

eDNA onderzoek Krimpenerwaard Oudeland – Kamsalamander en waterspitsmuis



Colofon

Titel	eDNA onderzoek Krimpenerwaard Oudeland – Kamsalamander en waterspitsmuis
Tekst, foto's en samenstelling	Suzan Roemaat, Erwin Roze
In opdracht van	Arcadis Nederland B.V.
Naam opdrachtgever	Anouk de Koning
Rapportnummer	RA22177
Datum opstelling	6-10-2022
Aantal pagina's	9
Contactpersoon vanuit Datura	Suzan Roemaat
Wijze van citeren	Roemaat, S., Roze, E. (2022) eDNA onderzoek Krimpenerwaard Oudeland – Kamsalamander en waterspitsmuis. Rapport RA22177, Datura Molecular Solutions BV, Wageningen



Datura Molecular Solutions BV

Gevestigd te:
Agro Bussiness Park 10
6708 PW Wageningen
Nederland

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

Inhoudsopgave

1. Doelstelling	3
2. Methode	3
2.1 Bemonstering	3
2.2 Laboratoriumanalyse	5
2.3 Kwaliteitsborging	6
2.3.1 Hoe fout positieve waarnemingen worden voorkomen	6
2.3.2 Hoe fout negatieve waarnemingen worden voorkomen (qPCR)	7
3. Resultaten	8

1. Doelstelling

De doelstelling van dit onderzoek was het aantonen van de aan- of afwezigheid van kamsalamander (*Triturus cristatus*) en waterspitsmuis (*Neomys fodiens*) aan de hand van eDNA onderzoek. Dit onderzoek is uitgevoerd in opdracht van Arcadis Nederland B.V..

2. Methode

2.1 Bemonstering

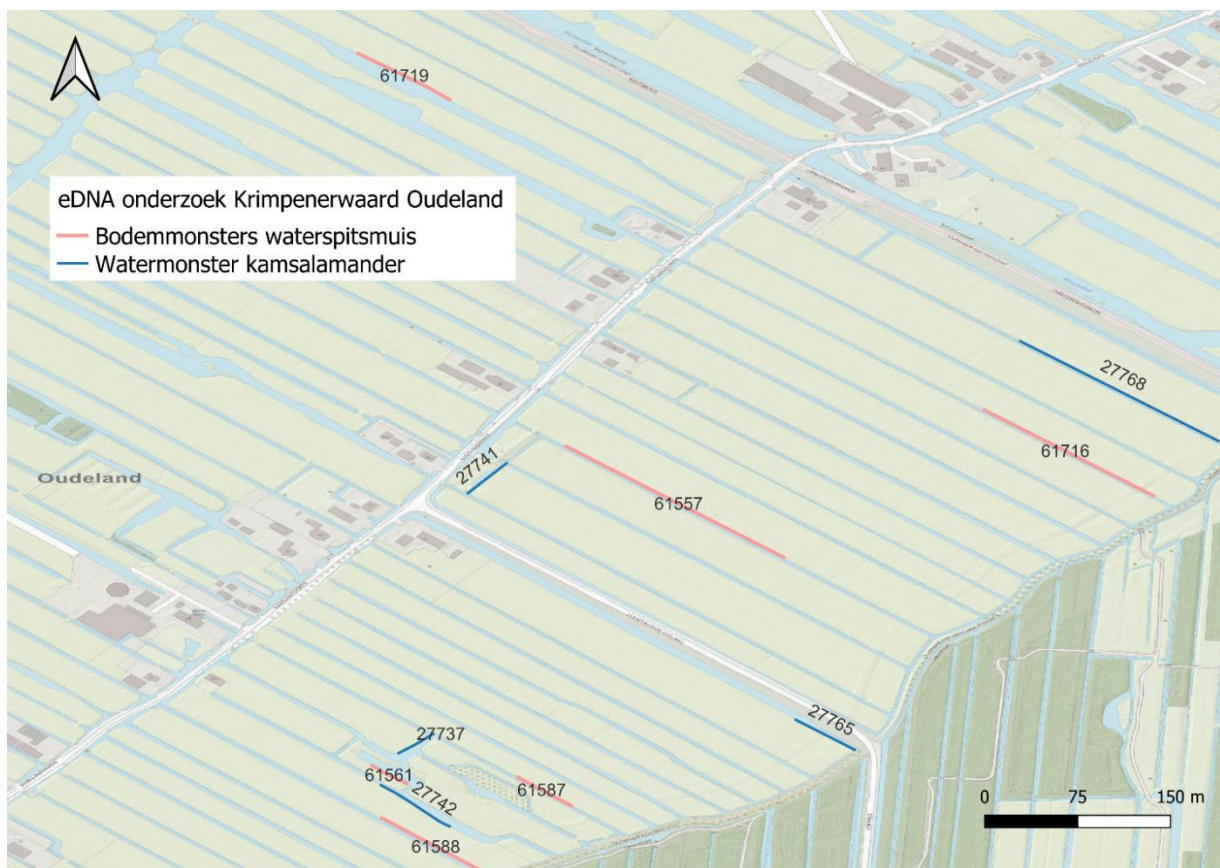
De bemonstering is uitgevoerd door medewerkers van Datura Molecular Solutions B.V. volgens gestandaardiseerde protocollen (opvraagbaar). In totaal zijn er 10 watermonsters en 9 bodemmonsters verzameld en aangeleverd aan het laboratorium van Datura (Tabel 1a en 1b). De bemonstering is uitgevoerd op 1 september 2022. Zie figuur 1a en 1b voor de exacte bemonsteringslocaties.

Tabel 1a: informatie watermonsters, doelsoort kamsalamander

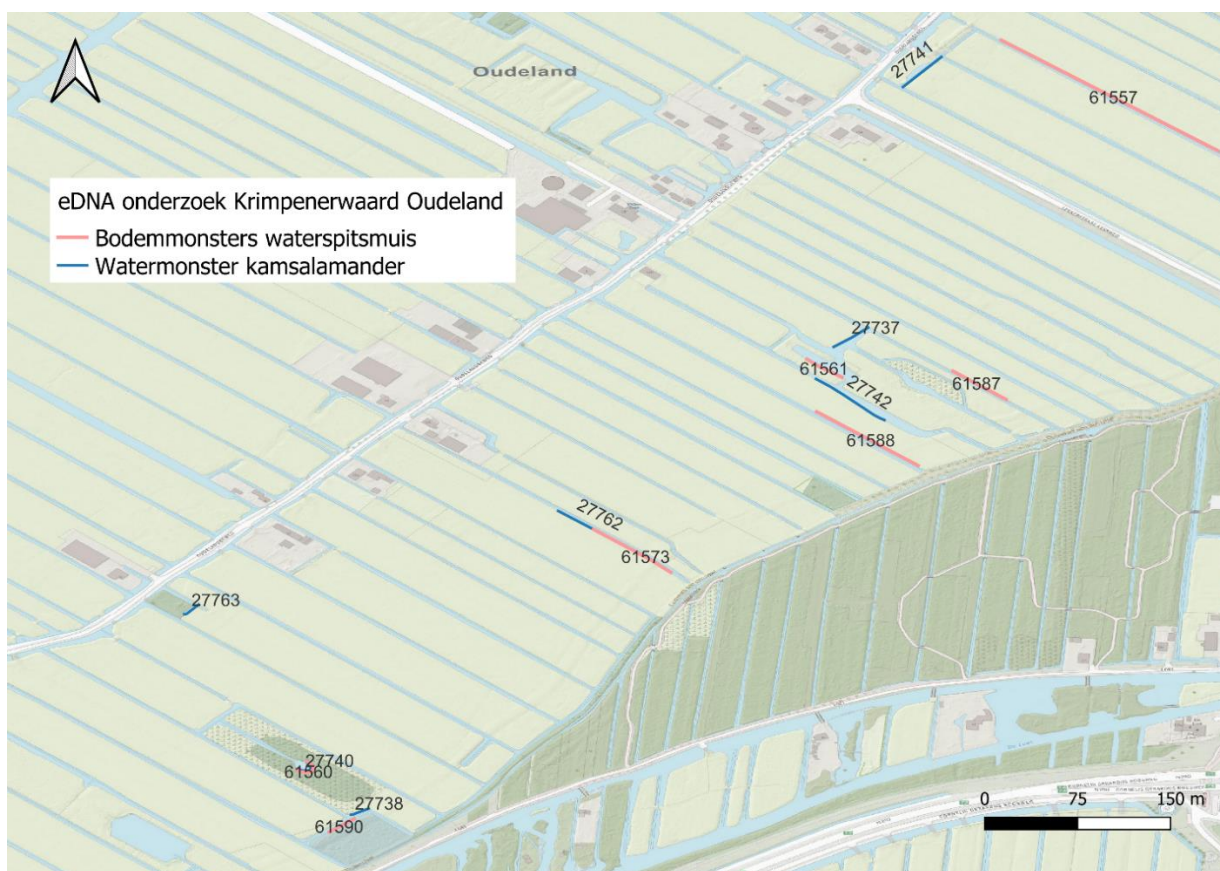
Monsternummer	Volume (ml)
27741	1050
27768	1000
27737	1100
27763	1000
27740	650
27738	900
27765	1000
27742	900
27762	1000
27747	1000

Tabel 1b: bodemmonsters, doelsoort waterspitsmuis

Monsternummer
61719
61716
61587
61590
61560
61588
61561
61557
61573



Figuur 1a: locaties water- en bodemonsters eDNA onderzoek Krimpenerwaard Oudeland (midden- en NO-deel)



Figuur 1b: locaties water- en bodemonsters eDNA onderzoek Krimpenerwaard Oudeland (midden- en ZW-deel)

2.2 Laboratoriumanalyse

De watermonsters zijn getest op de aanwezigheid van eDNA van kamsalamander. De bodemonsters zijn getest op de aanwezigheid van eDNA van waterspitsmuis. 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 geïnhibeerd 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 geïnhibeerd 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 geïnhibeerd 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 Kwaliteitsborging

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 de watermonsters is geen eDNA van kamsalamander gedetecteerd. Er is in één van de negen bodemmonsters eDNA van waterspitsmuis gedetecteerd, dit betreft monsternummer 61560. Een overzicht van de resultaten van dit onderzoek wordt weergegeven in Tabel 2a en 2b.

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 werd naar verwachting wel geamplificeerd. Dit geeft aan dat de analyse juist is uitgevoerd.

Tabel 2a: Resultaten van de qPCR analyses van de water- en bodemmonsters met 12 replica's

Monsternummer	Resultaat qPCR kamsalamander
27741	0/12
27768	0/12
27737	0/12
27763	0/12
27740	0/12
27738	0/12
27765	0/12
27742	0/12
27762	0/12
27747	0/12

Tabel 2b: Resultaten van de qPCR analyses van de water- en bodemmonsters met 12 replica's

Monsternummer	Resultaat qPCR waterspitsmuis
61719	0/12
61716	0/12
61587	0/12
61590	0/12
61560	1/12
61588	0/12
61561	0/12
61557	0/12
61573	0/12