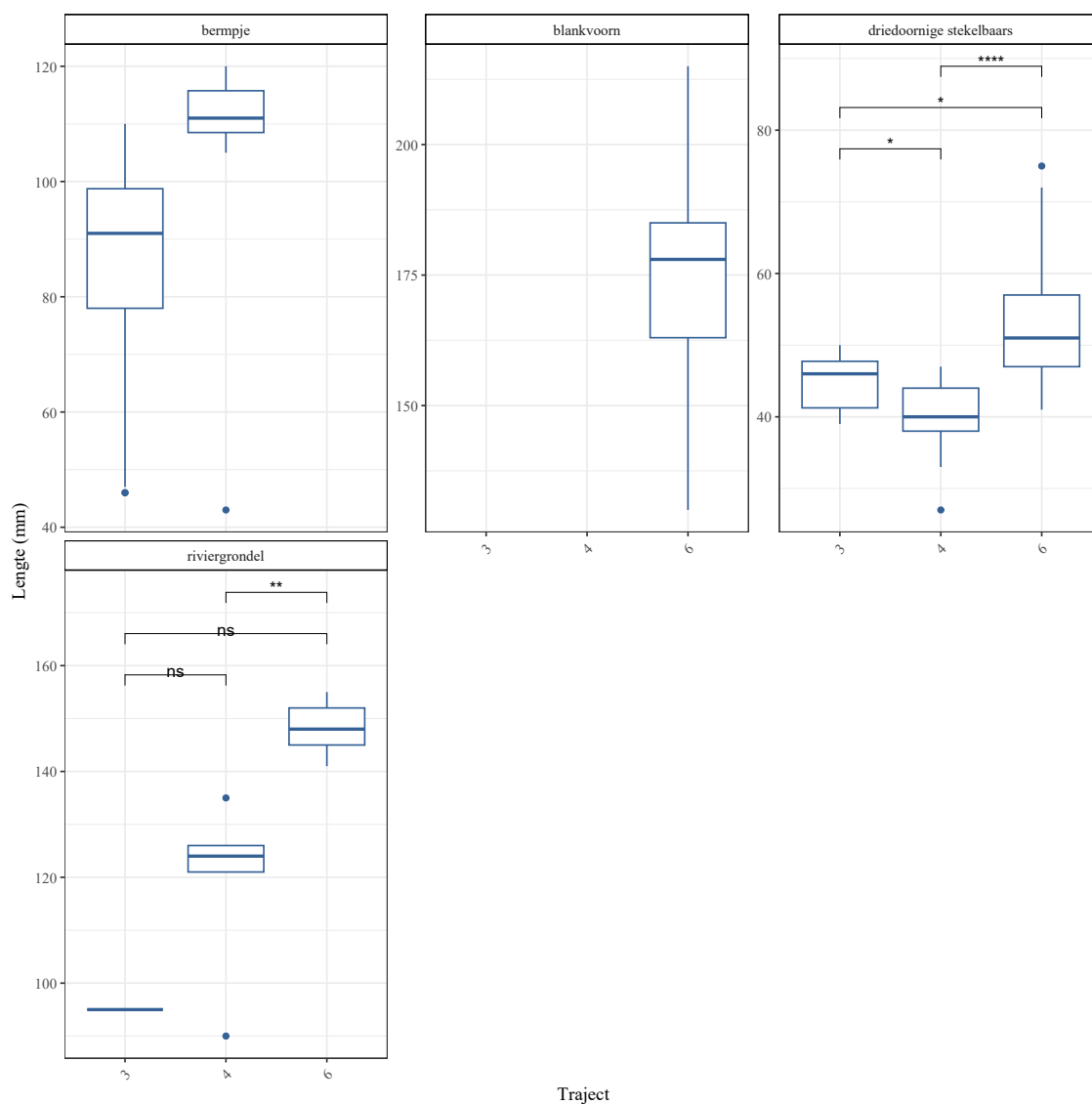
Figuur 6.1: Verdeling van de aantallen en totaal gewicht (g) per vissoort in de verschillende trajecten.



Figuur 6.2: Lengteverdeling voor de verschillende gevangen soorten

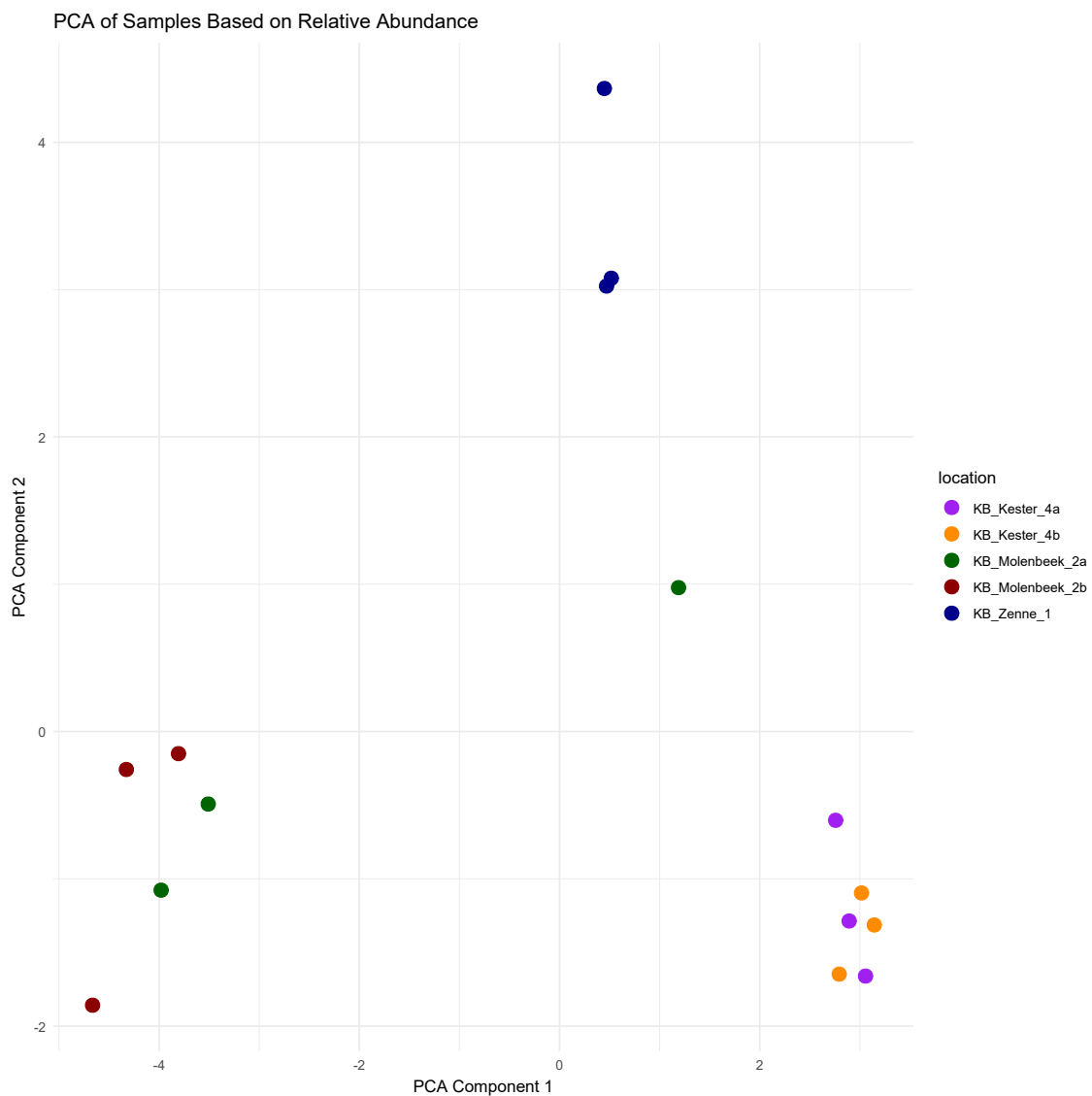


Figuur 6.3: Cumulatieve lengteverdeling voor de verschillende gevangen soorten

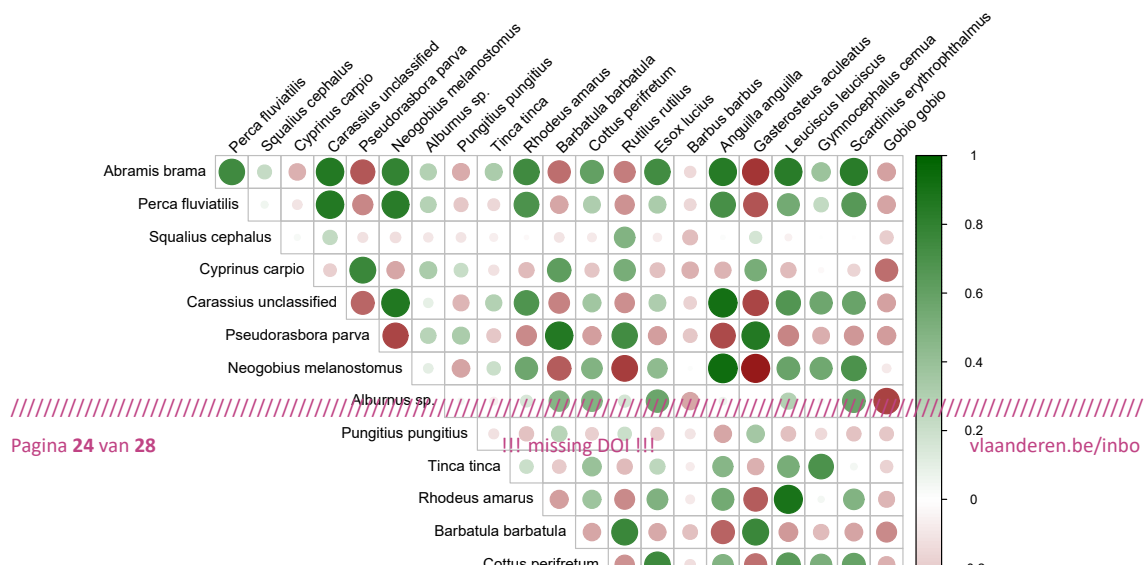


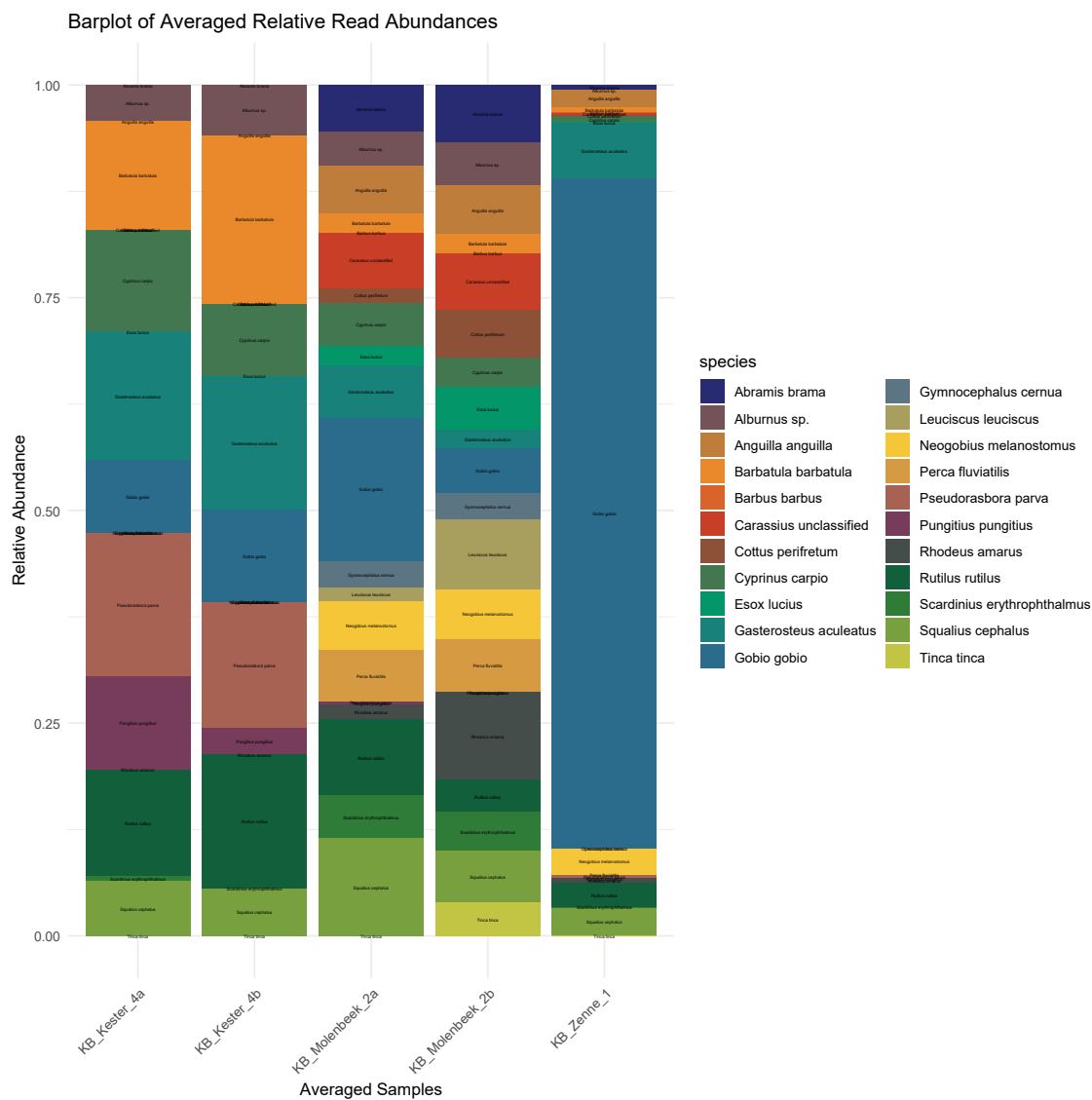
Figuur 6.4: Boxplots die de gemiddelde lengte voorstellen in functie van het traject. Gepaarde wilcoxon ranks sum testen met Bonferroni correctie werden gebruikt. p-waarden werden geclassificeerd als niet-significant of ns (>0.05), * (0.05-0.01), ** (0.01-0.001), *** (0.001-0.0001), **** (0.0001-0).

Ten slotte bevestigt de consistentie van veldreplicaten genomen binnen eenzelfde staalnamelocatie de betrouwbaarheid van de gebruikte metabarcoding-methodologie. Deze resultaten benadrukken het belang van zowel biologische als hydrologische factoren in de verspreiding van vissoorten en onderstrepen de waarde van eDNA-analyse voor het monitoren van aquatische ecosystemen.



Figuur 7.1: Principal Component Analyse (PCA) plot van de verschillende eDNA metabarcoding stalen. De verschillende kleuren vertegenwoordigen de locaties waar de stalen werden genomen. De clustering van de technische replicaten binnen dezelfde locatie liggen binnen de verwachtingen en duiden op een goede reproduceerbaarheid van de metingen.





Figuur 7.2: Barplot of staafdiagram van de gemiddelde (van de technische replicaten) relatieve sequentie-abundanties per staal. De verschillende kleuren vertegenwoordigen de gedetecteerde vissoorten, waarbij de relatieve abundantie per soort per locatie wordt weergegeven. Let wel, op twee locaties werden twee eDNA filters genomen, die elk gelden als biologische, dan wel als veldreplicaten.

A APPENDIX

A.1 PROJECT-SPECIFIEK PROTOCOL

A.1.1 Terreinverkenning

In een eerste fase wordt een terreinbezoek ingepland waarbij mogelijke vismigratieknelpunten worden geïdentificeerd en er een visuele beoordeling plaatsvindt van de variatie in fysieke habitats (bedding + oever). Dit terreinbezoek heeft plaatsgevonden op 23/4/2024 en inzichten verkregen tijdens het terreinbezoek zijn verwerkt in het verdere voorstel. Trajecten worden gebruikt om de hydromorfologische kwaliteit te bepalen. Het benodigde aantal trajecten, de lengte per traject en het aantal metingen in de lengterichting en dwarsrichting is afhankelijk van de variatie aan fysieke habitats. 9 trajecten van 50 meter elk met per traject 3 (lengte) x 3 (breedte) cellen zullen een representatief beeld schetsen van het gebied.

A.1.2 Habitatbeschrijving

A.1.2.1 Materiaal

Voor elk traject wordt de substraatsamenstelling (via inschatting in het veld: 1 meting per cel), stroomsnelheid (1 meting per cel), rivierbreedte (3 metingen per traject) en rivierdiepte (1 meting per cel) gemeten. Via visuele beoordeling wordt het aandeel holle oevers (buitenste cellen), waterplanten (1 meting per cel), elementen in de waterloop (hout, stenen, ander: 1 meting per cel) en natuurlijkheid en landgebruik oevers (buitenste cellen) bepaald. Om de verstuwingsgraad (een relatief nieuwe maatlat met een hoog potentieel naar gerichte verbetering van de ecologische toestand) te bepalen worden op regelmatige afstanden (maximaal om de 50 meter) hoogteligging metingen van de bedding genomen. Ter hoogte van duidelijke situaties van hoog verval (>20 cm) worden direct voor en na het verval gemeten.

A.1.3 Vismigratieknelpunten

Om de identificatie en beoordeling van vismigratieknelpunten te ondersteunen wordt aangeraden om gebruik te maken van visdata. Beschikbare visdata in de Kesterbeek is echter beperkt tot enkele vangsten van driedoornige en tiendoornige stekelbaars in 1997, 2002 en 2006 (<https://vis.inbo.be/>). Deze data is onvoldoende om te fungeren als baseline voor de PAS-herstelmaatregelen en specifiek om het effect ervan op de habitatrichtlijnsoorten (i.e. bittervoorn, rivierdonderpad en beekprik) te bepalen. Verzameling van visdata m.b.v. elektrisch vissen en eDNA om een inzicht te krijgen in de aanwezige soorten (en aantallen en biomassa in het geval van elektrisch vissen) wordt daarom uitgevoerd. Visvangsten dienen niet herhaald te worden om als baseline te fungeren maar een adequate periode dient wel bepaald te worden voor een representatieve staalname van ten minste de beoogde soorten. 5 afvissingen met elektrisch vissen over trajecten van 50 meter worden uitgevoerd. 7 eDNA stalen worden verzameld (5 locaties en 2 replicaten op de belangrijkste locaties). Idealiter overlappen de elektrisch vissen trajecten en eDNA staalnamepunten met de trajecten waar de hydromorfologie wordt bepaald.

Criterion	Meetmethode	Parameter
Hydromorfologie	Visuele beoordeling	Aandeel holle oevers
		Aandeel waterplanten
		Aandeel elementen waterloop
		Natuurlijkheid oevers
		Landgebruik oevers
	Veldmeting	Substraatsamenstelling
		Rivierbreedte
		Rivierdiepte
		Stroomsnelheid
		Hoogteligging TAW
Vismigratieknelpunten	Veldmeting	Elektrisch vissen en eDNA

A.1.4 Visgemeenschap

A.1.4.1 Materiaal

- 2 wagens
- Materiaal voor elektrisch vissen
- Lintmeter
- Plastiek palen
- Beluchting Containers voor vissen
- Kruidnagelolie
- Werktafel
- Weegschalen
- Meetlatten voor vissen
- Field sheets (direct via de laptop invoeren geniet voorkeur maar bij regen tot potlood en papier voorzien)
- Materiaal voor eDNA (Charlotte): 2 emmers, staalnamestok, consumables (= filters, darmen, staalna-mepakketten met handschoenen en zakken), virkon om materiaal te ontsmetten, Vampire sampler, koelbox

Op 3 locaties worden 2 replicaten ($n = 6$) van een waterstaal genomen dat zal dienen voor eDNA analyses. Een zevende, reservestaal wordt mee in rekening gebracht om in het veld in functie van de relevantie van de locaties en inschatting door aanwezige veldmedewerkers, een bijkomend staal te kunnen nemen. Ter plaatse werd beslist om dit staal in de Zenne te nemen. Twee medewerkers zullen het meest stroomafwaarts starten, en deze eDNA-staalname aanvangen alvorens het elektrisch afvissen wordt aangevat. Water wordt hiervoor verzameld gebruik makende van een telescopische staalnamestok, waarbij vanop de oever water genomen wordt. Op deze manier worden een 20tal 0.5L-zakjes, bevestigd aan het uiteinde van de staalnamestok, gevuld met water en in een emmer verzameld. Dit proces gebeurt tegelijkertijd voor 2 emmers en resulteert op die manier in twee veldreplicaten. Bij het nemen van het water, wordt gelet op een diverse, geïntegreerde staalname die beide oevers alsook enkele waterstalen te midden van de waterloop meeneemt. Het verzamelde waterstaal in de emmer wordt vervolgens gefilterd met behulp van een peristaltische pomp, en dit over een zeer fijnmazige filter capsule waarop dus het eDNA achterblijft. Deze filter wordt nadien droog geblazen en afgesloten met twee daarvoor voorziene caps. De filter wordt meteen in een koelbox bewaard, tot deze naar het labo kan gebracht worden voor verdere verwerking.

Na afwerken van een eDNA staalname op een locatie, kan het elektrisch vissen aangevat worden. Er wordt hierbij opnieuw gewerkt in stroomopwaartse richting. Bij aankomst locatie wordt beginpunt en eindpunt elektrisch vissen ingeschat (50 meter). Indien traject bemonsterbaar dan wordt met de lintmeter exact 50 meter bepaald voor het traject en begin en eindpunt worden afgezet met netten. 1 persoon brengt het elektrisch veld aan op het water, de ander vangt de vissen weg in een ton. Belangrijk om zoveel mogelijk verschillende habitats te bemonsteren. Soortensamenstelling is belangrijker dan aantallen per soort. De coördinaten van het beginpunt worden genoteerd. Vissen worden geïdentificeerd op soort en lengte en gewicht worden gemeten.

Opsplitsen in twee groepen: Groep 1: Stijn en Charlotte: eDNA stalen en aansluiten vsteam voor identificatie + meten vissen nadat edna staalname klaar is Groep 2: Veldmedewerker 1 en veldmedewerker 2: elektrisch vissen en identificatie + meten vissen totdat Stijn en Charlotte klaar zijn met de edna staalname. Stijn en Charlotte beginnen die dag wat vroeger zodat het vissend team altijd stroomafwaarts van hen werkt. Stijn en Charlotte gaan eerst naar de locatie aan de Zenne voor het eDNA staal. V1 en V2 gaan naar de eerste locatie voor het elektrisch vissen. De locaties in de google maps zijn voorstellen. Indien een alternatieve locatie in de buurt geschikter lijkt (habitat, bereikbaarheid, etc.) dan kan van dit voorstel afgeweken worden. V1 en V2 kunnen beginnen met vissen eens Charlotte en Stijn klaar zijn met de staalname in de Zenne. Charlotte en Stijn sluiten pas aan bij het vissend team eens ze klaar zijn met de volledige edna staalname van het gebied (alle 3 locaties). Terwijl Charlotte en Stijn de edna staalname doen zullen V1 en V2 zowel het elektrisch vissen doen als de identificatie + meten en wegen.