

Nader ecologisch onderzoek waterspitsmuis

Plas Molenweg te Berkel

Rapportnummer: 20181402/rap01
Status rapport: versie 1
Datum rapport: 8 maart 2019

Auteur: I.L.Y. (Igor) Spierts
Projectleider: E. (Esther) Schiedon
Kwaliteitscontrole: E. (Esther) Schiedon

Opdrachtgever: Iv-Infra b.v.
T.a.v. mevrouw E. Simoons
Trapezium 322
3664 DL Sliedrecht

Dit rapport is digitaal gegenereerd en derhalve niet voorzien van een handtekening. De inhoud van de rapportage is aantoonbaar gecontroleerd en vrijgegeven.

INHOUDSOPGAVE

1 INLEIDING	1
1.1 Aanleiding en doelstelling	1
1.2 Leeswijzer	1
2 PROJECTLOCATIE	2
2.1 Huidige situatie	2
2.2 Toekomstige situatie	4
3 METHODE	5
4 RESULTATEN	7
5 CONCLUSIES	8

Bijlagen

Bijlage 1: eDNA bodem samplingprotocol waterspitsmuis

Bijlage 2: eDNA filter water samplingprotocol

Bijlage 3: Rapport Datura: eDNA onderzoek naar waterspitsmuis



1 INLEIDING

1.1 Aanleiding en doelstelling

Het Hoogheemraadschap van Delfland is voornemens om bij de plas aan de Molenweg te Berkel een zogenaamde Natte Ecologische Zone aan te leggen.

Om te bepalen of de voorgenomen plannen (mogelijk) leiden tot een overtreding van de vigerende natuurwetgeving, is op de locatie reeds een quickscan Wet natuurbescherming uitgevoerd waarin de aanwezigheid van de waterspitsmuis niet kon worden uitgesloten (Mulder, J., 2018: Quickscan Natte Ecologische Zone plas Molenweg Berkel. Ecologisch Adviesbureau Mulder, Beemte Broekland).

Daarmee heeft de voorgenomen aanleg van de Natte Ecologische Zone mogelijk negatieve effecten op (leefgebied van) deze Wnb-beschermde soort.

Het is daarom noodzakelijk om een nader ecologisch onderzoek naar waterspitsmuis uit te voeren. Het doel van dit nader ecologisch onderzoek is geformuleerd in enkele onderzoeksvragen:

- Maakt de waterspitsmuis gebruik van het plangebied?
- Indien bovenstaande het geval is:
 - o Wat zijn de effecten van de voorgenomen werkzaamheden op de beschermde waterspitsmuis?
 - o Welke mitigerende en/of compenserende maatregelen dienen te worden uitgevoerd om negatieve effecten op deze soort te voorkomen of te beperken?
 - o Welke maatregelen zijn benodigd om aan de zorgplicht te voldoen?
 - o Is het noodzakelijk om voor de voorgenomen werkzaamheden een ontheffing Wet natuurbescherming aan te vragen?

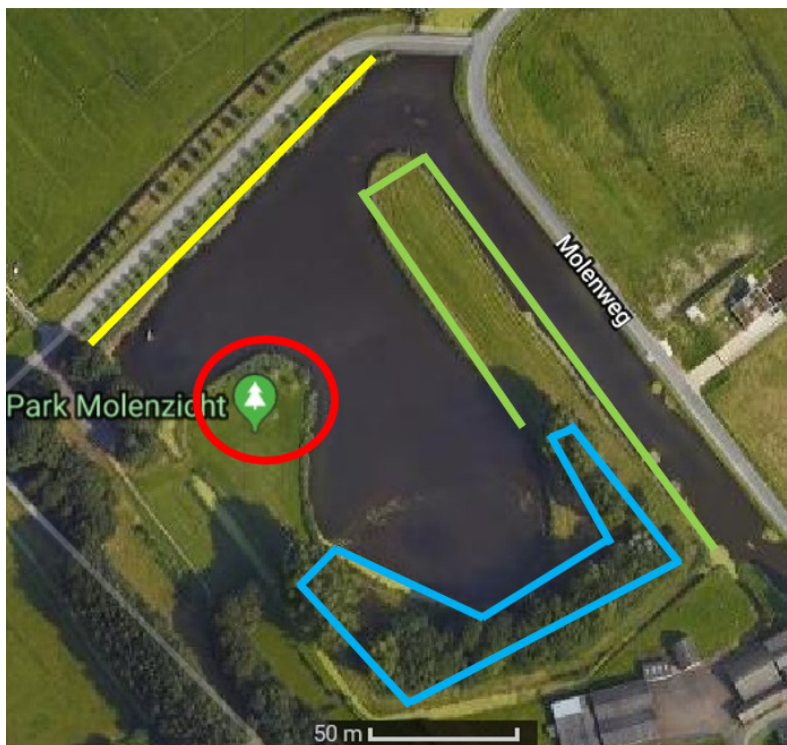
1.2 Leeswijzer

In hoofdstuk 2 worden de huidige en toekomstige situatie van het plangebied beschreven. In hoofdstuk 3 wordt vervolgens beschreven hoe het nader ecologisch onderzoek is uitgevoerd. De resultaten van het veldonderzoek worden in hoofdstuk 4 besproken. In hoofdstuk 5 worden de conclusies van het onderzoek gepresenteerd en maatregelen voor een zorgvuldige werkwijze voorgesteld (zorgplicht) en wordt ten slotte een mogelijke ontheffingsplicht voor de geplande werkzaamheden besproken.

2 PROJECTLOCATIE

2.1 Huidige situatie

De projectlocatie betreft een plas water aan de Molenweg te Berkel (zie figuur 2-1). Aan de noordwestelijke oever van de plas staan in de berm van een parallel gelegen weggetje knotwilgen. Direct daarnaast bevindt zich een brede strook rietkraag welke geleidelijk overgaat van land naar water (2-4 m breed, zie figuur 2-1, gele lijn). Overige plantensoorten die op deze locatie zijn aangetroffen zijn o.a. grote brandnetel, gele waterkers en veenwortel. De rietkraag vormt een goed habitat voor rietvogels, zoals de kleine karekiet. Aan de zuidzijde van de waterplas bevindt zich een natuurlijke zone met waterplanten en in de oever jonge bomen zoals zwarte els, gewone es en veldesdoorn (zie figuur 2-1, blauwe kader). De aanwezige oeverbegroeiing rondom de landtong aan de oostzijde van de plas bestaat uit een oever- en moeraszone met o.a. rietgras, grote brandnetel en waterzuring (zie figuur 2-1, groene lijnen). Een impressie van de groenstructuren is weergegeven in figuur 2-2.



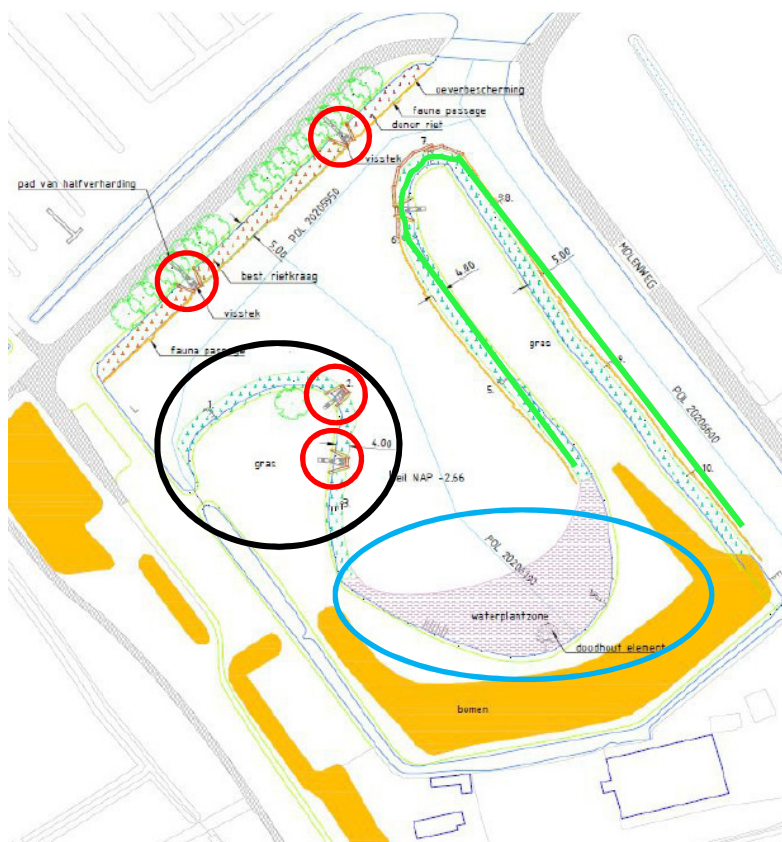
Figuur 2-1. Ligging huidige locatie plangebied (Bron ondergrond: Google Maps. Geel: brede rietstrook; rood; schiereiland; blauw: natuurlijke zone met waterplanten en groen: oeverbegroeiing rondom de landtong.



Figuur 2-2. Huidige situatie groenstructuren en oeverbegroeiing langs waterplas te Berkel met knotwilgen, rietkragen en rietgras, natuurlijke oevers, boschages en struiken.

2.2 Toekomstige situatie

In figuur 2-3 is een impressie weergegeven van de toekomstige situatie. Op deze noordwestelijke oever zijn twee (nieuwe) visstekken in de aanwezige rietkragen gepland (rode cirkels in figuur 2-3) met elk een verhard paadje die tussen de aanwezige knotwilgen kunnen worden aangelegd. Op het schiereiland wordt een natuurlijke oever, zonder vooroeverbescherming, gerealiseerd (zwarte cirkel in figuur 2-3). De overgang tussen water en land wordt gescheiden door een aan te brengen damwand. Ook op deze locatie worden twee nieuwe visstekken gerealiseerd (rode cirkels in figuur 2-3). Aan de oostzijde wordt rondom de landtong één (voor)oeverbescherming aangelegd (groene lijnen in figuur 2-3). Aan de zuidzijde wordt een waterplantzone met riet en doodhoutelement gerealiseerd (blauwe kader in figuur 2-3).



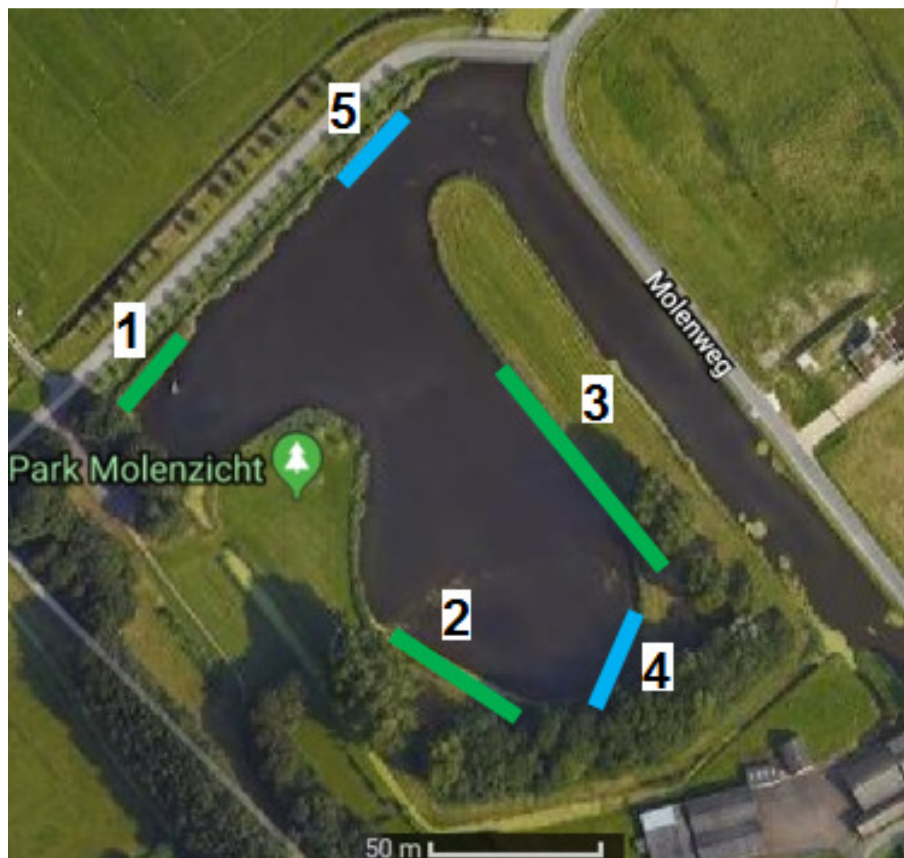
Figuur 2-3. Schets maatregelenkaart toekomstige situatie (Bron: Mulder, J., 2018: Quickscan Natte Ecologische Zone plas Molenweg Berkel. Ecologisch Adviesbureau Mulder, Beemte Broekland). Symbolen: zie tekst voor uitleg.

3 METHODE

De waterspitsmuis is schuw, kent een lage dichtheid en komt voor in en langs schoon, niet te voedselrijk vrij snelstromend tot stilstaand water met veel watervegetatie en ruig begroeide oevers. De soort komt alleen daar voor waar bodembedekkende vegetatie aanwezig is en waar binnen een straal van 500 m water te vinden is. Ze kunnen lopend over de oever of zwemmend in het water worden waargenomen. De oevers moeten bovendien voldoende schuilmogelijkheden bieden.

Als gevolg van de levenswijze van de waterspitsmuis is sprake van een lage detectiekans van waterspitsmuis middels regulier onderzoek (life-trap onderzoek, sporenonderzoek, braakballen enz.). Het onderzoek naar aanwezigheid van waterspitsmuis is voor dit project derhalve uitgevoerd middels een analyse van bodem- en watermonsters op de aanwezigheid van eDNA. Dit is een innovatieve methode die door het bevoegd gezag geaccepteerd wordt voor het aantonen van de aan- of afwezigheid van deze soort. Met deze methode kan met zeer weinig aanwezig DNA in water en / of op land de aanwezigheid van waterspitsmuis met zekerheid worden aangetoond.

Aangezien de soort zowel in het water als op de oever voorkomt, is door het nemen van zowel water- als bodemmonsters de kans op detectie bij aanwezigheid van de soort het grootst. Het basis eDNA-onderzoek bestaat uit het nemen van bodemmonsters (basis kit, zeer nauwkeurig, detectiekans: 75%, bron: Datura.nl) op de te onderzoeken oevers. Aanvullend worden watermonsters genomen (filter methode, onnauwkeuriger, detectiekans: 75%, bron: Datura.nl). De combinatie van deze twee sampling procedures verhoogt de detectiekans van de soort.



Figuur 3-1. Precieze locaties eDNA-monsternames bodem (groen) en water (blauw) op 4 februari 2019 in de waterplas te Berkel (Bron ondergrond: Google maps).

ATKB heeft op 4 februari 2019 de bodem- en watermonsters genomen voor het eDNA-onderzoek. De procedure voor het nemen van bodem- en watersamples worden beschreven in respectievelijk bijlagen 1 en 2. Er is uiteraard zorgvuldig bemonsterd om contaminatie (vals positieven) te voorkomen.

Op de planlocatie zijn in de oeverzone drie bodemmonsters verzameld (zie groene lijnen in figuur 3-1 en nummers 1 t/m 3). Tevens zijn op twee locaties watermonsters worden genomen (zie blauwe lijnen in figuur 3-1 en nummers 4 en 5). Wanneer eDNA van waterspitsmuis wordt gevonden in het water en niet op de oever, dan is het aannemelijk dat het aangetroffen eDNA afkomstig is van (met plas Molenweg in verbinding staande) watergangen in de omgeving.

Alle eDNA-samples (bodem- en watersamples) zijn op 5 februari 2019 naar het laboratorium gestuurd. Datura Molecular Solutions BV te Leiden heeft de analyses uitgevoerd. Een nauwkeurige beschrijving van de gehanteerde analysemethode van de verzamelde eDNA-samples voor dit specifieke onderzoek, inclusief een toelichting van een gedegen kwaliteitswaarborging voor het voorkomen van valse positieve en / of negatieve waarnemingen, is beschreven in het rapport van Datura: 'van Bochove K. 2019. eDNA onderzoek naar waterspitsmuis. Rapport RA2019004, Datura, Huissen' (zie bijlage 3).

4 RESULTATEN

In tabel 4-1 zijn de resultaten van het eDNA-onderzoek naar waterspitsmuis op de vijf onderzochte locaties bij de waterplas te Berkel weergegeven. In de derde kolom in tabel 4-1 zijn het aantal replica's eDNA weergegeven die in de geanalyseerde monsters zijn aangetroffen. Bij 1/12 is een lage concentratie eDNA van de waterspitsmuis in het betreffende monster waargenomen en bij 12/12 een hoge concentratie. Het is duidelijk dat in geen van de vijf onderzochte monsters eDNA van waterspitsmuis is aangetroffen (zie tabel 4-1).

Tabel 4-1. Resultaten eDNA analyses. De vermelde monsternummers corresponderen met de nummers zoals weergegeven in figuur 3-1.

Monsternr.	Soort monster	# Aangetroffen replica's eDNA
1	Bodem	0/12
2	Bodem	0/12
3	Bodem	0/12
4	Water	0/12
5	Water	0/12

5 CONCLUSIES

Er is onderzoek gedaan naar de aanwezigheid van waterspitsmuis. Op basis van de eDNA-monsters kan de aanwezigheid van vaste looproutes en rust- en verblijfplaatsen van de soort in en nabij de waterplas te Berkel met zekerheid worden uitgesloten. Ook kan de aanwezigheid van leefgebied van enige importantie voor waterspitsmuis in het plangebied of de directe omgeving wordt uitgesloten. Het plangebied vervult daarom geen enkele essentiële functie voor waterspitsmuis. Voor deze soort geldt dan ook dat er geen essentiële functies aanwezig zijn en dat er zodoende geen effectenanalyse en nadere formulering van maatregelen noodzakelijk zijn.

De werkzaamheden leiden niet tot overtreding van verbodsbepalingen waardoor de Wet natuurbescherming niet wordt overtreden en het aanvragen van een ontheffing niet aan de orde is.



ATKB kan u tevens van dienst zijn met:

BODEM

- Verkennend en nader (asbest) bodemonderzoek
- Partijkeuringen grond, bagger en niet vormgegeven bouwstof
- Opstellen saneringsplannen, bestekken conventionele en in-situ landbodemsaneringen
- Begeleiding, evaluatie van conventionele en in-situ landbodemsanering
- Non destructief bodemonderzoek (grondradar)
- Second opinions
- Monitorings- en nazorgplannen
- Juridisch advies bodemzaken
- Beleidsondersteuning
- Civieltechnisch onderzoek naar asfalt, zand en klei
- Coördinatie archeologisch onderzoek
- Coördinatie asbestonderzoek gebouwen

ECOLOGIE

- Soortgericht onderzoek (o.a. vleermuizen, amfibieën, vogels)
- Toetsingen aan natuurwetgeving
- Ecologisch werkprotocol en begeleiding
- Vegetatiekarteringen
- Hydrobiologisch onderzoek
- Waterplantenonderzoek en ecoscans
- Visstandbemonstering
- Vismigratieonderzoek (vistelemetrie, pit-tag)
- Actief Biologisch Beheer
- Visserijmanagement
- Visbeheerplannen
- Beleidsstudies, beheerplannen en adviezen
- BREEAM-NL (gecertificeerd duurzaam bouwen)
- BREEAM-NL PLUS (duurzaamheid en milieuvergunning)

WATER & RUIMTE

- Kwalitatief en kwantitatief waterbodemonderzoek
- Baggerplan en werkplan baggerwerk
- Directievoering, toezicht en begeleiding baggerwerken
- Inrichting en beheer grondwatermeetnetten
- Grondwatermonitoring (grondwaterstand en -kwaliteit)
- Onderzoek en monitoring oppervlaktewaterkwaliteit
- Watervraagstukken
- Coördinatie/opstellen bemalingsplannen
- Watertoetsen en waterparagrafen
- Meldingen en vergunningen
- Coördinatie/opstellen ruimtelijke onderbouwing
- Saneringsplan en bestek waterbodemsanering
- Begeleiding en evaluatie van waterbodemsanering
- BREEAM-NL (gecertificeerd duurzaam bouwen en gebiedsontwikkeling)
- BREEAM-NL PLUS (duurzaamheid en milieuvergunning)

BIJLAGE 1



Protocol:

eDNA bodembemonstering van waterspitsmuis.



Let op: samplekit pas in het veld open maken i.v.m. contaminatierisico!

De samplekit bevat:

- 2 paar handschoenen
- 1 pot met 250 mL MilliQ-water
- 3 buizen (50 mL) met 25 mL ethanol om te conserveren

Verzamelen van samples

1. Trek een set handschoenen aan (denk aan contaminatie!).
2. Het verzamelen van bodem/strooisel materiaal kan het meest eenvoudig met de hand gedaan worden (de handschoenen zijn immers steriel).
3. Waterspitsmuizen foerageren vaak langs de oever. Door gericht bodemmateriaal te verzamelen op flauw aflopende oevers (daar waar waterspitsmuis graag foerageert) kan de kans vergroot worden om waterspitsmuis te detecteren.
4. Schraap met de hand materiaal van de bovenste centimeter van de oever. Dat kan strooisel, bodem of sediment zijn, op de grens van water en land. Het is niet erg als hiermee mossen of delen van planten meekomen.
5. Het bodemmateriaal kan verzameld worden langs een traject van 50-100 meter.
6. Verzamel bodem/strooiselmateriaal in de liter pot. Hou ~200 mL vrij zodat het sample goed geschud en vermengd kan worden.

Bewaar de samples in de 50 mL buizen

7. Schud de pot voor 1 minuut stevig door elkaar zodat het eDNA homogeen verdeeld wordt.
8. Trek het tweede paar schone handschoenen aan om contaminatie te voorkomen.
9. Giet 25 mL van het sample vanuit de liter pot over in elk van de schone 50 mL buizen met alcohol. Elke locatie levert dus een sample dat bestaat uit 3 buizen.
10. Bewaar de samples in de koelkast.
11. Stuur de samples binnen een week op naar Datura (zie eDNA sample formulier). Voor langetermijnopslag kunnen samples het beste in een -80 °C vriezer bewaard worden.

Heeft u nog vragen? Neem gerust contact op met Kees van Bochove.

keesvanbochove@datura.nl

0031(0)629455328

www.datura.nl

Datura Molecular Solutions BV

BIJLAGE 2



eDNA filter samplingprotocol

Let op: sampling kit pas in het veld open maken i.v.m. contaminatierisico!

De sample kit bevat:

- 2 paar handschoenen
- 1 blauwe bemonsteringsschep
- 1 steriele Whirl-Pak bag
- 2 2mL buisjes met conserverende buffer
- 1 wegwerpincet

Locatie van bemonstering

- Submonsters worden genomen langs een traject van 50-100 meter;

Verzamelen van subsamples

1. Trek een set handschoenen aan (denk aan contaminatie!).
2. Open de Whirl-Pak bag.
3. Verzamel 26 subsamples met behulp van de blauwe bemonsteringsschep. Mix het water voorzichtig door de schep heen en weer te bewegen. Zorg ervoor dat de bodem niet verstoord wordt. De bodem bevat mogelijk historisch DNA. Vul de schep tot de rand en leeg deze in de Whirl-Pak bag.
4. Sluit de Whirl-Pak bag en schudt om de subsamples te vermengen.
5. Haal de filterhouder uit de verpakking en draai deze op de fles.
6. Sluit de filterhouder aan op de pomp.
7. Giet het water uit de Whirl-pak bag voorzichtig op het filter.
8. Zet de pomp aan. Bij plassen, sloten en boezemwateren kan tot **maximaal** 1 liter water gefiltreerd worden. Dit duurt ongeveer 2 minuten. Bij troebel water kan filter echter al eerder verstopt raken. Het is dus niet erg als het niet lukt om 1 liter water te filteren. **Giet het water daarom stukje bij beetje op het filter en filtreer altijd het gehele toegevoegde volume.** Noteer aub de hoeveelheid water die gefilterd kon worden.
9. Zet de pomp uit.

Conserveer de samples

10. Trek het tweede paar schone handschoenen aan om contaminatie te voorkomen.
11. Als het water gefiltreerd is, gebruik dan de plastic pincet om het filter voorzichtig in de buisjes met conserverende vloeistof te duwen. (Bij lage temperaturen zal er precipitatie (neerslag) te vinden zijn in de buffer. Door deze even in de hand op te warmen wordt de buffer weer vloeibaar.) Het is belangrijk om te voorkomen dat er vloeistof gemorst wordt! Verdeel het filter over de twee buisjes. Het filter moet daarbij doorgescheurd worden. Het is dus niet erg als het filter in meerdere stukjes in de buisjes overgebracht wordt. **Zorg dat het filter geheel onder de buffer staat zodat het eDNA niet kan afbreken.** Door slechts één pootje van de pincet te gebruiken kan het filter eenvoudig naar beneden gedrukt worden.
12. Sla de buisjes in het opslagdoosje. Probeer het doosje zoveel mogelijk horizontaal te bewaren zodat er altijd een laagje buffer boven het filter blijft staan.
13. Bewaar de samples bij kamertemperatuur.
14. Stuur de samples zo spoedig mogelijk op naar Datura met een volledig ingevuld sample formulier (uitgeprint of digitaal). Langdurig bewaren van het sample kan leiden tot degradatie van het DNA.

De opvangfles, pomp en het opslagbakje met buisjes met filters ontvangen wij graag terug. De overige materialen mogen weggegooid worden.

NB: plastic scheiden is beter voor het milieu

Tips en trucs:

- De concentratie van eDNA in het water is laag. Daarom worden zeer gevoelige detectie technieken gebruikt. Dat maakt de methode echter gevoelig voor contaminatie. Voorkom aanraking van de buitenkant van de handschoenen. Verder is het belangrijk om met de handschoenen alleen de materialen die aanwezig zijn in de kit aan te raken.
- Van de meeste watertype kan maximaal 1 liter water gefilterd worden. Het filtreren van een groter volume water verhoogt weliswaar de concentratie eDNA in het sample, maar verhoogd ook de concentratie PCR inhiberende stoffen. PCR inhiberende stoffen hebben een negatief effect op de detectie gevoeligheid. Het filtreren van een groter volume dan 1 liter heeft daarom vaak negatief effect op de detectie. In troebele wateren kan het filter soms na 500 mL water al verstopt raken. In vennen waarin veel zwevend organisch materiaal aanwezig is, verstopt het filter al na 200 mL. Het heeft dan geen zin om minutenlang te wachten om nog extra water te kunnen filtreren. Over het algemeen resulteert dit juist in een te hoog percentage inhiberende stoffen. Voeg dus niet meer water toe dan in ~2 minuten gefiltreerd kan worden. Alleen in grote heldere (vaak stromende) watersystemen, zoals de grote rivieren en sommige boezemwateren, kan een groter volume water (1-4 liter) bemonsterd worden.
- De concentratie van eDNA in watersamples is laag. Daarom worden zeer gevoelige technieken gebruikt om eDNA toch te kunnen detecteren. Kleine hoeveelheid DNA van de doelsoort (bijvoorbeeld aanwezig op schepnetten) kan al leiden tot vals positief resultaat. Het is daarom zeer belangrijk om de samples zo schoon mogelijk te houden, om zodoende contaminatie te voorkomen;
- DNA verspreid zich slechts in beperkte mate door het water. Daarom is het belangrijk om 26 subsamples te verzamelen. Daardoor neemt de detectiekans af. Als de verwachting is dat de dichtheid van de doelsoort laag is, dan is het verstandig om de subsamples langs een traject van maximaal 100 meter te verzamelen. Als veel subsamples geen eDNA van de doelsoort bevatten dan wordt de eDNA concentratie in het sample laag. In de meeste gevallen is het daarom aan te raden om het verzamelen van de subsamples te beperken tot één waterlichaam. Zodoende kan worden voorkomen dat eDNA uit een sloot waarin de doelsoort aanwezig is te veel verdunt wordt met water waarin geen eDNA aanwezig is;
- Aan waterplanten kunnen allerlei (sediment)deeltjes gekleefd zitten. Bij beroering van het water kunnen deze deeltjes in het sample terecht komen. Probeer dit zoveel mogelijk te vermijden omdat dit eDNA detectie kan inhiberen. Dit kan door voorzichtig tussen de waterplanten te scheppen of door openingen in de watervegetatie te zoeken;
- In sommige watersystemen kan het water na (hevige) regenbuien sneller stromen dan normaal. Het kan daarom verstandig zijn om eDNA sampling na regenval te vermijden.

Heeft u nog vragen?

Neem gerust contact op met Datura

Datura Molecular Solutions BV

www.datura.nl

info@datura.nl

0031-(0)629455328

Samples kunnen opgestuurd naar:

Datura

t.a.v. Jitske Rook

Sylviusweg 72

2333 BE, Leiden

BIJLAGE 3



eDNA onderzoek naar waterspitsmuis



Colofon

Titel	eDNA onderzoek naar waterspitsmuis
Tekst, foto's en samenstelling	K. van Bochove en J. Rook
In opdracht van	ATKB
Naam opdrachtgever	I. Spierts en E. Schiedon
Intern projectnummer opdrachtgever	20181402 Berkel
Rapportnummer	RA2019004
Datum oplevering rapport	26 februari 2019
Aantal pagina's	8
Wijze van citeren	van Bochove K. 2019. eDNA onderzoek naar waterspitsmuis. Rapport RA2019004, Datura, Huissen.
Laboratorium analist	J. Rook



Datura Molecular Solutions BV

Gevestigd te:
Brouwketel 1
6851 ZX Huissen
Nederland

Postadres laboratorium:
t.a.v. Datura
Sylviusweg 72
2333 BE, Leiden
Nederland

www.datura.nl
info@datura.nl

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

Inhoudsopgave

1. Doelstelling.....	4
2. Methode.....	4
2.1 Sampling	4
2.2 Laboratorium analyse	4
2.2.1 Bodemsamples	4
2.2.2. Watersamples	5
2.3 Kwaliteitswaarborging	5
2.3.1 Hoe vals positieve waarnemingen voorkomen worden	5
2.3.2. Hoe vals negatieve waarnemingen voorkomen worden	7
3. Resultaten	8

1. Doelstelling

Vaststellen van de aan- of afwezigheid van eDNA van waterspitsmuis (*Neomys fodiens*) in bodemsamples en watersamples in opdracht van ATKB.

2. Methode

2.1 Sampling

De bemonstering is uitgevoerd door ATKB.

2.2 Laboratorium analyse

2.2.1 Bodemsamples

De bodemsamples zijn geanalyseerd op de aanwezigheid van eDNA van waterspitsmuis. Het analyseren van een DNA bodemsample vindt plaats in drie stappen. Eerst wordt het eDNA geconcentreerd in een pellet daarna volgt een extractie met een Qiagen Blood & Tissue kit. 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 uit de bodemsamples is 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 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.

2.2.2. Watersamples

Het eDNA uit watersamples wordt geëxtraheerd door middel van een phenol-chloroform DNA extractie. Gedurende deze extractie lost het filter op waardoor 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. Vervolgens zijn stap 2 en 3 uitgevoerd zoals beschreven in paragraaf 2.2.1.

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 soorten;

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 eDNA 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 slotwater 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. Voor een bodem sample worden minimaal **15 subsamples** verzameld. Hiermee wordt de kans vergroot dat eDNA van de doelsoort in het sample terecht komt.
2. Voor een water sample worden minimaal **26 subsamples** verzameld. Hiermee wordt de kans vergroot dat eDNA van de doelsoort in het sample terecht komt.
3. 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;
4. Gebruik van een **zeer korte merker** van maximaal 120 basepaar;
5. 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);
6. 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 waterspitsmuis 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 in beide watersamples een 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 bij de watersamples hoger. Om deze inhibitie tegen te gaan zijn de watersamples 2x verdund.

Samenvattend, de eDNA analyses zijn met succes uitgevoerd. Er is geen eDNA van waterspitsmuis aangetoond.

Tabel 1. Resultaten van de eDNA analyses.

Sample nr	Soort sample	Waterspitsmuis
21103	Water	0/12
21104	Water	0/12
6317	Bodem	0/12
6318	Bodem	0/12
6368	Bodem	0/12