



eDNA inventarisatieprotocollen

Grote modderkruiper, kamsalamander, heikikker,
platte schijfhoren en noordse woelmuis

Jelger Herder



RAVON

eDNA inventarisatieprotocollen

Grote modderkruiper, kamsalamander, heikikker,
platte schijfhoren en noordse woelmuis

Jelger Herder



RAVON

Colofon

Status uitgave:	Definitief
Rapportnummer:	2025.043
Datum uitgave:	08-07-2025
Titel:	eDNA inventarisatieprotocollen
Subtitel:	Grote modderkruiper, kamsalamander, heikikker, platte schijfhoren en noordse woelmuis
Wijze van citeren:	Herder, J.E., 2025. eDNA inventarisatieprotocollen - Grote modderkruiper, kamsalamander, heikikker, platte schijfhoren en noordse woelmuis. Rapportnr. 2025-043, RAVON, Nijmegen.
Samensteller:	RAVON (Jelger Herder, met medewerking van Jan Kranenbarg en Rémon ter Harmsel)
Begeleidingsgroep	Datura (Kees van Bochove & Jarno de Vaan) Stichting Anemoon (Adriaan Gmelig-Meyling), TAUW (Jeroen Nagtegaal), eDNA werkgroep NGB/Waardenburg Ecology (Peter Roemers & David Ekkers) en de Zoogdiervereniging (Maurice La Haye & Dick Bekker).
Foto's omslag:	eDNA bemonsteren en kamsalamander - foto's Jelger Herder
Aantal pagina's incl. bijlagen:	46
Projectnummer:	2025.043
Projectleider:	Jelger Herder
Naam en adres opdrachtgever(s):	Rijksdienst voor Ondernemend Nederland (RVO)
Referentie opdrachtgever(s):	BATPM24004
Akkoord voor uitgave:	J. Kranenbarg

Paraaf:



© 2025 RAVON, Nijmegen

Inhoud

1	Inleiding	6
1.1	Leeswijzer	8
2	Materiaal en methoden	9
2.1	Werkwijze	9
2.2	Samenwerking en toetsing	10
2.3	Reikwijdte eDNA-protocollen	11
3	Resultaten literatuurstudie en evaluatie per soort	13
3.1	Grote modderkruiper	13
3.2	Kamsalamander	15
3.3	Heikikker	18
3.4	Noordse woelmuis	21
3.5	Platte schijfhoren	24
4	Richtlijnen eDNA bemonsteringen in het veld	26
4.1	Bemonsteringsprotocol	26
4.2	Voorkomen van contaminatie	27
4.3	Conservering van eDNA-monsters	28
4.4	Registratie van de monsters	29
4.5	Achtergrondinformatie	29
5	Richtlijnen laboratorium vereisten en analyses	30
5.1	NEN Praktijkrichtlijn	30
5.2	Primers en probes	31
5.3	Aantal PCR replica's en PCR cycli	32
5.4	Registratie laboratorium:	33
5.5	Gegevens delen met NDFF	33
5.6	Optioneel bewaren eDNA-extracten	33
5.7	Achtergrondinformatie	34
6	Protocollen	35
6.1	Grote modderkruiper	35
6.2	Kamsalamander	37
6.3	Heikikker	39
6.4	Noordse woelmuis	41
7	Aanbevelingen	43
8	Literatuur	44

1 Inleiding

Inventarisaties om de aan-/afwezigheid van soorten vast te stellen spelen een cruciale rol in vergunningverlening en soortbescherming onder de omgevingswet. Ze geven inzicht in de lokale biodiversiteit en de aanwezigheid van kwetsbare of beschermde soorten. Daarnaast helpen ze bij het inschatten van de impact van projecten op aanwezige flora en fauna en vormen ze een essentieel onderdeel van vergunningstrajecten. De verzamelde gegevens zijn bovendien waardevol voor monitoringsverplichtingen, het volgen van trends (bijv. binnen het NEM) en het ontwikkelen van effectieve beheer- en herstelstrategieën.

Voor verschillende soort(groep)en zijn inventarisatieprotocollen ontwikkeld om de betrouwbaarheid van gegevens over aan- of afwezigheid te waarborgen. Bijvoorbeeld de soortinventarisatieprotocollen van het Netwerk Groene Bureaus (NGB, 2023), het vleermuisprotocol (NGB, 2021), kennisdocumenten van BIJ12 (BIJ12, 2017) en handleidingen voor de NEM Meetprogramma's, b.v. Reptielen (RAVON, 2020), Zoetwatervissen (RAVON, 2023), Amfibieën (RAVON, 2024), broedvogelmonitoring (Vergeer *et al.*, 2023), platte schijfhoren (Gmelig Meyling *et al.*, 2014), noordse woelmuis (La Haye & Schekkerman 2017) en vleermuis transecttellingen (Hommersen *et al.*, 2024). Belangrijk om hierbij in het oog te houden is dat de verschillende protocollen voor verschillende doelen zijn opgesteld. Zo zijn de soortinventarisatieprotocollen van NGB opgesteld om met voldoende zekerheid aan te tonen of een soort aan- of afwezig is voor vergunningverlening. Soortprotocollen van het NEM zijn gericht op het verzamelen van voldoende gegevens voor het in kaart brengen van verspreiding van soorten op landelijke schaal of het genereren van trends. Ze zijn daarom veelal niet één op één toepasbaar voor natuurwetgeving.

Sommige soorten of hun sporen zijn lastig te detecteren, bijvoorbeeld omdat ze onder water leven, uitsluitend 's nachts actief zijn, grotendeels ondergronds verblijven of in lage dichtheden voorkomen. Reguliere methoden bestaan voornamelijk uit veldwerk, waarbij gericht wordt gezocht naar directe waarnemingen van individuen of indirecte waarnemingen via sporen (bijvoorbeeld uitwerpselen). Nieuwe inzichten en technieken kunnen verwerkt worden in inventarisatieprotocollen wanneer de effectiviteit en betrouwbaarheid als toereikend is bevonden.

Environmental DNA (eDNA) in de vergunningverlening

Een relatief nieuwe methode om de aan- of afwezigheid van soorten vast te stellen is het gebruik van environmental DNA (eDNA). Soorten laten DNA achter in hun omgeving via huidschilfers, uitwerpselen en andere biologische resten. Dit eDNA kan worden verzameld door water-, bodem- lucht of keutelmonsters te nemen, waarna in het lab kan worden vastgesteld of het DNA van een doelsoort in het monster aanwezig is. Voordeel hierbij is dat het niet invasief is, dieren hoeven niet gevangen of verstoord te worden. Doordat eDNA in water binnen relatief korte tijd van enkele dagen tot 1 maand afbreekt duidt dit op recente aanwezigheid van de soort (Dejean *et al.*, 2011). De methode werd voor het eerst toegepast in een pilotstudie naar de Amerikaanse stierkikker (Ficetola *et al.*, 2008) en in Nederland voor het eerst gebruikt bij de grote modderkruiper (Herder *et al.*, 2012). Inmiddels is eDNA succesvol ingezet voor een groot aantal soorten en zijn de bemonsteringstechnieken sterk verbeterd. Waar aanvankelijk kleine watermonsters (90 ml) in ethanol werden bewaard, worden tegenwoordig grote watervolumes (500ml tot 60L) verzameld en met speciale filters reeds in het veld gefiltreerd wat de trefkans verhoogd

(Harper *et al.*, 2024). Ook aan de analysekant is er vooruitgang geboekt: de NEN (Stichting Koninklijk Nederlands Normalisatie Instituut) heeft een Nederlandse Praktijkrichtlijn (NPR 7394) ontwikkeld waarin de minimale vereisten staan voor laboratoria voor het uitvoeren van eDNA-analyses.

De eDNA-methode wordt inmiddels breed toegepast voor verschillende soorten, bijvoorbeeld bij grootschalige inventarisaties voor Natura 2000, de evaluatie van beheermaatregelen en als vroege signalering voor invasieve exoten. Binnen de vergunningverlening wordt eDNA ingezet om soorten aan te tonen, maar vaak nog niet geaccepteerd als methode om aanwezigheid definitief vast te stellen of uit te sluiten. Dit komt vooral doordat beschikbare kennis over de toepassing en trefkansen van eDNA nog niet gebundeld en breed gedeeld is. Een belangrijke voorwaarde voor acceptatie is de onderbouwing dat de trefkansen van eDNA vergelijkbaar of hoger zijn dan die van bestaande methoden, zoals de soortinventarisatieprotocollen van het NGB. Daarnaast is inzicht nodig in bemonsteringsinspanning en de eDNA-analyse inspanning in het lab die nodig is voor betrouwbare detectie, inclusief in welke periode van het jaar de methode betrouwbaar toepasbaar is. Hierdoor wordt eDNA binnen vergunningverlening slechts beperkt ingezet en uitsluitend voor het bevestigen van aanwezigheid, niet voor het uitsluiten van aanwezigheid. Terwijl er inmiddels ruim voldoende bewijs ligt dat de methode vergelijkbare of betere trefkansen kan geven dan reguliere methoden.

Om eDNA ook inzetbaar te maken voor het uitsluiten van de aanwezigheid van een soort heeft RVO aan RAVON en samenwerkingspartners (zie 2.2) daarom gevraagd om:

1. De bestaande kennis over eDNA-detectie en inventarisatiemethoden te verzamelen en bundelen voor onderstaande vijf soorten die veel voorkomen bij vergunningverlening:
 - grote modderkruiper
 - kamsalamander
 - heikikker
 - platte schijfhoren
 - noordse woelmuis
2. Deze kennis te beoordelen op effectiviteit en betrouwbaarheid, inclusief een vergelijking met regulier veldonderzoek, en vast te stellen of er voldoende onderbouwing is om eDNA in te zetten voor het vaststellen van de aan- of afwezigheid van soorten. En zo niet, wat er dan nog aan aanvullend onderzoek nodig is.
3. Voor de soorten waarvoor voldoende onderbouwing is om eDNA in te zetten voor het vaststellen van de aan- of afwezigheid, eDNA-inventarisatieprotocollen op te stellen die toepasbaar zijn binnen de vergunningverlening *.

** Het gaat daarbij om protocollen enkel op basis van eDNA. Het combineren van eDNA met andere reguliere inventarisatiemethoden om gezamenlijk betrouwbaar te kunnen uitsluiten is mogelijk maar valt buiten deze opdracht.*

1.1 Leeswijzer

Hoofdstuk 2 geeft inzicht in de gevolgde werkwijze, samenwerking met experts binnen de begeleidingsgroep en de reikwijdte van de opgestelde protocollen. **Hoofdstuk 3** geeft de uitkomsten van de literatuurstudie aangevuld met praktijkervaring en expert judgement. Per soort worden de trefkansen, geschikte bemonsteringsperioden en de habitats waarbinnen de methode toepasbaar is behandeld, ieder met een samenvattende conclusie van de beschikbare kennis. Tot slot is er een eindconclusie of er voldoende kennis beschikbaar is om een protocol op te stellen. **Hoofdstuk 4** geeft richtlijnen voor het bemonsteren van eDNA in het veld. Het gaat om algemene protocollen en aandachtspunten voor het verzamelen van eDNA-monsters, met nadruk op de bemonstering, contaminatiepreventie, conservering en monsterregistratie. **Hoofdstuk 5** geeft richtlijnen voor de analyses en laboratoriumvereisten. Hierin worden de minimale kwaliteitscriteria beschreven en worden ter ondersteuning kaders gegeven voor de analyses. **Hoofdstuk 6** geeft de protocollen per soort voor soorten waarvoor er voldoende kennis beschikbaar was om deze op te stellen. Deze protocollen bevatten per soort de bemonsteringsinspanning, habitats en periode waarin bemonsterd mag worden. In hoofdstuk 7 worden aanbevelingen gegeven voor vervolgonderzoek en actualisatie van de protocollen in de toekomst. Tot slot bevat **hoofdstuk 8** de literatuurlijst met gebruikte bronnen.

2 Materiaal en methoden

2.1 Werkwijze

De werkzaamheden omvatten globaal drie hoofdfasen:

1 - Verzamelen en bundelen van bestaande kennis

De eerste fase bestond uit het verzamelen en bundelen van bestaande kennis over de toepassing van eDNA voor soorteninventarisaties voor de vijf in de inleiding genoemde soorten. Dit onderzoek richtte zich op drie pijlers:

- **Literatuuronderzoek:** analyse van zowel wetenschappelijke literatuur (peer-reviewed) als grijze literatuur (rapporten, artikelen, etc.) met betrekking tot eDNA toepassingen voor de betreffende soorten.
- **Kennisinventarisatie in Nederland:** het verzamelen van (ongepubliceerde) informatie via samenwerkingspartners en gerichte uitvragen bij laboratoria en leden van het NGB die met eDNA werken.
- **Vergelijking met reguliere methoden:** literatuuronderzoek naar trefkansen met reguliere methoden in vergelijking met eDNA, om inzicht te verkrijgen hoe deze zich tot elkaar verhouden.

2 - Evaluatie en beoordeling van verzamelde informatie (hoofdstuk 3)

Alle verzamelde bronnen zijn geanalyseerd op de volgende criteria:

- **Trefkans met eDNA,** Hierbij is onderscheid gemaakt tussen:
 - *Absolute trefkans:* studies die hebben gekeken naar de trefkans met eDNA op basis van een x-aantal locaties waarvan **van te voren bekend** was of de soort aan- of afwezig was (en grofweg in welke dichtheden).
 - *Relatieve trefkans:* studies die hebben gekeken naar de trefkans met eDNA op basis van een x-aantal locaties waarvan **van te voren niet bekend** was of de soort aan- of afwezig en in welke dichtheden. In deze studies is eDNA toegepast naast reguliere methoden. De relatieve trefkans met eDNA is vervolgens berekend door het aantal locaties waarop de soort met eDNA is aangetoond te delen door het aantal locaties waarop de soort met alle ingezette methoden samen is aangetoond. Dit kan leiden tot een overschatting van de trefkans met eDNA, aangezien locaties waar de soort met geen enkele methode werd gedetecteerd buiten beschouwing blijven. Dergelijke studies geven echter inzicht in de prestaties van eDNA ten opzichte van reguliere methoden.
- **Aantal onderzochte locaties:** het aantal locaties waarop de eDNA-methode is getest.
- **Bemonsteringsperiode:** de periode van het jaar waarin bemonsterd is.
- **Habitattypen:** de verschillende habitats waarin bemonsterd is
- **Bemonsteringsmethode:** specificaties van de toegepaste methodiek, zoals aantal deelmonsters, monstervolume en filtratietechnieken.
- **Aanvullende informatie:** opmerkelijke of methodologisch cruciale details uit de onderzochte bronnen.

Op basis van deze criteria is per soort beoordeeld of er “voldoende kennis” beschikbaar is voor het opstellen van een eDNA-inventarisatieprotocol (zie hoofdstuk 3). Daarmee wordt bedoeld dat er voldoende bewezen is dat de eDNA-methode effectief en betrouwbaar is om de aan- of afwezigheid van een soort vast te stellen (ook in vergelijking met reguliere inventarisatiemethoden die reeds worden toegepast). Dit is gedaan op basis van de (wetenschappelijke) literatuur, nog niet gepubliceerde onderzoeken die gedeeld zijn door leden van de begeleidingsgroep aangevuld met bijna 15 jaar praktijkervaring en expert-judgement van leden van de begeleidingsgroep (voor de meeste soorten zijn reeds honderden of duizenden eDNA monsters verzameld in Nederland).

De begeleidingsgroep bestond uit vertegenwoordigers van soortenorganisaties, ecologische adviesbureaus, laboratoria, en leden van de eDNA-werkgroep van het Netwerk Groene Bureaus (zie colofon). Gezamenlijk is per soort tijdens online-bijeenkomsten een inhoudelijke beoordeling uitgevoerd, waarbij de gecombineerde kennis en ervaring is ingezet om te bepalen of de beschikbare informatie voldoende was om tot een goed onderbouwd protocol te komen. Hoewel niet voor alle soorten voor alle onderzochte criteria (wetenschappelijk) onderzoek beschikbaar is, is het oordeel "voldoende kennis" gebaseerd op het geheel van gegevens, inclusief veldervaring, kennis van de soort-experts, ervaringen met eDNA-onderzoeken naar de betrokken soorten en gedeelde inzichten van experts. Daarbij is ook meegewogen dat de eDNA-methoden doorgaans minimaal gelijke, maar vaak hogere, trefkansen gaven dan de momenteel gangbare methoden uit de inventarisatieprotocollen van het NGB. Deze integrale aanpak maakt het mogelijk om ook voor soorten waarvoor relatief minder publicaties beschikbaar zijn toch tot goed onderbouwde en verantwoorde protocollen te komen. De begeleidingsgroep heeft hierbij bewust een conservatieve benadering gehanteerd: wanneer de beschikbare kennis als onvoldoende werd beoordeeld, is ervoor gekozen om (vooralsnog) geen protocol op te stellen voor de betreffende soort of habitat.

3 - Opstellen van eDNA inventarisatieprotocollen per soort

Voor soorten waarvoor voldoende informatie beschikbaar is, zijn eDNA-inventarisatieprotocollen opgesteld. Deze protocollen zijn vergelijkbaar met de soortinventarisatieprotocollen van het NGB en bevatten:

- Informatie over het habitat van de soort
- Informatie over van de toe te passen bemonsteringsmethode (zoals totaal monstervolume en aantal deelmonsters).
- Richtlijnen voor het aantal bemonsteringen per oppervlak of in de tijd, waarbij de exacte invulling door een deskundig ecooloog bepaald wordt.
- De periode binnen het jaar waarbinnen eDNA betrouwbare resultaten geeft.

Algemene voorschriften voor het bemonsteren van eDNA in het veld (hoofdstuk 4) en het analyseren van eDNA in het laboratorium (hoofdstuk 5) worden beschreven in overkoepelende teksten omdat deze gelden voor alle soorten.

2.2 Samenwerking en toetsing

RAVON is door RVO gevraagd om, in samenwerking met experts en vertegenwoordigers van het Netwerk Groene Bureaus (NGB), de Zoogdiervereniging, Stichting ANEMOON en Datura, de protocollen op te stellen.

Verschillende partijen hebben inhoudelijke input geleverd en bijgedragen aan de toetsing van de werkwijze en protocollen. RAVON heeft het voortouw genomen, de literatuurstudie uitgevoerd en het eerste concept van de rapportage en protocollen opgesteld. RAVON (Jelger Herder, Rémon ter Harmsel en Jan Kranenbarg) hebben daarbij expertise ingebracht op het gebied van eDNA, monitoring, amfibieën en vissen. De input van ecologische adviesbureaus is door TAUW (Jeroen Nagtegaal) en de eDNA werkgroep van het Netwerk Groene Bureaus (NGB) geleverd (Peter Roemers en David Ekkers, Waardenburg Ecology) vanuit hun ruime ervaring met inventarisaties (waaronder eDNA) binnen vergunningstrajecten. Het DNA service lab Datura (Kees van Bochove en Jarno de Vaan) heeft input gegeven vanuit hun grote ervaring met eDNA bemonsteringen en analyses in Nederland voor de binnen dit project onderzochte soorten. Vanuit de soortenorganisaties hebben de Zoogdiervereniging (Maurice La Haye en Dick Bekker) en Stichting Anemoon (Adriaan Gemelig Meyling) input gegeven over eDNA, resp. de noordse woelmuis en de platte schijfhoren.

2.3 Reikwijdte eDNA-protocollen

Zoals reeds in de inventarisatieprotocollen van het NGB beschreven staat, is er in het kader van de Omgevingswet geen eenduidigheid over de inspanning die voldoende is om aanwezigheid van een soort uit te sluiten (juridische nul-waarneming). De hier opgestelde inventarisatieprotocollen met eDNA geven op basis van een combinatie van wetenschappelijke onderbouwing en expert judgement door soort-experts en eDNA-experts een richtlijn voor de inspanning die nodig is om de aanwezigheid van een soort aan te tonen of uit te sluiten d.m.v. eDNA-onderzoek. De ecooloog zal i.s.m. de eDNA expert van het lab moeten beoordelen of deze inspanning voor de specifieke situatie voldoende is. Bij uitzonderlijk grote of complexe projecten kan de ecooloog er voor kiezen de inspanning, alsmede inspanning met reguliere methoden, vooraf af te stemmen met bevoegd gezag.

De hier opgestelde inventarisatieprotocollen met eDNA bieden een aanvulling op reeds bestaande protocollen met reguliere methoden zoals die van het NGB of de kennisdocumenten van BIJ12. Qua reikwijdte en uitgangspunten zijn ze vergelijkbaar met die van het NGB. Deze zijn hieronder overgenomen en licht aangepast voor toepassing van de eDNA methode:

- De inventarisatieprotocollen eDNA beschrijven de minimum onderzoeksinspanning die nodig is om een soort redelijkerwijs, middels een gedragen en maatschappelijk verantwoorde onderzoeksinspanning uit te sluiten. Uitsluitende waarnemingen zijn immers juridisch noodzakelijk.
- Afwijken van de protocollen is altijd beargumenteerd mogelijk, mits dit een ecologisch inhoudelijke argumentatie betreft. Er zijn andere methoden denkbaar, zoals regulier onderzoek, om de afwezigheid van soorten aan te tonen. Het combineren van methoden is ook mogelijk, daar is in deze protocollen niet specifiek naar gekeken.
- De protocollen betreffen methoden voor eDNA onderzoek in het kader van de omgevingswet, onderdeel soortenbescherming, voor het aantonen of uitsluiten van de aanwezigheid van een soort,. Ze zijn niet bedoeld als protocol voor monitoringonderzoek, het bepalen of beschrijven van functies van habitats, of voor het bepalen van de omvang van de lokale populatie, een populatie binnen het plangebied of bijvoorbeeld aantalsmonitoring.

- De eDNA bemonsteringen in het kader van deze protocollen dienen altijd te worden uitgevoerd door ecologen met voldoende soortenkennis én kennis van het bemonsteren van eDNA en bijbehorende voorzorgsmaatregelen om deze correct uit te kunnen voeren en te kunnen interpreteren.

De hier opgestelde eDNA-protocollen zijn gebaseerd op analyse met qPCR, dit is de meest gangbare methode voor soortgerichte detectie met eDNA. Soorten kunnen echter ook worden gedetecteerd met andere technieken, zoals ddPCR (digital droplet PCR) en eDNA-metabarcoding. De lab analyses vielen oorspronkelijk buiten de opdracht voor het opstellen van de protocollen. Omdat deze toch onlosmakelijke verbonden zijn met de eDNA monsternamen zijn er wel kaders en globale richtlijnen gegeven voor de meest toegepaste analyse methode met qPCR, waarvoor reeds ook gedetailleerde richtlijnen beschikbaar zijn middels een Nederlandse praktijkrichtlijn (zie verder hoofdstuk 5). Hoewel met ddPCR en metabarcoding vergelijkbare trefkansen kunnen worden verkregen zijn deze methoden buiten beschouwing gelaten voor deze inventarisatieprotocollen. Dit omdat voor deze methoden nog generieke richtlijnen beschikbaar waren zoals bij qPCR. Dit wil echter niet zeggen dat deze methoden niet bruikbaar of betrouwbaar zijn wanneer deze worden uitgevoerd door gerenommeerde laboratoria. Het zijn beiden betrouwbare detectietechnieken voor eDNA dat al in de monsters zit. Bij ddPCR wordt het PCR-mengsel verdeeld in duizenden druppeltjes waarin afzonderlijke PCR-reacties plaatsvinden. Dit resulteert in een hoge gevoeligheid en betrouwbare kwantificatie, met doorgaans minder PCR-replica's dan bij qPCR. Bij eDNA-metabarcoding worden meerdere soorten gelijktijdig vermenigvuldigd met behulp van primers die zich richten op een groep soorten, bijvoorbeeld vissen of amfibieën. Het PCR-product wordt vervolgens uitgelezen via next-generation sequencing (NGS), waarbij de DNA-sequenties van alle vermeerderde fragmenten worden bepaald en vergeleken met een referentiedatabase. Op basis daarvan wordt een soortenlijst samengesteld, inclusief het aantal reads per soort.

3 Resultaten literatuurstudie en evaluatie per soort

3.1 Grote modderkruiper

Trefkans

Er zijn drie studies gevonden waarin de absolute trefkans per eDNA monster bepaald is. Dit is de trefkans op locaties die vooraf geselecteerd zijn op de aanwezigheid van grote modderkruiper. Het betreft Herder *et al.* (2012) welke een absolute trefkans van 87,5% vonden op 8 locaties, Thomsen *et al.* (2012) welke een trefkans van 100% vonden in 11 poelen waarvan bekend was dat de soort er voorkwam en 54% in 15 sloten waarvan onbekend was of de soort er voorkwam (wel zeker dat deze in het gebied zat waarbinnen de sloten lagen). De Jong & van Bochove (2016) vonden een absolute trefkans van 89% in 9 sloten (3 eDNA monsters per sloot). Kusanke *et al.* (2021) lieten een trefkans van 100% zien met 7 verschillende workflows in een experimentele opstelling waarbij 40 grote modderkruipers in een vijver waren geplaatst. Daarnaast zijn er nog drie studies die de relatieve trefkans laten zien t.o.v. parallel ingezette reguliere vangstmethoden op locaties waarvan vooraf niet bekend was dat de doelsoort er zat. De relatieve detectiekans wordt uitgedrukt als het percentage locaties waar de soort met eDNA is gedetecteerd, ten opzichte van het totaal aantal locaties waar de soort met ten minste één van de ingezette methoden is aangetroffen. Het gaat om Herder *et al.* (2014) waar een relatieve trefkans van 100% werd gevonden in 9 sloten, De Jong & van Bochove (2016) welke een relatieve trefkans van 95% vonden op 27 trajecten in sloten en Macheler *et al.* (2023) waar een relatieve trefkans van 100% werd gevonden in 4 sloten. De relatieve trefkans geeft informatie over de efficiëntie van de eDNA methode t.o.v. reguliere methoden. In Herder *et al.* (2014) was de trefkans met eDNA 2,7 keer hoger dan die met elektrovisser met gelijkstroom (250 meter, 45 minuten met 2 man). De trefkans met elektrovisser met gelijkstroom lag daarbij op maximaal 37,5%. In de Jong & van Bochove (2016) lag de trefkans in sloten waar met één van de ingezette methoden grote modderkruiper was aangetoond met eDNA per traject op 95% t.o.v. 63% met gelijkstroom, 32% met wisselstroom en 6% met het schepnet. Uit Sigsgaard *et al.* (2015) zijn geen trefkanssen te extraheren maar wordt wel beschreven dat de inspanning met eDNA grofweg vijf keer lager lag (56 uur om 300 uur) dan die met een combinatie van reguliere methoden (elektrovisser, schepnet en fuiken) voor het aantonen van grote modderkruipers.

Conclusie: samenvattend kan geconcludeerd worden dat de absolute trefkans met eDNA voor grote modderkruiper zeer hoog is, tegen de 90%. De lagere trefkans van 54% uit Thomsen *et al.*, 2012 is waarschijnlijk een onderschatting omdat enkel bekend was dat de soort in het gebied zat en niet perse in iedere onderzochte sloot. Deze hoge trefkans komt reeds uit oudere pilotstudies welke zowel bij de bemonstering (beperkt watervolume dan met huidige filters) en analyse (aantal PCR-replica's vaak lager (3 tot 12) een lagere inspanning hanteerden. De verwachting is daarom dat met de huidige bemonsterings- en analyse inspanning de trefkanssen minimaal gelijkwaardig of zelfs nog iets hoger liggen. T.o.v. reguliere methoden zoals elektrovisser, is in veel studies bewezen dat de trefkans met eDNA aanzienlijk hoger ligt (relatieve trefkans). De eDNA-methode heeft zich voor de grote modderkruiper voldoende bewezen om aanwezigheid van de soort ook uit te sluiten.

Periode van bemonsteren

De beste periode voor het bemonsteren van grote modderkruiper is afhankelijk van meerdere factoren. Herder *et al.* (2013) hebben twee sloten en een poel jaarrond

maandelijks bemonsterd. Daaruit kwam naar voren dat grote modderkruiper in een poel vrijwel iedere maand te detecteren was. Alleen in februari werd de soort niet gedetecteerd, toen lag er ijs en waren de grote modderkruipers mogelijk in winterrust. De twee sloten gaven tegengestelde resultaten. In de ene sloot werd een diepe kom bemonsterd en werd enkel eDNA gedetecteerd in de maanden juli tot december. Dit was te verklaren doordat de dieren in deze tijd in de diepere kom aanwezig waren (deels droogvallen van de rest van de sloot en winterrust). In de overige maanden waren de dieren juist de ondiepe delen van de sloot in getrokken en werden ze in het diepe deel niet gedetecteerd. In de tweede sloot werd grote modderkruiper enkel tussen april en september aangetroffen, in de overige maanden maakten ze gebruik van diepere plaatsen in het midden met een zeer dikke modderbodem (vaak meer dan 40 cm dik). Samen met een verminderde activiteit van de grote modderkruipers in deze periode is dat een mogelijke verklaring voor het feit dat er geen eDNA van grote modderkruipers is aangetoond in deze maanden. Kusanke *et al.* (2021) hebben eveneens jaarrond gekeken naar de trefkans voor grote modderkruiper (met uitzondering van december en januari toen de sloot droog was gevallen). Zij vonden detectie tussen februari en november waarbij de hoogste eDNA concentraties in de zomermaanden lagen (juni-september).

Samenvattend laten de resultaten zien dat het aantreffen van grote modderkruiper afhankelijk is van de volgende factoren:

- Het habitat op de locatie (voortplantingshabitat, zomerhabitat, winterhabitat), ze zijn in een open systeem vaak niet jaarrond op een locatie aanwezig. Dit maakt 2 bezoeken (1 in de paaiperiode en 1 in de dispersie/migratieperiode met minimaal 2 maanden ertussen), of een groter gebied bemonsteren om zo de verschillende habitats qua functies (paaihabitat en zomerhabitat) mee te nemen noodzakelijk).
- Activiteit van de grote modderkruipers: in perioden van winterrust zijn ze moeilijker te detecteren (daarom is de periode november-maart ongeschikt).
- Waterstanden, in het vroege voorjaar staat er veelal veel meer water in de sloten waardoor eDNA meer verdund wordt en de trefkans lager is.

Conclusie: de grote modderkruiper kan met eDNA goed gedetecteerd worden tussen april en oktober, dit is op basis van veldervaring de periode waarin de soort actief is (niet in winterrust), waarbij de optimale periode voor het bemonsteren ligt tussen juni en september wanneer waterstanden vaak laag zijn, er reeds larven en juvenielen in het water zitten en deze veelal gelijkmatig over een water verdeeld zijn. Doordat de soort in verschillende periodes van het jaar verschillende habitats gebruikt is het noodzakelijk om 2 bezoeken uit te voeren waarvan 1 in de paaiperiode (april-mei) en 1 in de dispersie/migratieperiode (juni/oktober) met minimaal 2 maanden ertussen of een groot gebied met daarin de verschillende functies (paaihabitat en zomerhabitat) 1-malig te bemonsteren (minimaal 5 locaties).

Habitats van toepassing

De habitat van de grote modderkruiper bestaat uit ondiepe wateren met een dikke modderlaag en veel waterplanten. Oorspronkelijk bevonden dergelijke wateren zich in de overstromingsvlakten van rivieren en beken en de aangrenzende veenwateren. Doordat deze gebieden in de loop der eeuwen ingepolderd en ontgonnen zijn, bevindt een aanzienlijk deel van het Nederlandse leefgebied zich tegenwoordig in poldersloten. Ook wordt de soort hier en daar nog in poelen of geïsoleerde wateren aangetroffen. In de bovengenoemde onderzoeken is een representatieve steekproef bemonsterd van de verschillende watertypen waarin de soort voorkomt. Inmiddels zijn er de afgelopen 15 jaar

alleen door RAVON al meer dan 1800 eDNA-monsters verzameld voor grote modderkruiper. Er zijn geen aanwijzingen dat er habitats zijn waarin de eDNA methode niet zou werken. Wel dient de ecooloog bij de bemonstering rekening te houden met de ecologie van de soort om voor de specifieke locatie te bepalen in welke tijd van het jaar de grote modderkruiper deze potentieel kan gebruiken en de bemonstering daarop af te stemmen.

Conclusie: in de verschillende onderzoeken (zie referenties hierboven) is een representatieve steekproef bemonsterd van de verschillende watertypen waarin de soort voorkomt. Daarnaast is er praktijkervaring in meer dan 1800 wateren in Nederland waaruit geen aanwijzingen zijn dat de eDNA-methode in bepaalde habitats niet zou werken. Geconcludeerd wordt dat de methode overal in Nederland toepasbaar is voor de grote modderkruiper.

Bemonsteringsinspanning

In hoofdstuk 4 staan richtlijnen voor de bemonsteringsinspanning beschreven. Aanbevolen wordt altijd deelmonsters te verzamelen (30 tot 50) over een traject van 250 meter en een filter te gebruiken voor filtratie van grotere volumes water.

Eindconclusie

Er is voldoende kennis (trefkans, periode en habitat) voorhanden om een eDNA-protocol op te stellen voor grote modderkruiper waarmee niet enkel aan- maar ook afwezigheid kan worden vastgesteld met voldoende zekerheid.

3.2 Kamsalamander

Trefkans

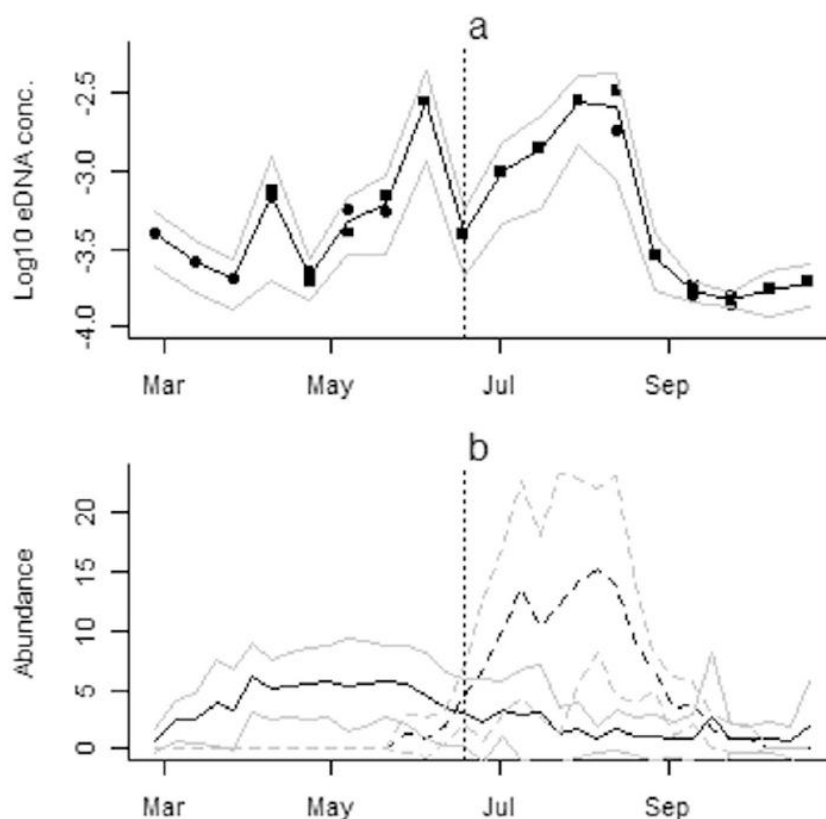
Er zijn drie studies gevonden waarin de absolute trefkans per eDNA monster bepaald is. Dit is de trefkans op locaties die vooraf geselecteerd zijn op de aanwezigheid van kamsalamander. Het betreft Thomsen *et al.* (2012) welke een absolute trefkans van 91% vonden in 11 poelen, Rees *et al.* (2014) welke een absolute trefkans van 84% vonden in 19 poelen en Biggs *et al.* (2015) welke een absolute trefkans van 99,6% vonden in 35 poelen die vier keer bemonsterd werden door professionals (139 van de 140 eDNA samples waren positief) en een absolute trefkans van 91,2% in 239 wateren bemonsterd door vrijwilligers. In Biggs *et al.* (2015) is ook de vergelijking gemaakt met gelijktijdige bemonsteringen met reguliere methoden in de 35 wateren (4x in het jaar). Daaruit kwam een trefkans van 44% voor het zoeken naar eieren, 76% voor het inzetten van flesvallen (een petfles met de bovenkant afgesneden er omgekeerd opgezet als kleine fuik) en 75% voor het zoeken met de zaklamp. Deze methoden worden vaak samen ingezet, flesvallen en zaklamp samen kwamen op een trefkans van 95% en daarmee in de buurt van de trefkans met eDNA (99,6%).

Conclusie: samenvattend kan geconcludeerd worden dat de absolute trefkans met eDNA voor kamsalamander zeer hoog is, boven de 90%. Enkel Rees *et al.* (2014) vonden een lage trefkans maar daar waren geen subsamples genomen (1 liter water verzameld en in het lab gefiltreerd). De zeer hoge trefkansen gevonden in Thomsen *et al.* (2012) en Biggs *et al.* (2015) komen ook uit reeds uit oudere pilotstudies waar een beperkter watervolume is bemonsterd dan tegenwoordig met filters gebeurt. Harper *et al.* (2024) hebben het protocol uit Biggs *et al.* (2015) vergeleken met de inzet van kleine filters en lieten zien dat de met

filters vergelijkbare of hogere trefkansen werden behaald. Iets wat ook beschreven is in Minemoto *et al.* (2016) en Hinlo *et al.* (2017). De verwachting is daarom dat met de huidige bemonsterings- en analyse inspanning de trefkansen minimaal gelijkwaardig of zelfs nog iets hoger liggen. De trefkans lag ook iets hoger t.o.v. reguliere methoden (volledig protocol). De eDNA-methode heeft zich voor de kamsalamander voldoende bewezen om aanwezigheid van de soort ook uit te sluiten.

Periode van bemonsteren

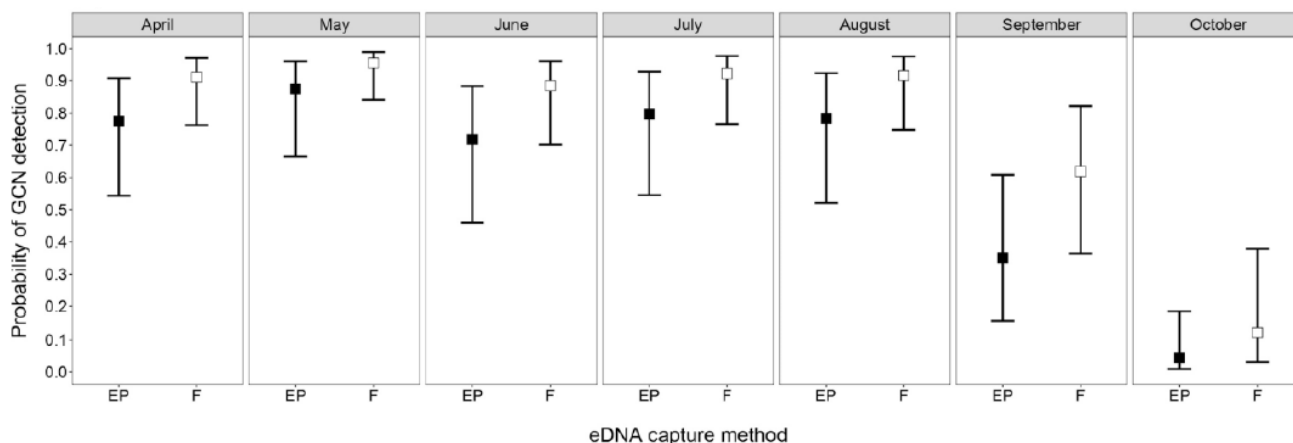
De beste periode waarin kamsalamander bemonsterd kan worden in het water met eDNA is gerelateerd aan de periode waarin adulten en/of larven van kamsalamander in het water aanwezig zijn. Er zijn in het Verenigd Koninkrijk twee studies gedaan waarbij gekeken is naar de trefkans met eDNA voor kamsalamander gedurende het seizoen. Buxton *et al.* (2017) keken naar de concentratie eDNA van kamsalamanders en vonden twee duidelijke pieken. De eerste in de eerste helft van juni wat overeenkomt met het einde van de voortplantingsperiode voor adulten en de tweede van half juli tot half augustus wanneer de aantallen en grootte van de larven piekt (zie figuur 1)



Figuur 1: overgenomen uit Buxton *et al.* (2017). De bovenste grafiek toont de eDNA concentratie per maand en de onderste grafiek het aantal kamsalamanders in het water (adulten als zwarte ononderbroken lijn en larven als zwarte onderbroken lijn, beiden met 95% betrouwbaarheidsintervallen).

Harper *et al.* (2024) hebben 18 wateren maandelijks bemonsterd tussen april en oktober met twee verschillende methoden: 6x 15ML water op ethanol en het gebruik van een klein filter. Hieruit kwam naar voren dat de trefkans iets hoger lag met de filters dan met de 6x

15ML water op ethanol. Daarnaast bleek dat voor de 18 wateren de trefkans boven de 90% lag tussen april en augustus waarna de trefkans duidelijk daalde in september en verder in oktober (zie figuur 2). Het oorspronkelijke eDNA protocol voor kamsalamander in het Verenigd Koninkrijk schrijft een monsterperiode voor tussen half april en eind juni (Biggs *et al.*, 2015). De studie van Harper *et al.* (2024) laat zien dat de kamsalamanders nog goed te bemonsteren zijn met eDNA tot in augustus door de aanwezigheid van larven.



Figuur 2: overgenomen uit Harper et al. (2024). Getoond wordt de trefkans per maand met de 6x 15ml water op ethanol (EP) en filters (F) gebaseerd op 18 onderzochte wateren (met 95% betrouwbaarheidsintervallen).

Buxton *et al.* (2018) hebben vier seizoenen met elkaar vergeleken: winter, lente, zomer en herfst. Daaruit concludeerden ze dat de trefkans buiten het voortplantingsseizoen laag waren, de zomer scoorde iets hoger dan de lente. In de herfst zakte de trefkans naar (minder dan) 50% en in de winter naar (minder dan) 25%

Conclusie: samenvattend kan worden gesteld dat de periode waarin kamsalamanders betrouwbaar kunnen worden bemonsterd met eDNA ligt tussen half april en augustus. Waarbij daarbinnen de hoogste trefkans ligt rond het einde van de voortplantingsperiode van de adulten (1^e helft juni) en de piek van het aantal en de grootte van de larven (half juli/half augustus). Om aan de veilige kant te zitten heeft de begeleidingsgroep gekozen voor de periode half april tot half augustus om in koude jaren zeker te zijn dat de kamsalamanders reeds in het water zitten en in warme jaren kamsalamanders sneller kunnen metamorfoser en wateren kunnen droogvallen waardoor eind augustus mogelijk te laat is.

Habitats van toepassing

Kamsalamanders kunnen zich voortplanten in een verscheidenheid aan watertypen. Op de zandgronden en in beekdalen leeft de soort in poelen, vijvers en matig voedselrijke vennen en leemputten. In het rivierengebied komt de soort voor in zelden overstromende laagdynamische strangen, kleiputten, kolken en ondiepe sloten. Ze hebben een voorkeur voor relatief grote, diepere (>50cm), stilstaande wateren met een rijke watervegetatie, afwezigheid van vis die zelden droogvallen. De bovengenoemde studies zijn grotendeels uitgevoerd in poelen, vijvers en vennen. De methode is in Nederland door RAVON en anderen reeds in honderden wateren ingezet. Hieruit zijn er geen aanwijzingen dat de methode in andere habitats zoals sloten en strangen niet zou werken.

Conclusie: in de verschillende onderzoeken (zie referenties hierboven) zijn vooral poelen, vijvers en vennen bemonsterd. Daarnaast is er praktijkervaring in honderden wateren in Nederland waaruit geen aanwijzingen zijn dat de eDNA-methode in bepaalde habitats/watertypen niet zou werken. Geconcludeerd wordt dat de methode overal in Nederland toepasbaar is voor de kamsalamander.

Bemonsteringsinspanning

In hoofdstuk 4 staan richtlijnen voor de bemonsteringsinspanning beschreven. Aanbevolen wordt altijd deelmonsters te verzamelen (30 tot 50) en een (klein) filter te gebruiken voor filtratie van grotere volumes water.

Eindconclusie

Er is voldoende kennis (trefkans, periode en habitat) voorhanden om een eDNA-protocol op te stellen voor kamsalamander waarmee niet enkel aan- maar ook afwezigheid kan worden vastgesteld met voldoende zekerheid.

3.3 Heikikker

Trefkans

Voor de heikikker is er één niet-gepubliceerde pilotstudie uit Nederland bekend waarbij is gekeken naar de absolute trefkans per eDNA monster (Datura niet-gepubliceerd). In deze studie zijn 9 wateren waaruit heikikkers bekend waren bemonsterd met twee methoden (6x 15ml water op ethanol en een klein filter). Het betrof vier vennen met een hoge dichtheid en vijf sloten met een lagere dichtheid. Met beide methoden werden in alle wateren heikikkers gedetecteerd wat in deze beperkte studie neerkomt op een trefkans van 100%. In Noorwegen is er een studie gedaan waarbij een absolute trefkans werd gevonden van 84% in 31 wateren gebruikmakend van eDNA metabarcoding (Osman *et al.*, 2022). De wateren waren vooraf geselecteerd op aanwezigheid van heikikker op basis van gegevens uit de Noorse openbare biodiversiteitsdatabank. Daarnaast is er nog één studie die de relatieve trefkans laten zien t.o.v. parallel ingezette reguliere vangstmethoden op locaties waarvan vooraf niet bekend was dat de doelsoort er zat. De relatieve detectiekans wordt uitgedrukt als het percentage locaties waar de soort met eDNA is gedetecteerd, ten opzichte van het totaal aantal locaties waar de soort met ten minste één van de ingezette methoden is aangetroffen. Het gaat om Olli *et al.* (2024) waar een relatieve trefkans van 82% in de koorperiode en 72% in 3-4 weken na de koorperiode werd gevonden in 17 wateren. De relatieve trefkans geeft informatie over de efficiëntie van de eDNA methode t.o.v. reguliere

methoden. In Olli *et al.* (2024) was de trefkans met eDNA 23% hoger dan op basis van luisteren naar roepende mannetjes (21 om 17 locaties).

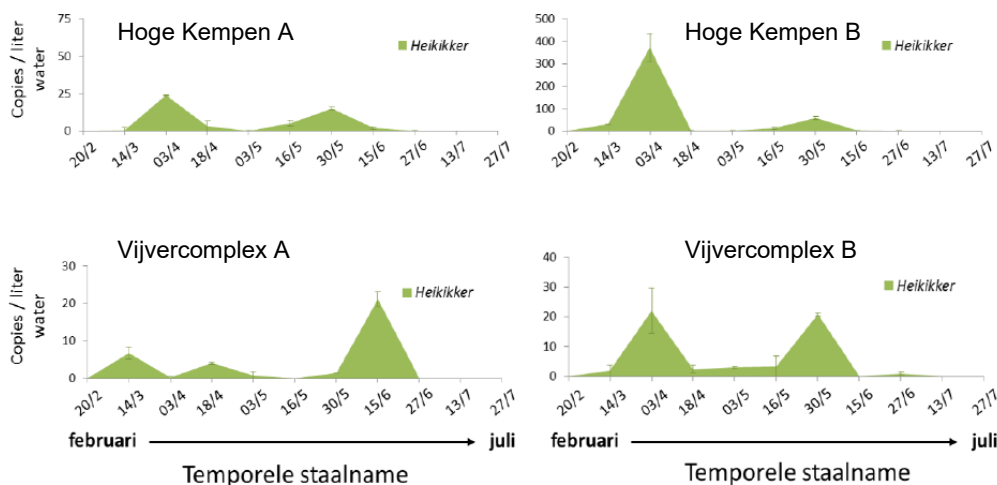
Conclusie: samenvattend kan geconcludeerd worden dat de absolute trefkans met eDNA voor heikikker hoog is in geïsoleerde wateren als poelen en vennen (100% in 5 vennen in Nederland en 84% in 31 wateren in Noorwegen), dit sluit ook aan bij de inschatting van experts op basis van eDNA detectie van andere amfibiesoorten. In sloten, zoals in laag-Nederland is er nog onvoldoende onderzoek gedaan naar de trefkans. Omdat heikikkers in dergelijke habitats vaak lokaal en in lage dichtheden voorkomen kunnen de resultaten behaald in geïsoleerde wateren als poelen en vennen niet zomaar geëxtrapoleerd worden. Voor sloten is er daarom nog onvoldoende kennis voorhanden om een inventarisatieprotocol met eDNA op te stellen.

Periode van bemonsteren

De beste periode waarin heikikker bemonsterd kan worden in het water met eDNA is gerelateerd aan de periode waarin adulten en/of larven van heikikker in het water aanwezig zijn. In Vlaanderen is een uitgebreide studie naar gedaan waarbij gekeken is naar de trefkans voor heikikker met eDNA gedurende het seizoen (Brys *et al.*, 2020b). Hierbij zijn tussen 20 februari en 27 juli 2018 elke drie weken vier wateren bemonsterd in twee gebieden (vennen en vijvers). Hieruit kwam naar voren dat de eDNA concentratie van heikikker gedurende het jaar duidelijk twee pieken liet zien. De eerste wanneer de adulten heikikkers in het water zaten voor de voortplanting (hier rond begin maart) en de tweede wanneer de larven tegen de metamorfose aanzaten (hier eind mei/begin juni). Opvallend was dat de heikikker tussen de twee pieken in niet detecteerbaar was met eDNA, hoewel er wel degelijk kleine larven in de wateren aanwezig moeten zijn geweest. Dit geeft aan dat timing van de monsternamen belangrijk is voor de detectiekans (wat ook het geval is bij onderzoek met traditionele methoden).

Op de hogere zandgronden warmen wateren relatief snel op en start de voortplanting relatief vroeg, afhankelijk van de temperaturen in het vroege voorjaar meestal tussen eind februari en eind maart. In de veenweide en poldergebieden van laag-Nederland warmen wateren in de regel minder snel op en begint de voortplanting meestal later vanaf maart tot half april.

Conclusie: samenvattend kan worden gesteld dat de timing voor de eDNA bemonstering bij heikikker van groot belang is voor de detectiekans waarbij gemikt dient te worden op de voorplantingspiek wanneer de adulten in het water zitten of op de maand voorafgaand aan de metamorfose wanneer er grote larven aanwezig zijn die door het metamorfoserende meer eDNA afscheiden. Dit is afhankelijk van de locatie in Nederland. Omdat de piek van de voortplanting en die van de larven relatief lastig te timen is worden 2 bemonsteringen voorgeschreven, eentje die zich richt op de piek van de voortplanting en eentje die zich richt op de maand voorafgaand aan de metamorfose.



Figuur xx: eDNA signaal gedurende het jaar voor heikikker gemeten in twee vennen en twee vijvers in Vlaanderen (bron: Brys et al., 2020b).

Habitats van toepassing

De heikikker heeft een voorkeur voor halfnatuurlijke, vochtige landschappen zoals heide, hoogveen en laagveen. Het voortplantingshabitat verschilt sterk tussen de zandgronden van hoog Nederland en de veenweide- en poldergebieden van laag Nederland. Op de hogere zandgronden maakt de heikikker vooral gebruik van voedselarme vennen en kleine geïsoleerde wateren in heide- en hoogveengebieden. Deze wateren zijn meestal ondiep, zonbeschenen en hebben vaak een lage pH (4,5–6,0). In laaggelegen gebieden zoals het veenweidegebied of klei-op-veen gebruikt de heikikker voor de voortplanting met name smalle, ondiepe sloten en greppels, kleiputjes, rabatten en ook poelen. Ze hebben daarbij een voorkeur voor structuurrijke, moerassige, zonbeschenen wateren met verlandingsvegetatie. De onderzoeken naar de toepassing van eDNA voor heikikker hebben zich voornamelijk gericht op vennen en poelen waarbij de methode goed werkt. In sloten (in Laag Nederland) zijn slechts 4 locaties onderzocht waarmee er nog onvoldoende onderzoek is gedaan om de werking van de eDNA-methode hier te valideren. In sloten in Laag Nederland komen heikikkers vaak enkel lokaal en in lagere dichtheden voor dan in vennen waardoor de habitats niet zomaar ter vergelijken zijn.

Conclusie: in de verschillende onderzoeken (zie referenties hierboven) zijn vooral vennen en poelen bemonsterd. Voor dergelijke geïsoleerde wateren is een hoge trefkans gevonden en kan geconcludeerd worden dat hier voldoende kennis beschikbaar is om een inventarisatieprotocol met eDNA op te stellen. In sloten, waarbinnen heikikkers in Laag-Nederland veelal voorkomen, is nog onvoldoende onderzoek gedaan. Omdat heikikkers in dergelijke habitats vaak lokaal en in lage dichtheden voorkomen kunnen de resultaten behaald in geïsoleerde wateren als poelen en vennen niet zomaar geëxtrapoleerd worden. Voor sloten is er daarom nog onvoldoende kennis voorhanden om een inventarisatieprotocol met eDNA op te stellen.

Bemonsteringsinspanning

In hoofdstuk 4 staan richtlijnen voor de bemonsteringsinspanning beschreven. Aanbevolen wordt altijd deelmonsters te verzamelen (30 tot 50) en een (klein) filter te gebruiken voor filtratie van grotere volumes water.

Eindconclusie

Er is onvoldoende kennis (trefkans, periode en habitat) voorhanden om een eDNA-protocol op te stellen voor alle habitats voor heikikker waarmee niet enkel aan- maar ook afwezigheid kan worden vastgesteld met voldoende zekerheid. Voor sloten waar de soort in lage dichtheden voorkomt is er onvoldoende onderzoek gedaan naar de trefkans. Voor poelen en vennen is er voldoende kennis voorhanden om een eDNA-protocol op te stellen voor heikikker waarmee niet enkel aan- maar ook afwezigheid kan worden vastgesteld met voldoende zekerheid. De periode van bemonsteren is onderzocht in België waarbij de resultaten in lijn liggen met de ecologie van de soort (piek rond voortplanting wanneer adulten in het water zitten en piek in de maand voor de metamorfose wanneer de larven groot zijn en veel eDNA afscheiden). Op de hogere zandgronden start de voortplantingsperiode doorgaans iets eerder (eind februari en eind maart) dan in later dan in de veenweide en poldergebieden van laag-Nederland (vanaf maart tot half april).

3.4 Noordse woelmuis

Trefkans

Beijering *et al.* (subm.) geven een overzicht van studies die zijn uitgevoerd naar de trefkans met eDNA voor noordse woelmuis op basis van het zoeken van keutels. Er zijn drie studies die absolute trefkansen geven. Dit is de trefkans op locaties die vooraf geselecteerd zijn op de aanwezigheid van noordse woelmuis of studies waarbinnen de soort op alle onderzochte locaties ook gevonden is. Het betreft Herder *et al.* (2015) welke een absolute trefkans van 100% vonden op 10 locaties, La Haye (2017) welke een absolute trefkans van 83,3% vonden op 12 locaties en De Kraker (2018) welke een absolute trefkans van 100% vond op 15 locaties. De Vaan (2024) heeft onderzoek gedaan op 36 locaties. Deze waren van te voren geselecteerd op het (waarschijnlijk) voorkomen van noordse woelmuis, waarbij het niet overal zeker was. Om aan de veilige kant te gaan zitten qua trefkansen hebben we ze hier voor de berekening beschouwd als aanwezig wat waarschijnlijk een lichte onderschatting geeft van de werkelijke trefkans. Er zijn drie eDNA methodes getest welke de volgende absolute trefkansen gaven: eDNA via keutels zoeken: 75%, eDNA via bodemonsters: 80,6% en eDNA via watermonsters: 80,6%.

Daarnaast is er nog één studie die de relatieve trefkans met eDNA-keutels zoeken laat zien t.o.v. parallel ingezette reguliere vangstmethoden (inloopvallen volgens standaardprotocol: enkele nachten 'prebaiting' waarbij de vallen in het veld geplaatst met het triggermechanisme geblokkeerd om de dieren te laten wennen en daarna twee dagen vangen met vier controles) op locaties waarvan vooraf niet bekend was dat de doelsoort er zat. De relatieve detectiekans wordt uitgedrukt als het percentage locaties waar de soort met eDNA is gedetecteerd, ten opzichte van het totaal aantal locaties waar de soort met ten minste één van de ingezette methoden is aangetroffen. Het gaat om La Haye en Dijkstra (2017) waar 15 locaties onderzocht waren met eDNA en inloopvallen en op slechts één locatie noordse woelmuis is aangetroffen met eDNA en op geen locaties met inloopvallen wat resulteert in een relatieve trefkans van 100%. Ook in de andere onderzoeken was

parallel regulier onderzoek uitgevoerd met inloopvallen waarbij de trefkansen voor inloopvallen beduidend lager lagen dan die met eDNA. Voor Herder *et al.* (2015) lag de trefkans met inloopvallen op 70% op 10 locaties, voor La Haye (2017) lag de trefkans met inloopvallen op 50% op 12 locaties en bij Kraker (2018) lag de trefkans met inloopvallen op 73% op 15 locaties. Gemiddeld komt dat neer op een trefkans van 65% met inloopvallen over 37 locaties.

Het zoeken van keutels geeft een vergelijkbare trefkans, maar tegelijk meer informatie dan eDNA-bodemmonsters of eDNA-watermonsters. Zo kunnen dichtheden worden afgeleid aan het aantal keutelhoopjes dat gevonden wordt (hoe lang er over gedaan wordt om 5 hoopjes te vinden) en geven de gevonden keutelhoopjes zeer gedetailleerde informatie over waar de noordse woelmuizen voorkomen. Wanneer geen keutels gevonden kunnen worden hebben eDNA-bodemmonsters de voorkeur omdat deze meer informatie geven dan eDNA-watermonsters. Dit omdat water meer mengt en bij aanwezigheid van stroming (niet alleen beken, maar ook in wateren waarin waterpeil wordt ingelaten bij droogte of juist wegstroomt na regen) eDNA zich met het water mee kan verplaatsen waardoor een eDNA detectie minder nauwkeurig te koppelen is aan de vindplaats dan bij de bodemmonsters.

Conclusie: samenvattend kan geconcludeerd worden dat de absolute trefkansen met eDNA voor noordse woelmuis door middel van het zoeken van keutels zeer hoog is, variërend tussen de 75% en 100% en gemiddeld genomen over alle pilotstudies 85%, waarbij dit waarschijnlijk nog een onderschatting is doordat het voorkomen van noordse woelmuis op de locaties uit de Vaan (2024) niet overal zeker was. De trefkansen met bodemmonsters lag op (minimaal) 80,6%. Deze trefkansen liggen ruim hoger dan die met de reguliere methode met inloopvallen (65%). Vanwege het feit dat de keutelmonsters meer informatie opleveren (schatten van dichtheden en exacte locaties) hebben deze de voorkeur boven bodemmonsters. Bodemmonsters worden daarom als alternatief voorgesteld wanneer het niet lukt om keutels te vinden en hebben een voorkeur boven watermonsters welke minder nauwkeurig zijn qua plaatsbepaling (herkomst water kan van verder komen) en daarom zijn watermonsters niet opgenomen in de protocollen.

Periode van bemonsteren

Herder *et al.* (2015) hebben onderzoek gedaan naar de afbraak van DNA in keutels en hoe lang keutels herkenbaar bleven in het veld. Hiervoor zijn verse keutels van noordse woelmuis verzameld en buiten in het veld geplaatst onder een afdak (regenvrij) en open in het veld. Vervolgens zijn er om de twee dagen eDNA keutelmonsters verzameld. De keutels vrij in het veld bleken na 7 dagen door regen uit elkaar te zijn gevallen en niet meer als keutel te herkennen. De keutels onder het afdakje bleven tot het eind van het experiment (4 weken) nog als muizenkeutels herkenbaar. Zolang keutels herkenbaar waren, waren ze te identificeren met behulp van eDNA. In Nederland, waar het vaak regent, wijst de vondst van keutels daarom op recente aanwezigheid van de soort. De studie van De Vaan (2024) laat zien dat het mogelijk is om toch nog eDNA sporen te vinden van noordse woelmuis door het verzamelen van bodemmonsters wanneer keutels niet meer vindbaar zijn. In de gevonden publicaties staat niets vermeld over de (optimale) periode waarbinnen noordse woelmuis met eDNA en keutels (of bodemmonsters) verzameld kan worden. Op basis van expert judgement en veldervaring wordt aangenomen dat de periode waarbinnen de soort goed met inloopvallen kan worden onderzocht overeenkomt met de periode waarbinnen goed keutels en andere eDNA-sporen kunnen worden gevonden. Dit is de periode in de augustus tot november waarbinnen de hoogste dichtheden aan noordse woelmuizen aanwezig zijn en de grootste activiteit te verwachten is.

Conclusie: op basis van expert judgement en praktijkervaring is gekozen voor dezelfde bemonsteringsperiode als het huidige onderzoek met inloopvallen omdat binnen die periode (augustus-november) de dichtheden aan noordse woelmuizen het hoogst zijn. Het zou heel waardevol zijn om experimenteel vast te stellen wat jaarrond de trefkansen van de diverse methoden zijn om te bekijken of de periode waarbinnen de soort betrouwbaar onderzocht kan worden kan worden uitgebreid.

Habitats van toepassing

De noordse woelmuis leeft vooral in hoge, kruidenrijke vegetaties op natte plekken zoals rietland, moeras, nat weiland en vochtige duinvalleien in West en Noord-Nederland. De soort is niet bang voor water en individuen bereiken zwemmend makkelijk eilandjes, waar de noordse woelmuis vaak als enige woelmuis voorkomt. In gebieden zonder andere woelmuizen leven ze soms ook op drogere plekken, zoals wegbermen of droog naaldbos. Noordse woelmuizen zijn gevoelig voor concurrentie van andere woelmuissoorten, maar gedijen in natte, dynamische terreinen waar andere woelmuissoorten het moeilijk hebben. In de bovenstaande studies is de methode middels eDNA en keutels zoeken succesvol getest in de belangrijkste habitats voor de soort zoals rietvelden, moerassen, extensief beheerde weilanden, drassige hooilanden en vochtige duinvalleien. In periodiek overstromende gebieden is de methode ook niet getest en blijkt het een uitdaging om keutels te vinden, Beijering *et al.* (subm.) suggereren dat hier gewerkt zou kunnen worden met het uitleggen van plaatjes waarop noordse woelmuizen hun keutels kunnen deponeren. Dit dient nog in de praktijk uitgetest te worden. In gebieden met een hele dichte vegetatie of een dikke laag bodemstrooisel kan het lastig zijn om keutels te vinden. Wanneer deze niet gevonden worden kan een eDNA bodemonster verzameld worden om toch nog een goede trefkans te verkrijgen.

Conclusie: de methode met eDNA-keutels zoeken is in de belangrijkste habitats voor de soort getest. Enkel in periodiek overstromende gebieden bleken keutels weg te spoelen en is de methode vooralsnog niet toepasbaar (aanvullend naar een methode met plaatjes waarop de noordse woelmuizen keutels deponeren loopt). Voor de bodemonsters zijn niet alle habitats onderzocht maar aangezien de eDNA-sporen hierin naar verwachting ook grotendeels afkomstig zijn van de keutels is het de verwachting geen afwijkende resultaten zal geven in vergelijkbare habitats.

Bemonsteringsinspanning

De volgende bemonsteringsinspanning wordt voorgeschreven op basis van eerdere onderzoeken waarmee trefkansen zijn bepaald (Beijering *et al.* (subm.)).

- Zoek maximaal één uur naar keutels binnen een locatie of totdat je vijf keutelhoopjes hebt verzameld in één eDNA keutelmonster. Een locatie bestaat uit een aangesloten stuk habitat met een oppervlak van maximaal 1,5 ha.
- Noteer de totale zoektijd wanneer de vijf keutelhoopjes binnen het uur verzameld werden (dit geeft een indicatie voor de habitatgeschiktheid en dichtheid aan woelmuizen).
- Noteer het aantal keutelhoopjes wanneer het niet lukt vijf keutelhoopjes te verzamelen binnen een uur (dit geeft een indicatie voor de habitatgeschiktheid en dichtheid aan woelmuizen). Een enkel keutelhoopje is in principe voldoende (bij een zoektijd van een uur), omdat onderzoek heeft uitgewezen dat het nagenoeg altijd om 1 woelmuissoort gaat in een gebied (Beijering *et al.* (subm.)). Voor de robuustheid van de inventarisatie en om een idee te krijgen van de dichtheid,

wordt desondanks geadviseerd om minimaal 5 keutelhoopjes te bemonsteren of minimaal één uur naar keutels te zoeken.

Wanneer het niet lukt om keutelhoopjes te verzamelen dient een bodemmonster te worden verzameld. Dit gaat door middel van 20 subsamples (volume 40ML per sample) door met steriele handschoenen bodem/strooisel of sediment te verzamelen verspreid over de locatie van bemonstering (per 1,5 ha. Aaneengesloten habitat één bodemmonster gelijk aan de keutelmonsters).

Zie verder de algemene voorschriften voor voorkomen van contaminatie (paragraaf 4.2), conservering van eDNA-monsters (paragraaf 4.3) en registratie van eDNA monsters (paragraaf 4.4).

Eindconclusie

Er is voldoende kennis (trefkans, periode en habitat) voorhanden om een eDNA-protocol op te stellen voor noordse woelmuis waarmee niet enkel aan- maar ook afwezigheid kan worden vastgesteld met voldoende zekerheid. Met uitzondering van periodiek overstromende gebieden. Het zou heel waardevol zijn om experimenteel vast te stellen wat jaarrond de trefkansen van de diverse methoden zijn om te bekijken of de periode waarbinnen de soort betrouwbaar onderzocht kan worden kan worden uitgebreid.

3.5 Platte schijfhoren

Trefkans

Voor de platte schijfhoren zijn er geen studies gepubliceerd die kijken naar de trefkans met eDNA voor de soort. Er is één niet-gepubliceerde pilotstudie uit Nederland bekend waarbij is gekeken naar de absolute trefkans per eDNA monster (Datura niet-gepubliceerd). In deze studie zijn 15 wateren waaruit platte schijfhoren bekend was bemonsterd met zowel eDNA als met reguliere methoden. Met eDNA werd de soort in 14 wateren aangetroffen wat neerkomt op een absolute trefkans van 93% en met de reguliere bemonstering in 13 wateren wat neerkomt op een trefkans van 87%.

Conclusie: de eDNA methode lijkt potentie te hebben voor het vaststellen van de aan- of afwezigheid van platte schijfhoren maar er is nog onvoldoende onderzoek naar de trefkans gedaan voor het opstellen van een goed onderbouwd, juridisch houdbaar, protocol.

Periode van bemonsteren

Er is nog weinig kennis over de optimale periode van bemonsteren met eDNA voor de platte schijfhoren. Datura heeft in een kleine studie in de winter in januari en februari ieder drie locaties bemonsterd waar de platte schijfhoren voorkwam maar kon de soort in deze maanden niet detecteren met eDNA. Detectie met eDNA in de wintermaanden lijkt daarom weinig kansrijk maar voor de overige maanden van het jaar ontbreekt nog kennis. De eDNA monsters uit de pilot studie met 15 locaties waren allen in augustus verzameld, op één monster na dat op 26 juni was verzameld (scoorde wel positief 4/12 PCR replica's).

Conclusie: er is nog onvoldoende kennis beschikbaar over de periode waarbinnen platte schijfhoren met eDNA bemonsterd kan worden. Detectie in de wintermaanden lijkt weinig kansrijk, voor de overige maanden is meer onderzoek nodig.

Habitats van toepassing

De platte schijfhoren leeft vooral in ondiepe, zonnige en voedselrijke wateren met veel onderwatervegetatie, zoals plassen en sloten in (veen)weidegebieden. Andere biotopen zijn voedselrijke duin- en laagveenplassen en het overstromingsgebied van de grote rivieren

De soort komt minder vaak voor op klei en nauwelijks op zandbodems. Belangrijke planten in het leefgebied zijn o.a. draadwieren (voor jonge dieren), waterpest, hoornblad, kroossoorten, en in betere waterkwaliteit ook krabbescheer en kranswieren. De soort verdraagt lichte verrijking van het water, maar is gevoelig voor vervuiling, zoals afvalwater en intensief gebruik van mest en bestrijdingsmiddelen. De hoogste dichtheden worden gevonden in vegetatierijke, matig voedselrijke veensloten met ecologisch beheer. In overbemeste sloten (bijv. bij boerderijen of maïsakkers) met veel kroos en weinig onderwaterplanten, ontbreekt de soort vrijwel altijd. Er zijn nog onvoldoende habitats bemonsterd om uitspraken te kunnen doen over de toepasbaarheid in alle habitats.

Conclusie: er is nog onvoldoende kennis beschikbaar over de habitats waarbinnen platte schijfhoren met eDNA bemonsterd kan worden. Meer onderzoek is nodig.

Bemonsteringsinspanning

In hoofdstuk 4 staan richtlijnen voor de bemonsteringsinspanning beschreven. Aanbevolen wordt altijd deelmonsters te verzamelen (30 tot 50) en een (klein) filter te gebruiken voor filtratie van grotere volumes water.

Conclusie

Er is onvoldoende kennis voorhanden om een eDNA-protocol op te stellen voor platte schijfhoren. De methode lijkt kansrijk maar het aantal locaties waarop de methode getest is laag. Met name voor locaties met lage dichtheden van platte schijfhoren is de trefkans nog niet voldoende onderzocht. Daarnaast ontbreekt kennis over in welke maanden de methode kan worden toegepast en is de methode nog niet in alle habitats voldoende getest.

4 Richtlijnen eDNA bemonsteringen in het veld

4.1 Bemonsteringsprotocol

Voor het bemonsteren van eDNA in water zijn diverse protocollen in omloop. In de eerste toepassingen werd per locatie slechts drie keer 15 ml water in buisjes met ethanol verzameld (Ficetola *et al.*, 2008; Thomsen *et al.*, 2012), wat desondanks zeer hoge trefkansen opleverde. Omdat eDNA niet homogeen in het water is verdeeld, vergroot het nemen van meerdere deelmonsters de trefkans (Herder *et al.*, 2014; Brys *et al.*, 2020a; Troth *et al.*, 2021). In de jaren na de eerste studies werd een verbeterd protocol ontwikkeld waarbij 20 deelmonsters van elk 30 ml werden verzameld, resulterend in een totaalmonster van 600 ml. Hieruit werden vervolgens zes submonsters van 15 ml in ethanol genomen (Biggs *et al.*, 2015). Later werden filters geïntroduceerd, waarmee grotere waterhoeveelheden kunnen worden gefiltreerd, wat de trefkans verder verhoogd (Harper *et al.*, 2024).

Voor kleine stilstaande wateren (≤ 1 ha) is een bewezen methode het verzamelen van 30 tot 50 deelmonsters met een totaal volume van 2 liter. Dit water wordt vervolgens gefiltreerd met bijvoorbeeld Sterivex-filters, Sylphium-filters of vigiDNA-filters. Voor grotere wateren (> 1 ha) en stromende wateren zijn grotere monstervolumes vereist, aangezien eDNA in deze systemen sneller verdund wordt (Pont *et al.*, 2022). In dergelijke situaties kunnen bemonsteringen worden uitgevoerd met bijvoorbeeld vigiDNA-filters, Envirocheck HV-samplingcapsules of andere filters met grote capaciteit, die in combinatie met een peristaltische pomp tot 60 liter water kunnen filtreren. De in deze eDNA protocollen behandelde soorten (grote modderkruiper, kamsalamander en heikikker) bevinden zich bij voorkomen in grote stilstaande wateren in de oeverzones. Waardoor volstaat monsters met een kleiner volume te nemen. Waarbij het totaal aantal monsters gerelateerd is aan de oeverlengte (zie protocollen) voor voldoende dekking. In snelstromende wateren zijn de soorten niet te verwachten, in langzaam stromende delen van rivieren en grote beken kunnen grote modderkruipers voorkomen, op deze locaties is het noodzakelijk een groot volume te bemonsteren.

Gezien de diversiteit aan methoden die momenteel in gebruik zijn is het niet mogelijk—en vanuit innovatieperspectief ook niet wenselijk—om één vaste methode aan te wijzen. Het literatuuronderzoek toont aan dat uiteenlopende methoden (zeer) hoge trefkansen opleveren voor de doelsoorten. Zelfs de minimale inspanning uit de eerste eDNA-studies gaf al zeer hoge trefkansen (veelal hoger dan reguliere methoden). Inmiddels worden door alle betrokken partijen gevoeligere methoden toegepast. Daarnaast is de meest geschikte methode afhankelijk van de locatie en de omvang van het te bemonsteren gebied.

Gezien de huidige kennis gelden als richtlijn de volgende punten:

- **Verzamel altijd deelmonsters** (30 tot 50) over een traject van bijvoorbeeld 250 meter, of rond de hele poel. Dit vergroot de trefkans aanzienlijk omdat eDNA niet gelijkmatig verdeeld is over een water.
- **Gebruik filters** om relatief grote watervolumes te kunnen bemonsteren in het veld waarmee een monstervolume van minimaal 100ML tot 2L afhankelijk van hoe troebel het water is gefiltreerd kan worden. *

- **Bemonster het oppervlak:** bemonster de bovenste 30 tot 50cm van het water en bemonster (ruim) boven de bodem zodat er geen sediment/bodem in de monsters komt wat de analyses kan belemmeren.

** uitzondering: in langzaamstromende beken en rivieren is het noodzakelijk grote watervolumes te bemonsteren met filters met grote capaciteit (min 10L)*

Daarnaast wordt, net als in de soortinventarisatieprotocollen van het NGB, de keuze voor de exacte bemonsteringsmethode overgelaten aan de ecooloog die de bemonstering uitvoert, in overleg met het laboratorium dat de analyses verzorgt. Indien nodig kan voorafgaand afstemming met het bevoegd gezag plaatsvinden.

4.2 Voorkomen van contaminatie

Omdat de eDNA-methode extreem gevoelig is en zelfs minieme hoeveelheden eDNA kan detecteren, is zorgvuldig werken en het voorkomen van contaminatie in het veld essentieel voor betrouwbare resultaten. De volgende richtlijnen zijn hierbij van toepassing.

- **Draag wegwerphandschoenen** tijdens de bemonstering om kruisbesmetting tussen monsters te voorkomen.
- **Gebruik per eDNA-monster nieuwe, DNA-vrije materialen**, zoals handschoenen, filters, waterschepjes, verzamelzakken en siliconenslangen.
- **Minimaliseer of voorkom hergebruik van hulpmiddelen** die direct in contact komen met het water of het monster:
 - Voor kleine monstervolumes kan dit door uitsluitend wegwerpmaterialen te gebruiken.
 - Voor grotere monstervolumes kan een peristaltische pomp worden ingezet. Deze voorkomt direct contact met het monster doordat alleen de buitenkant van de siliconenslang wordt aangeraakt.
 - Indien hergebruik van materialen onvermijdelijk is (zoals monsterstokken of bepaalde type vacuümpompen), moeten deze grondig worden gedesinfecteerd tussen de bemonsteringen door, bijvoorbeeld met Virkon S. In het geval van hergebruik van materialen kan overwogen worden om ook negatieve veldcontroles te verzamelen waarmee potentiële contaminatie via hergebruikte materialen kan worden opgespoord.
- **Voorkom besmetting van eDNA monsters door fysiek contact met het water** (via waadpak of laarzen), een boot, andere bemonsteringsmethoden:
 - **Bemonster vanaf een boot altijd vóór de boeg uit** in water waar nog niet overheen is gevaren. In stromend water dient bemonstering altijd tegen de stroom in te gebeuren.
 - **Bemonster bij voorkeur vanaf de waterkant.** Indien wadend bemonsteren noodzakelijk is, houd de bemonsteringsapparatuur met gestrekte arm ver voor je uit en vermijd contact met het monstergebied. In stromend water dient bemonstering ook hier altijd tegen de stroom in te gebeuren.
 - **Neem eDNA-monsters altijd vóór het toepassen van reguliere bemonsteringsmethoden** zoals schepnetten, fuiken of andere methoden die het water kunnen verstoren. Denk hierbij ook aan onderhoudsmachines zoals maaiboten die van locatie naar locatie gaan (dus niet net na een maaibeurt bemonsteren).

- **Houdt rekening met potentiële instroom van eDNA van elders.** In stilstaand water verspreidt eDNA zich doorgaans slechts over korte afstanden, waardoor de detectie van eDNA van de doelsoort een directe aanwijzing is voor de aanwezigheid ervan. In slootsystemen en andere open watersystemen kan echter transport van eDNA plaatsvinden, met name onder invloed van hydrologische fluctuaties. Tijdens droge periodes wordt vaak water ingelaten om het waterpeil te handhaven, wat kan leiden tot de instroom van extern eDNA. Omgekeerd kan bij hevige neerslag water worden afgevoerd via sloten, ook hierdoor kan op een locatie extern eDNA in het bemonsteringsgebied terecht komen. In geïsoleerde poelen speelt dit geen rol, aangezien er geen uitwisseling met andere waterlichamen plaatsvindt. De grote modderkruiper (*Misgurnus fossilis*) komt voornamelijk voor in de haarvaten slootstructuren van poldersystemen, waar het water vaak zeer ondiep is. In deze kleine sloten is de invloed van gebiedsvreemd eDNA waarschijnlijk gering. In boezemwateren, kanalen en bredere vaarten kan dit effect echter aanzienlijk zijn, waardoor de herkomst van aangetroffen eDNA minder eenduidig is. Het is aan de ecooloog om in te schatten of extern eDNA een rol kan spelen op de bemonsteringslocatie en hier bij de timing van de bemonstering rekening mee te houden.

4.3 Conservering van eDNA-monsters

DNA in eDNA-monsters degradeert snel, waardoor het essentieel is om direct na de monsternamen het eDNA te conserveren en verdere afbraak te voorkomen. Er zijn verschillende conserveringsmethoden beschikbaar, die vaak samenhangen met de bemonsteringsstrategie en de analysemethode in het laboratorium.

- **Buffer toevoegen:** dit is de meest toegepaste conserveringsmethode. Er zijn verschillende buffers/conserveringsmiddelen in omloop welke aan de eDNA monsters kunnen worden toegevoegd om verdere afbraak van DNA voorkomen. Hierbij kan onderscheid gemaakt worden tussen buffers die het monster geheel conserveren zoals ethanol, DESS oplossing, RNAlater en lysesbuffers waarbij DNA al wordt vrijgemaakt in de buffer zoals Longmire's buffer en Sarkosyl buffer. De keuze voor een buffer hangt vaak samen met de laboratoriumanalyse die volgt. Sommige buffers maken langdurige opslag bij kamertemperatuur mogelijk, wat de logistiek van eDNA-bemonstering en transport naar het laboratorium aanzienlijk vereenvoudigt.
- **Invriezen:** direct na het filtreren kunnen de filters gekoeld worden getransporteerd en vervolgens op kantoor of in het laboratorium worden ingevroren. Hierbij is het cruciaal om te voorkomen dat de monsters te warm worden, aangezien dit de DNA-afbraak versnelt. Herhaaldelijk invriezen en ontdooien heeft bovendien een negatieve invloed op de DNA-opbrengst.
- **Drogen:** dit wordt zover bekend niet toegepast in Nederland, maar met behulp van silicagel of een andere vochtonttrekker worden gedroogd, waarna ze weken tot maanden bij kamertemperatuur bewaard kunnen blijven. Een nadeel van deze methode is dat het lastig kan zijn om een filter in een capsule volledig droog te krijgen, wat de effectiviteit van conservering kan beïnvloeden.

4.4 Registratie van de monsters

Het werken met eDNA vereist grote nauwkeurigheid en discipline. In tegenstelling tot traditioneel veldwerk, waarbij dieren of sporen direct in het veld worden waargenomen en resultaten soms kunnen worden gevalideerd op basis van geheugen (herinneren dat een soort op locatie x was gezien), is dat bij eDNA niet mogelijk. Daarom is een zorgvuldige en consistente registratie en labeling van de monsters essentieel.

Bij registratie valt in ieder geval te denken aan de volgende gegevens:

- **Unieke monster-code:** gebruik unieke codes die zowel op de filters, de doosjes/zakjes waarin filters of monsters worden opgeslagen, als op een veldformulier of digitaal systeem worden genoteerd. Deze unieke codes worden bij voorkeur door het lab dat de bemonsteringsmaterialen levert gegenereerd en anders centraal binnen de organisatie van de uitvoerende partij (dit om onbedoelde dubbeling door zelf gekozen codes te voorkomen). Dubbelcheck deze codes altijd, aangezien dit de enige koppeling vormt tussen de analyseresultaten en de bemonsteringslocatie.
- Locatiennaam
- **Coördinaten** (vastgelegd met GPS of telefoon)
- Datum van bemonstering
- Personen die de monsters hebben verzameld
- **Beschrijving van het monstertraject:** bijvoorbeeld lengte van het bemonsterde traject of het volledige waterlichaam (poel, sloot, etc.).
 - Foto van het bemonsteringstraject
- **Gegevens over mogelijk instromend water:** noteren of dit ter plaatse een rol speelt en of er in een natte periode (veel regenval) of droge periode (potentiële waterinlaat) bemonsterd is.
- **Informatie over eventuele problemen** die zich hebben voorgedaan tijdens de monsternamen.

4.5 Achtergrondinformatie

Hierboven zijn de belangrijkste generieke aandachtspunten met betrekking tot eDNA-bemonsteringen besproken. Voor meer achtergrondinformatie verwijzen we naar de volgende bronnen:

- Environmental DNA - toepassingsmogelijkheden voor het opsporen van (invasieve) soorten (Herder *et al.*, 2014)
- Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species (Goldberg *et al.*, 2016)
- A practical guide to DNA-based methods for biodiversity assessment (Bruce *et al.*, 2021)

5 Richtlijnen laboratorium vereisten en analyses

Net als bij de bemonstering van eDNA zijn ook voor de analyses van de eDNA-monsters uiteenlopende protocollen in omloop bij verschillende laboratoria. Zo kunnen er bijvoorbeeld verschillen bestaan in extractieprotocollen of de gebruikte primers tussen laboratoria. Ook hierin zijn nog steeds ontwikkelingen en innovaties gaande. Het strikt vastleggen van één enkel protocol of primer is daarom niet haalbaar en ook niet wenselijk, er zijn meerdere methoden om tot een betrouwbaar resultaat te komen.

Om de kwaliteit van eDNA-analyses te waarborgen, zijn echter minimale criteria vastgesteld waaraan zowel de analyses als de laboratoria moeten voldoen. Deze criteria zijn vastgelegd in de Nederlandse praktijkrichtlijn NPR 7394: *Water - Algemene principes bij kwaliteitsborging van moleculairbiologisch onderzoek voor micro-organismen en environmental DNA*. De richtlijn is opgesteld door een projectgroep met vertegenwoordigers en eDNA-experts van diverse organisaties en laboratoria in Nederland. Na een publieke commentaarrronde is de praktijkrichtlijn in 2022 definitief vastgesteld (NEN, 2022).

In de hieronder volgende paragrafen worden de belangrijkste kwaliteitscriteria samengevat, en worden richtlijnen gegeven met betrekking tot primers, het minimale aantal PCR-replica's en -cycli, evenals de registratieprocedures in het laboratorium. Tot slot wordt kort ingegaan op de opslag van DNA-extracten voor contra-analyses of de analyse van aanvullende soorten. Deze protocollen en richtlijnen richten zich op analyses met qPCR en niet op analyses met ddPCR of metabarcoding, hoewel er wel veel overlap is (zie de reikwijdte in paragraaf 2.3).

5.1 NEN Praktijkrichtlijn

Laboratorium met gescheiden ruimten

Bij eDNA-analyses wordt gewerkt met extreem lage DNA-concentraties, in tegenstelling tot DNA-onderzoek bij bijvoorbeeld micro-organismen of weefselmonsters. Daarom is een speciaal ingericht laboratorium noodzakelijk voor het werken met eDNA. Dit laboratorium bestaat uit meerdere fysiek gescheiden ruimten, waarbij onderdruk en overdruk worden toegepast om te voorkomen dat DNA uit ruimten met hoge concentraties zich kan verplaatsen naar ruimten met lage concentraties.

Voor het werken met eDNA worden vier afzonderlijke ruimtes aanbevolen:

- **Reagentia-bereidingsruimte** (overdrukruimte): voor de bereiding van reagentia die worden gebruikt bij de monsteropwerking, de bereiding van PCR-mixen, en het oplossen van primers.
- **eDNA-monstervorbereidingsruimte** (overdrukruimte): voor de extractie van eDNA en het toevoegen van DNA-extract aan de reactiemix.
- **DNA-monstervorbereidingsruimte** (neutrale of onderdrukruimte): voor de extractie van weefselmonsters (bijvoorbeeld voor referentiedatabases) en de voorbereiding en toevoeging van positieve controles/standaarden.
- **PCR-ruimte** (onderdrukruimte): voor de amplificatie door middel van PCR en de verdere verwerking van het PCR-product voor verificatie via sequencing.

Daarnaast wordt een strikte werkstroom gehanteerd: binnen één werkdag is het niet toegestaan om vanuit een ruimte met een hoge DNA-concentratie naar een ruimte met een lage DNA-concentratie te gaan. Dit minimaliseert het risico op contaminatie en verhoogt de betrouwbaarheid van de analyses.

Voorzorgsmaatregelen ter voorkoming van contaminatie

- Draag wegwerphandschoenen en vervang deze bij elke handeling en/of bij het betreden van een andere ruimte.
- Gebruik wegwerp-laboratoriumjassen of, indien niet mogelijk, wissel per ruimte van laboratoriumjas.
- Maak gebruik van een luchtcirculatiesysteem in combinatie met ultraviolet licht om eventueel vrijgekomen DNA af te breken.
- Desinfecteer werkoppervlakken vóór en na gebruik met een chlooroplossing.

Controles bij de analyses

- **Negatieve controles:** deze monsters (blanco's) doorlopen hetzelfde extractie- en PCR-proces als de eDNA-monsters en dienen ter detectie van mogelijke contaminatie.
- **Positieve controles:** deze worden toegevoegd aan de PCR en bevatten hoogwaardig DNA van de doelsoort om te verifiëren dat de analyse correct verloopt.
- **Rendements-/inhibitiecontrole:** hierbij wordt een niet-natuurlijk 'controle-gen' met een vaste concentratie aan elk eDNA-monster toegevoegd voorafgaand aan de extractie. Afwijkingen in de verwachte detectie kunnen duiden op PCR-inhibitie. Indien inhibitie optreedt (stoffen die de PCR reactie verstoren of blokkeren), kunnen vervolgstappen worden genomen om tot een betrouwbaar resultaat te komen, aangezien inhibitie kan leiden tot vals-negatieve resultaten.

Zie voor meer gedetailleerde informatie over de verschillende laboratoriumprocessen de Nederlandse praktijkrichtlijn NEN 7394 (NEN, 2022).

5.2 Primers en probes

De gebruikte primers en probes dienen zich te richten op korte DNA-fragmenten, aangezien eDNA-fragmenten doorgaans niet langer zijn dan 150 basenparen (Deagle *et al.*, 2006). De primers en probes dienen middels drie stappen gevalideerd te zijn:

- **In silico:** het ontwerpen en testen van de primers op de computer, om te verzekeren dat ze soortspecifiek zijn en uitsluitend DNA van de doelsoort amplificeren.
- **In vitro:** het testen van de primers in het laboratorium op weefsel van de doelsoort en nauw verwante soorten. Dit dient om te bevestigen dat de primers uitsluitend DNA van de doelsoort amplificeren en geen vals-positieve resultaten geven bij nauw verwante soorten. Daarnaast wordt hier de gevoeligheid van de primers bepaald, met zowel de detectiegrens (*Limit of Detection*, LOD) als de kwantificeringsgrens (*Limit of Quantification*, LOQ).
- **In situ:** het testen van de primers op monsters uit het veld, verzameld op locaties met hoge en lage dichtheden van de doelsoort en ter controle eveneens op locaties waar de doelsoort afwezig is.

Zie voor meer gedetailleerde informatie de review over toepassingsmogelijkheden van eDNA (Herder *et al.*, 2014).

5.3 Aantal PCR replica's en PCR cycli

Omdat eDNA in lage concentraties voorkomt, zeker wanneer doelsoorten in lage dichtheden aanwezig zijn, moeten er speciale voorzorgsmaatregelen getroffen worden in de amplificatie stap. Vanwege de PCR stochasticiteit (de kans dat een PCR reactie faalt doordat de primers niet weten te binden aan doel DNA bij een zeer lage hoeveelheid DNA van de doelsoort) moet er een hoog aantal PCR replica's worden uitgevoerd (multi-tube approach (Taberlet *et al.*, 1996)). Uit de resultaten blijkt dat regelmatig maar 1 van de 12 replica's positief is, wat indiceert dat de eDNA concentratie van de doelsoort in het monster in dat geval erg laag is (maar de soort dus wel aanwezig). Hiermee wordt de noodzaak van het hoge aantal replica's benadrukt om de resultaten betrouwbaar te krijgen. Ficetola *et al.* (2015) hebben berekend dat een minimum van 12 PCR-replica's nodig is voor het aantonen van soorten die in lage dichtheden voorkomen (lagere trefkans). In Biggs *et al.* (2015) is dit hoge aantal PCR-replica's in het veld gevalideerd.

Omdat betrouwbaarheid van de uitkomst van de analyses voor de vergunningverlening van groot belang is, zeker bij het uitsluiten van soorten, **wordt een minimum van 12 PCR replica's voorgeschreven voor het analyseren van watermonsters met PCR of qPCR.**

De PCR bestaat uit een reeks cycli, waarbij elke PCR-cyclus drie stappen omvat: denaturatie, annealing en extensie. In iedere cyclus wordt het doel-DNA verdubbeld. Bij traditioneel gebruik van PCR of qPCR – waarbij gewerkt wordt met hoogwaardige kwaliteit en hogere concentraties DNA – worden doorgaans 30 tot 45 cycli uitgevoerd om een specifiek DNA-fragment tot miljoenen kopieën te vermenigvuldigen. Bij eDNA-analyses ligt de uitgangskoncentratie van doel-DNA echter vaak extreem laag. Omdat een laag aantal cycli de kans vergroot dat de doelsoort niet wordt gedetecteerd, wordt het aantal PCR-cycli bij eDNA-analyses vaak verhoogd ten opzichte van traditionele PCR/qPCR. In verschillende studies zijn daarom meer dan 50 cycli toegepast (Dejean *et al.*, 2011, 2012; Ficetola *et al.*, 2008; Goldberg *et al.*, 2011; Jerde *et al.*, 2011; Thomsen *et al.*, 2012a). Deze aanpak vereist echter voorzichtigheid, aangezien het verhogen van het aantal cycli ook de kans op vals-positieve resultaten vergroot. Dit komt doordat de gevoeligheid voor het oppikken van sporen van contaminatie eveneens toeneemt. Werken in een speciaal voor eDNA ingericht laboratorium is daarom essentieel (zie paragraaf 5.1). Omdat verschillende laboratoria op verschillende manieren werken is ervoor gekozen hier geen vast aantal cycli te geven in deze protocollen maar het enkel als aandachtspunt te beschrijven.

5.4 Registratie laboratorium:

Een zorgvuldige en consistente registratie en labeling van eDNA-monsters is essentieel, evenals een nauwkeurige vastlegging van de analyseresultaten. Belangrijke registratiegegevens omvatten:

- **Binnenkomst van eDNA-monsters:**
 - Datum en tijd van ontvangst.
 - Staat van het monster: visuele inspectie op mogelijke beschadigingen aan de zending, doosjes, buisjes of filters. Controle op lekkages (monstervolume of hoeveelheid buffer correct). Indien monsters bevroren hadden moeten blijven, controleren of ze niet ontdooid zijn. Alle afwijkingen moeten worden geregistreerd.
- **Personeel dat de analyses uitvoert.**
- **Datum van analyse:** geeft, in combinatie met de datum van monsternamen, inzicht in de bewaar- en conserveringstijd van de monsters.
- **Uitkomsten van controles:** resultaten van positieve, negatieve en inhibitie controles
- **Afwijkingen van standaardprotocollen en problemen:** eventuele afwijkingen van de standaardprocedures en problemen die zich tijdens de analyse hebben voorgedaan, dienen te worden gedocumenteerd.
- **Rapportage van resultaten:** bij qPCR worden het aantal positieve PCR-replica's en, indien kwantificeerbaar, de gedetecteerde hoeveelheid DNA uitgedrukt als concentratie in kopieën per monstervolume, vastgelegd. Deze gegevens moeten worden gekoppeld aan de unieke monstercode.

5.5 Gegevens delen met NDFF

Indien toegestaan binnen het project, moeten de gegevens worden gedeeld met de Nationale Database Flora en Fauna (NDFF). Dit draagt bij aan de kennis over de verspreiding van soorten en maakt een extra validatieslag mogelijk door soortexperts, die onwaarschijnlijke waarnemingen kunnen signaleren. Deze taak ligt in eerste instantie bij het adviesbureau en/of de opdrachtgever.

5.6 Optioneel bewaren eDNA-extracten

In de meeste gevallen wordt voldoende DNA geëxtraheerd uit de monsters, waardoor naast de analyse van de doelsoort later aanvullende analyses mogelijk zijn. Dit maakt het mogelijk om een contra-analyse uit te voeren of extra doelsoorten te analyseren. Het resterende DNA-extract uit de eDNA-monsters dient onder optimale omstandigheden te worden opgeslagen om de DNA-integriteit te behouden en degradatie te minimaliseren. De geschikte opslagmethode hangt af van de verwachte opslagduur en de beoogde toepassing van het DNA. Over het algemeen wordt opslag in een vriezer bij -20°C aanbevolen voor een periode van enkele jaren, terwijl langdurige opslag het best bij -80°C plaatsvindt. Het bewaren van eDNA-extracten is optioneel en vormt geen onderdeel van het protocol maar wordt hier als optie beschreven.

5.7 Achtergrondinformatie

Hierboven zijn de belangrijkste generieke aandachtspunten met betrekking tot eDNA-analyses en laboratoria samengevat. Voor meer achtergrondinformatie en details verwijzen we naar de volgende bronnen:

- Praktijkrichtlijn NEN 7394: Water - Algemene principes bij kwaliteitsborging van moleculairbiologisch onderzoek voor micro-organismen en environmental DNA (NEN, 2022) .
- Environmental DNA - toepassingsmogelijkheden voor het opsporen van (invasieve) soorten (Herder *et al.*, 2014)
- Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species (Goldberg *et al.*, 2016)

6 Protocollen

6.1 Grote modderkruiper

Foto: Jelger Herder



Functies

De grote modderkruiper leeft in ondiepe meestal kleine wateren (sloten), met een slibrijke bodem en doorgaans een structuurrijke watervegetatie zoals verlandingsvegetaties (maar niet noodzakelijk). In dergelijke wateren komen vaak weinig andere vissoorten voor en kunnen de omstandigheden extreem zijn (tijdelijke droogval en lage zuurstofconcentraties). Oorspronkelijk bevonden dergelijke wateren zich in de overstromingsvlakten van rivieren en beken en de aangrenzende veenwateren. Doordat deze gebieden in de loop der eeuwen ingepolderd en ontgonnen zijn, bevindt een aanzienlijk deel van het Nederlandse leefgebied zich tegenwoordig in poldersloten. Ook wordt de soort hier en daar nog in poelen of geïsoleerde wateren zoals oude strangen in het rivierengebied aangetroffen. Gedurende het jaar (voorjaar, zomer/herfst en winter) maken grote modderkruipers gebruik van verschillende habitats. In de voorplantingsperiode en tijdens de winter kunnen ze zeer geclusterd voorkomen. Het is daarom van belang op twee momenten in het jaar te bemonsteren of middels voldoende grote steekproef (minimaal 5 locaties met eDNA bemonsteren binnen een gebied, rekening houdend met de verschillende habitats). Tussen april en oktober zijn ze met zekerheid in het **voortplantings-/zomerhabitat** aanwezig, wat bestaat uit ondiepere delen van het water. In de winterperiode heeft de soort een inactieve periode en houdt ze zich op in het **winterbiotoop**: diepe, vaak slibrijke delen van het water zoals op kruisingen van sloten en bij stuwtjes, duikers en andere diepere plaatsen.

Werkwijze eDNA watermonsters grote modderkruiper

Functie	Methode	Leefgebied toepasbaar	Periode	Aantal bezoeken	Periode tussen bezoeken
Voortplantings- en zomerbiotoop *	eDNA-water	heel Nederland	apr-okt	2 bezoeken OF 1 bezoek met minimaal 5 eDNA-monsters **	1e bezoek april-mei, 2e bezoek minimaal 2 maanden later in periode jun-okt

* het winterbiotoop is niet goed met eDNA te onderzoeken doordat de trefkans wanneer de dieren ingegraven zitten in de modder waarschijnlijk lager is. Ook met traditionele methoden wordt het winterbiotoop niet onderzocht. In de NGB protocollen staat dat inschatting van het winterbiotoop op basis van expert-judgement door de ecoloog plaatsvindt.

** 2 bezoeken met ieder 1 eDNA-monster per oppervlakte/lengte eenheid **OF** minimaal 5 eDNA monsters op verschillende locaties in het plangebied of in de omgeving in watergangen die in verbinding staan (dus minimaal 5 lengte-eenheden van 250meter), om vast te stellen of uit te sluiten dat de soort in een gebied aanwezig is met een enkel bezoek (in periode april-okt). In een geïsoleerd water zoals een poel volstaat een enkel bezoek.

Richtlijnen inspanning (aantal eDNA-watermonsters) per oppervlak

Poelen, vennen, plassen	Aantal eDNA-monsters
tot 1 ha	1 monster - gehele water rondom *
> 1ha (= ~350m oeverlengte)	bemonsteren zoals lijnvormig water op basis van oeverlengte

Lijnvormig water	Aantal eDNA-monsters
Tot 1000 meter aan slootlengte	1 per 250m**
1000-3000 meter slootlengte	1 per 333m met een minimum van 4 ***
3000-8000 meter slootlengte	1 per 400m met een minimum van 9 ***
>8000 meter slootlengte	1 per 500m met een minimum van 20 ***

* bij aanwezigheid van meerdere poelen wordt 1 monster per poel verzameld

** wanneer het plangebied kleiner is dan 250 meter dan moet het eDNA monster wel over een lengte van 250 meter verzameld worden om de trefkans hoog te houden (bijvoorbeeld sloot die voor 100 meter in plangebied ligt en daarbuiten doorloopt)

*** wanneer de gezamenlijke totale lengte van de sloot/sloten groter is dan 1000m slootlengte zal het niet meer integraal bemonsterd worden. Het is dan belangrijk om bij de bemonsteringen de verschillende functies (paaihabitat en zomerhabitat) en habitats op te nemen binnen de bemonstering.

Richtlijnen voor verzamelen eDNA watermonster

Voor een eDNA watermonster gelden de volgende vereisten: **Verzamel altijd deelmonsters** (30 tot 50 schepjes) over een traject van 250 meter, of rond de hele poel. Bemonster hierbij kansrijke locaties zoals vegetatierijke oeverzones, de kopse kant van doodlopende slootjes, bij stuwtjes etc., zorg daarbij voor voldoende spreiding. En maak gebruik van **filters** om relatief grote watervolumes te kunnen bemonsteren in het veld (honderden milliliters tot tientallen liters, afhankelijk van de situatie). Zie verder de uitgebreide richtlijnen in hoofdstuk 4 van dit rapport.

Voor de analyses staan de minimale vereisten in **hoofdstuk 5** van dit document. Belangrijkste zijn: volg de NPR praktijkrichtlijn en analyseer minimaal 12 PCR replica's per monster.

6.2 Kamsalamander



Foto: Jelger Herder

Functies

Voortplantingsbiotoop

Kamsalamanders kunnen zich voortplanten in een verscheidenheid aan watertypen. Op de zandgronden en in beekdalen leeft de soort in poelen, vijvers en matig voedselrijke vennen en leemputten. In het rivierengebied komt de soort voor in zelden overstromende laagdynamische strangen, kleiputten, kolken en ondiepe sloten. Ze hebben een voorkeur voor relatief grote, diepere (>50cm), stilstaande wateren met een rijke watervegetatie, zonnige ligging, afwezigheid van vis en die zelden droogvallen. Maar ze kunnen ook in suboptimale wateren voorkomen.

Werkwijze eDNA watermonsters kamsalamander

Functie	Methode	Leefgebied toepasbaar	Periode	Aantal bezoeken
Voortplantingsbiotoop*	eDNA-water	heel Nederland	15 apr - 15 aug (optimaal 1e helft jun)	1

Richtlijnen inspanning (aantal eDNA-watermonsters) per oppervlak

Poelen, vennen, plassen	Aantal eDNA-monsters
tot 1 ha	1 monster - gehele water rondom *
> 1ha (= ~350m oeverlengte)	bemonsteren zoals lijnvormig water op basis van oeverlengte

Lijnvormig water	Aantal eDNA-monsters
Tot 1000 meter aan slootlengte	1 per 250m**
1000-3000 meter slootlengte	1 per 333m met een minimum van 4 ***
3000-8000 meter slootlengte	1 per 400m met een minimum van 9 ***
>8000 meter slootlengte	1 per 500m met een minimum van 20 ***

* bij aanwezigheid van meerdere poelen wordt 1 monster per poel verzameld

** wanneer het plangebied kleiner is dan 250 meter dan moet het eDNA monster wel over een lengte van 250 meter verzameld worden om de trefkans hoog te houden (bijvoorbeeld sloot die voor 100 meter in plangebied ligt en daarbuiten doorloopt)

*** wanneer de gezamenlijke totale lengte van de sloot/sloten groter is dan 1000m slootlengte zal het niet meer integraal bemonsterd worden. Het is dan belangrijk om bij de bemonsteringen de verschillende habitats en meest kansrijke plaatsen (inschatting ecooloog) op te nemen binnen de bemonstering.

Richtlijnen voor verzamelen eDNA watermonster

Voor een eDNA watermonster gelden de volgende vereisten: **Verzamel altijd deelmonsters** (30 tot 50 schepjes) over een traject van 250 meter, of rond de hele poel. Bemonster hierbij kansrijke locaties zoals vegetatierijke oeverzones, langs de noordoever van wateren (deze warmt het snelst op) en neem ook iets dieper water mee indien mogelijk, zorg daarbij voor voldoende spreiding. En maak gebruik van **filters** om relatief grote watervolumes te kunnen bemonsteren in het veld (honderden ml tot tientallen liters, afhankelijk van de situatie). Zie verder de uitgebreide richtlijnen in hoofdstuk 4 van dit rapport.

Voor de analyses staan de minimale vereisten in **hoofdstuk 5** van dit document. Belangrijkste zijn: volg de NPR praktijkrichtlijn en analyseer minimaal 12 PCR replica's per monster.

6.3 Heikikker



Foto: Jelger Herder

Functies

Voortplantingsbiotoop

De heikikker heeft een voorkeur voor half natuurlijke, vochtige landschappen zoals heide, hoogveen en laagveen. Het voortplantingshabitat verschilt sterk tussen de zandgronden van hoog Nederland en de veenweide- en poldergebieden van laag Nederland. Op de hogere zandgronden maakt de heikikker vooral gebruik van voedselarme vennen en kleine geïsoleerde wateren in heide- en hoogveengebieden. Deze wateren zijn meestal ondiep, zonbeschenen en hebben vaak een lage pH (4,5–6,0). In laaggelegen gebieden zoals het veenweidegebied of klei-op-veen gebruikt de heikikker voor de voortplanting met name smalle, ondiepe sloten en greppels, kleiputjes, rabatten en ook poelen. Ze hebben daarbij een voorkeur voor structuurrijke, moerassige, zonbeschenen wateren met verlandingsvegetatie. De voortplanting start doorgaans eerder op de hogere zandgronden waar wateren sneller opwarmen dan in laaggelegen gebieden.

Werkwijze eDNA watermonsters heikikker

Functie	Methode	Leefgebied toepasbaar	Periode	Aantal bezoeken	Periode tussen bezoeken
Voortplantingsbiotoop	eDNA-water	Vennen en poelen op hogere zandgronden	feb – mrt EN mei-jun	2	Eerste bezoek op piek voortplanting, 2 ^e bezoek in maand voor metamorfose larven (2-3 maand ertussen)
	eDNA-water	Vennen en poelen in Laag Nederland, laagveen-veenweide	mrt-apr EN jun	2	Eerste bezoek op piek voortplanting, 2 ^e bezoek in maand voor metamorfose larven (2-3 maand ertussen)

** Tip: houdt grotere referentiepopulaties in de omgeving in de gaten voor een goede timing.*

Let op: voor sloten is de eDNA methode nog onvoldoende gevalideerd om een betrouwbaar protocol op te stellen. Er zijn enkel protocollen voor vennen en poelen waar de soort in de regel in hogere dichtheden voorkomt dan in sloten.

Richtlijnen inspanning (aantal eDNA-watermonsters) per oppervlak

Poelen, vennen, plassen	Aantal eDNA-monsters
tot 1 ha	1 monster - gehele water rondom *
> 1ha (= ~350m oeverlengte)	bemonsteren zoals lijnvormig water op basis van oeverlengte

Oeverlengte	Aantal eDNA-monsters
Tot 1000 meter aan oeverlengte	1 per 250m
1000-3000 meter oeverlengte	1 per 333m met een minimum van 4 **
3000-8000 meter oeverlengte	1 per 400m met een minimum van 9 **
>8000 meter oeverlengte	1 per 500m met een minimum van 20 **

* bij aanwezigheid van meerdere poelen wordt 1 monster per poel verzameld

** wanneer de gezamenlijke totale lengte van de oever groter is dan 1000m oeverlengte zal het niet meer integraal bemonsterd worden. Het is dan belangrijk om bij de bemonsteringen de meest kansrijke plaatsen (inschatting ecoloog) op te nemen binnen de bemonstering.

Richtlijnen voor verzamelen eDNA watermonster

Voor een eDNA watermonster gelden de volgende vereisten: **Verzamel altijd deelmonsters** (30 tot 50 schepjes) over een traject van 250 meter, of rond de hele poel. Bemonster hierbij kansrijke locaties zoals vegetatierijke oeverzones, langs de noordoever van wateren (deze warmt het snelst op), zorg daarbij voor voldoende spreiding. En maak gebruik van **filters** om relatief grote watervolumes te kunnen bemonsteren in het veld (honderden ml tot tientallen liters, afhankelijk van de situatie). Zie verder de uitgebreide richtlijnen in hoofdstuk 4 van dit rapport.

Voor de analyses staan de minimale vereisten in **hoofdstuk 5** van dit document. Belangrijkste zijn: volg de NPR praktijkrichtlijn en analyseer minimaal 12 PCR replica's per monster.

6.4 Noordse woelmuis



Foto: Jelger Herder

Functies

Biotoop

De noordse woelmuis leeft vooral in hoge, kruidenrijke vegetaties op natte plekken zoals rietland, moeras, nat weiland en vochtige duinvalleien in West en Noord-Nederland. De soort is niet bang voor water en individuen bereiken zwemmend makkelijk eilandjes, waar de noordse woelmuis vaak als enige woelmuis voorkomt. In gebieden zonder andere woelmuizen leven ze soms ook op drogere plekken, zoals wegbermen of droog naaldbos. Noordse woelmuizen zijn gevoelig voor concurrentie, maar gedijen in natte, dynamische terreinen waar andere soorten het moeilijk hebben. De belangrijkste habitats voor de soort zijn rietvelden, moerassen, extensief beheerde weilanden (met pitrus), drassige hooilanden en vochtige duinvalleien. Ook komt de soort voor in periodiek overstromende gebieden (meer onderzoek voor nodig voordat eDNA keutelmonsters kunnen worden toegepast omdat deze door het periodiek overstromen waarschijnlijk moeilijk te verzamelen zijn).

Werkwijze eDNA keutel/bodem monsters noordse woelmuis

Functie	Methode	Leefgebied toepasbaar	Periode	Aantal bezoeken	Inspanning
Leefgebied	eDNA keutels	heel Nederland behalve periodiek overstromende gebieden*	aug-nov	1	maximaal 1 uur of tot 5 keutelhoopjes zoeken die in 1 eDNA mengmonster gaan. Indien geen keutels gevonden dan 1 bodem monster verzamelen

* In periodiek overstromende gebieden is de eDNA keutelmonstermethode moeilijk toepasbaar omdat het een uitdaging kan zijn om keutels te vinden. Daarom wordt de methode in dergelijke gebieden nog niet inzetbaar geacht en zal eerst meer onderzoek moeten worden gedaan naar de trefkans in dergelijke gebieden.

Richtlijn inspanning (aantal eDNA keutel/bodemmonsters) per oppervlak

Habitat	Aantal eDNA-monsters
Leefgebied	1 per 1,5 ha leefgebied *

* zie richtlijnen hieronder

Richtlijnen voor verzamelen eDNA keutelmonster

- Zoek maximaal één uur naar keutels binnen een locatie of totdat je vijf keutelhoopjes hebt verzameld in één eDNA keutelmonster. Een locatie bestaat uit een aangesloten stuk habitat met een oppervlak van maximaal 1,5 ha.
- Zoek op kansrijke plekken zoals wissels of looppaden en let op afgebeten plantenstengels. Woelmuiskeutels zijn herkenbaar aan hun kleine formaat en cilindervorm. Afhankelijk van het voedsel kan de kleur variëren van helder- tot donkergroen tot bijna zwart. Zoek door op je knieën op de grond te gaan zitten en til hier en daar de vegetatie op.
- Noteer de totale zoektijd wanneer de vijf keutelhoopjes binnen het uur verzameld werden (dit geeft een indicatie voor de habitatgeschiktheid en dichtheid aan woelmuizen).
- Noteer het aantal keutelhoopjes wanneer het niet lukt vijf keutelhoopjes te verzamelen binnen een uur (dit geeft een indicatie voor de habitatgeschiktheid en dichtheid aan woelmuizen). Een enkel keutelhoopje is in principe voldoende (bij een zoektijd van een uur), omdat onderzoek heeft uitgewezen dat het nagenoeg altijd om 1 woelmuissoort gaat in een gebied (Beijering *et al.* (subm.). Voor de robuustheid van de inventarisatie en om een idee te krijgen van de dichtheid, wordt desondanks geadviseerd om minimaal 5 keutelhoopjes te bemonsteren of minimaal één uur naar keutels te zoeken.

Wanneer het niet lukt om keutelhoopjes te verzamelen dient een bodemmonster te worden verzameld, dit dient te gebeuren op dezelfde kansrijke plekken als hierboven beschreven.

Richtlijnen voor verzamelen eDNA bodemmonster (als keutels vinden niet lukt!)

Voor een eDNA bodemmonster (wanneer het niet lukt keutelhoopjes te vinden) gelden de volgende vereisten: **Verzamel minimaal 20 deelmonsters** van 40ML ieder om tot een totaal monster te komen van 800ML bodem. Doe dit door met steriele handschoenen bodem/strooisel of sediment te verzamelen verspreid over de locatie van bemonstering (binnen de eenheid van 1,5 ha leefgebied).

Zie verder de algemene voorschriften voor voorkomen van contaminatie (paragraaf 4.2), conservering van eDNA-monsters (paragraaf 4.3) en registratie van eDNA monsters (paragraaf 4.4).

Voor de analyses staan de minimale vereisten in **hoofdstuk 5** van dit document. Belangrijkste zijn: volg de NPR praktijkrichtlijn en analyseer minimaal 12 PCR replica's per monster.

7 Aanbevelingen

Deze rapportage bevat voor vier van de vijf onderzochte soorten (gedeeltelijke) eDNA-protocollen en vormt een solide basis voor het ontwikkelen van protocollen voor andere soorten volgens een vergelijkbare werkwijze. Voor sommige soorten van de hier onderzochte soorten ontbreekt momenteel nog voldoende kennis om protocollen op te stellen voor specifieke habitats of voor de soort als geheel. Desondanks is de eDNA-methode voor deze soorten veelbelovend. Met gerichte vervolgstudies naar bijvoorbeeld geschikte habitats en bemonsteringsperioden kunnen deze protocollen mogelijk alsnog worden opgesteld of uitgebreid. Hoofdstuk 3 benoemt per soort de belangrijkste kennishiaten.

Daarnaast is het aan te bevelen om in de toekomst voor andere soorten inventarisatieprotocollen met eDNA op te stellen volgens een vergelijkbare werkwijze. Op deze manier wordt de kwaliteit en uniformiteit geborgd.

Aangezien eDNA-toepassingen zich voortdurend ontwikkelen, kunnen nieuwe innovaties bijdragen aan efficiëntere en/of kosteneffectievere methoden. Deze rapportage schetst daarom vooral kaders met minimale eisen, waarbinnen innovatie mogelijk blijft. Het verdient aanbeveling om de protocollen over enkele jaren opnieuw te evalueren en waar nodig aan te passen of uit te breiden.

Tot slot kunnen eDNA-inventarisaties goed worden gecombineerd met reguliere methoden, zoals ook gebeurt in de soortinventarisatieprotocollen van het NGB (2023), waarin voor sommige soorten een combinatie van technieken wordt voorgeschreven. Zo ontstaat een completer beeld van de aan- of afwezigheid van soorten.

8 Literatuur

- Beijering, K.N., D.L. Bekker, N. Beemster & M. La Haye, subm. eDNA as a Tool for Reliable and Efficient Small Mammal Inventory: A Case Study on the Endangered Root Vole in the Netherlands.
- Biggs, J., Ewald, N., Valentini, A., Gaboriaud, C., Dejean, T., Griffiths, R. A., Foster, J., Wilkinson, J. W., Arnell, A., Brotherton, P., Williams, P., & Dunn, F. (2015). Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Biological Conservation*, 183, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.029>
- BIJ12, 2017. Kennisdocumenten Soorten – Natuurbescherming. Website van BIJ12:
- Bruce K, Blackman R, Bourlat SJ, Hellström AM, Bakker J, Bista I, Bohmann K, Bouchez A, Brys R, Clark K, Elbrecht V, Fazi S, Fonseca V, Hänfling B, Leese F, Mächler E, Mahon AR, Meissner K, Panksep K, Pawlowski J, Schmidt Yáñez P, Seymour M, Thalinger B, Valentini A, Woodcock P, Traugott M, Vasselon V, Deiner K (2021) A practical guide to DNA-based methods for biodiversity assessment. Advanced Books.
- Brys R., A. Haegeman, D. Halfmaerten, S. Neyrinck, A. Staelens, J. Auwerx & T. Ruttink, 2020a. Monitoring of spatiotemporal occupancy patterns of fish and amphibian species in a lentic aquatic system using environmental DNA. *Molecular Ecology*. 2021;30:3097–3110
- Brys, R., Cox, K. & Neyrinck S., 2020b. Ontwikkeling van een monitoringsprotocol voor heikikker: bepaling van de aanwezigheid en verhouding bruine en heikikker via (e)DNABarcoding en opstart genetische monitoring. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2020 (8). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel. DOI: doi.org/10.21436/inbor.17686189
- Brys, R., Halfmaerten, D., Neyrinck, S., Mauvisseau, Q., Auwerx, J., Sweet, M., & Mergeay, J., 2021. Reliable eDNA detection and quantification of the European weather loach (*Misgurnus fossilis*). *Journal of Fish Biology*, 98(2), 399–414.
- Buxton, A. S., Groombridge, J. J., Zakaria, N. B., & Griffiths, R. A. (2017). Seasonal variation in environmental DNA in relation to population size and environmental factors. *Scientific Reports*, 7, 46294. <https://doi.org/10.1038/srep46294>
- De Vaan, J., 2024. eDNA-detectietechnieken voor de noordse woelmuis. Hogeschool Van Hall Larenstein.
- Deagle, B.E., Eveson, J.P., Jarman, S.N., 2006. Quantification of damage in DNA recovered from highly degraded samples - a case study on DNA in faeces. *Front. Zool.* 3, 11.
- Dejean, T., Valentini, A., Duparc, A., Pellier-Cuit, S., Pompanon, F., Taberlet, P., Miaud, C., 2011. Persistence of Environmental DNA in Freshwater Ecosystems. *PLoS ONE* 6, e23398.
- Dejean, T., Valentini, A., Miquel, C., Taberlet, P., Bellemain, E., Miaud, C., 2012. Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *J. Appl. Ecol.* 49, 953–959.
- Ficetola, G.F., Miaud, C., Pompanon, F., Taberlet, P., 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol. Lett.* 4, 423
- Gmelig Meyling, A., A. Boeseveld & V. Kalkman, 2014. Monitoring- en verspreidingsonderzoek mbt de Platte schijfhoren. Stichting Anemoon en EIS.
- Goldberg, C., R. Cameron R. Turner, K. Deiner, P. Taberlet, J.E. Herder *et al.*, 2016. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *May 2016 Methods in Ecology and Evolution* 7(11). DOI: 10.1111/2041-210X.12595
- Goldberg, C.S., Pilliod, D.S., Arkle, R.S., Waits, L.P., 2011. Molecular detection of vertebrates in stream water: a demonstration using Rocky Mountain tailed frogs and Idaho giant salamanders. *PloS One* 6, e22746.

- Harper, L.R., K. J. Harper, S. Platts, R. Irwin, M. Bennett, B. Jones, O. Taylor, L. Plant, D. Eccleshall, A. Briscoe, L. Gorman, K. Stanhope & B. Egeter, 2024. Extending sampling approaches for great crested newt (*Triturus cristatus*) eDNA monitoring. *BioRxiv*. doi:
- Herder, J.E., A. de Bruin & J. Kranenbarg. 2013a. Beste tijd van het jaar voor eDNA onderzoek aan de grote modderkruiper. Stichting RAVON, Nijmegen. Rapport 2012-040.
- Herder, J.E., A. Valentini, E. Bellemain, T. Dejean, J.J.C.W. van Delft, P.F. Thomsen en P. Taberlet., 2014. Environmental DNA - toepassingsmogelijkheden voor het opsporen van (invasieve) soorten. Stichting RAVON, Nijmegen. Rapport 2013-104.
- Herder, J.E., D. Bekker, R. Koelman and E. Bellemain, 2013b. Noordse woelmuis en waterspitsmuis beter in beeld - net eDNA op het goede spoor. *Zoogdier 24-2*, pagina 8-10. (download PDF)
- Herder, J.E., E. Bellemain, R. Witte, D. Bekker & M. La Haye, 2015. Noordse woelmuis inventariseren met eDNA. *De Levende Natuur*, jaargang 116 (2), pagina 67-69
- Herder, J.E., J. Kranenbarg, A. de Bruin and A. Valentini, 2013c. Op jacht naar DNA - Effectief zoeken naar grote modderkruipers. *Visionair 28*: 8-11. (download PDF)
- Herder, J.E., Valentini, A., Kranenbarg, J., 2012. Detectie van grote modderkruipers met behulp van Environmental DNA. *H2O 45*, 25
- Hinlo, R., Gleeson, D., Lintermans, M., & Furlan, E. (2017). Methods to maximise recovery of environmental DNA from water samples. *PLoS ONE*, 12, e0179251. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179251>
- Hommersen, V.J.A., A. van Woersem, M. Falzon, E. Jansen en H.J.G.A. Limpens, 2024. Handleiding NEMVleermuis transecttellingen Rapport 2024.22. Zoogdierverseniging, Nijmegen.
- Jerde, C.L., Mahon, A.R., Chadderton, W.L., Lodge, D.M., 2011. "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conserv. Lett.* 4, 150–157
- Jong, Th. de en K. van Bochove, 2016. De grote modderkruiper lastig te vangen? *De Levende Natuur* - jaargang 117 - nummer 2
- Kraker, K. (2018). Monitoring noordse woelmuis Natura 2000. Oosterschelde van Zierikzee tot de Weversinlaag. Ecologisch adviesbureau Sandvicensis.
- Kranenbarg, J., A. de Bruin, F. Spikmans, J.E. Herder, J. de Jong en B. Prudon, 2014. Nieuwe inventarisatiemethode helpt bij behoud (beschermde) grote modderkruiper. *H2O-online*, 21 oktober 2014.
- Kusanke, L. M., Panteleit, J., Stoll, S., Korte, E., Sünger, E., Schulz, R., & Theissinger, K. (2020). Detection of the endangered European weather loach (*Misgurnus fossilis*) via water and sediment samples: Testing multiple eDNA workflows. *Ecology and Evolution*, 10(15), Article 15.
- La Haye, M. & Dijkstra, V. (2017). Zoogdieren in Zuid-Holland: noordse woelmuis, bever in N2000-gebieden en konijntellingen. Rapport 2016.36. Zoogdierverseniging, Nijmegen.
- La Haye. (2017). e-DNA Noordse woelmuis kop van Schouwen. Rapport 2016.070. Zoogdierverseniging, Nijmegen.
- La Haye, M. & Schekkerman, H. (2017). Voorstel voor monitoring van de noordse woelmuis d.m.v. eDNA in N2000-gebieden en andere leefgebieden. Rapport 2016.30. Zoogdierverseniging, Nijmegen.
- Macher, T., R. Schutz, L.F. Klumper & F. Leese, 2023. Untersuchung zum Vorkommen des Europäischen Schlammpeitzgers (*Misgurnus fossilis*) im Bereich der Issel, des Wyler Meers und der Heubachniederung mit Hilfe von Umwelt-DNA-Analysen. Technical report, Universität Duisburg-essen, april 2023. DOI: 10.13140/RG.2.2.32555.25126
- Minamoto, T., Naka, T., Moji, K., & Maruyama, A. (2016). Techniques for the practical collection of environmental DNA: filter selection, preservation, and extraction. *Limnology*, 17, 23–32. <https://doi.org/10.1007/s10201-015-0457-4>

- NEN, 2022. Praktijkrichtlijn NEN 7394: Water - Algemene principes bij kwaliteitsborging van moleculairbiologisch onderzoek voor micro-organismen en environmental DNA. Stichting Koninklijk Nederlands Normalisatie Instituut, Delft.
- Netwerk Groene Bureaus, werkgroep 'Standaarden en protocollen' (2023) Soortinventarisatieprotocollen in het kader van de Wet natuurbescherming, versie nov 2023.
- Olli, S. P. Lampila, P. Lampila, L. Kvist & J. Honka, 2024. Development and optimization of a novel environmental DNA-based method for moor frog (*Rana arvalis*) monitoring and comparison with a commercial detection kit. Environmental DNA. DOI: 10.1002/edn3.516
- Osman OA, Andersson J, Martin-Sanchez PM, Eiler A (2022) National eDNA-based monitoring of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian species in Norway. Metabarcoding and Metagenomics 6: e85199.
- Pont D, Meulenbroek P, Bammer V, Dejean T, Erős T, Jean P, Lenhardt M, Nagel C, Pekarik L, Schabuss M, Stoeckle BC, Stoica E, Zornig H, Weigand A, Valentini A, 2022. Quantitative monitoring of diverse fish communities on a large scale combining eDNA metabarcoding and qPCR. Mol Ecol Resour. 2023 Feb;23(2):396-409. doi: 10.1111/1755-0998.13715.
- RAVON, 2020. Handleiding voor het monitoren van reptielen in Nederland - 4e druk. Stichting RAVON, Nijmegen.
- RAVON, 2023. Handleiding voor het monitoren van zoetwatervissen in Nederland -1e druk. Stichting RAVON, Nijmegen.
- RAVON, 2024. Handleiding voor het monitoren van amfibieën in Nederland -5e druk. Stichting RAVON, Nijmegen.
- Rees H.C., K. Bishop, D.J. Middleditch, J.R.M. Patmore, B.C. Maddison, K.C. Gough, 2014. The application of eDNA for monitoring of the Great Crested Newt in the UK. Ecology and Evolution, 4 (21) (2014), pp. 4023-4032, 10.1002/ece3.1272
- Sigsgaard, E. E., Carl, H., Møller, P. R., & Thomsen, P. F. (2015). Monitoring the near-extinct European weather loach in Denmark based on environmental DNA from water samples. Biological Conservation, 183, 46–52.
- Taberlet, P., Griffin, S., Goossens, B., Questiau, S., Manceau, V., Escaravage, N., Waits, L.P., Bouvet, J., 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. Nucleic Acids Res. 24, 3189.
- Thomsen, P.F., Kielgast, J., Iversen, L.L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M.T.P., Orlando, L., Willerslev, E., 2012. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. Mol. Ecol
- Troth., C. R., M. J. Sweet, J. Nightingale & A. Burian, 2021. Seasonality, DNA degradation and spatial heterogeneity as drivers of eDNA detection dynamics, Science of The Total Environment, Volume 768, 2021,
- Vergeer J.W., Boele A., van Bruggen J. & van Turnhout C. 2023. Handleiding Sovon Broedvogelmonitoring: Broedvogel Monitoring Project en kolonievogels. Sovon Vogelonderzoek Nederland, Nijmegen

RAVON

Reptielen Amfibieën Vissen Onderzoek Nederland

Natuurplaza

Toernooiveld 1 - 6525 ED Nijmegen

Postbus 1413 - 6501 BK Nijmegen

T: 024 - 7 410 600 (alg.)

www.ravon.nl

