

Notitie / Memo

HaskoningDHV Nederland B.V.
Water

Aan: Provincie Overijssel
Van: Arne Kijk in de Vegte (Royal HaskoningDHV)
Datum: 29 juni 2017
Ons kenmerk: WATBE5989N001F0.2
Classificatie: Open

Onderwerp: Aanvullend waterspitsmuisonderzoek

Bijlage 1 Resultaten eDNA onderzoek Datura

Inleiding

Het Zwarte Water en Vecht is aangewezen als Natura 2000-gebied. In dat kader is voor het gebied een Natura 2000 ontwerp-beheerplan opgesteld waarin onder andere is aangegeven welke maatregelen uitgevoerd moeten worden om de instandhoudingsdoelstellingen van het gebied te bereiken. Provincie Overijssel heeft Royal HaskoningDHV gevraagd om een inrichtingsplan voor 11 deelgebieden (uitwerkingsgebieden) op te stellen. In dit inrichtingsplan wordt binnen het uitwerkingsgebied gronden ingericht met onder andere als doel het behoud en de uitbreiding van het areaal aan kievitsbloemhooilanden (behorend tot habitatype H6510B Vossenstraathooiland) te garanderen (Royal HaskoningDHV, 2017a).

Het inrichtingsplan moet verankerd worden in een Provinciaal inrichtingsplan (PIP). Als bijlage is hiervoor door Royal HaskoningDHV een quickscan flora en fauna uitgevoerd (Royal HaskoningDHV, 2017b). Met deze quickscan is onderzocht of er effecten kunnen optreden op beschermde soorten die de uitvoerbaarheid van het PIP in gevaar kan brengen. Uit deze quickscan is onder andere naar voren gekomen dat het niet is uit te sluiten dat er vaste rust- en verblijfplaatsen van waterspitsmuis aanwezig zijn in de deelgebieden. Bij werkzaamheden aan oeverzones is niet uit te sluiten dat er holletjes van de waterspitsmuis worden aangetast en/of vernietigd. De Wet natuurbescherming verbiedt het beschadigen en vernielen van de vaste rust- en verblijfplaatsen van waterspitsmuis en mitigerende maatregelen om dergelijke effecten op te heffen zijn beperkt voorhanden. Een aanvullend onderzoek naar verspreiding van de waterspitsmuis binnen de deelgebieden van Uiterwaarden Zwarte Water en Vecht is daarom noodzakelijk.

Doelstelling van het aanvullend waterspitsmuisonderzoek is vast te stellen of de waterspitsmuis in de onderzochte deelgebieden aanwezig is. Daarnaast wordt in deze memo beknopt advies gegeven voor mitigatie en vervolgstappen in relatie tot de Wet natuurbescherming.

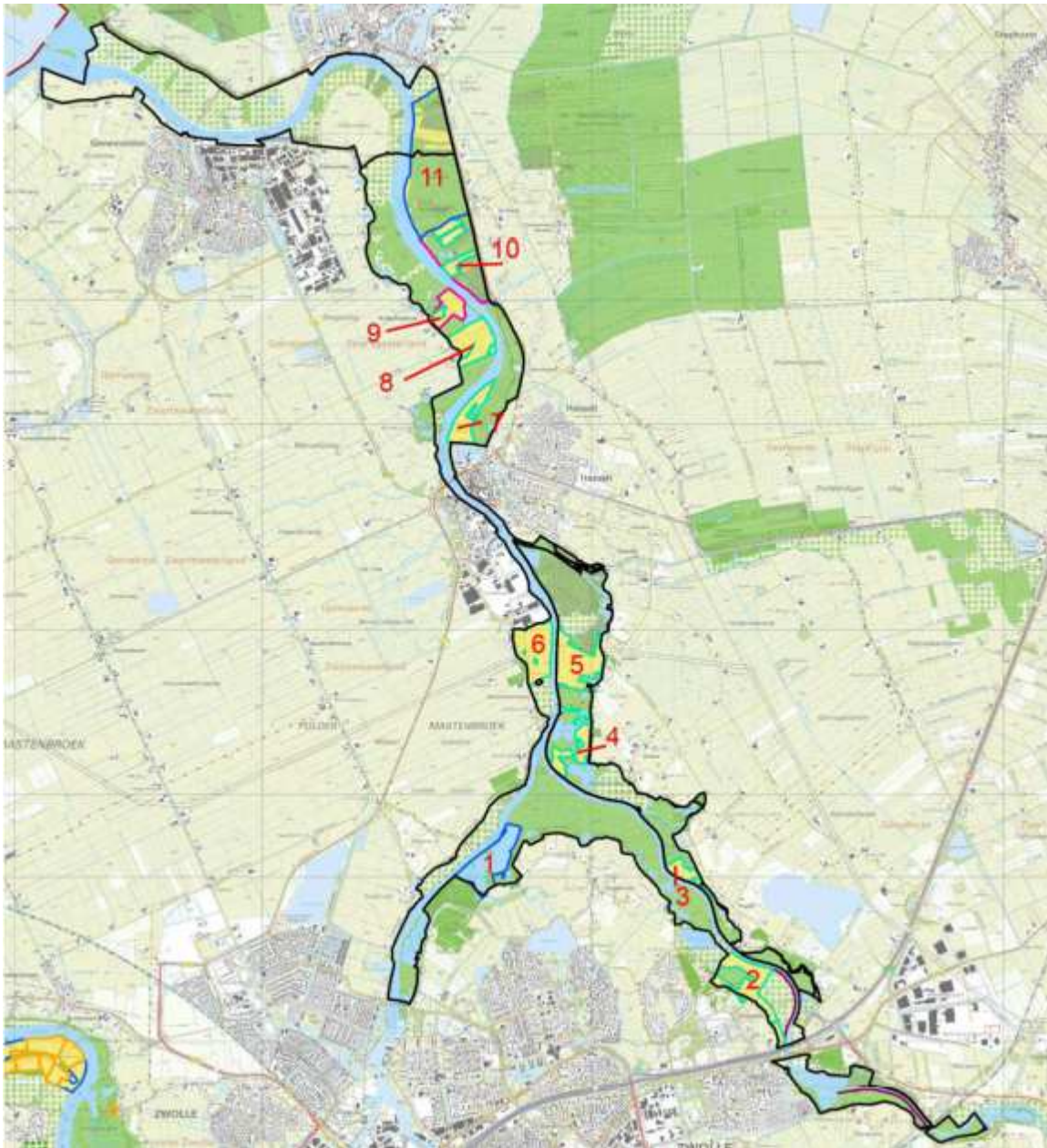
Ligging plangebied en voorgenomen werkzaamheden

Het plangebied wordt gevormd door een deel van het Natura 2000-gebied Uiterwaarden Zwarte Water en Vecht. Het plangebied ligt in de gemeenten Zwartewaterland en Zwolle. De Uiterwaarden Zwarte Water en Vecht betreffen het geheel aan uiterwaarden ten noorden van Zwolle waar de Overijsselse Vecht samenstroomt met het Zwarte Water. Voor het inrichtingsplan is het plangebied opgedeeld in 11 deelgebieden.

De deelgebieden bestaan overwegend uit agrarische hooilanden. Na het hooien worden sommige percelen nabeweïd met jongvee, reguliere beweiding is echter niet aan de orde. Bemesting varieert van reguliere bemesting tot geen bemesting. De intensiteit van het agrarisch gebruik is afhankelijk van de

lokale omstandigheden. Drogere en hoger gelegen percelen worden over het algemeen intensiever gehooïd, bemest en begraasd dan de nattere percelen (Royal HaskoningDHV, 2017a).

De werkzaamheden bestaan grofweg uit het vervangen van duikers, plaggen van rietland, aanleg van poelen en het realiseren van natuurvriendelijke oevers.



Figuur 1 Ligging plangebied met de verschillende deelgebieden aangeduid met rode cijfers (Royal HaskoningDHV, 2017)

Werkwijze

Het aanvullende waterspitsmuisonderzoek is uitgevoerd met behulp van eDNA onderzoek. Dit is een relatief nieuwe methode om de aanwezigheid van soorten aan te tonen (waaronder waterspitsmuis). Dieren laten via faeces, huidcellen en urine DNA achter. Door monsters te nemen en deze te analyseren op DNA van een doelsoort is het mogelijk de aanwezigheid van een soort aan te tonen zonder dat de

soort zelf gevangen hoeft te worden. Met deze methode is er een hogere trefkans dan de waterspitsmuizen te vangen met inloopvallen. Daarnaast levert deze methode geen (onnodige) stress op.

Op 14 april 2017 is door Arne Kijk in de Vegte, ecooloog in dienst van Royal HaskoningDHV een aanvullend waterspitsmuisonderzoek uitgevoerd. In elk deelgebied is één monster verzameld, uitgezonderd van deelgebied 1 en 11. In deelgebied 1 worden geen inrichtingswerkzaamheden verricht die het leefgebied van waterspitsmuis aantast. Van deelgebied 11 is al bekend dat er waterspitsmuizen voorkomen. Daarnaast worden hier ook geen inrichtingswerkzaamheden verricht die het leefgebied van waterspitsmuis aantast, mitigerende maatregelen zijn in dit deelgebied niet nodig.

De monsters bevatten bodemmateriaal en strooisel over een traject van 50-100 meter die verzameld zijn in het meest potentieel geschikte waterspitsmuis habitat van elk deelgebied (begroeide, flauw oplopende oevers). De monsters zijn geanalyseerd door Datura (zie bijlage 1).

Indien er een hoge dichtheid aan waterspitsmuizen in een deelgebied aanwezig is kan er vanuit gegaan worden dat deze gedetecteerd worden met het eDNA onderzoek. Indien in een deelgebied geen eDNA is aangetroffen van waterspitsmuis wil niet zeggen dat deze ook niet aanwezig zijn in het deelgebied. Echter kan er wel vanuit gegaan worden dat de dichtheid van waterspitsmuis dusdanig laag is dat geen sprake is van essentieel leefgebied voor deze soort.

Resultaten

In deelgebied 3 'Genne-Zuid' is DNA aangetroffen van waterspitsmuis. In dit gebied zijn waarschijnlijk waterspitsmuizen in hoge dichtheden aanwezig, mede doordat het habitat zeer geschikt is. Het leefgebied bestaat op deze locatie uit de rietrijke oevers langs de watergangen en de dichtgegroeide kolk. In de overige deelgebieden is geen DNA aangetroffen van waterspitsmuis. In afbeelding 1 is een foto van de monsterlocatie weergegeven en in figuur 2 is de monsterlocatie op kaart weergegeven.



Afbeelding 1 Monsterlocatie deelgebied 3 Genne-Zuid



Figuur 2 Inrichtingsplan deelgebied 3 Genne-Zuid met in rood de monsterlocatie

Mitigerende werkzaamheden

Alleen voor de werkzaamheden in deelgebied 3 zijn mitigerende maatregelen nodig om negatieve effecten op de waterspitsmuis en het leefgebied te voorkomen waardoor de duurzame staat van instandhouding van de soort niet in gevaar komt. De werkzaamheden in deelgebied 3 bestaan ter hoogte van het leefgebied uit het weer opnieuw uitgraven van een dichtgegroeide kolk met behoud van de flauwe oevers. Onderstaand worden mitigerende maatregelen beschreven om negatieve effecten op waterspitsmuis zoveel mogelijk te voorkomen:

- Tijdens de werkzaamheden moeten vluchtplaatsen voor waterspitsmuis altijd beschikbaar blijven. Hiervoor moeten delen/randen van de kolk, grenzend aan de watergang, niet opnieuw uitgegraven worden, zodat hier ruige rietlanden behouden blijven die ook in verbinding staan met de rest van het leefgebied langs de watergang. Voorafgaand aan de werkzaamheden wordt overlegd met een deskundig ecoloog waar deze vluchtplaatsen/leefgebieden behouden moeten blijven.
- De vegetatie in de kolken die vergraven gaat worden moet in september (na het voorplantingsseizoen van waterspitsmuizen) kort worden gemaaid en gehouden. Hiermee wordt het leefgebied ongeschikt gemaakt voor waterspitsmuis en zullen veel waterspitsmuizen het gebied verlaten.
- Werkzaamheden dienen plaats te vinden in de periode oktober t/m maart (buiten voortplantingsseizoen van waterspitsmuis), onder relatief zachte weersomstandigheden, bij een

temperatuur van minimaal 10 graden Celsius, zodat de waterspitsmuis niet in hun overwinteringsschuilplaats zitten.

- Er moet in één richting worden gewerkt, richting het noordwesten, zodat waterspitsmuizen (en ook andere dieren) kunnen vluchten naar resterend leefgebied. Daarnaast moet de ruimte die noodzakelijk is voor het uitvoeren van de werkzaamheden zo beperkt mogelijk worden gehouden.

Compenserende maatregelen zijn niet nodig. Door het opnieuw uitgraven van de kolk kan de verlanding opnieuw gebinnen en wordt de kwaliteit van het leefgebied van waterspitsmuis juist verbeterd.

Ontheffing Wet natuurbescherming

Ondanks de mitigerende maatregelen is het niet uit te sluiten dat vaste rust- en verblijfplaatsen van de waterspitsmuis wordt aangetast/ dan wel vernietigd in deelgebied 3. Dit is een overtreding van de Wet natuurbescherming. Een ontheffing van de Wet natuurbescherming is daarom noodzakelijk. Voor het aanvragen van ontheffing moet een activiteitenplan worden meegestuurd. In het activiteitenplan moet onder andere worden beschreven hoe schade aan het leefgebied van waterspitsmuis zo veel mogelijk wordt gemitigeerd en/of gecompenseerd. Deze memo kan gebruikt worden als basis voor het activiteitenplan.

Conclusie

In deelgebied 3 is leefgebied van waterspitsmuis aanwezig en zijn negatieve effecten door de werkzaamheden niet uit te sluiten. Om negatieve effecten te voorkomen moeten mitigerende maatregelen worden genomen. Ondanks deze maatregelen is niet uit te sluiten dat leefgebied wordt aangetast/ vernietigd en is ontheffing van de Wet natuurbescherming nodig.

Literatuur

K, van Boichove. 2017. *eDNA onderzoek naar waterspitsmuis*. Wageningen 2017. Rapport RA2017215, Datura.

Royal HaskoningDHV. 2017a. *Ontwerp rapportage, Inrichtingsmaatregelen en beheerstrategie Natura 2000-gebied Uiterwaarden Zwarte Water en Vecht*.

Royal HaskoningDHV. 2017b. *Inrichtingsplan uiterwaarden Zwarte Water en Vecht toetsing aan de Wet natuurbescherming*. 2017. WAT_BE5989_R002_NL98237_F2.0.



eDNA onderzoek naar waterspitsmuis



Colofon

Titel	eDNA onderzoek naar waterspitsmuis
Tekst, foto's en samenstelling	K. van Bochove en J. Rook
In opdracht van	Royal HaskoningDHV
Naam opdrachtgever	A. Kijk in de Vegte
Rapportnummer	RA2017215
Datum oplevering rapport	15 mei 2017
Aantal pagina's	8
Wijze van citeren	van Bochove K. 2017. eDNA onderzoek naar waterspitsmuis. Rapport RA2017215, Datura, Wageningen
Laboratorium analist	J. Rook



Datura Molecular Solutions BV

Gevestigd te:
Johan Buziastraat 55
6708 NR Wageningen
Nederland

Postadres laboratorium:
t.a.v. Datura (NCB)
Sylviusweg 72
2333 BE, Leiden
Nederland

0031(0)629455328
www.datura.nl
keesvanbochove@datura.nl

Inhoudsopgave

1. Doelstelling	4
2. Methode	4
2.1 Bemonstering eDNA waterspitsmuis	4
2.2 Laboratoriumanalyse.....	4
2.3 Kwaliteitswaarborging.....	5
2.3.1 Hoe vals positieve waarnemingen voorkomen worden.....	5
2.3.2 Hoe vals negatieve waarnemingen voorkomen worden	7
3. Resultaten.....	8

1. Doelstelling

Vaststellen van de aan- of afwezigheid van eDNA van waterspitsmuis (*Neomys fodiens*) in bodem samples, in opdracht van Royal HaskoningDHV.

2. Methode

2.1 Bemonstering eDNA waterspitsmuis

De bemonstering is uitgevoerd door Royal HaskoningDHV.

2.2 Laboratoriumanalyse

De eDNA samples zijn geanalyseerd op de aanwezigheid van eDNA van waterspitsmuis. Het analyseren van een eDNA sample vindt plaats in drie stappen. Eerst wordt het eDNA op een filter geconcentreerd en gezuiverd. Vervolgens wordt een controle analyse uitgevoerd om te testen of eDNA detectie in een sample eventueel geïnhibeerd wordt door storende stoffen. Tenslotte wordt het eDNA gedetecteerd met behulp van een real-time quantitative PCR.

1. Het eDNA is geëxtraheerd met behulp van de Qiagen Blood & Tissue Kit. Storende stoffen als humuszuren kunnen detectie van het eDNA inhiberen wat kan leiden tot vals negatief resultaat. Gedurende de extractie zijn deze inhiberende stoffen zo veel mogelijk verwijderd.
2. Er is een controle uitgevoerd om na te gaan of eDNA detectie in een sample geïnhibeerd wordt. Dit is gedaan door een bekende hoeveelheid van een fragment artificieel DNA toe te voegen. Vervolgens is de concentratie van dit fragment artificieel DNA gemeten. Dit is zowel gedaan in een reactie waar een hoeveelheid sample aan toegevoegd is, als in een reactie waar geen sample aan toegevoegd is. Als DNA detectie in een sample geïnhibeerd wordt, dan is de gemeten concentratie artificieel DNA in de reactie waarin sample toegevoegd wordt lager ten opzichte van de reactie waaraan geen artificieel DNA aan toegevoegd is. Met name in zuur water, waarin veel organische deeltjes aanwezig zijn kan inhibitie optreden. In een dergelijk geval wordt een extra zuivering stap uitgevoerd of wordt het sample verdund. Vervolgens wordt opnieuw gekeken of de inhiberende stoffen voldoende verwijderd zijn.
3. Detectie van (e)DNA vindt plaats door middel van een real-time quantitative PCR. Het principe achter deze techniek is dat een specifiek deel van het DNA zeer vaak vermenigvuldigd (geamplificeerd) wordt. Datura maakt gebruik van soort-specifieke primers die uitsluitend DNA van de doelsoort vermenigvuldigen. Bovendien wordt een soort-specifieke probe gebruikt (een soort primer) die uitsluitend bindt aan (e)DNA van de doelsoort. Binding van de probe aan het vermenigvuldigde (e)DNA van de doelsoort veroorzaakt een fluorescent signaal. Dit signaal wordt gedetecteerd met behulp van een qPCR platform (CFX96 Touch™ van Bio-Rad). De qPCR detectie van eDNA wordt uitgevoerd met 12 replica's. Het aantal positieve replica's is een indicatie voor de concentratie eDNA. Het is echter (voornamelijk) niet mogelijk om op basis van de concentratie van eDNA de populatiedichtheid te bepalen. De DNA detectie uit keutels wordt gedaan met 2 replica's. In keutels is een hogere concentratie DNA aanwezig in vergelijking met eDNA waardoor 2 replica's hiervoor genoeg is. De qPCR voor de water samples is uitgevoerd met 55 cycli, de qPCR voor keutel samples is uitgevoerd met 35 cycli. De qPCR detectie wordt uitgevoerd met de TaqMan® Environmental Mastermix 2.0 (Life Technologies®). Naast de

(e)DNA samples worden qPCR reacties uitgevoerd waaraan geen sample is toegevoegd. Deze moeten negatief zijn. Zodoende kan bevestigd worden dat de analyse schoon is uitgevoerd en er geen contaminatie optreedt. Tenslotte worden ook enkele reacties geanalyseerd waaraan een bekende concentratie DNA is toegevoegd. Deze reacties moeten positief zijn. Dit bevestigt dat de analyse juist is uitgevoerd.

2.3 Kwaliteitswaarborging

2.3.1 Hoe vals positieve waarnemingen voorkomen worden

Het optreden van zowel vals positieve als vals negatieve waarnemingen wordt tot het minimum beperkt. Vals positieve waarnemingen kunnen op drie manieren ontstaan:

- De gebruikte primers en de probe zijn niet specifiek;
- Er vindt contaminatie plaats in het laboratorium;
- Er vindt contaminatie plaats in het veld.

Hieronder wordt aangegeven hoe vals positieve waarnemingen voorkomen worden. Omdat de kans op vals positieve waarnemingen zeer klein is, kunnen we niet exact kwantificeren hoe groot de kans daadwerkelijk is. Datura kan daarom niet 100 % zeker garanderen dat vals positieve waarnemingen nooit optreden. In de praktijk (middels validatie studies) nemen we echter geen vals positieve waarnemingen waar. Het is daarom aannemelijk dat vals positieve waarnemingen niet optreden.

Het voorkomen van vals positieve waarnemingen door het ontwerp en validatie van specifieke primers en probes:

1. Er wordt gebruik gemaakt van een **2-staps** qPCR protocol, hetgeen de kans op aspecifieke detectie verkleint;
2. Gebruik van zeer **specifieke primers** waarmee uitsluitend (e)DNA van de doelsoort gedetecteerd kan worden. De primers zijn ontwikkeld met behulp van specialistische software;
3. Een qPCR detectie wordt uitgevoerd met behulp van een zeer specifieke **probe**. Deze probe hecht uitsluitend aan DNA van de doelsoort, hetgeen resulteert in een fluorescent signaal;
4. De primers en de probe zijn in het laboratorium getest. Eerst is getest of de qPCR detectie inderdaad negatief resultaat geeft na het toevoegen van DNA van (verwante) soorten;
5. Vervolgens is de methode **gevalideerd** door het testen van veldsamples. Er zijn eDNA samples verzameld op locaties waar de doelsoort niet voorkomt. Er werd geen eDNA gedetecteerd in deze samples. Zodoende kon aangetoond worden dat de methode niet resulteert in positieve detectie als de doelsoort niet aanwezig is.

Om vals positieve waarnemingen te voorkomen werkt Datura in een specifiek voor (e)DNA ingericht laboratorium omgeving en worden strikte procedures gevolgd:

1. Verschillende onderdelen van de analyse workflow worden uitgevoerd in fysiek gescheiden laboratorium ruimtes. Het samenstellen van de sample kits en het voorbereiden van de qPCR reagentia vindt plaats in een **DNA clean room**. Dit is een ruimte waarin geen DNA samples aanwezig zijn. Zodoende kunnen we garanderen dat er geen DNA aanwezig is in de eDNA sample kits en de reagentia (zoals de primers en probes) die later gebruikt worden in de analyses. Het extraheren van de (e)DNA samples gebeurt in een **pre-PCR laboratorium**. Dit is een ruimte waarin uitsluitend lage concentraties DNA aanwezig zijn. Vervolgens worden hier de (e)DNA samples samen met de qPCR reagentia in een 96-well plaat gepipetteerd. Deze plaat wordt luchtdicht afgesloten. Tenslotte wordt de qPCR uitgevoerd in een **post-PCR laboratorium**. In dit laboratorium wordt het (e)DNA vermeerderd en hier zijn dus hoge concentraties DNA aanwezig.
2. Er wordt een **unidirectionele workflow** gehanteerd om contaminatie van de DNA clean room en het pre-PCR laboratorium te voorkomen. Dit houdt in dat materialen die eenmaal in het post-PCR laboratorium geweest zijn niet meer terug mogen naar de DNA clean room en het pre-PCR laboratorium. Ook mogen medewerkers van Datura niet dezelfde dag van een post-PCR laboratorium terug naar de DNA clean room en het pre-PCR laboratorium.
3. In iedere analyse worden **controle analyses** uitgevoerd. Zo worden er samples geëxtraheerd waaraan geen slootwater wordt toegevoegd (zogenaamde extractie controles). In de qPCR worden naast de extractie controles ook negatieve PCR controles meegenomen. Zodoende kan heel nauwkeurig gemonitord worden of er inderdaad geen contaminatie optreed.

Om contaminatie in het veld te voorkomen worden de volgende maatregelen genomen:

1. Het **sampling protocol** van Datura wordt gevolgd. Dit protocol schrijft een specifieke werkwijze voor. In de praktijk is gebleken dat er geen contaminatie plaats vindt als dit protocol gevolgd wordt;
2. Bij het nemen van eDNA samples dient rekening gehouden te worden met **waterverschuivingen**. De sampling wordt daarom uitgevoerd op een moment dat er weinig stroming is. Zo worden eDNA samples niet verzameld direct na (hevige) regenval. Ook wordt er rekening gehouden met kunstmatig opgewekte stroming, bijvoorbeeld bij wisseling van zomer- naar winterpeil.

2.3.2 Hoe vals negatieve waarnemingen voorkomen worden

Naast vals positieve waarnemingen kunnen ook vals negatieve waarnemingen optreden. Uit diverse **validatie studies** blijkt dat de eDNA detectiekans (per sample) voor waterspitsmuis in stilstaand water 78% is. Er is dus altijd een kans dat eDNA niet gedetecteerd wordt in een watersample, ook al is de waterspitsmuis wel aanwezig. Maatregelen die genomen worden om vals negatieve waarnemingen te voorkomen:

1. Per eDNA sample worden **26 subsamples** verzameld. Hiermee wordt de kans vergroot dat eDNA in het sample terecht komt.
2. Bij eDNA wordt een zeer gevoelige **qPCR detectie** uitgevoerd met behulp van **12 replica's**. Wanneer minder replica's uitgevoerd worden kan er minder gevoelig gedetecteerd worden. Meer dan 12 qPCR replica's leidt echter niet tot gevoeliger detectie;
3. Gebruik van een **zeer korte merker** van maximaal 100 basepaar;
4. In ieder sample wordt **vastgesteld of de qPCR detectie geïnhibeerd** wordt door storende stoffen. Indien dit het geval is wordt er een **extra zuiveringstap** uitgevoerd. Vervolgens wordt nogmaals getest of de inhiberende stoffen er inderdaad geen inhibitie meer optreedt (zie methode voor een uitgebreidere beschrijving);
5. Er wordt altijd een **positieve controle** van doelsoort DNA meegenomen in de qPCR detectie. Deze controle moet altijd resulteren in positieve detectie. Ook als alle samples negatief zijn, kan zodoende vastgesteld worden dat de detectie juist is uitgevoerd.

3. Resultaten

In een van de samples werd eDNA van waterspitsmuis aangetroffen (zie tabel 1).

Er is geen amplificatie waargenomen in de negatieve PCR controle reacties waar geen sample aan toegevoegd is. De positieve controle reacties waar DNA uit weefsel van de target soorten aan toegevoegd is werden naar verwachting wel geamplificeerd. Dit bewijst dat de analyse juist is uitgevoerd.

Humuszuren kunnen een qPCR reactie inhiberen wat kan leiden tot vals positief resultaat. Daarom wordt altijd een interne controle mee geanalyseerd om vast te kunnen stellen of er sprake is van inhibitie. Er werd geen significante afwijking gevonden in de Cq-waarde van de interne controles waar een sample aan toegevoegd is ten opzichte van de reacties waar geen sample aan toegevoegd is. Er is dus geen sprake van inhibitie.

Tabel 1. Resultaten van eDNA analyse.

Sample nummer	Resultaten voor eDNA waterspitsmuis
6099	Negatief
6100	Negatief
6101	Positief
6102	Negatief
6103	Negatief
6104	Negatief
6105	Negatief
6106	Negatief
6107	Negatief