

BVP-2023.01.2

eDNA filtratieprotocol vissen, amfibieën, platte schijfhoren en waterspitsmuis.

Let op: sample kit pas in het veld openmaken i.v.m. contaminatierisico!

Inhoud sample kit

- 2 paar handschoenen
- 1 blauwe bemonsteringsschep
- 1 steriele Whirl-Pak bag
- 1 buisje (5 ml) met conserverende buffer
- 1 wegwerppincet

Overige benodigdheden:

- Filterhouder (per sample)
- Opvangfles
- Vacuümpomp

Locatie van bemonstering

- Subsamples worden genomen langs een traject van 50 - 200 meter.

Verzamelen van subsamples

1. Trek een set handschoenen aan (denk aan contaminatie!).
2. Open de Whirl-Pak bag.
3. Verzamel 30 subsamples met behulp van de blauwe bemonsteringsschep. Mix het te bemonsteren water voorzichtig door de schep heen en weer te bewegen. Zorg ervoor dat de **bodem niet verstoord wordt, een verstoord bodem kan resulteren in onbetrouwbare resultaten bij de laboratorium analyse**. Daarnaast bevat bodem mogelijk historisch DNA. Vul de schep tot de rand en leeg deze in de Whirl-Pak bag.
4. Sluit de Whirl-Pak bag en schudt om de subsamples te vermengen.
5. Haal de filterhouder uit de verpakking en draai deze op de opvangfles.
6. Sluit de filterhouder aan op de pomp.
7. Giet het water uit de Whirl-pak bag voorzichtig op het filter.
8. Zet de pomp aan. Bij plassen, sloten en boezemwateren kan tot **maximaal 1 liter** water gefiltreerd worden. Dit duurt ongeveer 2 minuten. Bij troebel water kan het filter echter al eerder verstopt raken. Het is dus niet erg als het niet lukt om 1 liter water te filteren. **Giet het water daarom stukje bij beetje op het filter en filtreer altijd het gehele toegevoegde volume**. Noteer a.u.b. de hoeveelheid water die gefilterd kon worden.
9. Zet de pomp uit.

Conserveer de samples

10. Trek het tweede paar schone handschoenen aan om contaminatie te voorkomen.
11. Als het water gefilterd is, gebruik dan de plastic pincet om het filter voorzichtig los te maken en in het buisje met conserverende vloeistof te duwen. Bij lage temperaturen zal er precipitatie (neerslag) te vinden zijn in de buffer. Door deze even in de hand op te warmen wordt de buffer weer helder. Het is belangrijk om te voorkomen dat er vloeistof gemorst wordt! Stop het filter in het 5ml buisje. Het filter mag daarbij doorgescheurd worden. Het is dus niet erg als het filter in meerdere stukjes in het buisje overgebracht wordt. **Zorg dat het filter geheel onder de buffer staat zodat het eDNA niet kan afbreken**. Door slechts één pootje van de pincet te gebruiken kan het filter eenvoudig naar beneden gedrukt worden. **Let op: het filter moet zoveel mogelijk onder de buffer maar niet te hard aandrukken. In het laboratorium is een te hard aangedrukt filter niet meer los te krijgen.**
12. Sla het buisje op in het opslagdoosje. Probeer het doosje zoveel mogelijk horizontaal te bewaren.

13. Bewaar de samples bij kamertemperatuur.
14. Stuur de samples zo spoedig mogelijk op naar Datura met een volledig ingevuld sampleformulier (uitgeprint of digitaal). Langdurig bewaren van het sample kan leiden tot degradatie van het DNA. De opvangfles, pomp en het opslagbakje ontvangen wij graag terug. De overige materialen mogen weggegooid worden. NB: plastic scheiden is beter voor het milieu.

Aantallen samples

Om een hoge detectiekans te realiseren dienen er voldoende samples (monsters) verzameld te worden. Indien de volgende aantallen samples aangehouden worden kan in stilstaande wateren op basis van één monster een detectiekans van 90-100% behaald worden voor amfibieën en vissen en voor waterspitsmuis een detectiekans van 70%. In stromende wateren (beken en rivieren) kunnen andere detectiekansen gelden. Voor amfibieën, vissen en platte schijfhoren kan de volgende bemonsteringsintensiteit aangehouden worden:

- Tot 1000 meter aan slootlengte, 1 sample per 250 meter.
- Van 1000-3000 meter 1 sample per 333 meter.
- 3000 – 8000 meter aan slootlengte: voor elke 400 meter 1 sample.
- Vanaf 8000 meter aan slootlengte wordt er 1 sample per 500 meter genomen met een minimum van 20 monsters.
- Het bovenstaande overzicht is ook van toepassing op de oeverlengte bij poelen of plassen.

Voor waterspitsmuis gelden afwijkende voorschriften (zie Provinciale Handreiking Waterspitsmuis).

Tips en trucs

- De concentratie van eDNA in het water is laag. Daarom worden zeer gevoelige detectietechnieken gebruikt. Dat maakt de methode echter gevoelig voor contaminatie. Voorkom aanraking van de buitenkant van de handschoenen. Verder is het belangrijk om met de handschoenen alleen de materialen die aanwezig zijn in de kit aan te raken. Let ook op het feit dat een kleine hoeveelheid DNA van de doelsoort (bijvoorbeeld aanwezig op schepnetten) al kan leiden tot fout positief resultaat. Het is daarom zeer belangrijk om de samples schoon te houden om zodoende contaminatie te voorkomen.
- Er kan maximaal 1 liter water gefilterd worden. Het filtreren van een groter volume water kan weliswaar de concentratie eDNA in het sample verhogen, maar verhoogt ook de concentratie PCR Inhiberende stoffen. Deze stoffen hebben een negatief effect op de detectiegevoeligheid. Het filtreren van een groter volume dan 1 liter heeft daarom vaak negatief effect op de detectie. In troebele wateren kan het filter soms na 500 ml water al verstopt raken. Het heeft dan geen zin om minutenlang te wachten om nog extra water te kunnen filtreren. Over het algemeen resulteert een lange filtratie juist in een te hoog percentage inhibitorische stoffen, hetgeen de detectie negatief kan beïnvloeden. Voeg dus niet meer water toe dan in ~2 minuten gefiltreerd kan worden.
- DNA verspreidt zich slechts in beperkte mate door het water. Daarom is het belangrijk om 30 subsamples te verzamelen. Daardoor neemt de detectiekans toe. Als de verwachting is dat de dichtheid van de doelsoort laag is, dan is het verstandig om de subsamples langs een traject van maximaal 100 meter te verzamelen. Als veel subsamples geen eDNA van de doelsoort bevatten dan wordt de eDNA concentratie in het sample laag. In de meeste gevallen is het daarom aan te raden om het verzamelen van de subsamples te beperken tot één waterlichaam. Zodoende kan worden voorkomen dat eDNA uit een sloot waarin de doelsoort aanwezig is te veel verdund wordt met water waarin geen eDNA aanwezig is.
- Aan waterplanten kunnen allerlei (sediment)deeltjes gekleefd zitten. Bij beroering van het water kunnen deze deeltjes in het sample terechtkomen. Probeer dit zoveel mogelijk te vermijden omdat dit de eDNA detectie kan inhiberen. Dit kan door voorzichtig tussen de waterplanten te scheppen of door openingen in de watervegetatie te zoeken. In ondiepe sloten dient voorzichtig bemonsterd te worden om zodoende te voorkomen dat er sedimentdeeltjes in het sample terechtkomen.
- In sommige watersystemen kan het water na (hevige) regenbuien sneller stromen dan normaal. Het kan daarom verstandig zijn om eDNA sampling na regenval te vermijden.

Heeft u nog vragen?

Neem gerust contact op met Datura

Datura Molecular Solutions BV

Jarno de Vaan
jarno.devaan@datura.nl
0638229591

Samples kunnen opgestuurd naar:

Datura
Agro Business Park 10
6708 PW Wageningen
The Netherlands