



NOTITIE

Royal Haskoning DHV
Postbus 1132
3800 BC Amersfoort

DATUM: 19 juni 2024
ONS KENMERK: 22-0864/24.01.15/
UW KENMERK: BI8482
AUTEUR:
PROJECTLEIDER:
STATUS: Definitief
CONTROLE:

Vissen en macrofauna van de IJsselmeerdijk van Flevoland – Resultaten eDNA onderzoek

Waterschap Zuiderzeeland is voornemens om de IJsselmeerdijk tussen Lelystad en de Ketelbrug te versterken (Figuur 1). Per dijkvak zal de exacte uitvoering variëren, afhankelijk van de omstandigheden ter plaatse. Om een beeld te krijgen van de huidige diversiteit aan soorten op en langs de dijk zijn in 2023 diverse natuurinventarisaties uitgevoerd. Eén daarvan betreft een onderzoek middels environmental DNA (eDNA) naar vissen en meso- en macrofauna. Dit is een aanvulling op het electrovissen, het klassieke macrofauna-onderzoek en het insectenonderzoek dat in hetzelfde jaar is uitgevoerd (Broeckx 2024; Kruijt 2024; Derriks & Achterkamp 2024). Deze notitie beschrijft de resultaten van het eDNA onderzoek.

1 Inleiding

Met een aankomende versterking van de IJsselmeerdijk staat veiligheid voorop, maar even cruciaal is het behoud van het ecologisch evenwicht. Een grondige nulmeting voor de dijkversterking is daarom essentieel om de huidige biodiversiteit in het plangebied in kaart te brengen. Hierbij wordt ook gebruik gemaakt van eDNA-water- en bodemmetingen. Deze metingen bieden niet alleen inzicht in de diversiteit aan soorten, maar ook in de gezondheid



van het ecosysteem. Zo'n voorafgaande inventarisatie stelt ons in staat gerichte maatregelen te nemen om de impact van de versterkingswerken op de natuur te minimaliseren, zoals het beschermen van kwetsbare soorten en het behouden van essentiële habitats. Op deze manier zorgen we niet alleen voor een veilige dijk, maar dragen we ook bij aan het behoud van de biodiversiteit van de IJsselmeerdijk.

1.1 eDNA analyse zeldzame vissen

Het analyseren van omgevings-DNA (eDNA) in combinatie met de Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) is een zeer geschikte methode voor het monitoren van zeldzame en moeilijk bevisbare vissoorten. Deze techniek, die de aanwezigheid van soortspecifieke DNA-fragmenten in watermonsters detecteert, biedt een gevoelige en kwantitatieve benadering voor het monitoren en bestuderen van deze soorten, voor natuurbehoud en ecologisch onderzoek.

Een van de grootste voordelen van de combinatie van eDNA met qPCR is de hoge gevoeligheid. Zelfs in wateren waar vissen in zeer lage aantallen voorkomen, kunnen sporen van hun DNA, zoals in huidcellen, schubben of uitwerpselen, worden gedetecteerd. Dit maakt het mogelijk om soorten te identificeren die moeilijk waar te nemen zijn met traditionele methoden, zoals elektrovisserij of zegen vissen. Bovendien maakt de kwantitatieve aard van qPCR het mogelijk om niet alleen de aanwezigheid van de soorten aan te tonen, maar om ook een schatting te maken van de abundantie in het onderzochte gebied. Hierdoor kunnen spatio-temporele patronen in abundantie worden ontdekt.

In deze nulmeting is deze techniek toegepast voor enkele beschermde en zeldzame benthische vissoorten (zeeprik, rivierprik, meerval, kwabaal, rivierdonderpad en aal). Deze soorten maken mogelijk gebruik van de bestaande IJsselmeerdijk of zullen potentieel profijt hebben van de geplande aanpassingen.

1.2 Bodemanalyse

De gezondheid en diversiteit van bodem meso- en macrofauna speelt een fundamentele rol in ecologische processen. Deze organismen, variërend van microscopisch kleine nematoden tot grotere insecten en wormen, zijn essentieel voor het onderhouden van de bodemvruchtbaarheid, het bevorderen van plantengroei en het ondersteunen van biodiversiteit. Ze dragen bij aan cruciale bodemfuncties zoals het afbreken van organisch materiaal, het recyclen van voedingsstoffen, het verbeteren van de bodemstructuur en het reguleren van de dynamiek van bodemmicroben. Echter, ondanks hun belang, blijft het bestuderen van deze bodemorganismen een uitdagende taak. Traditionele methoden voor het identificeren en kwantificeren van deze soorten zijn vaak arbeidsintensief en kunnen een beperkt beeld geven van de werkelijke biodiversiteit. Hier biedt metabarcoding van bodemmonsters een alternatief. Metabarcoding maakt gebruik van DNA-sequencing technieken om genetisch materiaal uit bodemmonsters te analyseren. Deze aanpak maakt het mogelijk om met relatief weinig inspanning een breed beeld te krijgen van de bodemgemeenschap. Door het identificeren van unieke DNA-sequenties, kan meta-



barcoding een grote verscheidenheid aan soorten detecteren en identificeren, zelfs soorten die visueel moeilijk te onderscheiden zijn of in zeer lage aantallen voorkomen.

Deze techniek is niet alleen nuttig voor het vaststellen van de aanwezigheid en diversiteit van soorten, maar ook voor het begrijpen van hun functionele rollen binnen het ecosysteem. Door inzicht te krijgen in welke soorten aanwezig zijn en hoe ze met elkaar en hun omgeving interacteren, kan men beter begrijpen hoe verschillende bodemprocessen bijdragen aan de algehele gezondheid en veerkracht van het ecosysteem.

2 Methoden

2.1 Locatie en bemonsteringsmomenten

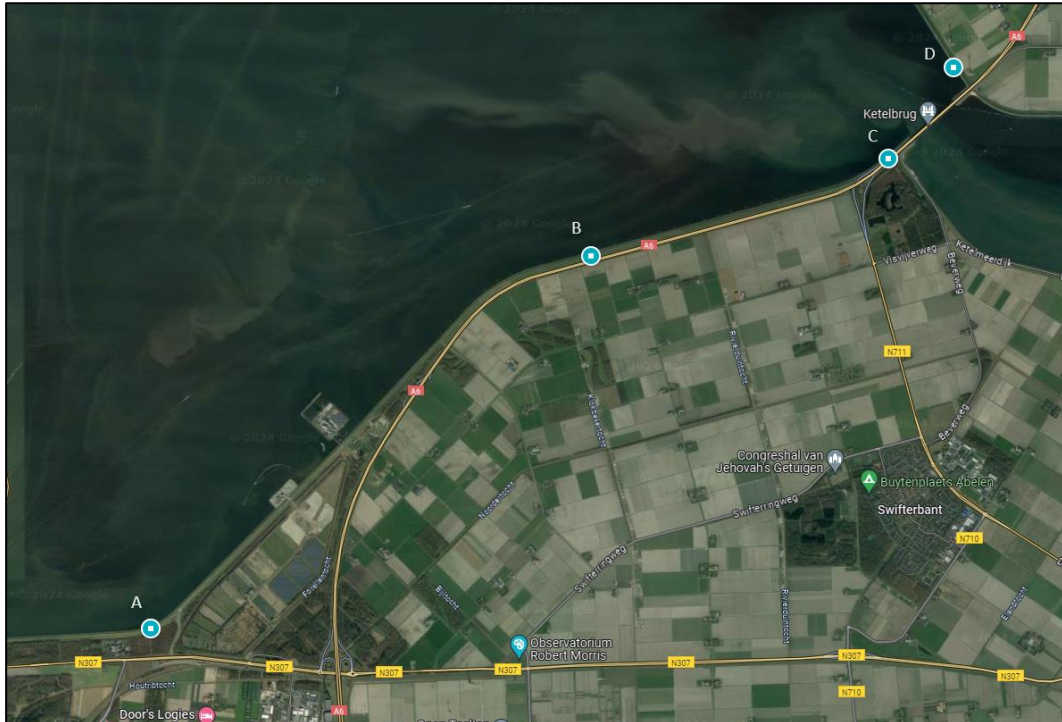
Voor zowel de visanalyse als de bodemfauna-analyse zijn drie locaties binnen het plangebied bemonsterd (Tabel 1; Figuur 1). Daarnaast is buiten het plangebied een vierde referentielocatie met vergelijkbare habitatkenmerken bemonsterd. Bemonstering is viermaal uitgevoerd verspreid over het jaar (Tabel 2).

Tabel 1 *Bemonsteringslocaties.*

Monsterlocaties	Naam	Coördinaten
A	Forellentocht	52°33'13.1"N 5°29'42.4"E
B	Kamperhoektocht	52°35'49.7"N 5°34'47.2"E
C	Ketelbrug	52°36'30.3"N 5°38'13.1"E
D (referentie)	Zuidermeerdijk	52°37'08.8"N 5°38'58.0"E

Tabel 2 *Bemonsteringsdata.*

Monsterdata	Datum
Ronde 1	5-4-2023
Ronde 2	14-6-2023
Ronde 3	16-8-2023
Ronde 4	18-10-2023



Figuur 1 *Bemonsteringslocaties IJsselmeerdijk, Flevoland (vis in het IJsselmeer, bodemfauna op de dijk).*

2.2 Vis qPCR-analyse

2.2.1 Bemonstering en eDNA-preservatie

De waterbemonstering is uitgevoerd met steriele spuitjes van 60 ml. Op elke locatie zijn deelmonsters van 60 ml water genomen, die ter plaatse zijn gefilterd met een eDNA-waterfiltercartridge (oppervlakte 69 cm², materiaal PES, poriëgrootte 0,8 µm). Voor elke locatie zijn twee filters gebruikt, waar doorheen ongeveer 2 liter water per filter is gefilterd. Per locatie zijn tussen de 30 en 40 deelmonsters (2 L) genomen, verspreid over 200 meter langs de waterkant (100 meter in elke richting vanaf de monsterlocatie).

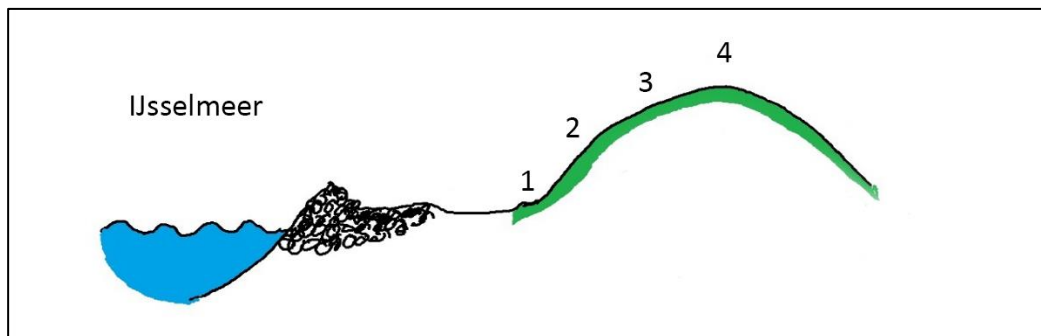
De eDNA-extractie is uitgevoerd volgens een chloroform-isoamylalcohol-extractieprotocol. Tijdens de eDNA-extractie zijn interne negatieve controles opgenomen om ongewenste contaminaties tijdens de extractie te controleren. Daarnaast zijn interne positieve controles (xenobiologische templates) toegevoegd aan de lysisbuffer om eventuele degradatie of verlies van eDNA tijdens de bemonstering en extractie te controleren. De interne positieve controle compenseert ook mogelijke vals-positieve resultaten als gevolg van PCR-inhiberende stoffen in het monster. Bovendien zijn negatieve (Milli-Q water) en positieve (doeltemplate) PCR-controles uitgevoerd om te controleren op een correct verloop van de PCR-reacties en afwezigheid van contaminaties. Deze interne en PCR-controles zijn gemeten met acht replicaten. Vervolgens zijn de soortspecifieke qPCR-analyses uitgevoerd met soortspecifieke primers en FAM-gelabelde probes. Voor deze analyses zijn voor elk monster eveneens acht replicaten gemeten.



Om vals-positieve signalen als gevolg van signaalafwijking en/of niet-specifieke binding uit te sluiten, zijn alleen logistische curves opgenomen met een minimale CT-waarde die overeenkomt met ≥ 1 template per liter. Target DNA-detecties waarbij slechts één replicatie positief is, zijn extra gecontroleerd op juistheid met behulp van gel-elektroforese. IJklijnen voor kwantificering zijn berekend op basis van een concentratiereeks van vier in duplicaat gemeten concentraties target DNA. Voor de ijklijn is een minimum van $R^2=0,92$ gehanteerd. De berekende concentraties van het doelsoort-DNA target per liter zijn gecorrigeerd voor het monstervolume.

2.3 eDNA-analyse van de bodemfauna

Tijdens het bemonsteringsproces zijn op elke locatie vier bodemmonsters genomen met steekbuizen van 10 cm diepte. De vier deelmonsters zijn verzameld over een traject, gaande van het hoogste punt van de dijk tot aan de onderhoudsweg. Deze deelmonsters zijn verdeeld over het begroeibare gedeelte van de dijk (Figuur 2). Op de locatie zijn de bodemmonsters uitgewassen met behulp van een 300 μm zeef en vervolgens gekoeld bewaard (zie Figuur 3). Steriele handschoenen zijn te allen tijde gebruikt bij het hanteren van de monsters, en zeven zijn tussen de monsters gereinigd om kruiscontaminatie te voorkomen.



Figuur 2 Locaties van de bodemmonsters op het buitentalud van de IJsselmeerdijk.



Figuur 3 Ongewassen bodemmonster (links) en op locatie uitgewassen monster (rechts).



Voor de DNA-extractie is een aangepast protocol voor bulkmonsters toegepast (Nielsen *et al.*, 2019). Op de dag van de bemonstering is het op locatie uitgewassen bodemonster verder behandeld in het laboratorium, waarbij detritus en macrofyten zoveel mogelijk zijn verwijderd. Het bodembulkmonster is 's nachts geliseerd en gepreserveerd in CTAB-lysisbuffer bij 55 °C, waarbij interne positieve controle-DNA-templates zijn toegevoegd om de extractie-efficiëntie te controleren. De volgende dag is een submonster van 50 ml genomen, dat gedurende 30 seconden is gehomogeniseerd met een beadbeater (6 m/s), en vervolgens is protease K toegevoegd (50 µg/ml). Dit mengsel is nog eens 2 uur geïncubeerd bij 55 °C. Daarna is het 50 ml monster 1 minuut gecentrifugeerd bij 1000 g, waarbij 1 ml supernatant is gebruikt als bronmateriaal voor de DNA-extractie.

De bodem-DNA-extractie is uitgevoerd met behulp van chloroform-isoamylalcohol fase-scheidingsextractie. Vervolgens zijn de DNA-extracten gecontroleerd op kwaliteit (gel-elektroforese) en kwantiteit (fluorometrie).

De amplificatie is uitgevoerd door Sylphium. Elk monster is in drievoud geamplificeerd met een proofreading-polymerase en vervolgens gepoold om overschaduwings-effecten van minder voorkomende soorten te minimaliseren. Er zijn metabarcoding primers gebruikt die specifiek gericht zijn op de amplificatie van gebieden van het COI mitochondriaal genoom voor arthropoda, met een hoge resistentie tegen eDNA-degradatie door beperkte gemiddelde PCR-productgrootte (178 bp). De gedegenereerde primerset fwhF1 en fwhR1 is hiervoor gebruikt (Vamos *et al.*, 2017).

Voordat de monsters werden verzonden voor sequencing, zijn de geamplificeerde bodemonsters gecontroleerd op grootte met behulp van gel-elektroforese. Sequencing voor alle monsters is uitgevoerd met de NGS Illumina MiSeq door Baseclear, waarbij kwaliteitscontroles zijn uitgevoerd vóór de sequencingprocedure.

De sequence reads zijn via een metabarcoding pipeline geanalyseerd en geïdentificeerd door Sylphium Molecular Ecology. Hierbij zijn eerst de primer sequences verwijderd en de forward en reverse reads gekoppeld. Vervolgens is een kwaliteitsfiltering uitgevoerd waarbij foutieve reads zijn verwijderd. Daarna zijn de opgeschoonde reads geclusterd tot OTUs (Operational Taxonomic Unit). Vervolgens zijn de reads vergeleken met een ncbi databank voor taxonomische identificatie.

3 Resultaten

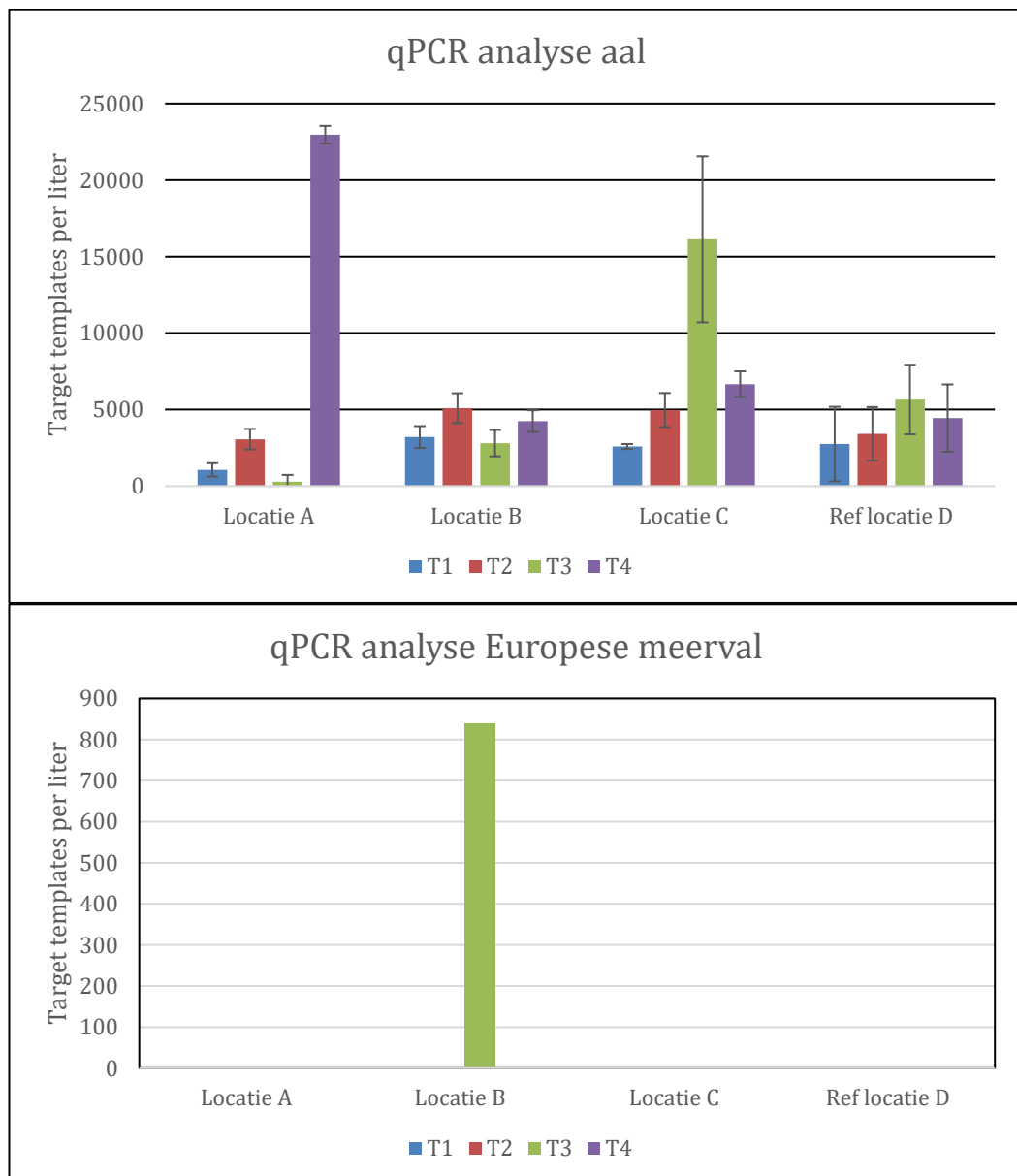
3.1 Vismonitoring

Aal is op alle locaties en tijdstippen aangetroffen in de qPCR-analyse (Bijlage: Data qPCR; Figuur 4). De bemonsteringslocaties kenmerken zich door basalt stortstenen oevers, een ideale omgeving als dagelijkse schuilplaats voor aal. De qPCR-analyse geeft aan dat de abundantie van aal relatief hoog is op alle monsterlocaties. Op locaties B en D blijven de dichtheden van aal-DNA in het water redelijk constant over de tijd. Op locatie A vertoont



de data echter variatie, met een afwijking naar beneden en naar boven tijdens het derde en vierde monsternmoment. Ook op locatie C is op het derde monsternmoment aanzienlijk meer aal-DNA aangetroffen. Op basis van de qPCR-gegevens lijkt de referentielocatie representatief te zijn voor de locaties in het plangebied wat betreft aal.

Wat betreft de Europese meerval is deze slechts eenmaal gedetecteerd op locatie B tijdens het derde tijds punt. De kwabaal, rivierdonderpad, rivierprik en zeeprik zijn daarentegen in geen enkel monster aangetroffen.



Figuur 4 Gedetecteerde aal (boven) en Europese meerval (onder) target templates per liter bemonsterd water (y-as). Error bars geven standaarddeviatie van qPCR replicaten per monster weer. De vier bemonsteringsmomenten zijn aangegeven als (T1- t/m T4).



Metingen van DNA in water roepen vaak vragen op over de locatie van de vissen waar de DNA van is gemeten. De detectieafstand van eDNA uit water is sterk gerelateerd aan stroming en abundantie van aanwezige vissoorten, absolute waarden zijn hierdoor niet te geven. Bijvoorbeeld een vispopulatie met een hoge dichtheid zal over een groot gebied detecteerbaar blijven. Daarnaast is watertemperatuur en activiteit van de vis ook van invloed op de snelheid waarmee DNA afbreekt en hoeveel DNA wordt afgegeven. Voor een enkel individu zal de detectieafstand aanzienlijk kleiner zijn. Voor besloten water (water zonder stroming) hanteren we meestal een afstand van ongeveer 0,5-1 km waarbinnen soorten ook in lage abundantie kunnen worden gedetecteerd. Als sprake is van stroming (rivieren) kan de detectieafstand aanzienlijk groter zijn (1-10 km). Wij schatten in dat het IJsselmeer hier tussenin zit: 1-3 km. Mogelijk is de detectieafstand in de buurt van de Ketelbrug (monsterpunt C) als gevolg van de stroming wat groter dan bij monsterpunt A. Uitgaande van deze detectieafstand kan worden gesteld dat de resultaten van de qPCR-metingen van aal en Europese meerval voor een dijk met een lengte van 18 km een goed beeld over het voorkomen en de abundantie geven. Aal is bovendien ook bij het elektrovissen in hoge aantallen aangetroffen (Broeckx 2024). Als de Europese meerval niet bij de dijk zat, dan zou DNA van deze soort door de stroming niet alleen bij monsterpunt B, maar in ieder geval ook bij monsterpunt C zijn aangetroffen.

3.2 Bodemfauna

Operational Taxonomic Units (OTUs) met een clustering confidence interval van $\geq 95\%$ (zie Bijlage: soortenlijst bodem meso-macrofauna.xlsx).

Om identificatiefouten te minimaliseren, zijn alleen OTU's met ≥ 10 reads beschouwd als betrouwbaar, wat resulteert in 398 betrouwbare OTUs. Van deze 398 OTUs behoren 317 (80%) tot soorten van bodemlevende macro- en mesofauna (zie Bijlage: Soortenlijst bodem meso-macrofauna.xlsx). De overige OTUs bestaan uit barcodes die ofwel met onvoldoende zekerheid op identiteit kunnen worden gebracht of behoren tot soorten die niet binnen de doelgroep vallen, zoals de strandplevier, veldmuis en blauw walstro.

Wat betreft de bodemmacro- en -mesofauna-OTUs kan ongeveer de helft tot op soortniveau worden herleid (157 OTUs), terwijl de rest (160 OTU) tot een hoger taxonomisch niveau kan worden herleid, meestal op geslacht of familieniveau. Door de beperkte sequence-diversiteit tussen soorten en de incompleetheid van de huidige DNA-databases is de betrouwbaarheid van de taxonomische identificatie momenteel beperkt. Daarom adviseren we OTUs voornamelijk op familieniveau te beschouwen om onterechte identificaties te voorkomen. Een diepere analyse voor elk OTU met betrouwbaarheid en het laagst mogelijke taxonomische niveau is mogelijk, maar hier zijn extra kosten aan verbonden.



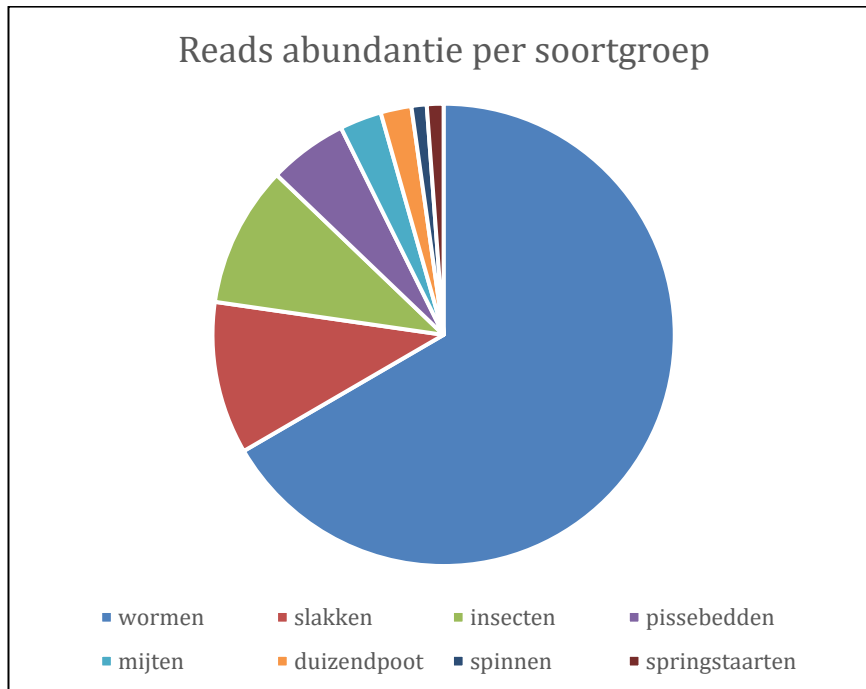
OTUs per soortgroep, aantal tussen haakjes geeft aan hoeveel identificaties op soort niveau beschikbaar zijn.

- 106 insecten OTU:
 - o 26 Kevers (20)
 - o 24 Muggen (12)
 - o 13 Sprinkhanen (10)
 - o 12 Mieren (6)
 - o 7 Vlinders/motten (7)
 - o 7 Vliegen (5)
 - o 6 Cicades (5)
 - o 4 Bladluizen (1)
 - o 4 Wantsen (4)
 - o 3 overig (2)
- 80 Wormen (30)
- 49 Mijten (15)
- 25 Springstaarten (10)
- 15 Duizendpoten/miljoenpoten (5)
- 14 Spinnen (11)
- 10 Pissebedden (4)
- 10 Slakken (7)
- 3 Beerdiertjes (3)

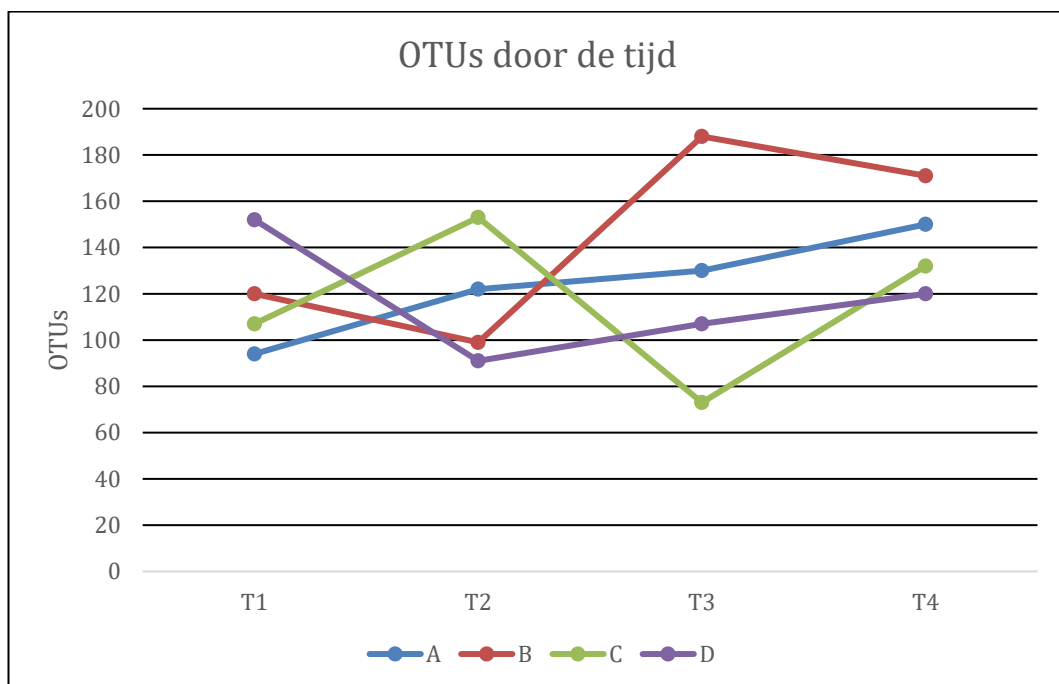
Reads abundantie

Voor wat betreft de reads abundantie vertegenwoordigen wormen de hoofdmoot (2/3) van het totaal aantal metabarcoding reads (Figuur 5). Daarna volgen slakken, insecten en pissebedden met een kwart van de reads. De rest van de reads vallen binnen mijten, duizendpoten, spinnen en springstaarten. Reads abundantie geeft een indicatie van biomassafracties van de verschillende bodemorganismen. Hierbij is het van belang dat met name grote verschillen in reads informatief zijn. Kleine verschillen in reads abundantie kunnen ook het gevolg zijn van verschillen in metabarcoding primer affiniteit tussen verschillende soorten.

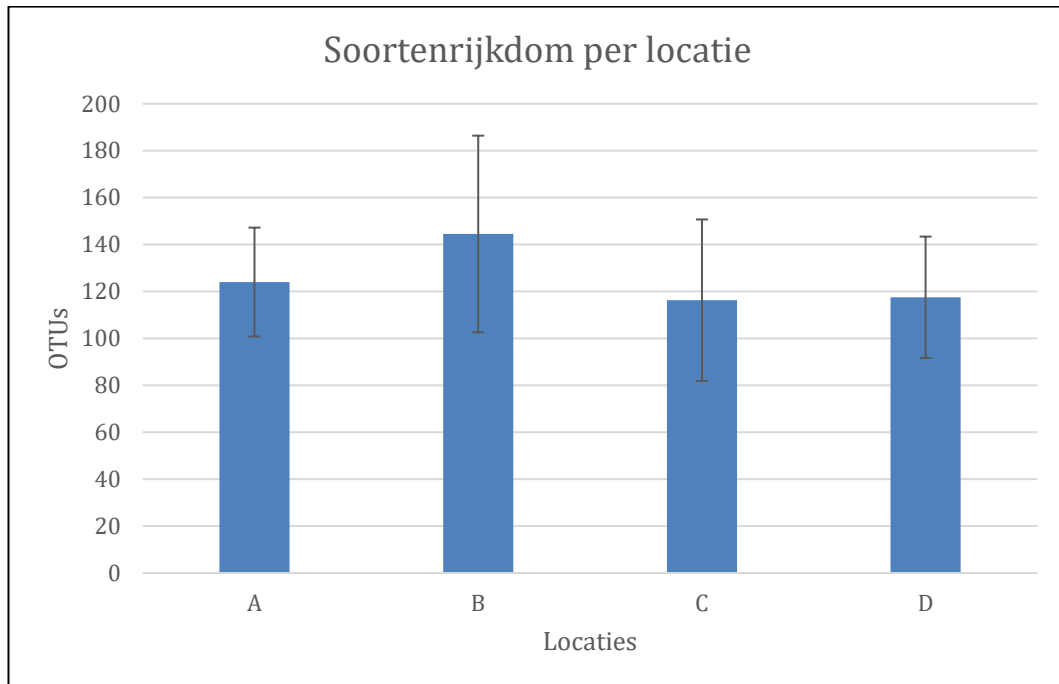
Het aantal OTU dat is gevonden varieert zowel in tijd als in ruimte tussen minimaal 73 OTU en maximaal 188 per locatie (Figuur 6). De soortenrijkdom op basis van de gemiddelde OTU count verschilt niet significant per locatie (Figuur 7). Of deze soortenrijkdom karakteristiek is voor dit soort (gras)dijken is onbekend. Er is nog weinig ervaring met eDNA-onderzoek van bodemfauna. Wel is duidelijk dat de combinatie van reads abundantie informatie en OTU diversiteit een goede basis vormen om veranderingen in de bodemgemeenschap te volgen en te kwalificeren voor vervolgonderzoek, het vergelijken van relatieve verschillen in het plangebied en de referentielocatie.



Figuur 5 Metabarcoding reads aantallen per soortgroep.



Figuur 6 Soortenrijkdom in de vorm van gedetecteerde OTUs (y-as) door de tijd (x-as) per locatie (A, B, C en D).



Figuur 7 Gemiddeld aantal OTUs gedetecteerd per locatie. Error bars geven de standaard deviatiewaarden van de verschillende monsternomenten.

Opmerkelijke vondsten

In zijn algemeenheid is het aantal insecten dat is gedetecteerd substantieel. Ook vliegende insecten die minder bodemgebonden zijn, zoals vlinders, muggen en vliegen, zijn gedetecteerd. De resultaten bieden zodoende ook een mooie aanvulling op de reguliere insecteninventarisatie.

4 Referenties

- Broeckx, P.B., 2024. Visstand en waterplanten langs de IJsselmeerdijk van Flevoland. Notitie met kenmerk 22-0864/23.07685/DenWa. Waardenburg Ecology, Culemborg.
- Derriks, F. & B. Achterkamp, 2024. Insecten op de IJsselmeerdijk van Flevoland in 2023. Notitie met kenmerk 22-0864/24.01.10/DenWa. Waardenburg Ecology, Culemborg.
- Kruijt, D., 2024. Macrofauna langs de IJsselmeerdijk van Flevoland. Notitie met kenmerk 22-0864/24.01.15/DirKr. Waardenburg Ecology, Culemborg.
- Nielsen M., M.T.P. Gilbert, T. Pape & K. Bohmann, 2019. A simplified DNA extraction protocol for unsorted bulk arthropod samples that maintains exoskeletal integrity. *Environmental DNA*. 1:144-154.
- Vamos E.E., V. Elbrecht & F. Leese, 2017. Short COI markers for freshwater macroinvertebrate metabarcoding. *Metabarcoding en Metagenomics*. 1: e14625.



Voor vragen over deze notitie kunt u contact opnemen met

Akkoord voor uitgave: 31 januari 2024



**WAARDEN
BURG**
Ecology

Waardenburg Ecology is niet aansprakelijk voor gevolgschade, alsmede voor schade welke voortvloeit uit toepassingen van de resultaten van werkzaamheden of andere gegevens verkregen van Waardenburg Ecology; opdrachtgever vrijwaart Waardenburg Ecology voor aanspraken van derden in verband met deze toepassing.

© Waardenburg Ecology / Royal HaskoningDHV

Dit rapport is vervaardigd op verzoek van opdrachtgever en is zijn eigendom. Niets uit dit rapport mag worden veeleenvoudigd en/of openbaar gemaakt worden d.m.v. druk, fotokopie, digitale kopie of op welke andere wijze dan ook, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de opdrachtgever hierboven aangegeven en Waardenburg Ecology, noch mag het zonder een dergelijke toestemming worden gebruikt voor enig ander werk dan waarvoor het is vervaardigd.

Waardenburg Ecology is een handelsnaam van Bureau Waardenburg BV. Lid van de branchevereniging Netwerk Groene Bureaus. Het kwaliteitsmanagementsysteem is gecertificeerd door EIK Certificering overeenkomstig ISO 9001:2015. Waardenburg Ecology hanteert als algemene voorwaarden de DNR 2011, tenzij schriftelijk anders wordt overeengekomen.

Waardenburg Ecology Varkensmarkt 9, 4101 CK Culemborg, 0345 512710
info@waardenburg.eco, www.waardenburg.eco