

Notitie

BURO SRO

T.a.v. dhr. H. van Arendonk

't Goylaan 11

3525 AA Utrecht

BLOM ECOLOGIE B.V.
ADVIES & ONDERZOEK

Zandweg 46

4181 PM Waardenburg

t 0418 820 288

e info@blomecologie.nl

i www.blomecologie.nl

KvK 67221904

BTW 856882999B01

IBAN NL21RABO0314240683

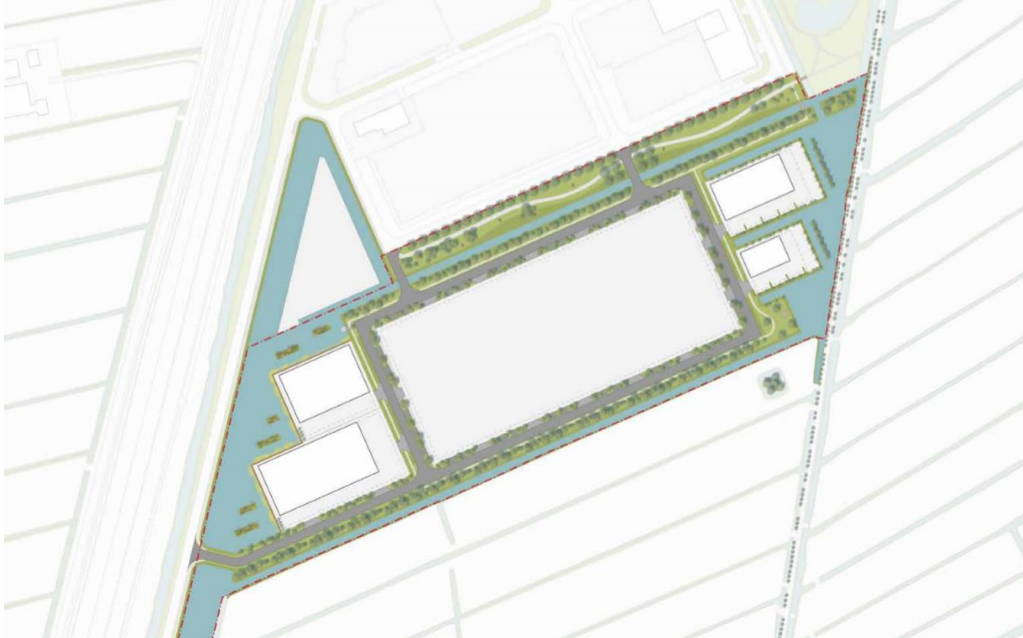
Datum	1 oktober 2019
Kenmerk	BE/2019/453/n
Onderwerp	eDNA onderzoek Grote modderkruiper, heikikker en rugstreeppad aan de Energieweg ong. te Meerkerk
Auteur(s)	ir. ing. K.J. Rebergen
Collegiale toets	ir. T.W.D. Schrader

Ten behoeve van de uitbreiding van het bedrijventerrein Meerkerk-zuid in zuidelijke richting zal verharding worden aangelegd. In het kader van de ontwikkeling worden een aantal sloten gedempt worden. De aanwezigheid van grote modderkruiper, heikikker en rugstreeppad kon niet worden uitgesloten bij de quickscan flora en fauna (Soethout, 2019). Door het dempen van de sloot, kunnen er mogelijk negatieve effecten (sterfte, afname leefgebied en verstoring) ten aanzien van grote modderkruiper, heikikker en rugstreeppad optreden.

De grote modderkruiper, heikikker en rugstreeppad hebben een wettelijke beschermde status onder de Wet natuurbescherming (§ 3.2. Beschermingsregime soorten Habitatrichtlijn). Ingrepen in het leefgebied zijn niet zonder meer toegestaan. Buro SRO begeleidt de ruimtelijke procedure en heeft Blom Ecologie B.V. verzocht om de aan- dan wel afwezigheid van grote modderkruiper, heikikker en rugstreeppad op het plangebied aan te tonen.



Figuur 1 De planlocatie (rood kader) is gelegen naast de Energieweg ong. te Meerkerk (bron kaart: arcgis.com).

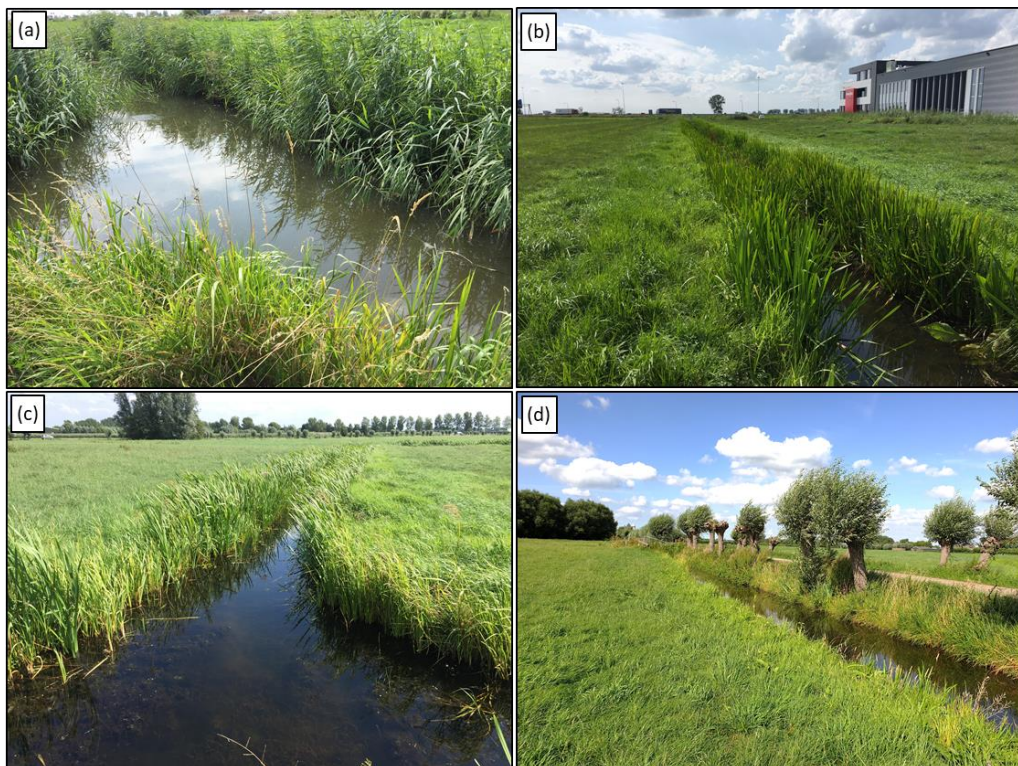


Figuur 2 De situatieschets.

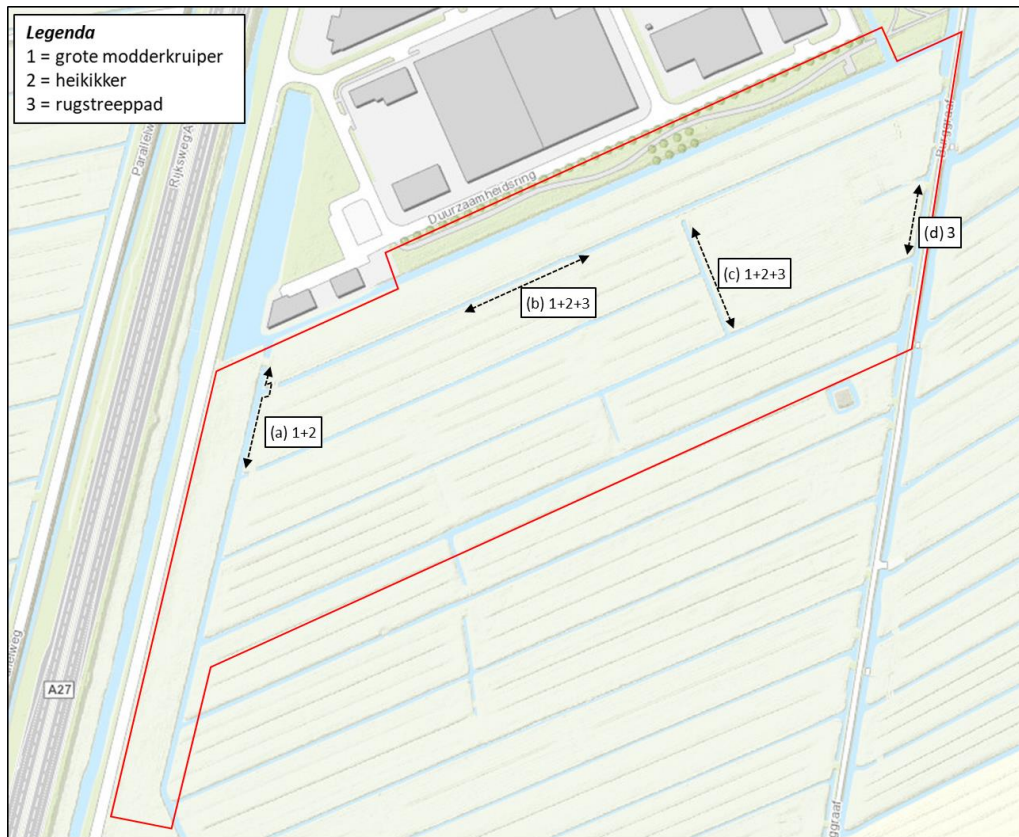
Environmental DNA (eDNA)

Deze methode is gebaseerd op het achterhalen van stukken DNA via feces, urine en huidcellen. Door het unieke oplossende vermogen van water worden deze stukjes DNA verspreid over een groot oppervlak. Door watermonsters te verzamelen en te analyseren op de aanwezigheid van DNA kan het voorkomen van een doelsoort worden aangetoond.

Op 8 augustus 2019 is het veldbezoek betreft het verzamelen van mogelijk eDNA uitgevoerd. Hierbij zijn trajecten van tussen de 50-100 m gelopen, waarbij elke 2,5 - 5 meter een subsample werd genomen. In totaal zijn 9 van zulke trajecten uitgevoerd (zie figuur 2). Hierbij geldt dat voor elke soort 3 samples zijn genomen.



Figuur 3 Fotografische indruk van de planlocatie. Deze sloten zijn bemonsterd op aanwezigheid van grote modderkruiper, heikikker en rugstreeppad.



Figuur 4 De onderzochte trajecten op eDNA grote modderkruiper, heikikker en rugstreeppad. De nummers corresponderen met de onderzochte soort. In totaal zijn 9 trajecten (3 voor elke soort onderzocht).

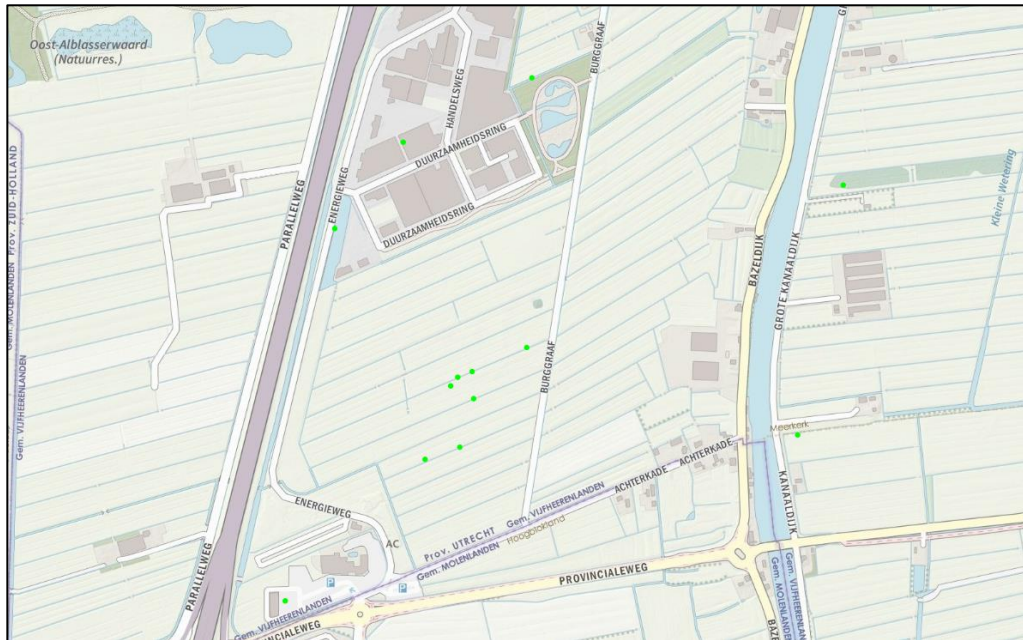
De samples zijn vervolgens door *Datura; molecule solutions in ecology* (rapportage is als bijlage bijgevoegd) geanalyseerd. Resultaat gaf aan dat in geen van de samples sporen van eDNA van de doelsoorten grote modderkruiper, heikikker en rugstreeppad is aangetoond.

Interpretatie en conclusie

De resultaten van de eDNA tonen aan dat de grote modderkruiper, heikikker en rugstreeppad in geen van de watergangen binnen het plangebied en in de directe omgeving voorkomen. De watergangen leken in eerste instantie geschikt voor deze soorten. De resultaten wijzen echter op de afwezigheid van de soorten.

- (i) Ten aanzien van grote modderkruiper: De dichtstbijzijnde waarneming van de grote modderkruiper is gelegen op een afstand van 3,3 km (NDFP 2009-2019). Ondanks de aanwezigheid van zeer geschikt leefgebied binnen het plangebied, is de afstand van een bekende populatie en het plangebied aannemelijk te groot om voor de soort het plangebied te koloniseren. Mogelijk geldt hierbij dat er een populatie aanwezig is op de plek van het waargenomen individu en dat het habitat voldoende is voor het aantal individuen binnen de populatie. Er is hierbij geen noodzaak om op zoek te gaan naar nieuw leefgebied.
- (ii) Ten aanzien van de heikikker: grenzend ten noordoosten van de planlocatie ligt een eiland met meerdere vennetjes gesitueerd. In deze vennetjes is het voorkomen van de heikikker bekend. Alhoewel de watergangen binnen het plangebied potentieel geschikt zijn voor heikikker, blijken ze strikt gebonden te zijn aan deze vennetjes.
- (iii) Ten aanzien van rugstreeppad: in de directe omgeving zijn een aantal waarnemingen van de soort bekend (zie tevens figuur 5). De waarnemingen zijn vrijwel allemaal uit 2018. Gezien de samples in triplo zijn uitgevoerd en de locatie op verschillende plekken bemonsterd is, kan er vanuit gegaan worden dat de onderzoeksinspanning voldoende is geweest. Aannemelijk bevindt er zich een populatie rugstreeppad ten zuiden van het

plangebied en heeft de populatie voldoende aan deze watergangen. Mogelijk zijn de planlocatie of de tussenliggende gebieden minder geschikt voor rugstreeppadden. Dit kan komen door een variatie aan factoren, o.a. foerageermogelijkheden, predatiedruk of voortplantingswater kan invloed hebben.



Figuur 5 De waargenomen rugstreeppad in de afgelopen 10 jaar (NDF 2009-2019). De resultaten zijn voor intern gebruik en mogen onder geen beding gepubliceerd worden.

Het dempen van een aantal sloten aan de Energieweg ong. te Meerkerk leidt momenteel niet tot het ongeschikt raken van functioneel leefgebied van de grote modderkruiper, heikikker en rugstreeppad, gezien deze soorten niet voorkomen binnen het plangebied. In de directe omgeving (noordoosten) is een kleine (sub)populatie bekend van de heikikker. Deze populatie zal behouden blijven door de beoogde ontwikkeling. Negatieve effecten ten aanzien van de voren genoemde soorten zijn uitgesloten. De beoogde ontwikkelingen leiden derhalve niet tot overtreding van de Wet natuurbescherming.

Wij hopen u met deze notitie voldoende te hebben geïnformeerd. Mochten er vragen zijn kunt u vrijblijvend contact opnemen.

Met vriendelijke groet,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'K.J. Rebergen', with a large, stylized loop at the end.

Blom Ecologie B.V.,
K.J. Rebergen

ZANDWEG 46A - 4181 PM WAARDENBURG

Niets uit deze rapportage mag zonder schriftelijke toestemming van de opdrachtgever en Blom Ecologie B.V. worden gebruikt door derden. Onder gebruik worden alle vormen van kopie, openbaarmaking en elke andere toepassing begrepen. Deze rapportage mag alleen gebruikt worden voor het doel waarvoor het is samengesteld.

Blom Ecologie B.V. is niet aansprakelijk voor schade die voortkomt uit toepassing van de resultaten van werkzaamheden en/of gegevens verkregen van Blom Ecologie B.V.

eDNA onderzoek naar grote modderkruiper, heikikker en rugstreeppad



Colofon

Titel	eDNA onderzoek naar grote modderkruiper, heikikker en rugstreeppad
Tekst, foto's en samenstelling	K. van Bochove en J. Rook
In opdracht van	Blom Ecologie
Naam opdrachtgever	Kelly Rebergen
Rapportnummer	RA2019065
Datum oplevering rapport	30 september 2019
Aantal pagina's	7
Wijze van citeren	van Bochove K. 2019. eDNA onderzoek naar grote modderkruiper, heikikker en rugstreeppad. Rapport RA2019065, Datura, Wageningen.
Laboratorium analist	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	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	7

1. Doelstelling

Vaststellen van de aan- of afwezigheid van eDNA van grote modderkruiper (*Misgurnus fossilis*), heikikker (*Rana arvalis*) en rugstreeppad (*Epidalea calamita*) in opdracht van Blom Ecologie.

2. Methode

2.1 Sampling

De bemonstering is uitgevoerd door een medewerker van Blom Ecologie.

2.2 Laboratorium analyse

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

1. Het eDNA is geconcentreerd in een pellet door het watermonster te centrifugeren. Vervolgens is het eDNA 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 geïnhibereerd 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 geïnhibereerd 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 **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 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 **waterververplaatsingen**. 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 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 geen van de samples is eDNA van de doelsoorten 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, rugstreeppad of heikikker aangetoond.

Tabel 1. Resultaten van eDNA analyse.

Sample nummer	Getest op	Aantal positieve reacties doelsoort
22031	Rugstreeppad	0/12
22032	Grote modderkruiper	0/12
22033	Grote modderkruiper	0/12
22034	Rugstreeppad	0/12
22035	Heikikker	0/12
22036	Grote modderkruiper	0/12
22037	Rugstreeppad	0/12
22038	Heikikker	0/12
22039	Heikikker	0/12