

2022

# Vervolgonderzoek Hagenbeek



5.1.2e

Ecologisch Adviesbureau Schröder  
14-11-2022

Rapportnummer 2214

# Vervolgonderzoek Hagenbeek

Inventarisatie van boomkikker, grote modderkruiper, kamsalamander,  
poelkikker en waterspitsmuis

Rapportnummer 2214

5.1.2e

14 november 2022

## Opdrachtgever:

Aveco de Bondt  
Postbus 64  
7450 AB Holten



## Ecologisch Adviesbureau Schröder

Droppersweg 1  
7108 BL Winterswijk-Woold  
Tel: 0543-564336  
E-mail: [ecoadvies@planet.nl](mailto:ecoadvies@planet.nl)  
l: [www.ecologischadviesbureauschroder.nl](http://www.ecologischadviesbureauschroder.nl)

## Colofon

© 2022 Ecologisch Adviesbureau Schröder, Winterswijk-Woold

<i>Tekst en samenstelling:</i>	5.1.2e (Ecologisch Adviesbureau Schröder).
<i>Status rapportage</i>	Definitief.
<i>In opdracht van:</i>	Aveco de Bondt.
<i>Contactpersonen:</i>	5.1.2e en 5.1.2e
<i>Veldwerk:</i>	5.1.2e en 5.1.2e
<i>Foto's omslag en rapport:</i>	5.1.2e
<i>Rechten:</i>	De inhoud van dit rapport (in het geheel of in delen) mag, behoudens Aveco de Bondt en Staatsbosbeheer, zonder schriftelijke toestemming van Ecologisch Adviesbureau Schröder, niet door fotokopie, druk of andere middelen worden gereproduceerd.
<i>Bronvermelding:</i>	Citaten uit dit rapport zijn toegestaan met volledige bronvermelding: Schröder, 2022. Vervolgonderzoek Hagenbeek.
<i>Wijze van citeren:</i>	5.1.2e 2022. Vervolgonderzoek Hagenbeek. Rapport 2214-Ecologisch Adviesbureau Schröder, Winterswijk-Woold.

Ecologisch Adviesbureau Schröder is aangesloten bij het Samenwerkingsverband Ecologie

## Inhoud

<b>1. Inleiding</b>	<b>3</b>
<b>2. Onderzoek</b>	<b>5</b>
2.1 Methode	5
2.2 Resultaten	7
<b>3. Wettelijke consequenties</b>	<b>8</b>
<b>4. Literatuur</b>	<b>9</b>
<b>Bijlagen</b>	<b>10</b>



# 1. Inleiding

## Aanleiding en probleemstelling (bron: Schröder, 2022)

Het natuurgebied Hagenbeek, in beheer door Staatsbosbeheer, is in 2008 ingericht tot een forse eenheid natte schraallanden. De totale oppervlakte van dit gebied is ordergrootte 50 hectare. De natuurontwikkeling hier mag één van de grotere successen van het natuurbeleid in de Achterhoek genoemd worden. Het natuurgebied wordt omringd door landbouwgronden waar in de droge jaren 2018, 2019 en 2020 sprake was van droogteschade. De agrariërs hebben het waterschap gevraagd om ten tijde van droogte de stuwpeilen te verhogen en voor de toekomst klimaatrobuste maatregelen te treffen voor het gebied.

In de periode 2006-2013 heeft het waterschap een GGOR-studie uitgevoerd. In deze studie is met een grondwatermodel gekeken naar het gewenste grond en oppervlaktewaterregime (GGOR) per functie. Zo is er ook aandacht besteed aan natuurgebied Hagenbeek en het omliggende landbouwgebied. Uit de studie blijkt dat de kwaliteit en duurzaamheid van het gebied verbeterd kunnen worden door watergangen rondom Hagenbeek te verondiepen c.q. hoger te stuw. Hierdoor zal de grondwaterinvoer (kwel) toenemen waardoor verzuring van de natuur wordt voorkomen, maar zorgt tevens voor een hogere grondwaterstand en grotere grondwatervoorraad voor het direct aangrenzende landbouwgebied ten tijde van droogte. Om het project te bewerkstelligen zijn er in de Samenwerkingsovereenkomst (SOK 2022-2027) door de provincie Gelderland met het waterschap afspraken gemaakt over de verdere uitwerking van de doorgerekende maatregelen.

Uit de uitgevoerde hydro-ecologische studie (LESA) blijkt dat de natuurwaarden ter plaatse kunnen worden verbeterd door het zure regenwater versneld af te voeren terwijl de schone kwelstromen van grondwater juist moeten toenemen. Dit kan door sloten en greppels te dempen of te verondiepen in combinatie met het verhogen van peilen in omliggende watergangen. Op sommige plekken in het aangrenzende landbouwgebied wordt natschade verwacht. Deze is te mitigeren o.a. door ophoging van het maaiveld. Op andere plekken is de peilverhoging juist gunstig om verdroging tegen te gaan en dus niet op te hogen. Dit vraagt om een bredere gebiedsaanpak.

In de afgelopen jaren is in totaal 12 hectare extra beschikbaar gekomen voor nieuwe natuurontwikkeling. Dit maakt ook onderdeel uit van de te nemen maatregelen. De benodigde gronden zijn reeds door de provincie verworven en zijn obstakelvrij (Egging, 2022).

In figuur 1 is de globale ligging van het plangebied opgenomen. In de uitsnede is de exacte gebiedsbegrenzing te zien.

De conclusie van deze quickscan was dat er vervolgonderzoek diende te worden uitgevoerd naar boomkikker, grote modderkruiper, kamsalamander, poelkikker en waterspitsmuis.

Daarom heeft Ecologisch Adviesbureau Schröder (EAS) in 2022 in opdracht van AdB een dergelijke vervolgonderzoek uitgevoerd (Schröder, 2022). Op deze wijze is het mogelijk om de eventuele negatieve effecten op flora en fauna (Wnb) en het NNN in kaart te brengen. Dit rapport beschrijft de bevindingen van het uitgevoerde onderzoek en de consequenties daarvan voor het project.

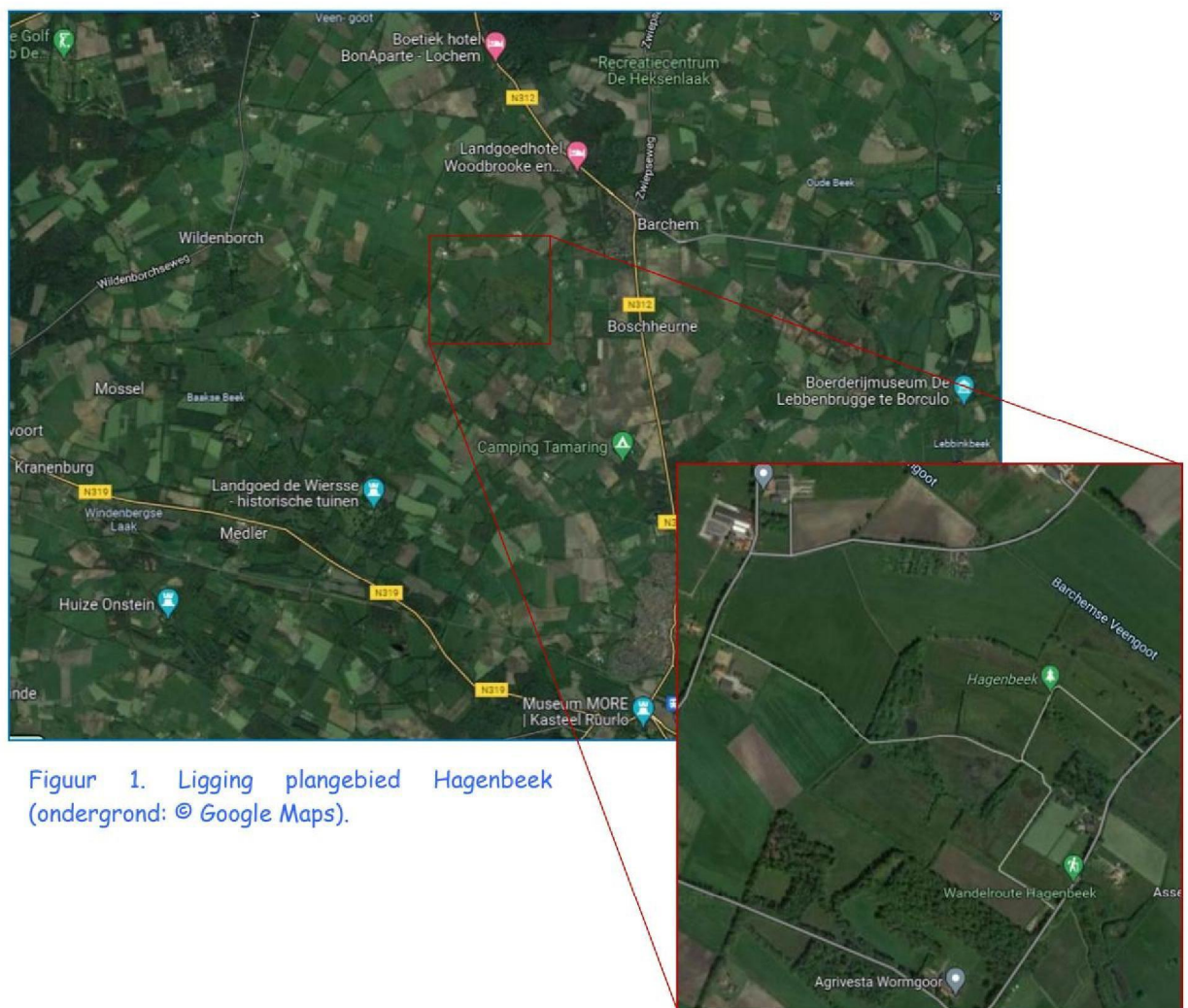
## Onderzoeksvragen

Het rapport geeft antwoord op de volgende hoofdvragen:

1. Soortbescherming en -beleid
  - a. Zijn er boomkijkers, grote modderkruipers, kamsalamanders, poelkijkers en/of waterspitsmuizen aanwezig in de te dempen watergangen in het plangebied?
2. Vergunning/ontheffing
  - a. Dienen er vergunningen of ontheffingen te worden aangevraagd in het kader van de Nederlandse natuurwetgeving of het provinciale natuurbeleid?

## Leeswijzer

De onderzoeksmethode en de -resultaten worden in hoofdstuk 2 besproken, terwijl in hoofdstuk 3 de wettelijke consequenties aan de orde komen.



Figuur 1. Ligging plangebied Hagenbeek (ondergrond: © Google Maps).



## 2. Onderzoek

### 2.1 Methode

Hieronder volgt een toelichting per soortgroep.

#### Amfibieën

Er is onderzoek uitgevoerd naar de volgende soorten:

1. Boomkikker
2. Kamsalamander
3. Poelkikker

#### Ad 1. Boomkikker

Ten tijde van het uitvoeren van het vervolgonderzoek (18 juli 2022) is de koorvorming onder boomkikkers niet of nauwelijks meer aan de orde. Daarom is voor dit vervolgonderzoek ingezet op eDNA-onderzoek. Dit is een gecombineerd amfibieënonderzoek op basis van eDNA metabarcoding. Er zijn 2 locaties potentieel geschikt voor de boomkikker.



Figuur 2. Mobiele vacuümpomp voor het verzamelen van samples t.b.v. het eDNA-metabarcoding onderzoek in plangebied Hagenbeek.

#### Ad 2. Kamsalamander

De onderzoekopzet is globaal gebaseerd op het kennisdocument Kamsalamander van BIJ12 (versie 1.0 - juli 2017).

In juli is met een schepnet gezocht naar larven. Hiertoe zijn 9 oppervlaktewateren potentieel geschikt. Om de trefkans te vergroten, worden in 2 van de 9 wateren samples verzameld ten behoeve van eDNA-onderzoek. Dit is een gecombineerd amfibieënonderzoek op basis van eDNA metabarcoding. In deze 2 wateren is er vanwege de dichte begroeiing een lage trefkans in relatie tot het scheppen naar larven.



### Ad 3. Poelkikker

De onderzoekopzet is globaal beschouwd gebaseerd op het kennisdocument Poelkikker van BIJ12 (versie 1.0 - juli 2017).

Tijdens de quickscan is al geluisterd naar kwakende mannen. In juli is nogmaals gelet op koorvorming en zijn tevens groene kikkers gevangen en tot op de soort gedetermineerd op basis van uiterlijke kenmerken. Hierbij zijn de vorm van de graafknobbel, al dan niet gevlekte buik en de kleur van de kwaakblazen cruciaal. Hiertoe zijn 13 oppervlaktewateren potentieel geschikt. Om de trefkans te vergroten, was gepland om in 2 van de 13 wateren samples te verzamelen ten behoeve van eDNA-onderzoek. Dit is een gecombineerd amfibieënonderzoek op basis van eDNA metabarcoding.

Op de dag dat de samples zijn verzameld waren de meeste oppervlaktewateren (m.n. watergangen) echter (grotendeels) opgedroogd. In bijlage 1 is daarvan een impressie opgenomen. Door deze droogte konden minder samples worden verzameld.

In figuur 3 is een overzicht opgenomen van de locaties waar nog wel samples van amfibieën konden worden genomen.

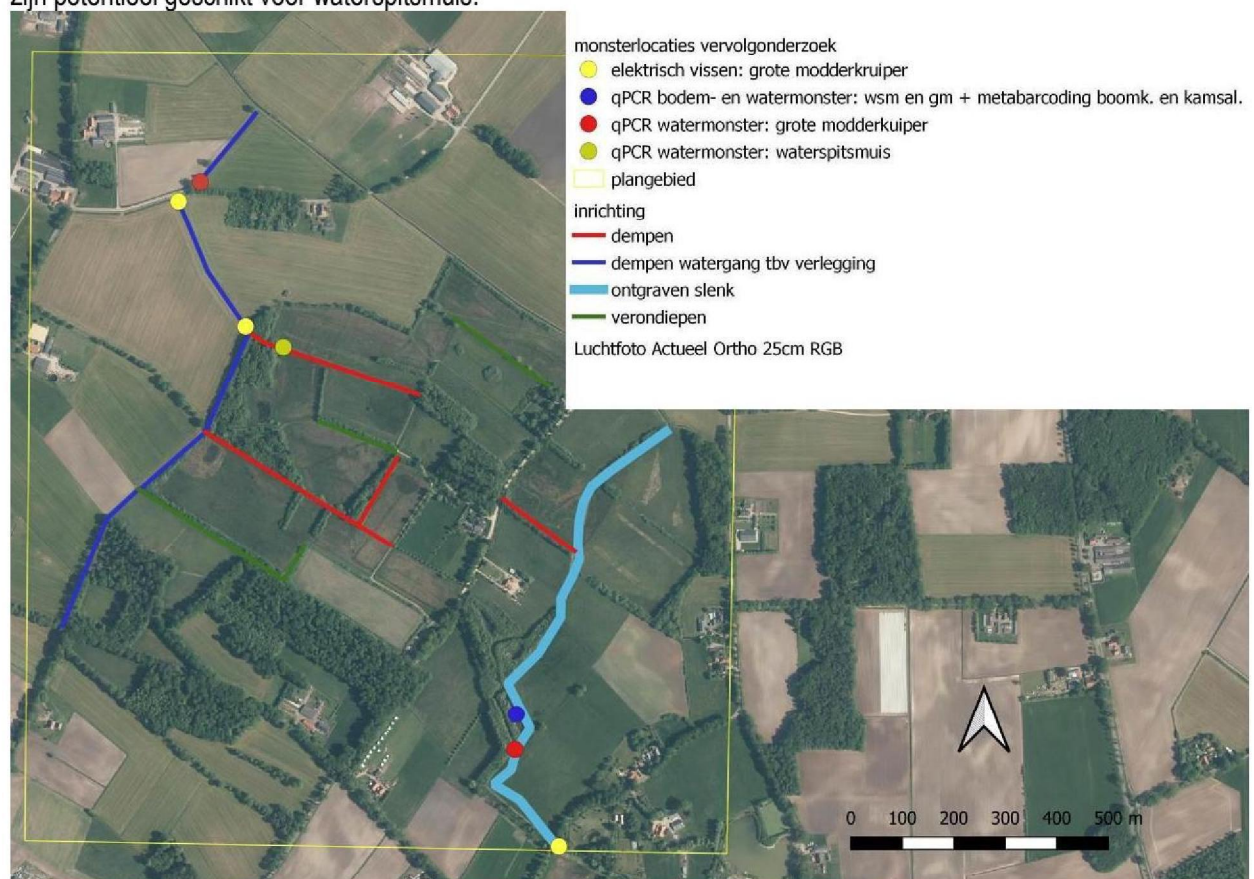
### Grondgebonden zoogdieren

De inventarisatie is gericht op de mogelijke aanwezigheid van de volgende soort:

1. Waterspitsmuis

### Ad 1. Waterspitsmuis

Waterspitsmuizen zijn moeilijk aan te tonen door middel van veldonderzoek (life-traps, cameravallen, e.d.). Daarom is gebruik gemaakt van onderzoek door middel van eDNA (qPCR eDNA bodemonmonster). Dit geeft weliswaar geen informatie over de aantallen in plangebied Hagenbeek, maar wel over de aan- of afwezigheid. Eén sloot en één poel zijn potentieel geschikt voor waterspitsmuis.



Figuur 3. Ligging monsterlocaties vervolgonderzoek plangebied Hagenbeek (ondergrond: © PDOK).



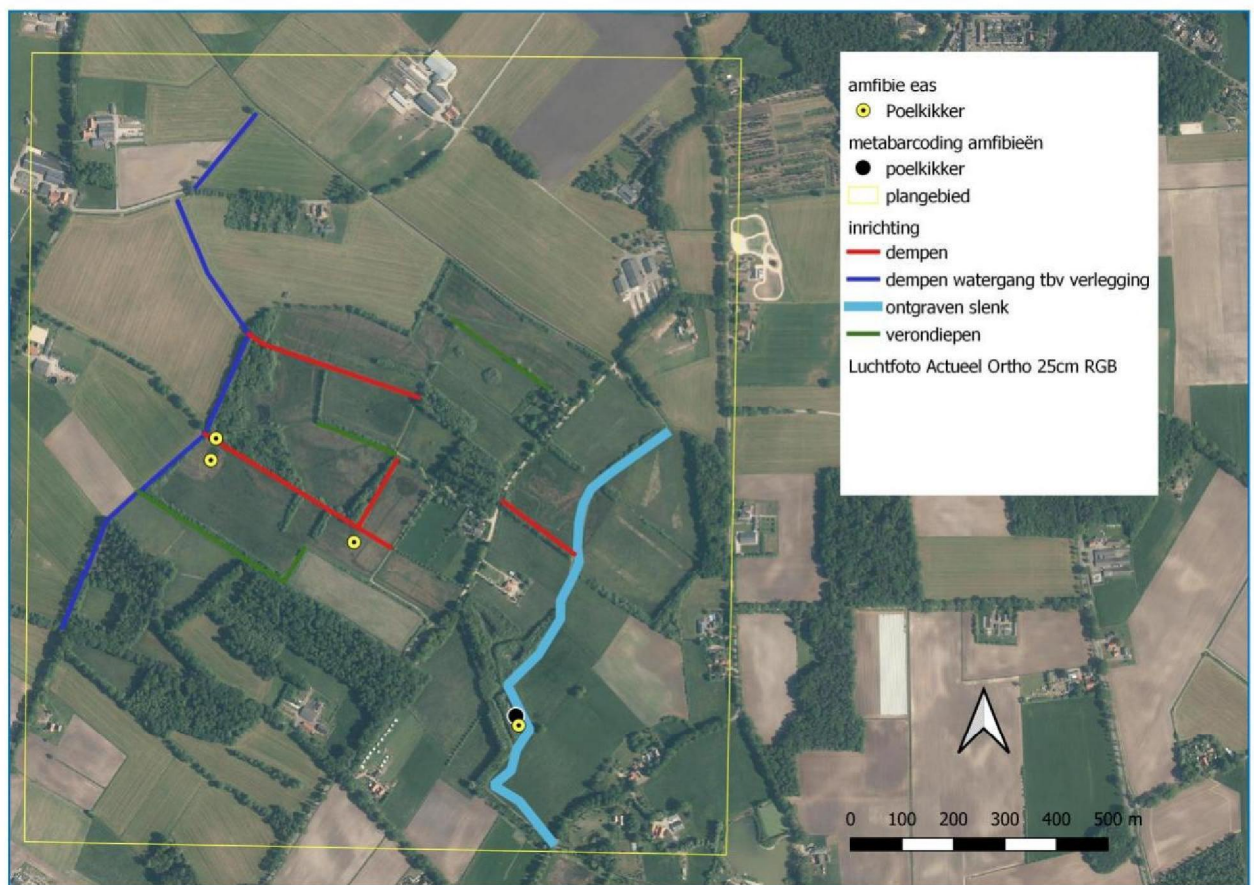
## Vissen

Met betrekking tot de vissen is er slechts 1 wettelijk beschermde soort die in het plangebied is te verwachten: grote modderkruiper (art. 3.10 Wnb). Deze soort is het beste door een combinatie van eDNA en electrovisserij vast te stellen. Daartoe konden watersamples verzameld worden van in totaal slechts 3 wateren. Deze sloten stonden voor het overgrote deel droog. De samples zijn daarom in de laatste restanten water verzameld. Daarnaast zijn meerdere (laatste waterhoudende delen van) sloten elektrisch afgevisd. Vanwege de veiligheid (Arbowet) is met 2 personen gevist.

## 2.2 Resultaten

Er is geen eDNA van grote modderkruiper of waterspitsmuis gedetecteerd in respectievelijk de water- en bodemonsters die zijn geanalyseerd middels een qPCR analyse.

Wel werden poelkikker en gewone pad middels metabarcoding gedetecteerd op monsterlocatie 25816. In figuur 4 is de verspreiding van poelkikker van metabarcoding en het quickscan natuuronderzoek (Schröder, 2022) opgenomen.



Figuur 4. Locaties poelkikkers, vastgesteld tijdens de quickscan (Schröder, 2022) en middels eDNA-metabarcoding in plangebied Hagenbeek (ondergrond: © PDOK).

Boomkikkers en kamsalamanders zijn met behulp van het eDNA-onderzoek niet aangetoond op de onderzochte locaties van figuur 3.

In bijlage 2 zijn de resultaten van de eDNA-analyses opgenomen.

### 3. Wettelijke consequenties

In het plangebied Hagenbeek zijn geen boomkikkers, grote modderkruipers, kamsalamanders en waterspitsmuizen vastgesteld in de oppervlaktewateren waar werkzaamheden gepland zijn. Zij vormt daarom in het kader van de Wet natuurbescherming (Wnb) geen belemmering.

Wel zijn op 2 locaties poelkikkers vastgesteld door het quickscan natuuronderzoek en het eDNA-onderzoek. Eén van de vindplaatsen betreft een te dempen sloot. De ander is een rietpoel nabij een watergang. Door deze rietpoel wordt een slenk aangelegd.

Omdat poelkikkers beschermd zijn middels artikel 3.5 van de Wnb dient voor deze soort een ontheffing aangevraagd te worden.

#### CONCLUSIE

De wettelijke consequenties ten aanzien van de Wet natuurbescherming is de volgende:

- Door het aanvullende onderzoek zijn geen boomkikkers, grote modderkruipers, kamsalamanders en waterspitsmuizen in het plangebied Hagenbeek vastgesteld. Daarom vormen deze juridisch zwaar beschermde soorten geen belemmering voor de door geplande werkzaamheden.
- Door de aanwezigheid van poelkikkers (art. 3.5. Wnb) dient voor de geplande ruimtelijke ontwikkelingen (dempen sloot en aanleg slenk) een ontheffing aangevraagd te worden .

## 4. Literatuur

Egging, C.A.T., 2022. Programma van Eisen 'Adviesdiensten klimaatrobuuste inrichting Hagenbeek'. Waterschap Rijn en IJssel, Doetinchem

Schröder, R.J.H., 2022. Quicksan natuuronderzoek Hagenbeek. Rapport 2207-Ecologisch Adviesbureau Schröder, Winterswijk-Woold.



## Bijlagen

1. Impressie van de monsterlocaties
2. eDNA-onderzoek

























eDNA onderzoek waterspitsmuis,  
grote modderkruiper en amfibieën



In opdracht van Ecologisch Adviesbureau Schröder



## Colofon

Titel	eDNA onderzoek waterspitsmuis, grote modderkruiper en amfibieën
Tekst, foto's en samenstelling	5.1.2e
In opdracht van	Ecologisch Adviesbureau Schröder
Naam opdrachtgever	5.1.2e
Rapportnummer	RA22150
Datum opstelling	15-9-2022
Aantal pagina's	12
Contactpersoon vanuit Datura	5.1.2e
Wijze van citeren	5.1.2e 2022. eDNA onderzoek waterspitsmuis, grote modderkruiper en amfibieën Rapport RA22150, 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  
5.1.2e @datura.nl

In opdracht van Ecologisch Adviesbureau Schröder

## Inhoudsopgave

1. Doelstelling .....	3
2. Methode .....	3
2.1 Bemonstering .....	3
2.2 Laboratoriumanalyse qPCR.....	4
2.3 Kwaliteitswaarborging qPCR.....	5
2.3.1 Hoe fout positieve waarnemingen worden voorkomen .....	5
2.3.2 Hoe fout negatieve waarnemingen worden voorkomen (qPCR).....	6
2.4 Laboratorium analyse metabarcoding.....	7
2.5 Data-analyse metabarcoding.....	8
4. Resultaten .....	10
4.1 Resultaten qPCR .....	10
4.2 Resultaten metabarcoding .....	11

## 1. Doelstelling

De doelstelling van dit onderzoek was om de aan- of afwezigheid van waterspitsmuis (*Neomys fodiens*), grote modderkruiper (*Misgurnus fossilis*), boomkikker (*Hyla arborea*) en kamsalamander (*Triturus cristatus*) aan te tonen aan de hand van eDNA onderzoek. Dit onderzoek is uitgevoerd in opdracht van Ecologisch Adviesbureau Schröder.

## 2. Methode

### 2.1 Bemonstering

De bemonstering is uitgevoerd door een medewerker van Ecologisch Adviesbureau Schröder volgens gestandaardiseerde protocollen van Datura (opvraagbaar). In totaal zijn er 3 watermonsters en 2 bodemonsters verzameld en aangeleverd aan het laboratorium van Datura (Tabel 1).

Tabel 1: informatie water en bodemonsters verzameld op 18-7-2022.

Monsternummer	Type	Doelsoort	Coördinaten
61337	qPCR bodemonster	Waterspitsmuis	225.886-459.442
61338	qPCR bodemonster	Waterspitsmuis	226.343-458.732
25800	qPCR watermonster	Grote modderkruiper	225.726-459.760
25817	qPCR watermonster	Grote modderkruiper	226.341-458.664
25816	qPCR watermonster	Grote modderkruiper	226.343-458.732
25816	Metabarcoding watermonster	Boomkikker, kamsalamander	226.343-458.732

## 2.2 Laboratoriumanalyse qPCR

De watermonsters zijn getest op de aanwezigheid van eDNA van grote modderkruiper. 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 geïnhibeeerd 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<sup>®</sup> 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 geïnhibeeerd 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 geïnhibeeerd 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<sup>™</sup> 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<sup>®</sup> Environmental Mastermix 2.0 (Life Technologies<sup>®</sup>). 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.

eDNA onderzoek waterspitsmuis, grote modderkruiper en amfibieën | 4



## 2.3 Kwaliteitswaarborging qPCR

### 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

eDNA onderzoek waterspitsmuil, grote modderkruiper en amfibieën | 5

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 (zogenaaamde 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.

eDNA onderzoek waterspitsmuis, grote modderkruiper en amfibieën | 6

#### 2.4 Laboratorium analyse metabarcoding

Het watermonster 25816 is geanalyseerd op de aanwezigheid van eDNA van amfibieën, met als doelsoort boomkikker en kamsalamander. Om de amfibieën te identificeren wordt gebruik gemaakt van het mitochondriale DNA. Het analyseren van een dergelijk eDNA-monster vindt plaats in een aantal stappen. Eerst wordt het DNA uit een monster geconcentreerd en gezuiverd. Vervolgens wordt DNA geamplificeerd (vermeerderd) met behulp van PCR. De PCR-fragmenten zijn gezuiverd en een DNA *library* is voorbereid. De *library* is gesequenced met behulp van Next Generation Sequencing (Novaseq 6000).

##### Analyse stappen:

1. Het DNA is uit het watermonster geëxtraheerd. Storende stoffen zoals humuszuren kunnen detectie van het eDNA inhiberen wat kan leiden tot fout negatief resultaat. Gedurende de DNA-extractie zijn deze inhiberende stoffen zo veel mogelijk verwijderd. De DNA-extractie is uitgevoerd middels een phenol-chloroform extractie.
2. Het DNA is geamplificeerd middels een PCR waarbij gebruik gemaakt is van een primerset (12S) die zeer efficiënt het DNA van amfibieën amplificeert. De primers bevatten ieder een unieke tag (7 nucleotiden). Gedurende de bioinformatica analyse kunnen de *reads* (gegenereerde sequenties) aan de hand van deze tags toegewezen worden aan het juiste monster. De PCR is uitgevoerd in 12 replica's met behulp van de TaqMan® Environmental Mastermix 2.0 (Life Technologies®). De PCR-producten van deze 12 replica's zijn vervolgens samengevoegd.
3. Door middel van gel-elektroforese is vastgesteld of de PCR geresulteerd heeft in PCR-producten van de juiste lengte. Met behulp van een tweede PCR zijn Illumina Nextera XT adaptors aan de PCR-producten gezet. Vervolgens zijn de PCR-producten samengevoegd. De pool van PCR-producten van verschillende samples is gezuiverd. Deze pool van PCR-producten vormen de zogenaamde DNA *library* die gebruikt wordt om het DNA te sequencen.
4. De PCR-producten zijn gesequenced met behulp van Next Generation Sequencing (Illumina Novaseq 6000 platform, 150 bp paired-end). Hierbij worden miljoenen sequenties (zogenaamde *reads*) van het DNA uitgelezen. In deze stap wordt het fysieke DNA in het buisje dus vertaald in digitale *reads*.

eDNA onderzoek waterspitsmuis, grote modderkruiper en amfibieën | 7



## 2.5 Data-analyse metabarcoding

Eerst is een standaard verwerking van Illumina paired-end data uitgevoerd. Deze omvat de volgende stappen:

1. FASTQ sequence files zijn gegenereerd met behulp van de Illumina RTA3.4.4 en Bcl2fastq v2.20 pipeline.
2. Een eerste kwaliteitscheck is uitgevoerd door middel van Illumina Chastity filtering.
3. Vervolgens zijn *reads* welke PhiX controle bevatten verwijderd.
4. (Restanten van) de sequencing adapters zijn uit de *reads* geknipt.
5. De kwaliteit van de overgebleven *reads* is getest met de FastQC tool.

Vervolgens zijn de sequenties geanalyseerd met behulp van softwarepakket Obitoools. Deze pipeline resulteert uiteindelijk in een tabel waarin voor elk sample aangegeven is hoeveel *reads* er van elke soort gedetecteerd zijn. Omdat er behoorlijke rekenkracht nodig is voor het verwerken van de sequentiedata wordt een workstation gebruikt die beschikt over 40-core processoren met hyper-threading en 512 Gb Ram-geheugen. De volgende stappen zijn doorlopen:

1. **Illuminapairedend**: genereren van een consensus sequentie op basis van de *forward* en *reverse read*.
2. **Obigrep**: sequenties die niet *aligned* werden zijn verwijderd.
3. **NGSfilter**: op basis van de gebruikte primers en de tags die toegevoegd zijn in de eerste stappen zijn alle sequenties toegewezen aan het corresponderende sample.
4. **Obiuniq**: om de dataset die nu nog bestaat uit miljoenen *reads* hanteerbaarder te maken zijn alle identieke sequenties binnen een sample samengevoegd.
5. **Obigrep**: bepaalde sequenties zijn verwijderd omdat dit sequencing fouten betreffen.
6. **Obiuniq**: alle sequenties (ook van de verschillende monsters) worden samengevoegd.
7. **Ecotag**: sequenties worden vergeleken met de referentie database (*matching*). Deze database is opgebouwd uit referentiemonsters die verzameld zijn door Datura, aangevuld met DNA-sequenties afkomstig van museumvouchers.
8. **Obidean**: sequencing-fouten en PCR-fouten worden als zodanig gelabeld. In de basis wordt elke waarneming het label 'singleton' (=op zichzelf staand) meegegeven. Sequentie A wordt vervolgens als 'internal' (=fout) aangemerkt als sequentie A slechts beperkt afwijkt van sequentie B, en als sequentie A aanzienlijk minder voorkomt dan sequentie B. Sequentie B wordt vervolgens aangemerkt als 'head' (=correcte sequentie).

eDNA onderzoek waterspitsmuis, grote modderkruiper en amfibieën | 8

Obiclean is vier maal uitgevoerd, met de volgende instellingen:

1.  $r=0,05$  en  $d=1$
2.  $r=0,005$  en  $d=2$
3.  $r=0,001$  en  $d=3$
4.  $r=0,0005$  en  $d=4$

Hierbij staat 'r' voor het percentage dat sequentie A maximaal mag voorkomen ten opzichte van B. En 'd' staat voor het aantal verschillen tussen sequentie A en B.

9. **Obitab:** tenslotte zijn de resultaten geëxporteerd naar een .tab file.

Het vervolg van de pipeline is geprogrammeerd in Python waarin de .tab files worden samengevoegd met als resultaat de voorkomende taxa per monster.

## 4. Resultaten

### 4.1 Resultaten qPCR

Er is geen eDNA van grote modderkruiper of waterspitsmuis gedetecteerd in de water- en bodemonsters die zijn geanalyseerd middels een qPCR analyse (Tabel 2).

De analyse van het watermonster is uitgevoerd met behulp van 12 replica's. 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 '1/2' of '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 '1/2' of '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 2: Resultaten van de qPCR analyses van de watermonsters met 12 replica's.

Monsternummer	Type	Resultaat qPCR waterspitsmuis	Resultaat qPCR grote modderkruiper
61337	bodemmonster	0/12	-
61338	bodemmonster	0/12	-
25800	watermonster	-	0/12
25817	watermonster	-	0/12
25816	watermonster	-	0/12

## 4.2 Resultaten metabarcoding

In totaal zijn er 2 soorten amfibieën gedetecteerd middels een metabarcoding analyse. Er is eDNA van poelkikker en gewone pad gedetecteerd. Er is geen eDNA van de doelsoorten boomkikker en kamsalamander gedetecteerd.

Tabel 3 geeft een overzicht van het aantal moleculen per liter gevonden eDNA van de amfibiesoorten. Deze aantallen moleculen geven voor elk monster weer hoeveel moleculen van het aangetroffen amfibieën DNA afkomstig was van een betreffende soort per liter. Indien de waarde "0" is, betekent dit dat er geen DNA van de betreffende soort in het monster is aangetroffen. Het aantal moleculen dient gelezen te worden als een globale indicatie voor de concentratie. Dat betekent dat 79235 moleculen geïnterpreteerd mag worden als  $7,9 \cdot 10^4$ . Omwille van de leesbaarheid wordt het exacte aantal moleculen zoals gemeten weergegeven. In theorie is het mogelijk dat in de PCR het DNA van de ene soort efficiënter vermeerderd wordt dan het DNA van een andere soort. Als gevolg daarvan kunnen er 'afwijkingen' ontstaan binnen een monster. Uit onze ervaring blijkt echter dat deze afwijking doorgaans niet groot is en dus bij relatief grote verschillen (bijv. soort A 6000 en soort B 1000 moleculen per liter) is het aannemelijk dat van soort A meer DNA aanwezig was in het monster dan van soort B. Indien de verschillen klein zijn (bijv. soort A 100 en soort B 200), is het advies om voorzichtiger te zijn met conclusies over de relatieve hoeveelheden aangetroffen DNA. De gemeten eDNA concentraties zijn op dit moment nog niet te relateren aan absolute aantallen van de doelsoorten of biomassa.

Tabel 3: Resultaten metabarcoding amfibieën: moleculen per liter gevonden eDNA per amfibiesoort.

Soort	Nederlandse naam	Monster 25816
<i>Pelophylax lessonae</i>	Poelkikker	2091
<i>Bufo bufo</i>	Gewone pad	257

[Ecologisch Adviesbureau](#)  
[Schröder](#)

Droppersweg 1  
7108 BL Winterswijk-Woold

Tel: 5.1.2e

E-mail : [ecoadvies@planet.nl](mailto:ecoadvies@planet.nl)

Internet:

[www.ecologischadviesbureauschroder.nl](http://www.ecologischadviesbureauschroder.nl)