

eDNA onderzoek waterspitsmuis, noordse woelmuis & rugstreeppad



Colofon

Titel	eDNA onderzoek waterspitsmuis, noordse woelmuis & rugstreepad
Tekst, foto's en samenstelling	Suzan Wellens-Roemaat, Jitske Rook, Marijn Goes
In opdracht van	Bureau Schenkeveld
Naam opdrachtgever	Bram Schenkeveld
Rapportnummer	RA23025
Datum opstelling	10 mei 2023
Aantal pagina's	9
Contactpersoon vanuit Datura	Suzan Wellens-Roemaat
Wijze van citeren	Goes, M. J., Rook, J., & Wellens-Roemaat, S. 2023 eDNA. Rapport eDNA onderzoek waterspitsmuis, noordse woelmuis & rugstreepad RA23025, Datura Molecular Solutions BV, Wageningen



Datura Molecular Solutions BV

Gevestigd te:
Agro Business Park 10
6708 PW Wageningen
Nederland

+31(0)643288093
www.datura.nl
suzan.wellens@datura.nl

Inhoudsopgave

1. Doelstelling	4
2. Methode	4
2.1 Bemonstering	4
2.2 Laboratoriumanalyse	5
2.3 Kwaliteitswaarborging	6
2.3.1 Hoe fout positieve waarnemingen worden voorkomen	6
2.3.2 Hoe fout negatieve waarnemingen worden voorkomen (qPCR)	8
3. Resultaten	9
Bijlagen - foto impressie monsterlocatie.....	10

1. Doelstelling

De doelstelling van dit onderzoek is het aantonen van de aan- of afwezigheid van de waterspitsmuis (*Neomys fodiens*), de noordse woelmuis (*Alexandromys oeconomicus arenicola*) en de rugstreeppad (*Epidalea calamita*) aan de hand van (e)DNA onderzoek. Hiervoor is gebruik gemaakt van eDNA water- en bodemonsters. Dit onderzoek is uitgevoerd in opdracht van Bureau Schenkeveld.

2. Methode

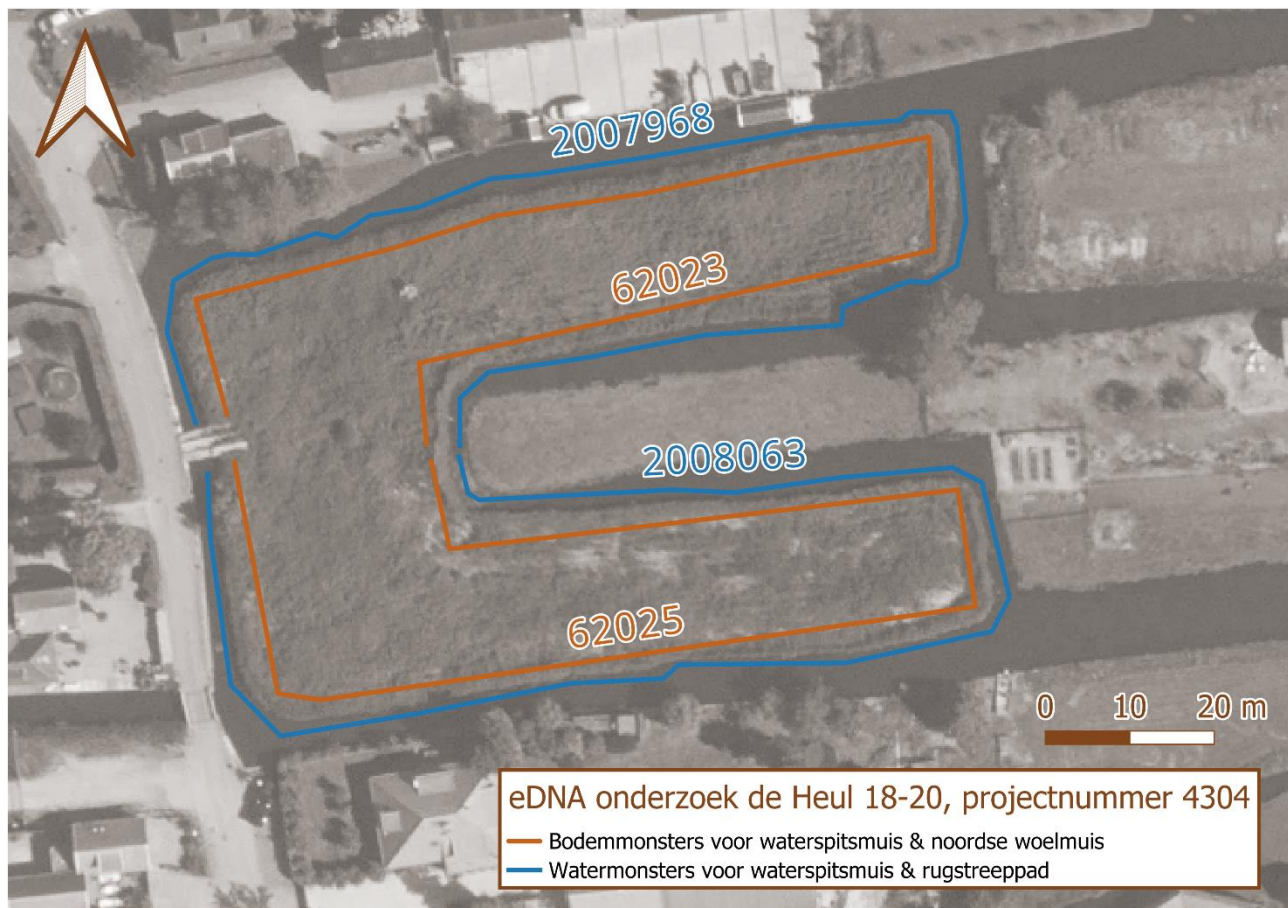
2.1 Bemonstering

De bemonstering is uitgevoerd door een medewerker van Datura Moleculair Solutions B.V. volgens gestandaardiseerde protocollen van Datura (opvraagbaar). In totaal zijn er twee watermonsters en twee bodemonsters verzameld en aangeleverd aan het laboratorium van Datura. Elk monster heeft een eigen nummer, de doelsoorten en het type monster zijn te zien in Tabel 1. Figuur 1 geeft daarnaast nog een grafische weergave van de monsterlocaties ter verduidelijking. Alle monsters zijn verzameld op 20 april 2023. In de bijlagen – foto impressie monsterlocaties zijn foto's te zien van de bemonsteringslocaties, met hierbij vermelde coördinaten.

Tabel 1: monsterinformatie eDNA onderzoek de Heul 18-20, projectnummer 4304.

Monsternummer	Doelsoort	Type
62023	- Waterspitsmuis - Noordse woelmuis	Bodemmonster
62025	- Waterspitsmuis - Noordse woelmuis	Bodemmonster
2008063	- Waterspitsmuis - Rugstreeppad	Waterwatermonster
2007968	- Waterspitsmuis - Rugstreeppad	Watermonster

Figuur 1: grafische weergave van de monsterlocaties voor eDNA onderzoek de Heul 18-20 Oostzaan , projectnummer 4304.



2.2 Laboratoriumanalyse

De watermonsters zijn getest op de aanwezigheid van eDNA afkomstig van de waterspitsmuis en de rugstreeppad. De bodemonsters zijn getest op de aanwezigheid van eDNA afkomstig van de waterspitsmuis en de noordse woelmuis. Het analyseren van een eDNA monster vindt plaats in drie stappen. Eerst wordt het eDNA in het monster geconcentreerd en gezuiverd. Vervolgens wordt een controle analyse uitgevoerd om te testen of eDNA detectie in een monster eventueel geïnhibereerd wordt door storende stoffen. Tenslotte wordt het eDNA gedetecteerd met behulp van een real-time quantitative PCR.

1. Het eDNA in de watermonsters is geëxtraheerd middels een chloroform-phenol extractie. De bodemonsters zijn eerst gecentrifugeerd waardoor het DNA neerslaat in een pellet en het eDNA is vervolgens geëxtraheerd met behulp van een aangepaste variant van de Qiagen® Dneasy Blood & Tissue kit. Storende stoffen als humuszuren kunnen detectie van het eDNA inhiberen wat kan leiden tot fout negatief resultaat. Gedurende de extracties zijn deze inhiberende stoffen zo veel mogelijk verwijderd.

2. Er wordt altijd een controle uitgevoerd om na te gaan of (e)DNA detectie in een monster geïnhibeed wordt. Dit wordt gedaan door een bekende hoeveelheid van een fragment artificieel DNA toe te voegen. Vervolgens wordt de concentratie van dit fragment artificieel DNA gemeten. Dit wordt zowel gedaan in een reactie waar een hoeveelheid monster aan toegevoegd wordt, als in een reactie waar geen monster aan toegevoegd wordt. Als DNA detectie in een monster geïnhibeed wordt, dan is de gemeten concentratie artificieel DNA in de reactie waarin monster toegevoegd wordt lager ten opzichte van de reactie waar geen monster 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 monster verdund. Vervolgens wordt opnieuw gekeken of de inhiberende stoffen voldoende verwijderd zijn.
3. Detectie van eDNA vindt plaats door middel van een real-time quantitative PCR. Het principe achter deze techniek is dat een specifiek deel van het DNA (target DNA) zeer vaak vermenigvuldigd (geamplificeerd) wordt. Datura maakt gebruik van soort-specifieke primers die uitsluitend DNA van de doelsoort vermenigvuldigen. Datura gebruikt bovendien soort-specifieke probes (een soort primer) die uitsluitend binden aan DNA van de doelsoort. Binding van de probe aan het vermenigvuldigde DNA van de doelsoort resulteert in een fluorescent signaal. Dit signaal wordt gedetecteerd met behulp van een qPCR platform (CFX96 Touch™ van Bio-Rad). De qPCR detectie van watermonsters wordt uitgevoerd met 12 replica's gezien de concentraties DNA in deze monsters erg laag zijn. Door te werken met 12 replica's kan zeer gevoelig gedetecteerd worden. De qPCR detectie wordt uitgevoerd met de TaqMan® Environmental Mastermix 2.0 (Life Technologies®). Naast het DNA monster worden PCR reacties uitgevoerd waaraan geen monster 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 fout positieve waarnemingen worden voorkomen

Het optreden van zowel fout positieve als fout negatieve waarnemingen wordt tot het minimum beperkt. Fout 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 fout positieve waarnemingen voorkomen worden. Omdat de kans op fout positieve waarnemingen zeer klein is, kunnen we niet exact kwantificeren hoe groot de kans daadwerkelijk is. Datura kan daarom niet 100% zeker garanderen dat fout positieve waarnemingen nooit optreden. In de praktijk (middels validatie studies) nemen we echter geen fout positieve waarnemingen waar. Het is daarom aannemelijk dat fout positieve waarnemingen vrijwel niet optreden.

Het voorkomen van fout positieve waarnemingen door het ontwerp en validatie van specifieke primers en

probes (bij qPCR):

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 eDNA 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 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 veldmonsters. Er zijn eDNA monsters verzameld op locaties waar de doelsoort niet voorkomt. Er werd geen eDNA gedetecteerd in deze monsters. Zodoende kon aangetoond worden dat de methode niet resulteert in positieve detectie als de doelsoort niet aanwezig is.

Om fout 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 eDNA monster kits en het voorbereiden van de qPCR reagentia vindt plaats in een **DNA clean room**. Dit is een ruimte waarin geen DNA monsters aanwezig zijn. Zodoende kunnen we garanderen dat er geen DNA aanwezig is in de eDNA monster kits en de reagentia (zoals de primers en probes) die later gebruikt worden in de eDNA analyses. Het extraheren van de eDNA monsters gebeurt in een **eDNA laboratorium**. Dit is een ruimte waarin uitsluitend lage concentraties DNA aanwezig zijn. Vervolgens worden hier de eDNA monsters 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 eDNA 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 eDNA 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 eDNA laboratorium. Ook medewerkers van Datura mogen niet dezelfde dag van een post-PCR laboratorium terug naar een ruimte waarin weinig DNA aanwezig is.
3. In iedere analyse worden **controle analyses** uitgevoerd. Zo worden er monsters geëxtraheerd waaraan geen sample water is 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 optreedt.

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

Het **bemonsteringsprotocol** 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.

2.3.2 Hoe fout negatieve waarnemingen worden voorkomen (qPCR)

Naast fout positieve waarnemingen kunnen ook fout negatieve waarnemingen optreden. Er is dus altijd een kleine kans dat eDNA niet gedetecteerd wordt, ook al is de doelsoort wel aanwezig. Door meerdere monsters te nemen kan de kans op fout negatieve waarnemingen aanzienlijk verkleind worden. Maatregelen die genomen worden om fout negatieve waarnemingen te voorkomen:

1. Per monster worden meerdere **submonsters** verzameld. Hiermee wordt de kans vergroot dat eDNA in het monster terecht komt.
2. Een zeer gevoelige **qPCR detectie** in eDNA water- en bodemonsters wordt 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 monster 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 er inderdaad geen inhibitie meer optreedt (zie methode voor een uitgebreidere beschrijving);
5. Er wordt altijd een **positieve controle** van de doelsoort DNA meegenomen in de qPCR detectie. Deze controle moet altijd resulteren in positieve detectie. Ook als alle monsters negatief zijn, kan zodoende vastgesteld worden dat de detectie juist is uitgevoerd.

3. Resultaten

In bodemonster 62025 is eDNA van noordse woelmuis gedetecteerd, dit monster was negatief voor waterspitsmuis. In het andere bodemonster (62023) is geen eDNA van de doelsoorten gedetecteerd, dit monster was negatief voor zowel noordse woelmuis als waterspitsmuis.

Er is in watermonster (2008063) wél eDNA van waterspitsmuis gedetecteerd. In geen van de watermonsters is eDNA van rugstreepad gedetecteerd. Een overzicht van de resultaten van dit onderzoek zijn weergegeven in Tabel 2 (uitslagen van de analyses van bodemonsters) en Tabel 3 (uitslagen van de analyses van de watermonsters).

Iedere analyse is uitgevoerd met behulp van 12 replica's (zie 2.2 Laboratoriumanalyse). De resultaten worden weergegeven als het aantal replica's (van de 12 replica's) dat positief scoorde voor eDNA van de doelsoorten in de betreffende monsters. Als er een score van "0/12" is verkregen, betekent dit dat er geen eDNA van de doelsoort in het betreffende monster is gedetecteerd. Als er minstens 1 positieve replica is verkregen (bijvoorbeeld '1/12' of hoger) dan betekent dit dat er eDNA van de doelsoort is gedetecteerd. Het aantal positieve replica's is een grove maat voor de concentratie eDNA van de doelsoort: bij een laag aantal positieve replica's (bijvoorbeeld '1/12') is de verwachting dat de eDNA concentratie van de doelsoort zeer laag is.

Er is geen amplificatie waargenomen in de negatieve controle reacties waar geen sample aan toegevoegd is. De positieve controle reacties waar DNA van de doelsoort aan toegevoegd is werden wel geamplificeerd. Dit geeft aan dat de analyse juist is uitgevoerd.

Tabel 2: Resultaten van de qPCR analyses van de bodemonsters met 12 replica's. Monsters met een positief resultaat zijn weergegeven met een blauw arcering.

Monsternummer	Doelsoort	Resultaat qPCR analyse
62023	Waterspitsmuis	0/12
62023	Noordse woelmuis	0/12
62025	Waterspitsmuis	0/12
62025	Noordse woelmuis	5/12

Tabel 3: Resultaten van de qPCR analyses van de watermonsters met 12 replica's. Monsters met een positief resultaat zijn weergegeven met een blauw arcering.

Monsternummer	Doelsoort	Resultaat qPCR analyse
2008063	Waterspitsmuis	1/12
2008063	Rugstreepad	0/12
2007968	Waterspitsmuis	0/12
2007968	Rugstreepad	0/12

Bijlagen - foto impressie monsterlocatie



Bodemmonster 62023 + watermonster 2007968
(52.457224, 4.868040)



Bodemmonster 62023 + watermonster 2007968
(52.457262, 4.867227)



Bodemmonster 62025 + watermonster 2008063
(52.457012, 4.867804)



Bodemmonster 62025 + watermonster 2008063
(52.456925, 4.867192)