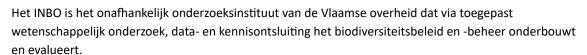
**Auteurs:** 

Stijn Bruneel D, Charlotte Van Driessche

#### **Reviewers:**

Lore Vandamme



#### **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

# ECOHYDROLOGISCHE STUDIE SBZ-DEELZONE KESTERBEEKVALLEI (HALLERBOS)

Stijn Bruneel, Charlotte Van Driessche



#### **Dankwoord**

De tekst voor het optionele dankwoord.

#### Voorwoord

De tekst voor het optionele voorwoord.

# Samenvatting

De tekst voor de verplichte samenvatting. Hou het Heerlijk Helder.

# Aanbevelingen voor beheer en/of beleid

Verplicht wanneer relevant.

# **English abstract**

Insert a translation of the summary here.

# Résumé français

Ajoutez éventuellement une traduction du résumé ici.

# Inhoudsopgave

Dankwoo	ord	1
Voorwoo	ord	2
Samenva	atting	3
Aanbeve	lingen voor beheer en/of beleid	4
English a	bstract	5
Résumé	français	6
Inhouds	opgave	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
Α	Appendix	26
A.1	Project-specifiek protocol	26

# Lijst van figuren

Figuur 4.1	Schematische weergave van het principe van eDNA analyses om gehele gemeenschap-	
	pen te onderzoeken (eDNA metabarcoding). (A) Een poel waarin op één plek een be-	
	paalde vissoort (ruisvoorn bij wijze van voorbeeld of andere doelsoorten) zouden kun-	
	nen rondhangen die voortdurend DNA afgeven aan de omgeving. (B) Het water waarin	
	de vissen vermoedelijk verblijven wordt door middel van een gestandaardiseerd staal-	
	nameprotocol 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 gea-	
	nalyseerd	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 wer-	
	den 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 me-	
	tingen	24
Figuur 7.2	Barplot of staafdiagram van de gemiddelde (van de technische replicaten) relatieve	
	sequentie-abundanties per staal. De verschillende kleuren vertegenwoordigen de ge-	
	detecteerde 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

Locaties knelpunten: klik hier

# 3 METHODOLOGIE ELEKTRISCH VISSEN

Locaties elektrisch vissen: klik hier

# ONTWERP

#### 4 METHODOLOGIE EDNA VISSEN

### 4.1 STAALNAME IN HET VELD

In vier van de zeven locaties binnen de Kesterbeekvallei (klik hier) werden voorafgaand aan het elektrisch vissen eDNA stalen genomen. Bij drie locaties werd bijkomend geopteerd om twee biologische, oftewel veldreplicaten te nemen. Per staalname werd daarvoor langsheen de oever van de rivier telkens meerdere malen een halve liter oppervlaktewater geschept die vervolgens in een steriele (d.w.z. vrij dan DNA) emmer werd gedeponeerd (Fig. 4.1A). Deze procedure werd herhaald tot heel de afstand van het transect dat nadien werd afgevist werd bemonsterd. Hiervoor werd een uitschuifbare staalnamestok gebruikt, waar aan het uiteinde een steriel zakje bevestigd werd, om zo het water te kunnen opscheppen vanaf de oever. De verschillende zakjes die zo gevuld werden met water, werden samengevoegd tot één omvangrijk mengstaal (Fig. 4.1B). In een volgende fase werd het verzamelde water van het mengstaal met behulp van een peristaltische pomp door een speciale gesloten filtercapsule met geïntegreerde prefilter (Sterlitech) gepompt. Zo werd al het eDNA dat in het water aanwezig was op de filter verzameld (Fig. 4.1C). Er werd gefilterd tot de filter verzadigd was, waarna het gefilterde volume water alsook de precieze staalnamelocatie en het labelnummer zorgvuldig werden genoteerd. Voor het nemen van meerdere biologische/veldreplicaten werden twee afzonderlijke emmers gevuld en elk op hun beurt gefilterd, resulterende in twee filters per locaties (voor locaties 2, 4 en 7).

Na filtering, werd de filter meteen in een vriesbox opgeslagen tot deze op het einde van de dag in de diepvries kon worden bewaard. Dit is een noodzakelijke handeling om de afbraak van het eDNA op de filter door ultraviolette straling of microbiële activiteit te vermijden in afwachting van de verdere verwerking in het labo.

Bij het nemen van de waterstalen in het veld wordt steeds een strikt en gestandaardiseerd stappenplan gevolgd om contaminatie van de uiteindelijke eDNA stalen met systeemvreemd DNA te vermijden en eveneens te voorkomen dat ziektekiemen, schimmels, of invasieve uitheemse soorten door de staalname van het ene waterlichaam naar het andere zouden worden overgebracht. Hiervoor wordt steeds met steriel voorverpakt materiaal gewerkt (zoals zakjes, handschoenen, etc.). Herbruikbaar staalnamemateriaal (zoals de uitschuifbare staalnamestok, emmer, etc.) wordt dan ook na elke staalname steeds grondig gereinigd en ontsmet met 2 % Virkon.

Tijdens dit onderzoek specifiëren we de verdere analyses uitsluitend op de aanwezige visgemeenschappen. Aan de hand van een referentiedatabank kan de juiste soortnaam worden toegekend aan de vermenigvuldigde genetische code. Dit stelt ons in staat om met precisie meerdere soorten tegelijkertijd te identificeren zonder dat fysieke waarneming nodig is.

Tijdens eerder eDNA-onderzoek uitgevoerd binnen het INBO (Van Driessche et al., 2022), werd vastgesteld dat in stromende systeme de eDNA-concentratie van een doelsoort significant afneemt naarmate de afstand tussen de bron (de organismen, d.i. de vissen) en de stroomafwaartse staalnamelocatie toeneemt. De afstand waarop een dergelijk eDNA signaal volledig verdund is of afgebroken en dus niet meer op te sporen, is echter enkele honderden meters tot zelf kilometers groot. Deze grote reikwijdte van eDNA in stromende systemen is te wijten aan het water waarin de eDNA-partikels zweven, dat onder invloed van de stroming verplaatst wordt alvorens het eDNA-signaal volledig is afgebroken. Vervolgonderzoek toonde aan dat voor gemeenschapsanalyses, via de metabarcoding-techniek, de reikwijdte van dit signaal iets



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.

beperkter 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 inzichten over 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 pimers), 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 VISSEN**

er werden weinig vissen gevangen.

Tabel 6.1: Aantal vissen per traject en vissoort

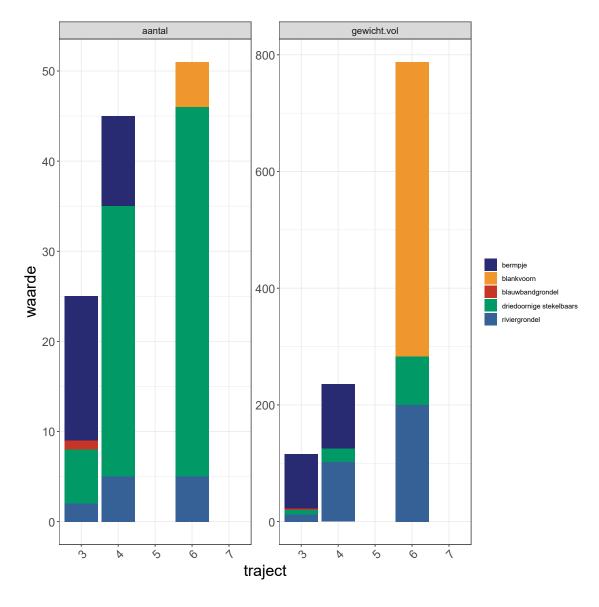
vissoort	3	4	5	6	7
bermpje	16	10	0	0	0
blankvoorn	0	0	0	5	0
blauwbandgrondel	1	0	0	0	0
driedoornige stekelbaars	6	30	0	41	0
riviergrondel	2	5	0	5	0

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

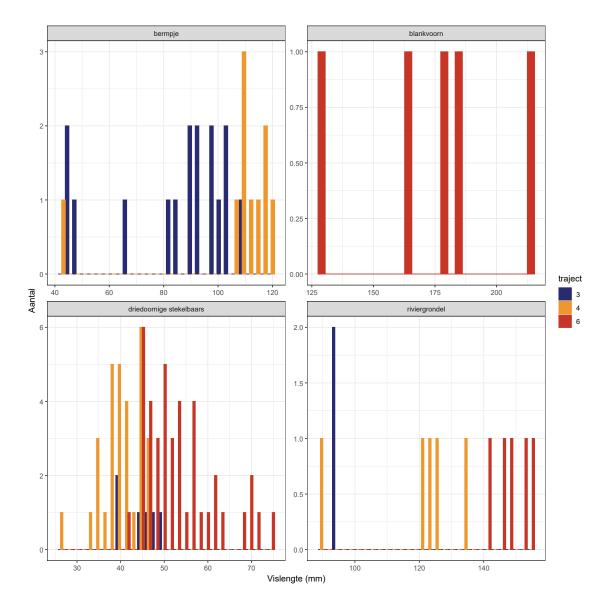
vissoort	3	4	5	6	7
bermpje	94.1	110.5	0	0.0	0
blankvoorn	0.0	0.0	0	505.0	0
blauwbandgrondel	2.2	0.0	0	0.0	0
driedoornige stekelbaars	7.7	23.4	0	82.7	0
riviergrondel	12.1	101.8	0	200.0	0

Tabel 6.3: Soortenaantal per sectie en jaar.

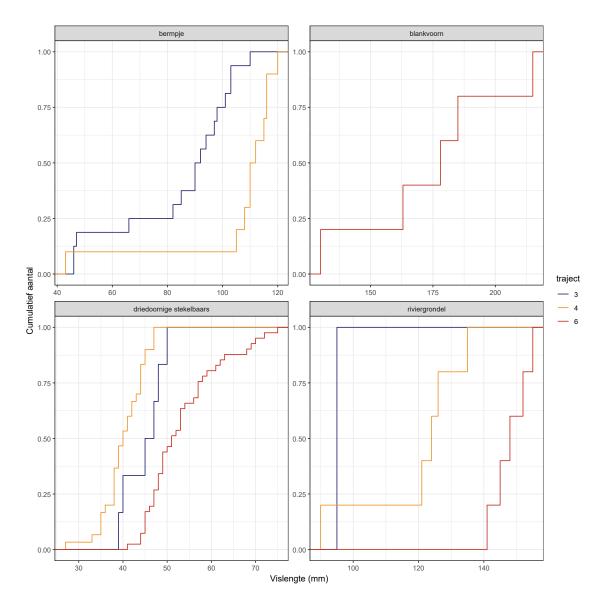
3	4	6
4	3	3



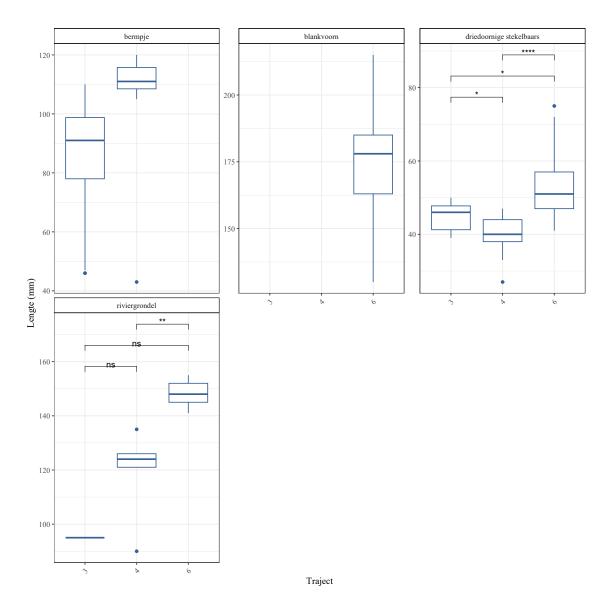
Figuur 6.1: Verdeling van de aantallen en totaal gewicht (g) per vissoort in de verschillende trajecten.



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 nietsignificant of ns (>0.05), \* (0.05-0.01), \*\*\* (0.01-0.001), \*\*\*\* (0.001-0.0001), \*\*\*\*

#### 7 RESULTATEN EDNA VISSEN

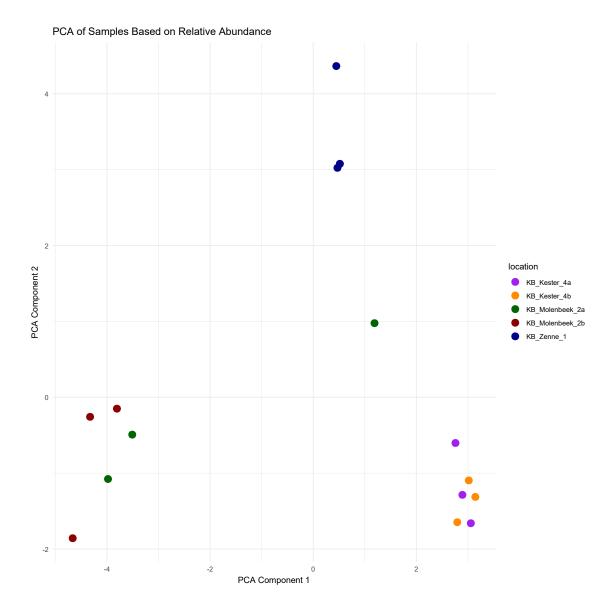
Alle blanco's die tijdens de workflow werden ingebouwd, bleken op het einde van het proces negatief. Er werd geoordeeld dat de resultaten betrouwbaar en herhaalbaar zijn. Bij de twee veldreplicaten genomen op locatie 7, de meest stroomopwaarts gelegen locatie, trad geen positieve amplificatie op, wat aangeeft dat er geen sporen van vis-eDNA werden teruggevonden op deze locatie. Bij de resterende 5 filters, genomen op in totaal 3 verschillende locaties, konden wel visgemeenschappen in kaart worden gebracht. De betrouwbaarheid van de technische replicaten werd geëvalueerd aan de hand van een Principal Components Analyse (PCA, Fig. 7.1) op basis van de relatieve abundantie van elke soort binnen de visgemeenschap. Uit de visualisatie blijkt dat de replicaten van dezelfde locatie sterk clusteren, wat wijst op een hoge reproduceerbaarheid van de metingen. Dit geeft aan dat de technische variabiliteit minimaal is, en dat de waargenomen verschillen voornamelijk toe te schrijven zijn aan biologische of omgevingsfactoren. Deze consistente clustering ondersteunt de betrouwbaarheid en robuustheid van de gebruikte analysemethode.

De opgeschoonde resultaten van de metabarcoding (Fig. 7.2) tonen aan dat de samenstelling van de visgemeenschappen sterk varieert tussen de verschillende staalnamelocaties. Zo wordt in locatie Zenne 1 een sterke dominantie van *Gobio gobio*, oftwel riviergrondel, waargenomen. Andere locaties kennen een meer evenwichtige verdeling van de verschillende vissoorten. Dit wijst op mogelijke ecologische of omgevingsfactoren die de verspreiding en detectie van soorten beïnvloeden.

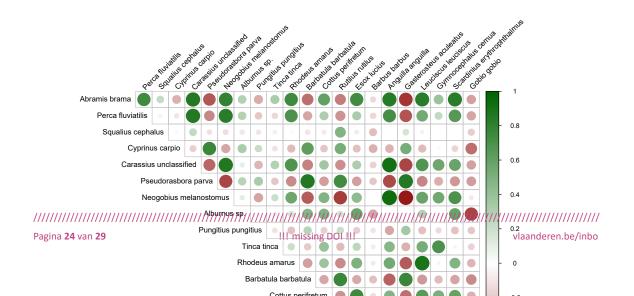
Bij de meest stroomopwaarts gelegen locatie in de Kesterbeek (locatie 7) werd geen vis-eDNA opgespoord Dit suggereert dat in deze zone geen, of slechts in zeer lage concentraties vis-eDNA aanwezig is. Mogelijke verklaringen hiervoor zijn een beperktere vispopulatie, een lagere waterdoorstroming waardoor eDNA minder goed verspreid wordt, of een hogere afbraak van eDNA onder invloed van bepaalde omgevingsfactoren.

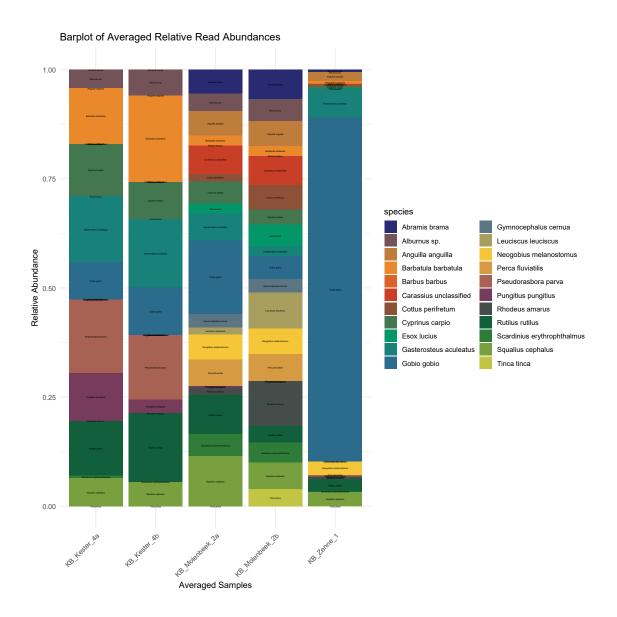
Daarnaast kan de invloed van hydrologische barrières, zoals stuwen of andere waterstructuren, een rol spelen in de verspreiding van vissoorten binnen het studiegebied. Dit zou kunnen verklaren waarom bepaalde soorten, zoals *Gobio gobio*, sterk aanwezig zijn in specifieke zones terwijl andere locaties een diversere gemeenschap vertonen. Verder kan de habitatkwaliteit een bepalende factor zijn, waarbij soorten zoals *Cyprinus carpio* (kaper) en *Esox lucius* (snoek) eerder voorkomen in locaties met specifieke hydrologische kenmerken zoals langzaam stromend of stilstaand water.

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 sequentieabundanties 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.

# ONTWERP

#### A APPENDIX

## A.1 PROJECT-SPECIFIEK PROTOCOL

#### A.1.1 Onderwerp

A.1.1.1 Definities en afkortingen

A.1.1.2 Doelstelling en toepassingsgebied

**Doelstelling** 

Toepassingsgebied:

A.1.2 Beperkingen van het protocol

Begaanbaar

A.1.3 Principe

A.1.4 Vereiste competenties

#### A.1.5 Terreinverkenning

In een eerste fase wordt een terreinbezoek ingepland waarbij mogelijke vismigratieknelpunten worden geïdentificeerd en er een visuele beoordeling plaatsvindt van de variatie in fysische habitats (bedding + oever). Dit terreinbezoek heeft plaatsgevonden op 23/4/2024 en inzichten verkregen tijdens het terreinbezoek zijn verwerkt in het protocol. 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 fysische 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.1.6 Habitatbeschrijving

#### A.1.6.1 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.1.7 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 verzamelt (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.

Criterium	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.1.8 Visgemeenschap

#### A.1.8.1 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, staalnamepakketten 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 visteam 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.