



Final Report 2023

Annex D5.7

Annex D5.7 Report on EDNA monitoring 2016 - 2022

Deliverable:



Action D5.7 Report on eDNA monitoring 2016 - 2022

The objective of this action was to monitor biodiversity with innovative eDNA method in the C1-C6 sites after implementation of adaptation measures. It contains full methodology and results of the monitoring esp. full list and location of detected species. All conclusions are also presented in the Summary report (Annex D5.1).

Environmental DNA (eDNA) sequencing is a rapidly developing method for studying biodiversity and monitoring ecosystem changes. Because organisms leave DNA in the environments in which they live, eDNA analysis can provide clues about the species present in it without disturbing the ecosystem. The possibilities of using eDNA include many systematic groups, but it is usually used to study organisms that are difficult to detect in the environment. Among the groups of organisms monitored as part of the biodiversity monitoring in the LIFE RadomKlima project, such groups are amphibians and fish. Due to the specificity of the method, information on the occurrence of additional groups of vertebrates: birds and mammals in the habitats was also obtained. However, the main objective of the monitoring was to detect rare species, difficult to detect by the traditional method and valuable from the point of view of European Union law (listed in the Habitats Directive), whose occurrence was likely in the research area, such as the crested newt, chickadee and goat.

As a result of eDNA monitoring, data on the occurrence of 5 species of amphibians, 20 species of fish, 2 species of birds and 9 species of mammals were obtained.

The detection of previously unidentified species, both 3 species in the scale of the entire project as well as previously unidentified species at individual sites, confirms that eDNA monitoring is an effective method complementing research with traditional methods and allows for a more accurate assessment of the biodiversity of the area. It was possible to confirm the occurrence of species valuable from the perspective of the European Union (listed in the Annex to the Habitats Directive) - crested newt and chickadee. The crested newt was confirmed in two locations – Cerekwianka and Potok Północny, where it was found using the traditional method in the pre-investment period in 2016 and detected this species in the post-investment period (2021-2022) near the project investment on the North Stream, although this could not be confirmed using the traditional method. The eDNA method also confirmed the occurrence of chickadee in the Cerekwianka area in the post-investment period (2021-2022). Thanks to the use of the NGS metabarcoding method, thanks to which it is possible to identify a wide spectrum of species (as opposed to the PCR method targeting one specific species), it was possible to obtain information about the occurrence of additional systematic groups (e.g. birds and mammals) in a cost-effective manner.

The data obtained from eDNA monitoring allow us to conclude that the biodiversity of amphibians and fish as a result of the LIFE project activities has increased even more than the results of traditional monitoring.



Raport z wyników analiz monitoringu EDNA

zadanie: D5 Monitoring Bioróżnorodności

Opracowanie: FPP Enviro sp. z o. o.

Analizy Laboratoryjne: Instytut Biologii Medycznej PAN w Łodzi

2022

w ramach realizacji projektu pn. „Adaptacja do zmian klimatu poprzez zrównoważoną gospodarkę wodą w przestrzeni miejskiej Radomia / Adaptation to climate change through sustainable management of water in the urban area in Radom City, nr **LIFE14 CCA/PL/000101, LIFERADOMKLIMA-PL**

Spis treści

1. Wstęp.....	2
2. Obszar badań i pobór prób.....	3
3. Analizy Laboratoryjne.....	3
4. Wyniki i Dyskusja.....	8

1. Wstęp

Sekwencjonowanie środowiskowego DNA (eDNA) jest szybko rozwijającą się metodą badania różnorodności biologicznej i monitorowania zmian ekosystemu. Ponieważ organizmy pozostawiają DNA w środowiskach w których żyją, analiza eDNA może dostarczyć wskazówek na temat obecnych w nim gatunków bez zakłócania ekosystemu. Możliwości wykorzystania eDNA obejmują wiele grup systematycznych jednak jest zwykle wykorzystywana do badań organizmów, które są trudno wykrywalne w środowisku. Spośród grup organizmów monitorowanych w ramach monitoringu bioróżnorodności w projekcie LIFE RadomKlima grupami takimi są płazy i ryby. Ze względu na specyfikę metody pozyskano także informacje o występowaniu w siedliskach dodatkowych grup kręgowców: ptaków i ssaków. Jednak głównym celem monitoringu było wykrycie gatunków rzadkich, trudnowykrywalnych metodą tradycyjną i cennych z punktu widzenia prawa Unii Europejskiej (wymienionych w Dyrektywie Siedliskowej), których występowanie było prawdopodobne w obszarze badań, takich jak traszka grzebieniasta, piskorz i koza.



Fot 1. Filtrowanie wody przez filtr strzykawkowy.



2. Obszar badań i pobór prób

Próby były pobierane w obszarach objętych monitoringiem bioróżnorodności metoda tradycyjną przy czym uwzględniono tylko te miejsca, które mogły stanowić siedlisko ryb lub płazów a kluczowym czynnikiem była obecność wody. Głównie były to obiekty tzw. Dużych BZI: Zalew Cerekwianka, Borki, Stawy Kolmatacyjne, rzeka Mleczna oraz mniejsze rozlewiska w pobliżu. W przypadku małych BZI były to 2 obiekty – Climapondy, przy ul. Gagarina i Grenadierów. W przypadku miejsc bardziej prawdopodobnego występowania trudnowykrywalnych i rzadkich ryb (piskorz, koza) lub płazów (traszka grzebieniasta) pobierano więcej prób aby zwiększyć prawdopodobieństwo wykrycia. Z obszaru projektu pobrano: w roku 2016 - 13 prób, w roku 2021 - 9 prób, w roku 2022 - 46 prób. Ze względu na szybką degradację materiału genetycznego w środowisku, terminy poboru były dostosowane do okresów spodziewanego największego zagęszczenia ryb i płazów - w miesiącach czerwiec – listopad, przy czym w przypadku ryb jest to okres lato/jesień, w przypadku płazów okres wiosna/lato. Próby wody pobierane były w kilkunastu miejscach, mogących stanowić najbardziej prawdopodobne siedlisko ryb lub płazów, za pomocy sterylnej, jednorazowej strzykawki do jednorazowego naczynia zbiorczego a następnie filtrowane przez filtry Sterivex 0.22 lub 0,45 mikrometra. Do prób dodano konserwant (alkohol w roku 2016 lub bufor ATL w roku 2021-2022). Po przeprowadzeniu filtracji każdy filtr został zamknięty (dedykowanymi korkami luer lock), opisany, umieszczony przechowywany w stanie zamrożonym (2016 i 2021) lub schłodzonym (2022). Materiał wykorzystywany do zbierania prób był sterylny, jednorazowego użytku.

3. Analizy Laboratoryjne

Badanie pilotażowe

Badania pilotażowe wykonano w celu oceny stanu zachowania DNA w próbach z lat 2016-2021.

1. Izolacja eDNA z filtrów Sterivex kitem DNAeasy PowerSoli Kit Pro (Qiagen). Do izolacji użyto całe filtry [Tab.1].

Tabela 1. Lista próbek przesłanych do izolacji.

No.	Sampling date	Location	Target Species	Sample ID	TC found	Person
1	8/06/2016	Cerekwianka pond, site 1, Radom	Triturus cristatus, Pelobates fuscus	2016-095	+	Michał M.
2	8/06/2016	Cerekwianka pond, site 2, Radom	Triturus cristatus, Pelobates fuscus	2016-105	+	Michał M.
3	8/06/2016	South of Borki, Radom	Triturus cristatus, Pelobates fuscus	2016-092	-	Michał M.
4	15/07/2016	Park Dietla, Sosnowiec, Silesia	Bufo viridis	2016-101	+	Michał M.
5	16/09/2016	Mleczna river 2 (North), Radom	to be decided - Misgurnus fossilis and/or Cobitis taenia	2016-085		Michał M.
6	16/09/2016	Mleczna river 1 (South), Radom	to be decided - Misgurnus fossilis and/or Cobitis taenia	2016-084		Michał M.
7	16/09/2016	Borki, near the S bridge, Radom	to be decided - Misgurnus fossilis and/or Cobitis taenia	2016-096		Michał M.
8	16/09/2016	Colmatation ponds N, Borki, Radom	to be decided - Misgurnus fossilis and/or Cobitis taenia	2016-099		Michał M.



9	16/09/2016	Colmatation ponds S, Borki, Radom	to be decided - Misgurnus fossilis and/or Cobitis taenia	2016-107		Michał M.
10	9/06/2016	Potok Północny, Radom	Triturus cristatus, Pelobates fuscus	2016-097	+	Michał M.
11	9/06/2016	Borki, flooded area 1	Triturus cristatus, Pelobates fuscus	2016-103	-	Michał M.
12	9/06/2016	Borki, flooded area 2	Triturus cristatus, Pelobates fuscus	2016-079	-	Michał M.
13	16/09/2016	Mleczna river S of Borki 1	to be decided - Misgurnus fossilis and/or Cobitis taenia	2016-081		Michał M.
14	16/09/2016	Mleczna river S of Borki 2	to be decided - Misgurnus fossilis and/or Cobitis taenia	2016-086		Michał M.
15	14/07/2021	Potok Północny, Radom	Triturus cristatus	2021-001	-	Paweł Sz.
16	25.11.2021	Cerekwianka	fisches	2.2021-C1	-	Paweł Sz.
17	25.11.2021	Cerekwianka	fisches	3.2021-C2	-	Paweł Sz.
18	25.11.2021	Cerekwianka	fisches	4.2021-C3	-	Paweł Sz.
19	25.11.2021	Kosówka	fisches	5.2021-K1	-	Paweł Sz.
20	25.11.2021	Mleczna N of Borki (Meandry)	fisches	6.2021-M1	-	Paweł Sz.
21	25.11.2021	Mleczna N of Borki (Meandry)	fisches	7.2021-M2	-	Paweł Sz.
22	25.11.2021	Mleczna N of Borki (Meandry)	fisches	8.2021-M3	-	Paweł Sz.
23	25.11.2021	Mleczna N of Borki (Meandry)	fisches	9.2021-M4	-	Paweł Sz.

Do izolacji wydobyto z konserwantu 23 próbki przechowywane do czasu izolacji w -26°C. Zauważono, że próbki 1 – 14 były zalane alkoholem, który nie zamarzł, a 15-23 konserwantem, który był zamrożony.

2. Sprawdzenie jakości i stężenia izolatów DNA na spektrofotometrze NanoDrop i fluorometrze Qubit [Tab. 2].

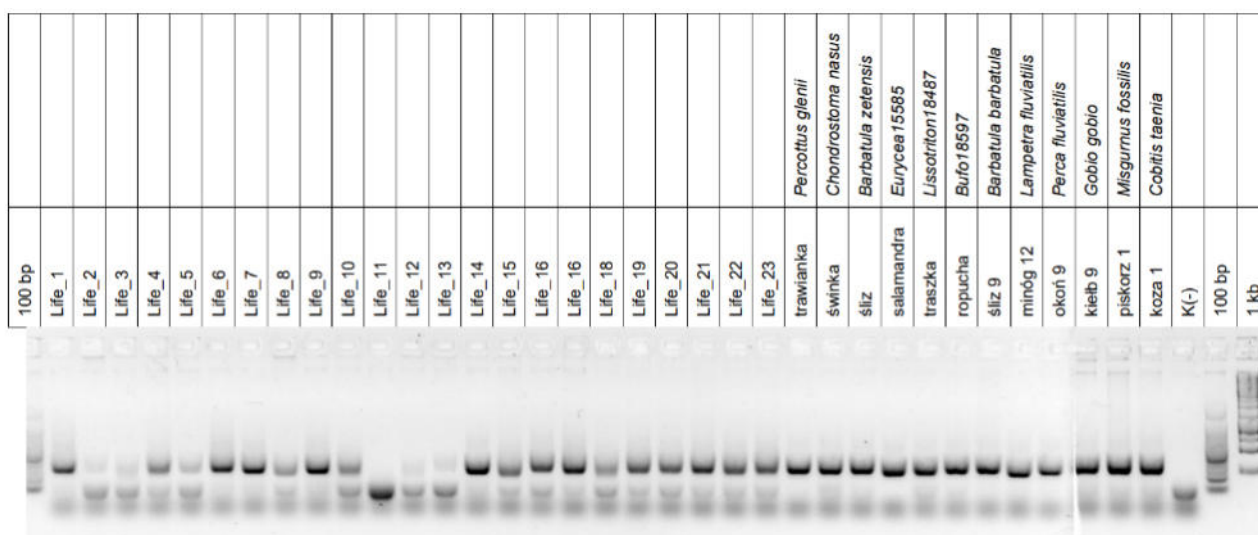
Tabela 2. Wynik pomiarów i jakości izolatów DNA

No	Sample ID	NanoDrop	Qubit	Unit	A260	A280	260/280	260/230
1	Life_1	5.7	too low	ng/μl	0.114	0.052	2.19	0.07
2	Life_2	15.9	10.1	ng/μl	0.319	0.166	1.92	0.71
3	Life_3	30.2	19.1	ng/μl	0.603	0.314	1.92	0.12
4	Life_4	106.5	90.1	ng/μl	2.13	1.129	1.89	0.24
5	Life_5	13	11.4	ng/μl	0.259	0.128	2.02	0.43
6	Life_6	2.3	too low	ng/μl	0.046	0.009	5.01	0.03
7	Life_7	3.9	too low	ng/μl	0.079	0.015	5.35	0.01
8	Life_8	7.9	3.19	ng/μl	0.157	0.071	2.22	0.03
9	Life_9	3	too low	ng/μl	0.06	0.017	3.61	0.1
10	Life_10	33.7	23.8	ng/μl	0.674	0.354	1.9	0.13
11	Life_11	3.6	too low	ng/μl	0.071	0.015	4.87	0.01
12	Life_12	7.3	3.21	ng/μl	0.145	0.063	2.32	0.04
13	Life_13	5.5	3.55	ng/μl	0.11	0.043	2.57	0.15
14	Life_14	2.7	too low	ng/μl	0.054	0.009	6.28	0.06
15	Life_15	43.1	34.2	ng/μl	0.863	0.46	1.88	0.12
16	Life_16	11.7	9.22	ng/μl	0.234	0.12	1.96	0.57
17	Life_16	9.1	6.72	ng/μl	0.183	0.085	2.14	0.07
18	Life_18	29.4	25.1	ng/μl	0.588	0.308	1.91	0.35

19	Life_19	20.7	17.5	ng/μl	0.415	0.213	1.95	0.19
20	Life_20	15.4	13.1	ng/μl	0.308	0.156	1.97	0.07
21	Life_21	12.6	11.2	ng/μl	0.252	0.121	2.08	0.05
22	Life_22	12.6	9.37	ng/μl	0.253	0.132	1.92	0.36
23	Life_23	14.7	8.88	ng/μl	0.295	0.152	1.94	0.33

3. Reakcja PCR z użyciem starterów na 16S rRNA (Vert-16SeDNA-F1 : Vert-16SeDNA-R1 [Vences et al. 2016]) wykrywających ryby i płazy, z dodatkiem blokera ludzkiego 16S rRNA MamMAVB1.

Izolaty, w których nie uzyskano wyniku pomiaru stężenia DNA (próbki 1, 6, 7, 9, 11 i 14) odparowano z objętości 60 μl do 12 μl, wzięto 10 ng DNA / reakcję i puszczono reakcję PCR w objętości 10 μl. Spodziewano się uzyskać produkt o wielkości ok. 355 bp. Reakcję PCR puszczono jednocześnie z DNA kontrolnych organizmów (płazów - traszka, salamandra, ropucha szara i ryb – koza, piskorz, kietb, okoń, minóg, ślíz) oraz kontrolą negatywną (bez DNA) [Ryc. 1].



Rycina. 1. Elektroforegram produktów PCR w 2% żelu agarozowym

4. Podsumowanie prac pilotażowych

Udało się uzyskać 18 oczekiwanych produktów PCR, które nadają się do dalszych analiz genetycznych (metabarkodowanie za pomocą NGS). Cztery próby (2, 3, 12 i 13) wymagają dalszych analiz w celu uzyskania pożądanego produktu PCR. Nie udało się przeprowadzić dalszych analiz na próbce nr. 11.

Projekt główny

1. Izolacja eDNA z 50 filtrów Sterivex kitem DNAeasy PowerSoli Kit Pro (Qiagen). Do izolacji użyto całe filtry i cały bufor ATL, którym były zalane [Tab.3].

Tabela 3. Lista próbek przesłanych do izolacji i wyniki pomiaru stężenia i czystości izolatów DNA na spektrofotometrze NanoDrop.

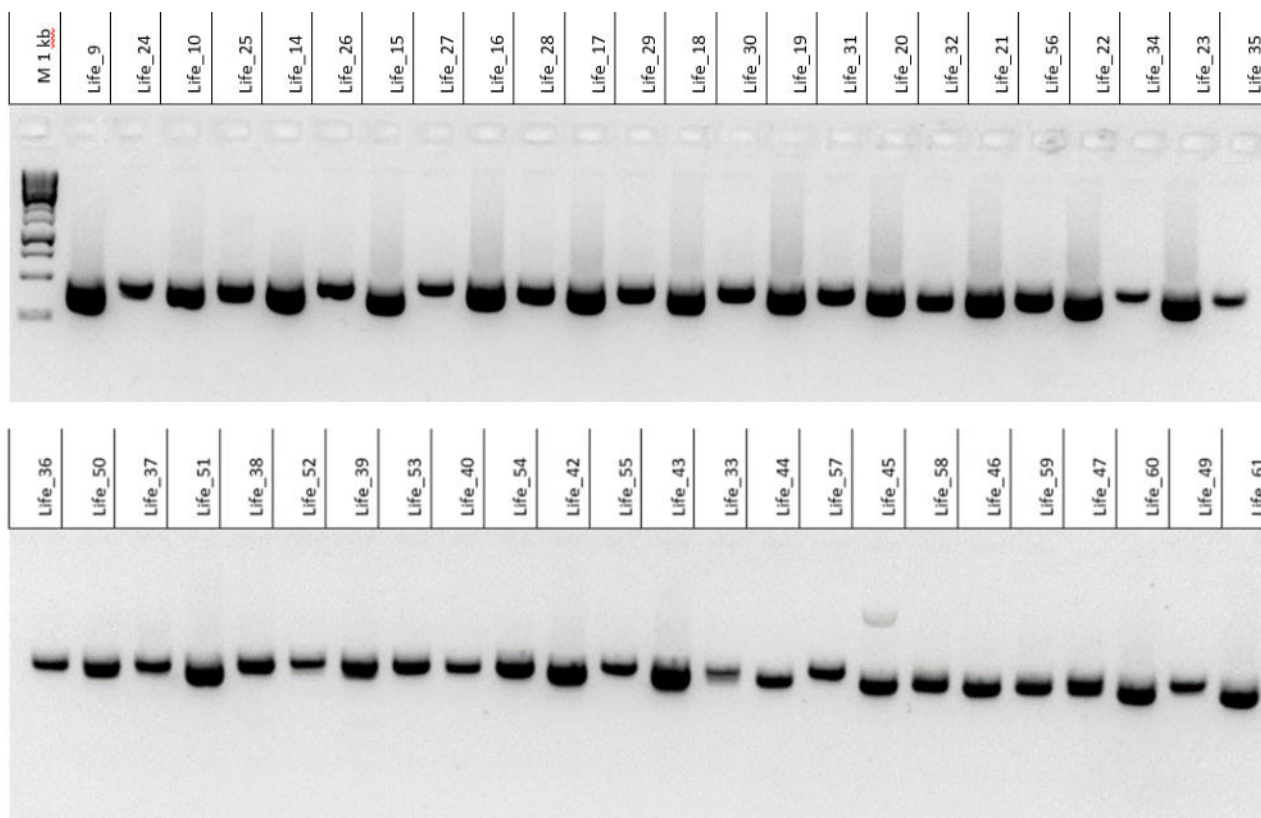


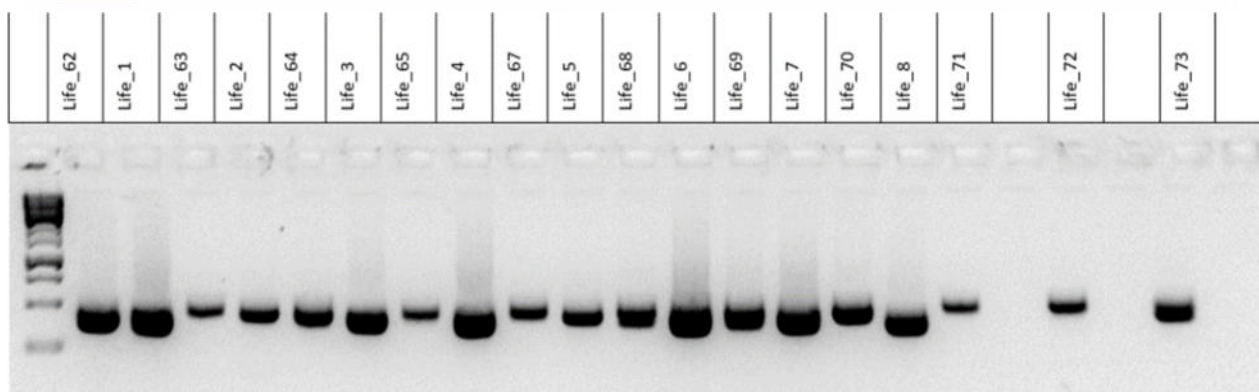
			Ilość (x60 ml)		filtr	ng/μl	260/280
24	13.06.2022	Żabi staw	1	22.06.13.BK331A	0.45	4.8	2.64
25	13.06.2022	Żabi staw	1	22.06.13.BK331B	0.45	11.7	1.92
26	13.06.2022	Cerekwianka (najbliżej ronda)	12	22.06.13.C1A	0.45	30.1	2.1
27	13.06.2022	Cerekwianka (najbliżej ronda)	12	22.06.13.C1B	0.45	5.2	2.8
28	13.06.2022	Cerekwianka	9	22.06.13.C2A	0.45	21.6	1.91
29	13.06.2022	Cerekwianka	9	22.06.13.C2B	0.45	24.2	1.89
30	13.06.2022	Cerekwianka	7	22.06.13.C3A	0.45	9.5	1.99
31	13.06.2022	Cerekwianka	7	22.06.13.C3B	0.45	20.8	1.93
32	13.06.2022	Kosówka	6	22.06.13.KK1A	0.45	17.2	1.82
33	13.06.2022	Kosówka	6	22.06.13.KK1B	0.45	4.6	2.86
34	13.06.2022	Mleczna z obu zatok	5	22.06.13.M1A	0.45	5.1	2.46
35	13.06.2022	Mleczna z obu zatok	5	22.06.13.M1B	0.45	4.2	2.13
36	13.06.2022	Potok Północny (Zbiorik Rutka)	5	22.06.13.PPTG1-A	0.45	5	2.78
37	13.06.2022	Potok Północny (Zbiorik Rutka)	5	22.06.13.PPTG1-B	0.45	6.5	2.48
38	13.06.2022	Stawy kolmatacyjne (bliżej żabiego stawu)	6	22.06.13.SK1A	0.45	5.9	2.18
39	13.06.2022	Stawy kolmatacyjne (bliżej żabiego stawu)	6	22.06.13.SK1B	0.45	4.6	2.86
40	13.06.2022	Stawy kolmatacyjne (Dalsze)	10	22.06.13.SK2A	0.45	5.1	2.12
41	13.06.2022	Stawy kolmatacyjne (Dalsze)	10	22.06.13.SK2B	0.45	4.3	2.05
42	22.06.2022	Przedszkole Grenadierów	3	22.06.PGK1	0.45	8.6	2.03
43	22.06.2022	Przedszkole Grenadierów	3	22.06.PGK2	0.45	8.7	2.13
44	22.06.2022	Gagarina	2	22.06.SGAK1	0.45	4.4	2.4
45	22.06.2022	Gagarina	2	22.06.SGAK2	0.45	3.9	2.42
46	22.06.2022	Ustronie	4	22.06-U-K1	0.45	21.4	1.98
47	22.06.2022	Ustronie	4	22.06-U-K2	0.45	5.4	2.32
48	04.07.2022	Kruklin Traszki łąka	7	2022-07-04K1	0.45	11.2	1.73
49	04.07.2022	Kruklin Traszki łąka	7	2022-07-04K2	0.45	7.9	2.08
50	05.07.2022	Kruklin Kukurydza; Kumak rzekotka	7	2022.07.05K1	0.45	16.3	2.02
51	05.07.2022	Kruklin Kukurydza; Kumak rzekotka	7	2022.07.05K2	0.45	17.6	2.08
52	11.08.2022	Cerekwianka (staw przy tablicy)	3	11.08.2022-C1-K1	0.45	27.2	1.99
53	11.08.2022	Cerekwianka (staw przy tablicy)	3	11.08.2022-C1-K2	0.45	5.8	2.38
54	11.08.2022	Cerekwianka	5	22.08.2022-C2-K1	0.45	4.3	2.57
55	11.08.2022	Cerekwianka	5	22.08.2022-C2-K2	0.45	6.1	2.17
56	11.08.2022	Cerekwianka	5	22.08.2022-C3-K1	0.45	6.5	2.34
57	11.08.2022	Cerekwianka	5	22.08.2022-C3-K2	0.45	10.3	1.87
58	11.08.2022	Cerekwianka	3	22.08.2022-C4-K1	0.45	9.8	1.83
59	11.08.2022	Cerekwianka	3	22.08.2022-C4-K2	0.45	10.3	1.93
60	11.08.2022	Cerekwianka	3	22.08.2022-C5-K1	0.45	33.6	1.93
61	11.08.2022	Cerekwianka	3	22.08.2022-C5-K2	0.45	21.3	1.88
62	11.08.2022	Mleczna	8	22.08.2022-M1-K1	0.45	11	1.86
63	11.08.2022	Mleczna	8	22.08.2022-M1-K2	0.45	12.1	1.72
64	11.08.2022	Mleczna	7	22.08.2022-M2-K1	0.45	10.8	1.89
65	11.08.2022	Mleczna	7	22.08.2022-M2-K2	0.45	13.3	1.78
66	18.08.2022	Kosówka	5	22.08.18-K01	0.22	16.2	1.9

67	18.08.2022	Kosówka	5	22.08.18-K02	0.22	15.3	1.85
68	18.08.2022	Mleczna Borki przy zaporze	5	22.08.18-MBN1K1	0.22	7.2	2.22
69	18.08.2022	Mleczna Borki przy zaporze	5	22.08.18-MBN1K2	0.22	11.3	2.34
70	18.08.2022	Mleczna Południe	9	22.08.18-MS1-K1	0.45	11.7	1.9
71	18.08.2022	Mleczna Południe	9	22.08.18-MS1-K2	0.45	12.5	1.68
72	18.08.2022	Stawy kolmatacyjne	5	22.08.18-SK1k1	0.45	7.1	1.75
73	18.08.2022	Stawy kolmatacyjne	5	22.08.18-SK1k2	0.22	15.1	2.07

2. Przygotowanie bibliotek metagenomowych

Pierwszą reakcją PCR puszczono z użyciem starterów na 16S rRNA (Vert-16SeDNA-F1 : Vert-16SeDNA-R1 [Vences et al. 2016]) wykrywających ryby i płazy, z dodatkiem blokera ludzkiego 16S rRNA MamMAVB1. Reakcję PCR puszczono w objętości 25 µl z dodatkiem 15 ng matrycowego DNA. Spodziewano się uzyskać produkt o wielkości ok. 355 bp. Reakcję PCR puszczono jednocześnie z DNA kontrolnych organizmów (38 gatunków ryb i 3 płazów - traszka, salamandra, ropucha szara) oraz kontrolą negatywną (bez DNA). Po oczyszczeniu produktów PCR za pomocą kulek magnetycznych Sera Mag przeprowadzono indeksowy PCR zgodnie z protokołem "16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Protocol" (Illumina Inc. Technical Note 15044223 2022). Przygotowane biblioteki w sumie 67 próbek oczyszczono za pomocą kulek magnetycznych Sera Mag a jakość sprawdzono na 2% żelu agarozowym (Ryc. 2).





Rycina 2. Elektroforegram produktów indeksowego PCR w 2% żelu agarozowym

Na podstawie intensywności świecenia przeprowadzono normalizację próbek i połączono wszystkie próbki w równych stosunkach ilościowych w ostateczną pulę, której molarność obliczono w NEB Tm Calculator na podstawie wartości Ct uzyskanych w reakcji qPCR.

Molarność puli złożonej z 67 próbek wyniosła 187.10 nM.

Przygotowaną pulę rozcieńczono do 4 nM, zdenaturowano 0.2 N NaOH i zsekwencjonowano na platformie MiSeq w trybie sparowanych odczytów 2x250 bp.

Po analizach jakości i usunięciu chimer uzyskano ostatecznie od 2113 do 60971 odczytów / próbkę. Sekwencje porównano z sekwencjami w bazie referencyjnej dla 16S rRNA kręgowców (NCBI, BOLD, autorskie uzupełnienie sekwencjami 16S RNA polskich gatunków ryb).

Dla 12 próbek nie udało się uzyskać wyników sekwencjonowania: Life_22, Life_24, Life_25, Life_32, Life_40, Life_42, Life_43, Life_44, Life_45, Life_46, Life_5 i Life_9

4. Wyniki i Dyskusja

W próbach wykryto następujące gatunki kręgowców: *Alburnus Alburnus*, *Ameiurus Nebulosus*, *Anas platyrhynchos*, *Anguilla sp.*, *Babka Gymnotrachelus*, *Ballerus sp.*, *Barbus barbus*, *Bombina bombina*, *Bufo bufo*, *Bufotes viridis*, *Canis sp.*, *Capreolus capreolus*, *Carassius sp.*, *Chondrostoma Nasus*, *Cobitis Taenia*, *Cyprinus sp.*, *Esox Lucius*, *Fulica sp.*, *Gobio sp.*, *Leucaspis Delineatus*, *Leuciscus Aspius*, *Leuciscus Idus*, *Lota Lota*, *Misgurnus Fossilis*, *Neogobius Fluviatilis*, *Neomys fodiens*, *Oncorhynchus sp.*, *Ondatra zibethicus*, *Pelophylax lessonae*, *Pelophylax sp.*, *Perca fluviatilis*, *Perca sp.*, *Proterorhinus sp.*, *Pseudorasbora parva*, *Pungitius Pungitius*, *Rana sp.*, *Romanogobio sp.*, *Rutilus rutilus*, *Rutilus sp.*, *Sabanejewia sp.*, *Salmo salar*, *Sander lucioperca*, *Scardinius Erythrophthalmus*, *Silurus Glanis*, *Sorex sp.*, *Squalius sp.*, *Sus scrofa*, *Talpa caeca*, *Tinca tinca*, *Triturus cristatus*, *Vulpes vulpes*. Szczegółowy procentowy udział gatunków przedstawiony jest w Załączniku 1.

Wykryte gatunki kręgowców przypisano obszarom badawczym i podzielono na stwierdzone w obszarach badawczych w okresie przedinwestycyjnym (2016) i poinwestycyjnym (2021-2022) (tab.3). Uzyskano dane o występowaniu 5 gatunków płazów, 20 gatunków ryb oraz o 2 gatunkach ptaków i 9 gatunkach ssaków. Ponadto w przypadku ryb zidentyfikowano 4 wyższe rzędy systematyczne, których nie można jednoznacznie przypisać do konkretnego gatunku: *Rutilus sp.* (której powszechnie występującym przedstawicielem jest płoć), rodzina Karpiołate, Rząd Karpiokształtne, Rodzina Leuciscidae, których przedstawiciele byli identyfikowani także osobno, dlatego nie ujęto ich w wyżej podanej sumie dla poszczególnych gromad.



Tab. 4. Gatunki stwierdzone w obszarach badawczych w okresie przedinwestycyjnym (2016) i poinwestycyjnym (2021-2022).

Gatunek	2016					2021-2022					
	Cerekwianka	Borki	Stawy kolmatacyjne	Mleczna S	Potok Północny	Cerekwianka	Stawy kolmatacyjne	Mleczna N	Mleczna S	Potok Północny	Ustronie
Płazy	1	2			1	4		2	1	3	
Ropucha szara						1					
Traszka grzebieniasta	1				1					1	
Żaba jeziorkowa						1		1		1	
Żaby brunatne		1				1			1	1	
Żaby zielone		1				1		1			
Ryby	2	10	8	1		11	9	14	14		4
Babka rzeczna	1							1			
Boleń pospolity									1		
Cierniczek północny		1	1			1	1	1	1		
Jaź		1				1	1	1	1		
Karaś	1	1	1			1	1	1	1		1
Karp		1					1	1	1		
Kiełb		1	1	1		1	1	1	1		
Lin							1	1	1		
Okoń		1	1			1	1	1	1		1
Piskorz						1					
Płoc		1	1					1			
Pstrąg									1		
Sandacz pospolity								1	1		
Słonecznica pospolita		1	1			1		1	1		1
Squalius sp. (np. Kleń)			1					1			
Sum						1					



Sumik karłowaty						1						
Szczupak pospolity		1				1	1	1	1			
Węgorz									1			
Wzdrega		1	1			1	1	1	1			1
Ryby nieoznaczone	1	2	2			1	2	4	2			3
Rutilus sp. (np. płoć)		1	1				1	1	1			1
Rodzina Karpowate	1	1	1			1	1	1	1			1
Rząd Karpiokształtne									1			
Rodzina Leuciscidae			1						1			1
Ptaki					1	2	1	2	1	1		
Krzyżówka					1	1		1	1		1	
Łyska						1	1	1				
Ssaki		2	2			2		3	7	1		
Dzik		1				1		1	1			
Krowa									1			
Pies			1					1	1			
Piżmak		1	1					1	1			
Ryjówka						1						
Rzęsorek rzeczek									1			
Sarna											1	
Kret									1			
Lis									1			
Suma	4	17	14	1	2	21	13	26	26	5	8	

Płazy

Spośród płazów oprócz gatunków szeroko rozpowszechnionych na obszarze naszego kraju: ropucha szara, żaba jeziorkowa, żaby brunatne, żaby zielone, których najwięcej, podobnie jak metodą tradycyjną wykryto na zrealizowanym w ramach projektu polderze Cerekwianka. Udało się także zidentyfikować traszkę grzebieniastą. Jej występowanie potwierdzono w dwóch lokalizacjach – Cerekwianka i Potok Północny, na których została stwierdzona metodą tradycyjną w okresie przedinwestycyjnym w roku 2016. Za największy sukces metody należy uznać potwierdzenie występowania tego gatunku w okresie poinwestycyjnym w pobliżu inwestycji projektu na Potoku Północnym mimo, że nie udało się tego potwierdzić metodą tradycyjną co potwierdza celowość zastosowania monitoringu eDNA. Występowanie tego gatunku w bliskiej odległości od nowoutworzonych w ramach projektu polderów zalewowych na Potoku Północnym daje nadzieję na możliwość kolonizacji obszaru po ukształtowaniu się odpowiednich siedlisk. Potwierdzono brak płazów na zbiorniku Ustronie, skąd, gdyby tam występowały, mogłyby się rozprzestrzeniać i zasiedlić, znajdujące się w pobliżu instalacje BZI (Climapondy). Z gatunków nie wykrytych metodą tradycyjną w okresie poinwestycyjnym (2021-2022) wykryto także żabę jeziorkową w dwóch lokalizacjach: rzece Mlecznej na północ od zbiornika Borki czyli w rejonie zrealizowanej meandryzacji rzeki oraz w pobliżu polderu na Potoku Północnym. Żaba jeziorkowa na rzece Mlecznej poniżej zbiornika Borki nie została wykryta metodą tradycyjną ani przed ani po inwestycji – jej występowanie, potwierdzone metodą eDNA może świadczyć o zwiększeniu bioróżnorodności tej lokalizacji, choć istnieje również prawdopodobieństwo, że DNA zostało przemieszczone z obszarów położonych wyżej lub któregoś z dopływów.



Fot 2. Pobór prób na zbiorniku Cerekwianka (maj 2022)

Ryby

Spośród 26 gatunków ryb stwierdzony w trakcie monitoringu metodą tradycyjną łącznie w trakcie monitoringu przed i poinwestycyjnego na wszystkich obszarach projektu, udało się potwierdzić występowanie 17 z nich w tym największym sukcesem jest potwierdzenie piskorza w obszarze Cerekwianka. Ponadto udało się stwierdzić występowanie 3 niewykrytych metodą tradycyjną gatunków: Babki rzecznej,



Pstrąga oraz Suma. Babka rzeczna została stwierdzona metodą eDNA na Cerekwiance w 2016 i na rzece Mlecznej poniżej zapory na zbiorniku Borki w monitoringu 2021-2022. W Polsce jest inwazyjnym gatunkiem obcym, po raz pierwszy zaobserwowanym w Bugu w 1997, obecnie występującym w dorzeczu Wisły. Pstrąg został stwierdzony na rzece Mlecznej powyżej zbiornika Borki (2021-2022) i jego obecność można wiązać najprawdopodobniej z zarybieniem lub ucieczką z hodowli gdyż jest gatunkiem udomowionym przez człowieka i najczęściej hodowanym w celach konsumpcyjnych. Dodatkowo stwierdzono Suma na Cerekwiance (2021-2022) co może świadczyć o korzystnej zmianie siedliskowej w wyniku działań projektu LIFE w tej lokalizacji. Oprócz Suma w roku 2022 w polderze Cerekwianka wykryto także inne pospolite gatunki nie stwierdzone metodą tradycyjną w tej lokalizacji: wzdręgę, słonecznicę co dodatkowo zwiększa ocenę bioróżnorodności tego zbiornika. Podobnie gatunki wykryte wyłącznie metodą eDNA na stawach kolmatacyjnych przy Zbiorniku Borki to: cierniczek, jaź, karp, kiełb.

Tab.5 Porównanie gatunków ryb stwierdzonych podczas monitoringu metodą tradycyjną i metodą eDNA.

Metoda tradycyjna	Metoda eDNA
Boleń <i>Aspius aspius</i>	+
Cierniczek <i>Pungitius pungitius</i>	+
Ciernik <i>Gasterosteus aculeatus</i>	
Czeczawka amurski <i>Pseudorasbora parva</i>	
Jazgarz <i>Gymnocephalus cernua</i>	
Jaź <i>Leuciscus idus</i>	+
Karaś pospolity <i>Carassius carassius</i>	+
Karaś srebrzysty <i>Carassius gibelio</i>	
Karp <i>Cyprinus carpio</i>	+
Kiełb <i>Gobio gobio</i>	+
Kleń <i>Leuciscus cephalus</i>	+
Koza <i>Cobitis taenia</i>	
Krąp <i>Blicca bjoerkna</i>	
Leszcz <i>Abramis brama</i>	
Lin <i>Tinca tinca</i>	+
Okoń <i>Perca fluviatilis</i>	+
Piskorz <i>Misgurnus fossilis</i>	+
Płoc <i>Rutilus rutilus</i>	+
Sandacz <i>Sander lucioperca</i>	+
Słonecznica <i>Leucaspis delineatus</i>	+
Sumik karłowaty <i>Ictalurus nebulosus</i>	+
Szczupak <i>Esox lucius</i>	+
Śliz <i>Barbatula barbatula</i>	
Trawianka <i>Percottus glenii</i>	
Węgorz <i>Anguilla anguilla</i>	+
Wzdrega <i>Scardinius erythrophthalmus</i>	+
Gatunki stwierdzone tylko w monitoringu eDNA	Babka rzeczna
	Pstrąg
	Sum



Fot 3. Zbieranie prób wody do naczynia zbiorczego (maj 2022)

Ptaki i ssaki

Choć nie było to planowane w monitoringu, dzięki zastosowaniu metody pozwalającej na identyfikację wszystkich kręgowców, dodatkowo w wyniku analiz laboratoryjnych pozyskano informację na temat DNA ptaków i ssaków. Z ptaków stwierdzono dwa gatunki ptaków wodnych: krzyżówkę i łyskę (2021-2022 - Stawy kolmatacyjne, rzeka Mleczna i Cerekwianka). Spośród ssaków - gatunki związane typowo ze środowiskiem wodnym: Rzęsorek rzeczek, Piżmak; udomowione Krowa, Pies, inne pospolite: Dzik, Ryjówka, Sarna, Kret, Lis.



Fot 4. Pobór prób na stawach kolmatacyjnych (maj 2022)



Podsumowanie

1. W wyniku monitoringu metodą eDNA uzyskano dane o występowaniu 5 gatunków płazów, 20 gatunków ryb oraz o 2 gatunkach ptaków i 9 gatunkach ssaków.
2. Wykrycie niezidentyfikowanych wcześniej gatunków, zarówno 3 gatunków w skali całego projektu jak również niezidentyfikowanych wcześniej gatunków na poszczególnych stanowiskach potwierdza, że monitoring eDNA jest skuteczną metodą uzupełniającą badania metodami tradycyjnymi i pozwala na dokładniejszą ocenę bioróżnorodności obszaru.
3. Dzięki metodzie eDNA udało się potwierdzić występowanie gatunków cennych z perspektywy Unii Europejskiej (wymienionych w załączniku Dyrektywy Siedliskowej) - traszki grzebieniastej i piskorza. Traszkę grzebieniastą potwierdzono w dwóch lokalizacjach – Cerekwianka i Potok Północny, na których została stwierdzona metodą tradycyjną w okresie przedinwestycyjnym w roku 2016 oraz wykryć ten gatunek w okresie poinwestycyjnym (2021-2022) w pobliżu inwestycji projektu na Potoku Północnym mimo, że nie udało się tego potwierdzić metodą tradycyjną. Metoda eDNA potwierdziła też występowanie piskorza w obszarze Cerekwianka w okresie poinwestycyjnym (2021-2022).
4. Dzięki zastosowaniu metody metabarkodowania za pomocą NGS dzięki której możliwa jest identyfikacja szerokiego spektrum gatunków (w przeciwieństwie do metody PCR celującej w jeden konkretny gatunek), udało się efektywnie kosztowo, pozyskać informację o występowaniu dodatkowych grup systematycznych (np. ptaków i ssaków).
5. Dane pozyskane w monitoringu eDNA pozwalają na stwierdzenie, że bioróżnorodność płazów i ryb w wyniku działań projektu LIFE wzrosła jeszcze bardziej niż wynika to z rezultatów monitoringu metodą tradycyjną.

Zał. 1 Wyniki Analiz laboratoryjnych

