NOTITIE

Onderwerp	NOTITIE NADER ONDERZOEK GROTE MODDERKRUIPER MAASBOMMEL-WEST
Aan	Stuurgroep Meanderende Maas
Datum	6-9-2022
Referentie ON	WSD.4.1/22-012.655
Referentie OG	WSD.4.1-0088
Status	Definitief 1.0
Project	Planuitwerking Meanderende Maas
Projectcode	124679-WSD.4.1
Kopie naar	
Verificatie	Auteurs: [redacted] gecontroleerd door: [redacted] goedgekeurd door: [redacted] Paraaf/handtekening:
Bijlage(n)	I **Roze, E. & Rook, J. 2022 eDNA. Rapport eDNA onderzoek Grote modderkruiper RA22041, Datura Molecular Solutions BV, Wageningen**

1 AANLEIDING

Het project Meanderende Maas gaat de historische Maasdijk tussen vestingstadje Ravenstein en de stuw bij Lith aan de Brabantse zijde versterken, de Maas meer ruimte geven en het gebied ontwikkelen. Ten behoeve van de aanleg van een fietspad richting de Oijenseveerweg te Alphen wordt een deel van een watergang gedempt in de uiterwaard ten westen van Maasbommel. Aangezien dit deel na een scopewijziging in beeld is gekomen, is dit deel niet meegenomen in de eerder uitgevoerde onderzoeken.

Om effecten op beschermde natuurwaarden in kaart te brengen is op 18 maart 2022 een QuickScan natuur uitgevoerd (Meanderende Maas, 2022). Uit de QuickScan blijkt dat de wetering mogelijk gebruikt kan worden als leefgebied voor de grote modderkruiper in de vorm van zomer-, voortplanting en winterhabitat. Om de aanwezigheid van de grote modderkruiper in het projectgebied in kaart te brengen, is in april 2022 een aanvullend eDNA onderzoek uitgevoerd (Roze & Rook, 2022). In deze notitie wordt een beknopte samenvatting gegeven van de resultaten van het nader onderzoek.

2 METHODE

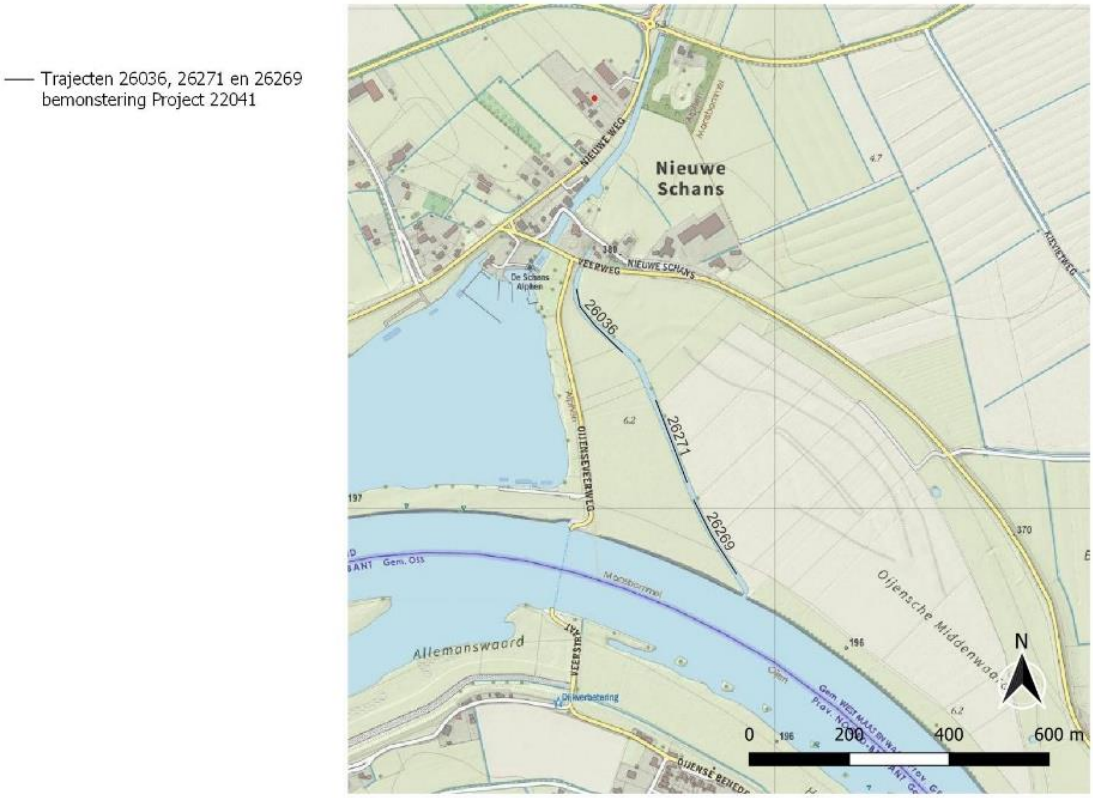
In april 2022 is eDNA-onderzoek uitgevoerd naar de aanwezigheid van de grote modderkruiper. Op 12 april 2022 zijn drie watermonsters verspreid over de loop van de watergang verzameld volgens gestandaardiseerde

protocollen van Datura, zie afbeelding 2.1. In tabel 2.1 zijn de locaties weergegeven. De monsters zijn geanalyseerd in het laboratorium van Datura (Bijlage I).

Tabel 2.1 Resultaten van de qPCR analyses van de watermonsters met 12 replica's. GMK=Grote modderkruiper

Monsternummer	Datum	Type	Locatie
26269 (GMK)	12-4-2022	watermonster	watergang ten zuiden van Nieuwe Schans (zie afbeelding 2.1)
26036 (GMK)	12-4-2022	watermonster	watergang ten zuiden van Nieuwe Schans (zie afbeelding 2.1)
26271 (GMK)	12-4-2022	watermonster	watergang ten zuiden van Nieuwe Schans (zie afbeelding 2.1)

Afbeelding 2.1 Locaties monstername samples



3 RESULTATEN

In geen van de watermonsters is eDNA van grote modderkruiper aangetroffen. Een overzicht van de resultaten van dit onderzoek is weergegeven in tabel 3.1. Iedere analyse is uitgevoerd met behulp van 12 replica's (zie Bijlage I). De resultaten worden weergeven als het aantal replica's (van de 12 replica's) dat positief scoorde

voor eDNA van de doelsoorten in de betreffende monsters. Indien er een score van '0/12' is bekomen, betekent dit dat er geen eDNA van de doelsoort in het betreffende monster is aangetroffen. Indien er minstens 1 positieve replica is in een monster (i.e. '1/12' of hoger) betekent dit dat er eDNA van de doelsoort is gedetecteerd.

Tabel 3.1 Resultaten van de qPCR analyses van de watermonsters met 12 replica's. GMK=Grote modderkruiper

Monsternummer	Type	Resultaat
26269 (GMK)	watermonster	0/12
26036 (GMK)	watermonster	0/12
26271 (GMK)	watermonster	0/12

4 CONCLUSIE

De aanwezigheid van grote modderkruiper is uitgesloten omdat er geen eDNA is aangetroffen in de wetering. Negatieve effecten als gevolg van de werkzaamheden ten behoeve van de aanleg van het fietspad op de grote modderkruiper zijn uitgesloten. Er is geen ontheffing nodig in het kader van de Wet natuurbescherming.

5 LITERATUUR

Meanderende Maas, 2022, quickscan natuur uitbreiding plangebied Maasbommel-west, toetsing in het kader van de Wet natuurbescherming, Ingenieursteam Meanderende Maas.

I

BIJLAGE: eDNA onderzoek Grote modderkruiper Datura

Datura
molecular solutions in ecology

eDNA onderzoek Grote modderkruiper

In opdracht van Tauw BV

Colofon

Titel	eDNA onderzoek Grote modderkruiper
Tekst, foto's en samenstelling	Erwin Roze, Kees van Bochove, Jitske Rook
In opdracht van	Tauw BV
Naam opdrachtgever	[redacted]
Rapportnummer	RA22041
Datum opstelling	9 mei 2022
Aantal pagina's	7
Contactpersoon vanuit Datura	Erwin Roze
Wijze van citeren	Roze, E. & Rook, J. 2022 eDNA. Rapport eDNA onderzoek Grote modderkruiper RA22041, Datura Molecular Solutions BV, Wageningen

Datura Molecular Solutions BV

Gevestigd te:
Agro Bussiness Park 10
6708 PW Wageningen
Nederland

+31-(0)6-38572998
www.datura.nl
erwin.roze@datura.nl

Inhoudsopgave

1. Doelstelling....4
2. Methode....4
2.1 Bemonstering....4
2.2 Laboratoriumanalyse....4
2.3.1 Hoe vals positieve waarnemingen worden voorkomen....5
2.3.2 Hoe vals negatieve waarnemingen worden voorkomen (qPCR)....7
3. Resultaten....8

1. Doelstelling

De doelstelling van onderhavig onderzoek is het aantonen van de aan- of afwezigheid van Grote modderkruiper (*Misgurnus fossilis*) aan de hand van (e)DNA onderzoek. Hiervoor is gebruik gemaakt van eDNA watermonsters. Dit onderzoek is uitgevoerd in opdracht van TAUW BV.

2. Methode

2.1 Bemonstering

De bemonstering is uitgevoerd door Datura volgens gestandaardiseerde protocollen van Datura (opvraagbaar). Er zijn 3 watermonsters verzameld en geanalyseerd door het laboratorium van Datura (Tabel 1).

Tabel 1: monsterinformatie

Monsternummer	Datum	Type	Locatie
26269	12-4-2022	Water	watergang ten zuiden van Nieuwe Schans (zie Fig. 1)
26036	12-4-2022	Water	watergang ten zuiden van Nieuwe Schans (zie Fig. 1)
26271	12-4-2022	Water	watergang ten zuiden van Nieuwe Schans (zie Fig. 1)

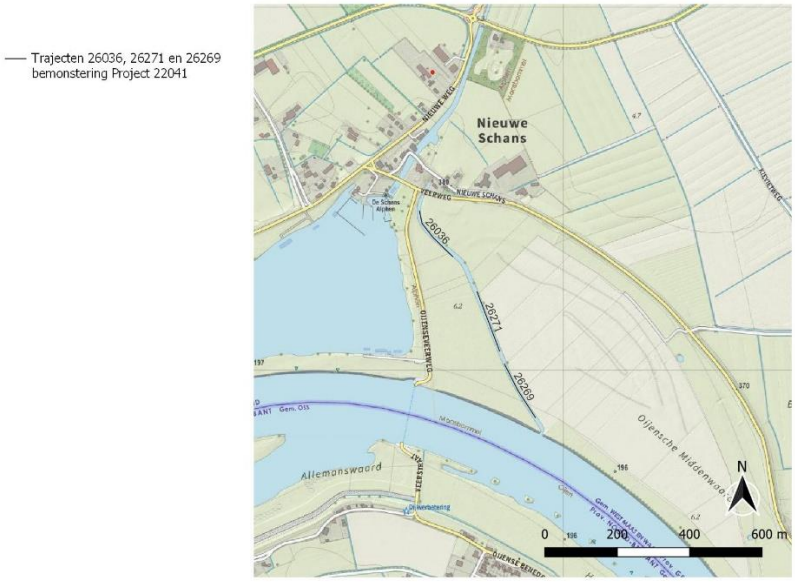


Fig. 1 Locaties monstername samples 26269, 26036 en 26271

2.2 Laboratoriumanalyse

De watermonsters zijn getest op de aanwezigheid van eDNA van Grote modderkruiper (26269, 26036 en 26271). 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. Storende stoffen als humuszuren kunnen detectie van het eDNA inhiberen wat kan leiden tot vals 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 eDNA 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 gemeten van dit fragment artificieel DNA. 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 waaraan 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 zuiveringsstap 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 zeer vaak vermenigvuldigd (geamplificeerd) wordt. Datura maakt gebruik van soort-specifieke primers die uitsluitend hechten aan DNA van de doelsoort
en dit vervolgens vermenigvuldigen. Datura werkt bovendien met soort-specifieke probes (een soort primer) die uitsluitend binden aan eDNA van de doelsoort. Binding van de probe aan het vermenigvuldigde eDNA 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 wordt uitgevoerd met 12 replica's. Daardoor kan zeer gevoelig gedetecteerd worden. De qPCR detectie wordt uitgevoerd met behulp van de TaqMan® Environmental Mastermix 2.0 (Life Technologies®). Naast het eDNA 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 opgetreden is. 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 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 diverse andere (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 DNase free 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 plaatsvindt 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 bodemmonsters 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;
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 de inhiberende stoffen nog invloed hebben en er inderdaad geen inhibitie meer optreedt (zie methode voor een uitgebreidere beschrijving);
5. Er wordt altijd een **positieve DNA controle** van de doelsoort 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 geen van de watermonsters 26269, 26036 en 26271 is eDNA van Grote modderkruiper aangetroffen. Een overzicht van de resultaten van dit onderzoek wordt weergegeven in Tabel 2. Iedere analyse is uitgevoerd met behulp van 12 replica's (zie 2.2 Laboratoriumanalyse). De resultaten worden weergeven als het aantal replica's (van de 12 replica's) dat positief scoorde voor eDNA van de doelsoorten in de betreffende monsters. Indien er een score van "0/12" is bekomen, betekent dit dat er geen eDNA van de doelsoort in het betreffende monster is aangetroffen. Indien er minstens 1 positieve replica is in een monster (i.e. '1/12' of hoger) 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 (e.g. '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**
26269 (GMK)	Watermonster	0/12
26036 (GMK)	Watermonster	0/12
26271 (GMK)	Watermonster	0/12

GMK = Grote modderkruiper