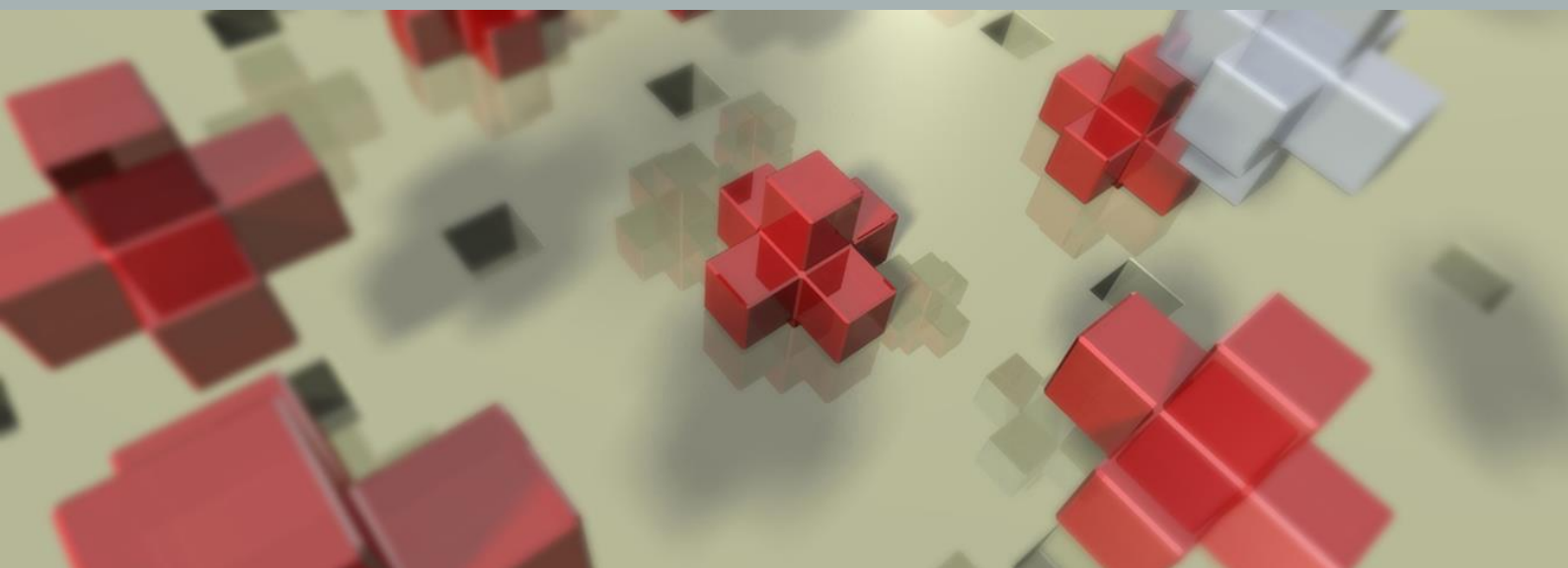


Ecologisch onderzoek
Heikikker en grote modderkruiper
Zaling 8A te Papendrecht



Ecologisch onderzoek Heikikker en grote modderkruiper Zaling 8A te Papendrecht

Rapportnummer: 211X08343

Datum: 16 november 2017

Contactpersoon opdrachtgever:

Projectteam BRO: Anja Diepen, Ineke Kroes

Trefwoorden: Heikikker, grote modderkruiper, Flora en Fauna onderzoek

Bron foto kaft: -

Beknopte inhoud: -

BRO
Hoofdvestiging
Bosscheweg 107
5282 WV Boxtel
T +31 (0)411 850 400
E info@bro.nl

Inhoudsopgave

pagina

1. AANLEIDING	2
1.1 Aanleiding	2
1.2 Doel	2
1.3 Leeswijzer	2
2. OMSCHRIJVING PLANGEBIED	3
2.1 Huidige situatie	3
2.2 Aanwezige ecotopen	4
2.3 Toekomstige (geplande) situatie	4
3. WERKWIJZE	7
3.1 Heikikker	7
3.2 Grote modderkruiper	9
4. RESULTATEN	10
4.1 Heikikkers	10
4.2 Grote modderkruiper	10
5. EFFECTENBEOORDELING	12
5.1 Heikikkers	12
5.2 Grote modderkruiper	12
6. TOETSING AAN DE WET NATUURBESCHERMING	13
6.1 Heikikker	13
6.2 Grote modderkruiper	13
7. CONCLUSIES EN ADVIES	14
8. BRONNEN	15
BIJLAGE	
Bijlage 1: eDNA onderzoek naar grote modderkruiper	

1. AANLEIDING

1.1 Aanleiding

Er zijn plannen om op de Zaling 8A in Papendrecht een woning te realiseren. Hiervoor zal over een watergang die het perceel scheidt van de straat, een brug worden aangelegd. Het terrein zal bouwrijp worden gemaakt. Er zal gras- en kruidenvegetatie en wellicht wat struiken verwijderd worden er zal grondverzet gepleegd worden.

Om te voldoen aan nationale en internationale regelgeving is het verplicht om, voordat de ingreep plaatsvindt, een onderzoek te doen naar het eventueel voorkomen van beschermde flora en fauna.

Om de effecten van de plannen op natuurwaarden te bepalen is in opdracht van BRO in mei 2017 een verkennend veldbezoek uitgevoerd. Uit dat onderzoek bleek dat het plangebied mogelijk geschikt is voor de heikikker en grote modderkruiper.

Door het verdwijnen van de grasvegetaties en het aanleggen van watergangen, waarbij huidige watergangen tijdelijk kunnen worden aangetast, kunnen mogelijk vaste rust- of verblijfplaatsen en/of foerageergebieden van de heikikker verdwijnen en door de aanleg van de brug kan de grote modderkruiper wellicht verstoord worden.

1.2 Doel

Dit onderzoek zal antwoord geven op de volgende vragen:

- Komt de heikikker momenteel voor in het plangebied?
- Welke functies heeft het plangebied voor de eventueel aanwezige heikikkers?
- Komt de grote modderkruiper voor in het plangebied?
- Welke functies heeft het plangebied voor de eventueel aanwezige grote modderkruipers?
- Leidt de ingreep tot overtreding van de verbodsbepalingen uit de Wet natuurbescherming?

1.3 Leeswijzer

Hoofdstuk 2 geeft een beschrijving van het plangebied, voor wat betreft de huidige en de toekomstige situatie. In hoofdstuk 3 worden de methode van werken en de onderzoeksinspanning beschreven. In hoofdstuk 4 worden de resultaten van onderzoek naar de heikikker gepresenteerd. De mogelijke effecten van de ingreep worden gerelateerd aan de aanwezige heikikkers in hoofdstuk 5. Toetsing aan de Wet natuurbescherming is beschreven in hoofdstuk 6. Hoofdstuk 7 is een beschrijving van de conclusies en aanbevelingen. Hoofdstuk 8 bestaat uit een korte bronnenlijst.

2. OMSCHRIJVING PLANGEBIED

2.1 Huidige situatie

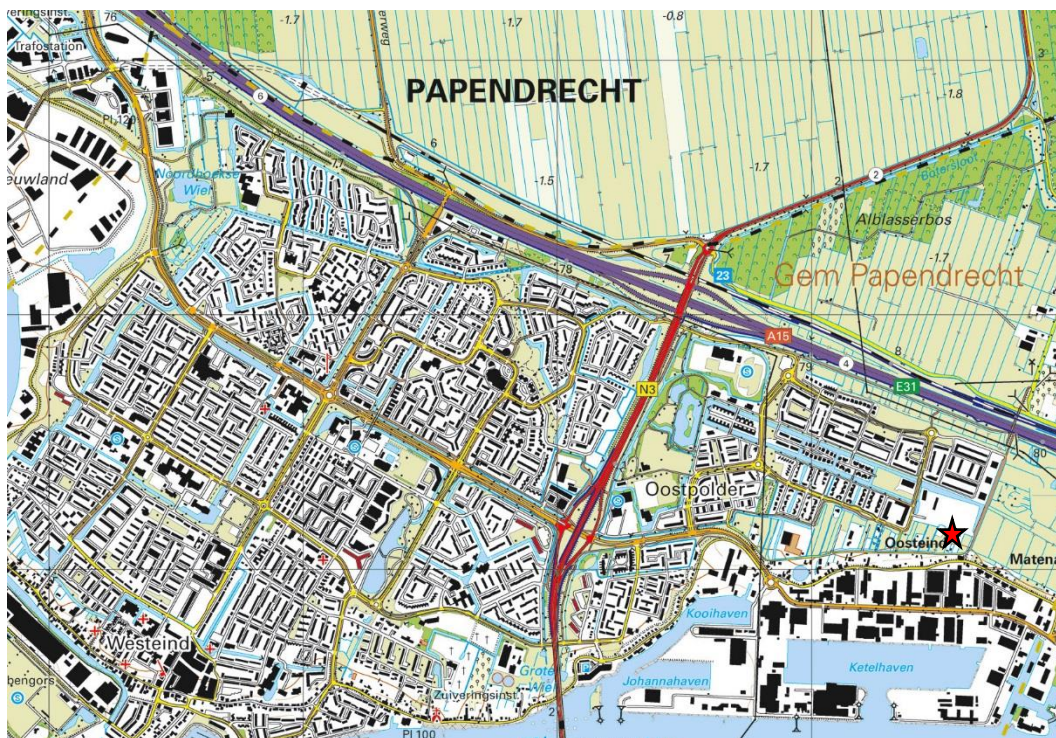
Ligging van het plangebied

De locatie van het plangebied betreft een perceeltje volkstuin aan de Zaling in Papendrecht. De Amersfoortcoördinaten van het midden van het plangebied zijn X= 109.577, Y= 427.122.

Het plangebied is onderdeel van een volkstuinencomplex. Momenteel staan er een aantal lage houten gebouwtjes op, en een glazen kas. Er is een grasveldje op het terrein. Het plangebied wordt aan twee kanten omgeven door een brede doorgaande watergang. Langs de watergang aan de oostkant staan een aantal oudere knotwilgen. Het volkstuinencomplex wordt aan de noord-, west- en zuidkant omgeven door woningen. Aan de oostkant liggen weiden. De ligging van het plangebied is te zien in onderstaande afbeeldingen, figuur 1 en 2.



Figuur 1: Luchtfoto met begrenzing plangebied.



Figuur 2: Topografische kaart plangebied.

2.2 Aanwezige ecotopen

Binnen het plangebied zijn de volgende ecotopen aanwezig:

- Weides met ruig gras en kruiden.
- Oevers met hoge begroeiing.
- Oevers met lage begroeiing.
- Watergangen.

2.3 Toekomstige (geplande) situatie

De gewenste ontwikkeling van het plangebied betreft de realisatie van een woning. Hiervoor zullen een paar houten gebouwtjes verdwijnen. Er zal een bruggetje aangelegd worden over de brede watergang. De knotwilgen blijven behouden. Er zullen wellicht struiken, en gras- en kruidenvegetatie verdwijnen en misschien enkele wat dunnere bomen.



Figuur 3: Indicatieve toekomstige gewenste situatie van het plangebied

De volgende afbeeldingen (figuur 4 t/m 9) geven een impressie van het plangebied.



Figuur 4: Plangebied, het tuintje met grasveld en wat open houten gebouwtjes.



Figuur 5: Plangebied, de veldschuur en de glazen kas.



Figuur 6: Overzicht van het gehele plangebied, gezien vanaf de Tiendweg Oost, met op de voorgrond de weide van het naastliggend perceel.



Figuur 7: Overzicht van het plangebied, gezien vanaf de Matenasche Scheikade, met op de voorgrond de weide van het naastliggend perceel.



Figuur 8: Overzicht van het plangebied, gezien vanaf de Zaling, met op de voorgrond de brede watergang die tussen het perceel en de Zaling in ligt.



Figuur 9: Aanzicht van het plangebied, gezien vanaf de Zaling, met op de voorgrond de afscheiding van het perceel langs de watergang.

3. WERKWIJZE

3.1 Heikikker

Voor het inventariseren van de heikikker is gebruik gemaakt van de aanwijzingen uit de soortenstandaard Heikikker *Rana arvalis* 2.0 (2014) en het kennisdocument Heikikker *Rana arvalis*, 1.0, BIJ12, juli 2017. Het inventariseren van heikikkers kan op verschillende manieren gebeuren. De beste methode om heikikkers te inventariseren is tijdens de voortplanting vroeg in het voorjaar. In de periode februari/maart moet naar roepende exemplaren worden gezocht. In dezelfde periode kunnen overdag ook eiklompjes worden gezocht. In april en mei kan naar larven gezocht worden. De larven van de heikikker lijken sterk op die van de bruine kikker. Ze zijn met de loep van elkaar te onderscheiden door te kijken naar het aantal liptandjes. Conform de soortenstandaard en het kennisdocument is de heikikker ook aan te tonen via een inventarisatie op het land (langs oevers van sloten) door naar volwassen individuen en juveniele heikikkers te zoeken. In juni en juli kan overdag naar gemetamorfoseerde exemplaren worden gezocht. Deze bevinden zich dan op de oevers van de voortplantingswateren. Volwassen heikikkers zijn lastiger te vinden. Het meest effectief is om te zoeken op vochtige plekken tijdens een nattere periode na een langdurig droge periode. Er moeten dan op 5 vochtige avonden na zonsondergang trajecten van 4 uur gelopen worden.

In 2015 is in het gebied vlakbij het plangebied, aan de Zuidkil, een uitgebreid onderzoek gedaan naar de aanwezigheid van heikikker. Hierbij ging het om stukjes extensief beheerde weiden, die geschikter waren voor heikikker dan het huidige plangebied. Er zijn toen na vijf avonden zoeken geen heikikkers aangetroffen, en is geconcludeerd dat er geen heikikkers aanwezig zijn binnen dit plangebied.



Figuur 10: Op heikikker onderzochte percelen in 2015, met rood omlijnd



Figuur 11: Op heikikker onderzochte percelen in 2015 (rode ster) en 2017 (blauwe ster)

Het plangebied 2017 betreft weliswaar een sloot met een stukje weide op veengrond, maar na oplevering van de quickscan flora en fauna (mei 2017) gebleken dat dit stukje weide regelmatig wordt gemaaid, wat niet gunstig is voor de heikikker. Het plangebied is daarnaast onderdeel van een volkstuintje, wat regelmatig bewerkt en bemest wordt, en deels bestaat uit een regelmatig kort gemaaid grasveld. Heikikker geeft de voorkeur aan extensief beheerde kruidenrijke graslanden (www.ravon.nl; Kennisdocument BIJ12 heikikker). Daarvan is hier bij nader inzien absoluut geen sprake. Het plangebied biedt slechts in zeer geringe mate geschikt habitat voor de heikikker.

Het plangebied ligt binnen de bebouwde kom, in een stukje stedelijk gebied deel wat voor het grootste deel omringd is met bebouwing. Het gaat hier om een oppervlak van bij benadering 200 m² grasveld wat verdwijnt. De heikikker leeft in netwerkpopulaties. (Kennisdocument BIJ12, heikikker) Een dermate klein, relatief geïsoleerd gebiedje is niet groot genoeg om een levensvatbare populatie heikikkers te laten voortbestaan.

Achteraf gezien is het niet aannemelijk dat binnen het de heikikker voorkomt binnen het plangebied. Hierdoor heeft er naast het veldbezoek ten behoeve van de quickscan, waarbij eveneens systematisch gezocht naar juveniele heikikkers, een extra veldbezoek plaatsgevonden op 29 juli 2017. Het terrein is tijdens beide veldbezoeken intensief onderzocht op de aanwezigheid van juveniele exemplaren van heikikker, door systematisch de oevers, het achterliggende grasland en de stenen- en takkenhopen af te zoeken en

baansgewijs het plangebied te onderzoeken op aanwezigheid van heikikkers en andere amfibieën. Daarnaast zijn de bouwsels grondig geïnspecteerd.

Tabel 1: Bezoek i.v.m. heikikker inventarisatie

Datum	Type onderzoek	Tijdsduur onderzoek	Zon op/ onder	Weer	Temp.
20-05-2017	Inspectie plangebied, Zichtwaarnemingen landhabitat en oevers bij daglicht	07.30-09.30	05.37-21.35	Wind gemiddeld 2 Bft Half bewolkt Neerslag 1,2 mm	12.5°C
29-07-2017	Inspectie plangebied, Zichtwaarnemingen landhabitat en oevers bij daglicht	09.30–12.30	05.58/ 21.34	Wind gemiddeld 3 Bft Geheel bewolkt Neerslag 7,6 mm	18.2°C

3.2 Grote modderkruiper

Voor het inventariseren van de grote modderkruiper is gebruik gemaakt van de aanwijzingen uit de soortenstandaard Grote modderkruiper *Misgurnus fossilis*, 2.0 (2014) en het kennisdocument Grote modderkruiper *Misgurnus fossilis*, 1.0, BIJ12, juli 2017. Bovenstaande informatiebronnen bieden verschillende mogelijkheden om de Grote modderkruiper aan te tonen of uit te sluiten, eDNA onderzoek is een van de mogelijke voorgeschreven mogelijkheden.

Voor de Grote modder is een eDNA-onderzoek uitgevoerd. De bemonstering is uitgevoerd op 18 augustus 2017. De details van de uitvoering staan beschreven in bijlage 1, van Bochove, K. 2017. eDNA onderzoek naar grote modderkruiper, rapportnummer RA2017272, Datura, Wageningen.

4. RESULTATEN

4.1 Heikikkers

Er zijn tijdens beide veldbezoeken, net als in 2015 op de nabijgelegen meer geschikte percelen, in het geheel geen heikikkers binnen het plangebied aangetroffen. Tijdens het veldbezoek in juli 2017 zijn wel relatief veel juveniele gewone padden gevonden. Het ging hierbij om zeker 16 exemplaren. Deze gewone padden werden vooral gevonden langs de oever in de eerste meter vanaf de sloot. Vier exemplaren werden gevonden onder een houtstapel en verder nog een exemplaar in de kas.



Figuur. 12: Locaties gevonden juveniele gewone padden. Met rode sterren is aangegeven waar de concentraties gewone padjes zich zoal bevonden. Er zijn geen heikikkers of andere streng beschermde amfibieën aangetroffen.

4.2 Grote modderkruiper

De aanwezigheid van grote modderkruiper is middels eDNA onderzoek aangetoond in de bredere sloot ten westen van het plangebied, die vanaf de Zaling naar de Tiendweg Oost loopt. In de sloot die parallel loopt aan de Zaling en die tussen de Zaling en het plangebied in loopt is geen grote modderkruiper aangetroffen. Figuur 11 en tabel 2 geven de gevonden resultaten. Details zijn te vinden in bijlage 1.



Figuur 13: Locaties waar voor de eDNA test gemonsterd is. De blauwe lijn geeft aan waar geen grote modderkruiper is aangetroffen, in de sloot aangegeven met rode lijn is grote modderkruiper aangetroffen.

Tabel 2. Resultaten eDNA onderzoek

Sample nummer	Aantal positieve reacties grote modderkruiper
2925	6/12
2476	0/12

5. EFFECTENBEOORDELING

5.1 Heikikkers

Er zijn uitsluitend gewone padden aangetroffen (Wnb-andere soorten). Het gaat hierbij in alle gevallen om een soort waarvoor een provinciale vrijstelling geldt van de Provincie Zuid-Holland. Bij werkzaamheden binnen het plangebied kunnen individuen van deze algemene soort mogelijk wel worden verstoord dan wel worden gedood.

Er zijn in het geheel geen heikikkers (Wnb-hrl) aangetroffen binnen het plangebied. Hoewel het in dit geval om een kwalitatief onderzoek gaat, is het op basis van deze resultaten in combinatie met de resultaten uit 2015 en de bij nader indien minder geschikte situatie voor heikikkers ter plaatse van het plangebied, redelijkerwijs uit te sluiten dat dit gebied een essentieel leefgebied is van de zwaar beschermde heikikker.

5.2 Grote modderkruiper

Er zijn sporen van grote modderkruiper aangetroffen in de sloot langs de Zaling, waar de ontsluitingsbrug gepland is. Door de aanleg van de brug over de sloot tussen Zaling en plangebied zal de grote modderkruiper mogelijk verstoord kunnen worden. Echter door te werken volgens de Unie van Waterschappen, kan deze verstoring tot een aanvaardbaar minimum gereduceerd worden en zal de lokale populatie niet in gevaar komen.

6. TOETSING AAN DE WET NATUURBESCHERMING

6.1 Heikikker

Binnen het plangebied zijn geen vaste rust- of verblijfplaatsen voor de heikikker aanwezig. Negatieve effecten van de ingreep op de heikikker zijn om die reden uitgesloten. De ingreep zal voor wat betreft heikikker niet leiden tot een overtreding van de Wet natuurbescherming.

Voor de aangetroffen juveniele gewone padden geldt een vrijstelling vanuit de Provincie Zuid-Holland. De ingreep zal voor wat betreft gewone pad niet leiden tot overtreding van de Wet natuurbescherming. Wel geldt hiervoor de zorgplicht. Dit houdt in dat al het redelijkerwijs mogelijke gedaan dient te worden om het doden van individuen te voorkomen. Dieren moeten de gelegenheid krijgen om het werkgebied zelfstandig en veilig te kunnen verlaten. Indien noodzakelijk dienen soorten zorgvuldig te worden verplaatst naar buiten het werkgebied.

6.2 Grote modderkruiper

Door de ingreep kan de grote modderkruiper die aanwezig is in de sloot tussen Zaling en plangebied mogelijk verstoord worden. De ingreep leidt niet tot overtreding van de Wet natuurbescherming indien maatregelen getroffen worden die verstoring tegengaan. Door te werken volgens de Gedragscode van de Unie van Waterschappen kan verstoring tot een aanvaardbaar minimum worden beperkt en wordt de Wet natuurbescherming niet overtreden. De te treffen maatregelen dienen wel nog te dienen gewerkt in een ecologisch werkprotocol, gespecificeerd op de planning en werkzaamheden van de voorgenomen plannen.

7. CONCLUSIES EN ADVIES

Binnen het plangebied zijn geen vaste rust- of verblijfplaatsen voor de heikikker aanwezig. Er is geen sprake van leefgebied van de heikikker binnen dit plangebied. Binnen het plangebied is in de sloot tussen Zaling en plangebied grote modderkruiper aanwezig. Door te werken volgens de Gedragscode van de Unie van Waterschappen wordt verstoring dermate beperkt dat overtreding van de Wet natuurbescherming wordt voorkomen. Wel dient hiervoor een ecologisch werkprotocol te worden opgesteld. Daarnaast is ten aanzien van de aanwezige gewone padden de zorgplicht van toepassing.

8. BRONNEN

Kennisdocument Heikikker Rana arvalis, 1.0, BIJ12, juli 2017.

Kennisdocument Grote modderkruiper Misgurnus fosillis, 1.0, BIJ12, juli 2017.

Rijksdienst voor Ondernemend Nederland, Soortenstandaard Heikikker Rana arvalis.
Versie 2.0, december 2014

Rijksdienst voor Ondernemend Nederland, Soortenstandaard Grote modderkruiper . Ver-
sie 2.0, december 2014

www.ravon.nl

BIJLAGE

Bijlage 1:

eDNA onderzoek naar grote modderkruiper

eDNA onderzoek naar grote modderkruiper



Colofon

Titel	eDNA onderzoek naar grote modderkruiper.
Tekst, foto's en samenstelling	K. van Bochove
In opdracht van	BRO
Naam opdrachtgever	M. Koen
Rapportnummer	2017272
Datum oplevering rapport	16 november 2017
Aantal pagina's	8
Wijze van citeren	van Bochove K. 2017. eDNA onderzoek naar grote modderkruiper. Rapport RA2017272, 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	Sampling.....	4
2.2	Laboratorium analyse	4
2.3	Kwaliteitswaarborging.....	5
2.3.1	Hoe vals positieve waarnemingen voorkomen worden	5
2.3.2	Hoe vals negatieve waarnemingen voorkomen worden	6
3.	Resultaten.....	8

1. Doelstelling

Vaststellen van de aan- of afwezigheid van eDNA van grote modderkruiper (*Misgurnus fosillis*) bij de Zaling te Papendrecht in opdracht van BRO.

2. Methode

2.1 Sampling

De bemonstering is uitgevoerd door Datura op 18 augustus 2017. Er zijn 2 watersamples verzameld (zie figuur 1). Op iedere locatie is een traject van enkele honderden meters bemonsterd. Langs beide trajecten zijn 26 subsamples van 35 mL verzameld. Deze 26 subsamples zijn vermengt tot één monster. Per sample is ongeveer één liter water gefiltreerd. Het sample is in het veld gefiltreerd met behulp van een polyethersulfone filter met een porie grootte van 0,22µm. Het eDNA van grote modderkruiper blijft achter op het filter. Het filter is geconserveerd in een CTAB buffer totdat het eDNA geëxtraheerd is in het laboratorium van Datura.



Figuur 1. Bemonsterde locaties.

2.2 Laboratorium analyse

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

1. Het eDNA is geëxtraheerd door middel van een phenol chloroform DNA extractie. Gedurende de extractie lost het filter op waardoor al het DNA vrij komt. 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 geïnhibeed 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 sample toegevoegd is. Voornamelijk in zuur water, waarin veel organische deeltjes aanwezig zijn kan inhibitie optreden. In een dergelijk geval wordt een extra zuiveringsstap uitgevoerd of wordt het sample verdund. Vervolgens wordt opnieuw gekeken of de inhiberende stoffen voldoende verwijderd zijn.

3. Detectie van eDNA vindt plaats door middel van een real-time kwantitatieve PCR (qPCR). 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 eDNA van de doelsoort. Binding van de probe aan het vermenigvuldigde eDNA van de doelsoort veroorzaakt een fluorescent signaal. Dit signaal wordt gedetecteerd met behulp van een qPCR platform (CFX96 TouchTM van Bio-Rad). De qPCR detectie wordt uitgevoerd met 12 replica's. Het aantal positieve replica's is een indicatie voor de concentratie eDNA. Het is echter (vooralsnog) niet mogelijk om op basis van de concentratie van eDNA de populatiedichtheid te bepalen. De qPCR detectie wordt uitgevoerd met de TaqMan[®] Environmental Mastermix 2.0 (Life Technologies[®]). Naast het eDNA sample 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 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 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 eDNA 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 eDNA analyses. Het extraheren van de eDNA samples gebeurt in een **pre-PCR laboratorium**. Dit is een ruimte waarin uitsluitend lage concentraties DNA aanwezig zijn. Vervolgens worden hier de eDNA 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 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 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. Er dient rekening gehouden te worden met **waterverplaatsingen**. 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. Daarnaast is uit diverse validatie studies gebleken dat het eDNA in sommige gevallen niet gedetecteerd wordt, ook al is de doelsoort wel aanwezig. Maatregelen die genomen worden om vals negatieve waarnemingen te voorkomen:

1. Per sample worden **26 subsamples** verzameld. Hiermee wordt de kans vergroot dat eDNA in het sample terecht komt.
2. Een zeer gevoelige **qPCR detectie** 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 gevoeligere detectie;

3. Gebruik van een **zeer korte merker** van maximaal 100 basepaar;
4. Van iedersample 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** reactie van doelsoort DNA meegenomen in de qPCR detectie. Deze controle reactie 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 één sample is eDNA van grote modderkruiper gedetecteerd (tabel 1).

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

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

Samenvattend, de eDNA analyses zijn met succes uitgevoerd. In één sample is eDNA van grote modderkruiper aangetoond.

Tabel 1. Resultaten van eDNA analyse.

Sample nummer	Aantal positieve reacties grote modderkruiper
2925	6/12
2476	0/12

