

NOTITIE

Onderwerp	Ecologisch onderzoek
Project	Onderzoekswerkzaamheden puttenveld Rodenhuis
Opdrachtgever	Oasen N.V.
Projectcode	114633
Status	Concept 01
Datum	30 juli 2019
Referentie	114633/19-012.573
Auteur(s)	mevrouw L. Bovend'aerde

Gecontroleerd door	ir. W.B. Roosen
Goedgekeurd door	ing. M.A.W. Vermeer (b/a ir. F. de Bruijn)
Paraaf	

Bijlage(n)	eDNA analyserapport
------------	---------------------

Aan	Oasen N.V.	ir. P. Cusell
Kopie	-	

1 INLEIDING

Oasen N.V. is voornemens een gedeelte van de wincapaciteit van puttenveld Rodenhuis te verplaatsen naar een aangrenzend perceel ten noorden van het huidige puttenveld. Ter voorbereiding op de ontwerp- en uitvoeringswerkzaamheden dienen een aantal onderzoeken te worden uitgevoerd. Eén van de te onderzoeken aspecten is het effect van het voornemen op beschermde soorten in en nabij het projectgebied. In een eerdere fase van het project is reeds een ecologische quickscan [lit. 1] alsook een MER-beoordelingsnotitie [lit. 2] opgesteld. Uit deze onderzoekstappen volgde dat de aanwezigheid van de onder de Wet natuurbescherming (Wnb) beschermde soorten grote modderkruiper en de rugstreeppad in de sloten in en rondom het projectgebied niet is uit te sluiten. Indien deze soorten voorkomen binnen de grenzen van het plangebied en ze als gevolg van de werkzaamheden worden verstoord/gedood of vaste onderdelen van hun leefgebied (voortplantingsplaatsen/vaste rustplaatsen) worden aangetast/vernietigd, is sprake van een overtreding van de verboden van de Wnb en is voor het voornemen een ontheffing nodig.

Om na te gaan of de werkzaamheden voor de verplaatsing en ingebruikname van de nieuwe winputvelden ontheffingsplichtig zijn, is daarom nader soortgericht onderzoek uitgevoerd. Middels een 'environmental DNA' (eDNA) analyse is vastgesteld of grote modderkruiper en rugstreeppad aanwezig zijn in de sloten in en rondom het projectgebied. Op basis van de resultaten van deze onderzoekstap is vervolgens bepaald wat de juridische consequenties zijn van het voornemen in het kader van de Wnb.

2 RELEVANTE BEPALINGEN VAN DE WNB

De grote modderkruiper is beschermd onder bijlage A van de Wnb en valt daarmee onder het Wnb beschermingsregime van de 'andere soorten'. Voor deze soort gelden de volgende verbodsbepalingen:

- het is verboden de vaste voortplantingsplaatsen of rustplaatsen van de dieren opzettelijk te beschadigen of te vernielen;
- het is verboden de dieren opzettelijk te doden of te vangen.

De rugstreeppad betreft een Habitatrichtlijnsoort en valt onder het gelijknamige Wnb beschermingsregime. Voor deze soort gelden volgende verbodsbepalingen:

- het is verboden de voortplantingsplaatsen of rustplaatsen van de dieren te beschadigen of te vernielen;
- het is verboden de dieren opzettelijk te doden of te vangen;
- het is verboden de dieren opzettelijk te verstoren.

3 METHODE

Het soortgericht onderzoek is uitgevoerd conform het soorteninventarisatieprotocol van het Netwerk Groene Bureaus in het kader van de Wet natuurbescherming [lit .3]: de aanwezigheid van de grote modderkruiper en de rugstreeppad is bepaald middels eDNA analyse in de periode april-juli.

Het veldwerk en de lab-analyse werden uitgevoerd door het onderzoeksbureau Datura. Op 18 juli zijn twee veldmedewerkers van dit onderzoeksbureau het veld in gegaan voor de staalnames. Hierbij zijn tien oppervlaktewaterstalen genomen verspreid in het slotennetwerk binnen het projectgebied (afbeelding 3.1). De staalnamelocaties zijn in het veld bepaald en werden gekozen op basis van de habitatgeschiktheid voor grote modderkruiper en rugstreeppad. Voor alle stalen werden 28 subsamples verzameld over de aangegeven trajecten in afbeelding 3.1 en werd er 1.000 ml water gefilterd. De eDNA stalen zijn vervolgens geanalyseerd op de aanwezigheid van eDNA van grote modderkruiper en rugstreeppad. Het analyseren van een eDNA sample vond plaats in drie stappen. Eerst is het eDNA op het filter geconcentreerd en gezuiverd. Vervolgens is een controle analyse uitgevoerd om te testen of eDNA detectie in een sample eventueel geïnhibeerd wordt door storende stoffen. Tenslotte is het eDNA gedetecteerd met behulp van een real-time quantitative PCR.

Een gedetailleerde beschrijving van de methodiek van de staalname en de lab-analyse is opgenomen in het analyserapport in bijlage I.

Afbeelding 3.1 Overzicht staalnamelocaties



4 RESULTATEN

Onderstaande afbeelding toont de resultaten van de eDNA analyse. In geen van de tien stalen werden eDNA sporen van grote modderkruiper of rugstreeppad gedetecteerd. Op basis van referentie analyses is vastgesteld dat de meting correct is uitgevoerd. Gezien het bovenstaande kan worden gesteld dat beide soorten afwezig zijn in het slotennetwerk in en rond het projectgebied.

Een gedetailleerde beschrijving van de resultaten is opgenomen in het analyserapport in bijlage I.

Afbeelding 4.1 Resultaten eDNA analyse

Sample nummer	Aantal positieve reacties grote modderkruiper	Aantal positieve reacties rugstreeppad	Coördinaten
21900	0/12	0/12	51.940449, 4.812540
21901	0/12	0/12	51.937974, 4.810796
21902	0/12	0/12	51.937606, 4.808073
21903	0/12	0/12	51.938206, 4.809369
21904	0/12	0/12	51.938750, 4.811786
21905	0/12	0/12	51.938865, 4.814657
21906	0/12	0/12	51.940957, 4.819165
21907	0/12	0/12	51.940438, 4.816529
21908	0/12	0/12	51.939895, 4.818143
21909	0/12	0/12	51.940220, 4.814685

5 CONCLUSIE

Grote modderkruiper

De resultaten van het eDNA onderzoek hebben uitgewezen dat de grote modderkruiper niet voorkomt in het slotennetwerk in en rond het projectgebied. Van een aantasting/vernietiging van vaste onderdelen van het leefgebied of het doden van individuen van deze soort als gevolg van het geplande voornemen is dan ook geen sprake. Een overtreding van de verbodsbepalingen van de Wnb ten aanzien van deze soort is daarmee niet aan de orde. Vervolgstappen in het kader van de Wnb zijn niet nodig.

Rugstreeppad

Ook voor rugstreeppad geldt dat er geen eDNA sporen werden gevonden in het slotennetwerk in en rond het projectgebied. Van een aantasting of vernietiging van voortplantingsplaatsen van deze soort als gevolg van de werkzaamheden is dan ook geen sprake.

Het is echter niet uit te sluiten dat individuen van deze soort als gevolg van het voornemen worden verstoord en/of gedood. Hoewel de soort momenteel niet voorkomt binnen het projectgebied kan immers niet worden uitgesloten, dat tijdens de uitvoering van de werkzaamheden individuen van deze soort opduiken in het projectgebied. In de uitvoeringsfase van de hier beschouwde werkzaamheden wordt mogelijk tijdelijk geschikt leefgebied voor rugstreeppadden gecreëerd. Zo wordt de grond plaatselijk kaal gemaakt (open, vergraafbare bodem), kunnen ondiepe poelen in de bandensporen van de werktuigen ontstaan (voortplantingswater) en wordt werkmateriaal zoals hout en platen op het werkterrein opgeslagen (schuilplaatsen). De rugstreeppad is een zeer mobiele soort die makkelijk enkele kilometers om het huidige leefgebied kan opduiken op zoek naar dergelijke dynamische milieus. Individuele rugstreeppadden die sporadisch in het projectgebied aanwezig zijn, kunnen worden verwond of gedood wanneer zij tijdens de werkzaamheden het projectgebied betreden en bijvoorbeeld onder de machines terechtkomen. Het dient te worden voorkomen dat individuen van rugstreeppad als gevolg van de werkzaamheden worden verstoord/gedood. Hiervoor zijn er verschillende mogelijkheden:

- 1 de werkzaamheden geheel uitvoeren binnen de winterrustperiode van de rugstreeppad (eind oktober tot en met maart). In deze periode is de soort immers niet actief en is het uit te sluiten dat de soort in het plangebied gaat opduiken. Belangrijk hierbij is wel dat de werkzaamheden ook worden afgerond voordat de soort opnieuw actief wordt (voor eind maart);
- 2 indien het niet mogelijk is om de werkzaamheden binnen de winterrustperiode van de rugstreeppad af te ronden, dienen volgende bijkomende maatregelen te worden genomen om te voorkomen dat de soort het gebied gaat betreden:
 - het zoveel mogelijk voorkomen dat geschikte biotopen voor de soort ontstaan in het plangebied: voorkom het ontstaan van bv. diepe bandensporen of andere regenplasjes (voortplantingsplaats), opstapeling van materiaal (schuilplaatsen), et cetera;
 - én het plaatsen van paddenschermen (plastic scherm met hoogte van 50 cm boven grond en 10 cm onder grond) rond de meest kansrijke locaties voor het opduiken van de rugstreeppad (zoals ondiepe poelen en plassen, opgestapeld materiaal, zandophoping, et cetera) om te voorkomen dat rugstreeppadden het projectgebied kunnen bereiken. En het plaatsen van emmers aan de binnenzijde van het paddenscherm om eventuele rugstreeppadden die binnen de begrenzing van de werkzaamheden aanwezig zijn op te vangen en te verplaatsen naar de andere kant van het scherm; kort houden (maaien) van vegetatie binnen een strook van één meter rond het scherm om te voorkomen dat amfibieën via de vegetatie het plangebied binnen komen.

6 LITERATUUR

- 1 Witteveen+Bos (2016). Vergunningentraject wijziging winning - Natuurtoets wijziging grondwaterwinning Rodenhuis, Definitieve versie, referentie GD251-1/16-007.259, in opdracht van Oasen N.V.
- 2 Witteveen+Bos (2017). Vergunningentraject wijziging winning - MER-beoordelingsnotitie, definitieve versie, referentie GD251-1/17-001.632, in opdracht van Oasen N.V.
- 3 Netwerk groen Bureaus (2017). Soortinventarisatieprotocollen in het kader van de Wet Natuurbescherming, versie juli 2017.



BIJLAGE: EDNA ANALYSERAPPORT

eDNA onderzoek naar grote modderkruiper en rugstreeppad



Colofon

Titel	eDNA onderzoek naar grote modderkruiper en rugstreeppad
Tekst, foto's en samenstelling	K. van Bochove en J. Rook
In opdracht van	Witteveen & Bos
Naam opdrachtgever	Lisa Bovend'aerde
Projectnummer extern	114633/19-008.343
Rapportnummer	RA2019028
Datum oplevering rapport	23 juli 2019
Aantal pagina's	8
Wijze van citeren	van Bochove K. 2019. eDNA onderzoek naar grote modderkruiper en rugstreeppad. Rapport RA2019028, Datura, Wageningen.
Laboratorium analist	S. Kroes en J. Rook



Datura Molecular Solutions BV

Gevestigd te:

Agro Business Park 10
6708 PW, Wageningen
Nederland

jitske.rook@datura.nl
0031(0)628022473
www.datura.nl

Inhoudsopgave

1.	Doelstelling.....	4
2.	Methode.....	4
2.1	Sampling	4
2.2	Laboratorium analyse	6
2.3	Kwaliteitswaarborging	7
2.3.1	Hoe vals positieve waarnemingen voorkomen worden	7
2.3.2.	Hoe vals negatieve waarnemingen voorkomen worden	8
3.	Resultaten	9

1. Doelstelling

Vaststellen van de aan- of afwezigheid van eDNA van grote modderkruiper (*Misgurnus fossilis*) en rugstreeppad (*Epidalea calamita*) in opdracht van Wittenveen & Bos.

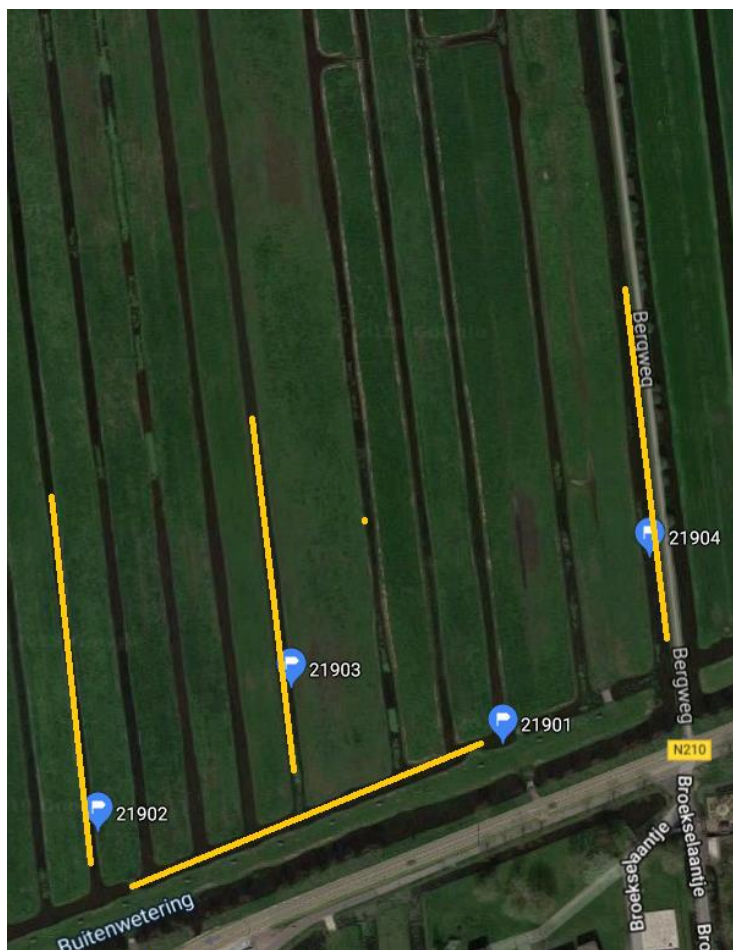
2. Methode

2.1 Sampling

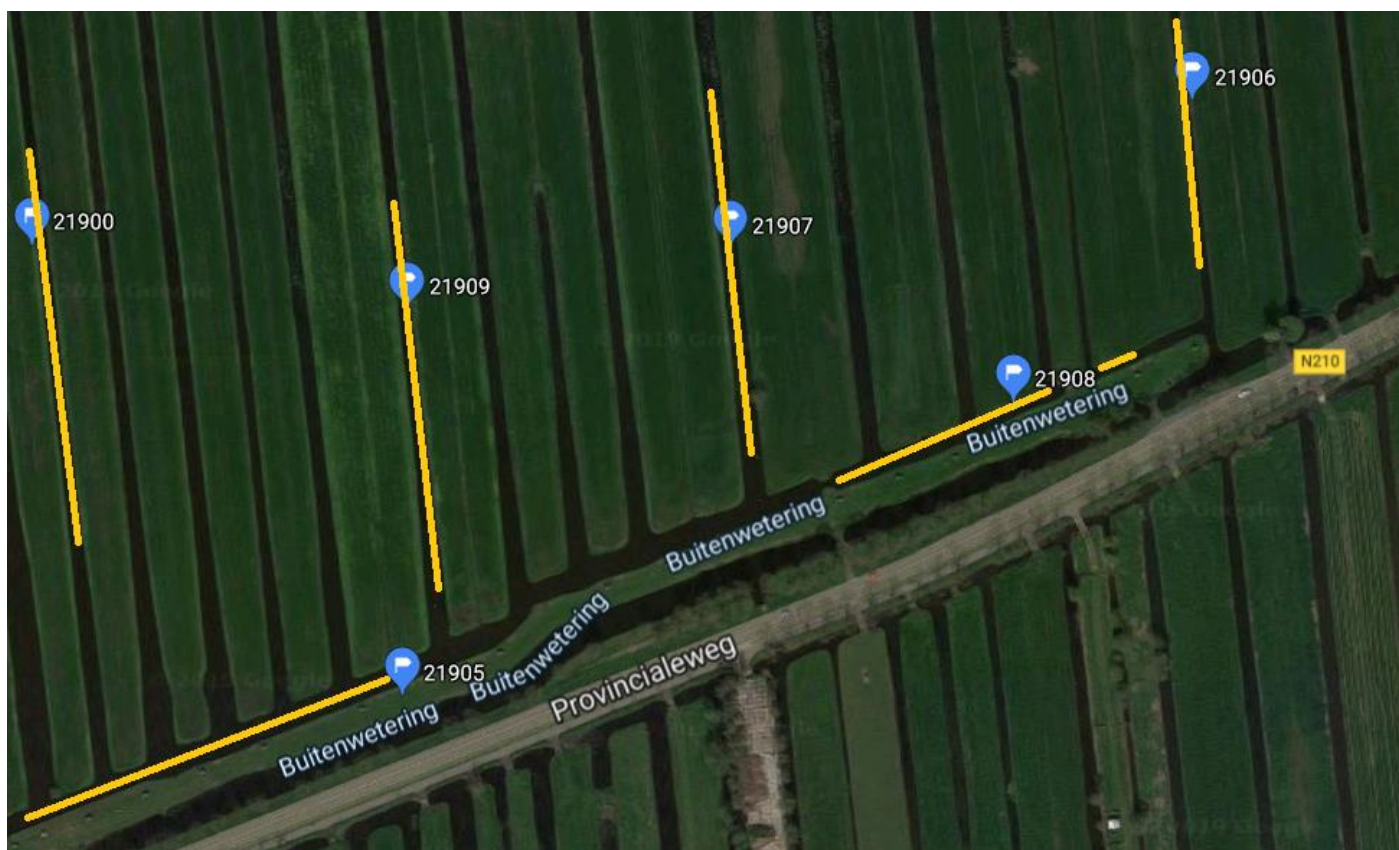
De bemonsteringen zijn uitgevoerd door Jitske Rook en Robbert van Himbeeck van Datura Molecular Solutions BV. op 18 juni 2019. Voor project PR2019028 zijn 10 watermonsters genomen (figuur 1, 2 en 3). Voor alle samples werden 28 subsamples verzameld over aangegeven trajecten en werd er 1000 ml water gefilterd. De met blauw aangegeven watermonsters worden verder uitgewerkt in rapportage RA2019071.



Figuur 1, overzicht monsterlocaties PR2019028 en PR2019071.



Figuur 2, samplelocaties voor 4 samples PR2019028



Figuur 3, samplelocaties voor 6 samples PR2019028

2.2 Laboratorium analyse

De eDNA samples zijn geanalyseerd op de aanwezigheid van eDNA van grote modderkruiper en rugstreeppad. 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 geïnhibeerd 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 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 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 Touch™ 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.

Hoe het optreden vals positieve waarnemingen voorkomen wordt door degelijk 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) vissoorten;

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 **eDNA 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 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 het eDNA laboratorium. Ook mogen medewerkers van Datura niet dezelfde dag van een post-PCR laboratorium terug naar de DNA clean room en het eDNA 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 optreedt.

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 **28 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 gevoeliger detectie;
3. Gebruik van een **zeer korte merker** van maximaal 100 basepaar;
4. Van ieder sample wordt **vastgesteld of de qPCR detectie geïnhibeeerd** 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 geen van de samples is eDNA van grote modderkruiper of rugstreeppad aangetoond (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. De Cq-waarde van de interne controles waar een sample aan toegevoegd is ten opzichte van de reacties waar geen sample aan toegevoegd is, waren gelijk. Er was in dit geval dan ook geen sprake van inhibitie.

Samenvattend, de eDNA analyses zijn met succes uitgevoerd. Er is geen eDNA van grote modderkruiper of rugstreeppad aangetoond.

Tabel 1. Resultaten van eDNA analyse.

Sample nummer	Aantal positieve reacties grote modderkruiper	Aantal positieve reacties rugstreeppad	Coördinaten
21900	0/12	0/12	51.940449, 4.812540
21901	0/12	0/12	51.937974, 4.810796
21902	0/12	0/12	51.937606, 4.808073
21903	0/12	0/12	51.938206, 4.809369
21904	0/12	0/12	51.938750, 4.811786
21905	0/12	0/12	51.938865, 4.814657
21906	0/12	0/12	51.940957, 4.819165
21907	0/12	0/12	51.940438, 4.816529
21908	0/12	0/12	51.939895, 4.818143
21909	0/12	0/12	51.940220, 4.814685