

Inventarisatie aanwezigheid *B. salamandrivorans* in Nederland op basis van eDNA

Annemarieke Spitzen – van der Sluijs, Maarten Gilbert, Naomi Lambrixx , Jelger Herder



Colofon

Status uitgave:	eindrapport
Rapportnummer:	2021.124
Datum uitgave:	22 augustus 2022
Titel:	Inventarisatie aanwezigheid <i>B. salamandrivorans</i> in Nederland op basis van eDNA
Wijze van citeren:	Spitzen - van der Sluijs, A., M. Gilbert, N. Lambrikk & J. Herder. 2022. Inventarisatie aanwezigheid <i>B. salamandrivorans</i> in Nederland op basis van eDNA). Stichting RAVON, Nijmegen.
Samenstellers:	Annemarieke Spitzen, Maarten Gilbert, Jelger Herder, Naomi Lambrikk
Projectnummer:	2021.124
Projectleider:	Annemarieke Spitzen
Naam en adres opdrachtgever(s):	Nederlandse Voedsel-en Warenautoriteit Postbus 43006 3540 AA Utrecht
Referentie opdrachtgever(s):	60037379
Akkoord voor uitgave:	Jan Kranenbarg (Teamleider)

Paraaf:





RAVON

1 Inhoud

1	Inleiding	6
2	Methodiek	7
3	Resultaten	8
3.1	Wormdal (locatie 1)	10
3.2	Schinveld (locatie 2 en 3)	10
3.3	Putberg (locatie 4)	10
3.4	Vijlenerbos bronpoel (locatie 5)	10
3.5	Vijlenerbos poel Fokkebroekweg (locatie 6)	11
3.6	Pepinusbeekdal (locatie 7)	11
3.7	Ijzerenbos (locatie 8)	11
3.8	Meertensgroeve (locatie 9)	12
3.9	Eckelrade (locatie 10)	12
3.10	Bunderbos (locatie 11, 12 en 13)	12
3.11	Mariënwaard (locatie 14)	13
3.12	GaiaZOO (locatie 15)	13
3.13	Brummen (locatie 16)	13
3.14	Eefde (locatie 17)	13
3.15	Warnsveld (locatie 18)	13
3.16	Gorssel (locatie 19)	14
3.17	Vragenderveen/Korenburgerveen (locatie 20)	14
3.18	Bussum (locatie 21 en 22)	14
3.19	Hoofddorp (locatie 23)	14
3.20	Heemstede (locatie 24)	15
3.21	Bloemendaal (locatie 25)	15
3.22	Locaties 26, 27 en 28	15
3.23	Slochteren (locatie 29)	15
3.24	Staphorst (locatie 30)	16
3.25	Sint Anthonis (locatie 31)	16
3.26	Liesbos (locatie 32)	16
3.27	Norg (locatie 33)	16
3.28	Valthe (locatie 34)	16
3.29	Zaamslag (locatie 35 en 36)	17
3.30	Baarn (locatie 37)	17
4	Discussie	18
5	Referenties	19

2 Inleiding

De tot 2013 onbekende schimmelsoort *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bsal) is een chytride schimmel die uit Azië afkomstig is. Deze schimmel vreet letterlijk de huid van een gevoelige, geïnfecteerde salamander weg (salamandrivorans betekent: salamander-eter). Dieren die besmet raken sterven binnen enkele weken tijd (Martel et al., 2013; 2014). De schimmel is aanwezig op verschillende plekken in Nederland. In Zuid Limburg is de schimmel voor het eerst ontdekt (Spitzen – van der Sluijs et al., 2013; Martel et al. 2013) en treft daar de vuursalamander (*Salamandra salamandra*), de kleine watersalamander (*Lissotriton vulgaris*) en Alpenwatersalamander (*Ichthyosaura alpestris*). De populatie vuursalamanders is zwaar getroffen. Momenteel resteert nog 0,1% van de oorspronkelijke populatie (RAVON, 2022) en er is geen teken van herstel. In 2018 is de schimmel in Gelderland aangetroffen. Hier zijn de kamsalamander (*Triturus cristatus*) en de kleine watersalamander slachtoffer. De besmette populaties worden sinds 2018 jaarlijks opgevolgd en, net als in Zuid-Limburg, blijkt dat de schimmel jaarlijks wordt aangetroffen.

Door eerdere onderzoeken en meldingen die RAVON binnen krijgt via het Early Warning System amfibieziektes (EWS), zijn er plekken aan te merken die ‘verdacht’ zijn of waar vroeger eenmalig Bsal is aangetroffen, maar waar destijds geen mogelijkheden waren deze uitbraak op te volgen. Het is mogelijk dat hier nog wel Bsal aanwezig is, maar door de lage prevalentie en de verborgen levenswijze van salamanders niet opgemerkt wordt. Het is door deze laatste twee factoren ook niet efficiënt om pro-actief dieren te gaan bemonsteren om te onderzoeken via huidswabs of er in een populatie Bsal aanwezig is. Dit vanwege de grote benodigde steekproef (DiGiacomo en Koepsell, 1986) en de hiermee gepaard gaande arbeids- en laboratoriumkosten.

In 2020 is gepubliceerd dat het mogelijk is om met behulp van de environmental DNA (eDNA) techniek de schimmel in stilstaand water te detecteren (Spitzen – van der Sluijs et al., 2020). Door deze methodiek kan snel en efficiënt een ‘snapshot’ worden gekregen van de aan- of afwezigheid van Bsal op het moment van bemonsteren.

De NVWA heeft aan RAVON gevraagd om een landelijke screening uit te voeren naar de aanwezigheid (Bsal) in Nederland door middel van het nemen van eDNA samples. Dit onderzoek is in 2021 en in 2022 uitgevoerd. Het doel van dit project was om inzicht te krijgen in de huidige verspreiding van Bsal in Nederland.

3 Methodiek

In 40 geïsoleerde wateren is een eDNA-monster genomen. Hiervan zijn 29 locaties in 2021 (3 mei – 21 juni) bezocht en 11 locaties in 2022 (10 maart – 11 april) (tabel 1). De locaties zijn gekozen op basis van de database die is samengesteld met daarin verdachte plekken en locaties waar een keer eerder Bsal is aangetoond. Een verdachte plek kan bijvoorbeeld een locatie zijn waar een vrijwilliger melding maakt dat het aantal salamanders op hun monitoringsroute achteruit is gegaan zonder evidente oorzaak. Tevens is ook rondom particuliere huishoudens bemonsterd waarvan bekend was dat er in een salamandercollectie op dat adres de schimmel is aangetroffen en waar salamanders in buitenverblijven/de tuin worden gehouden. De locaties zijn in deze rapportage allemaal geanonimiseerd vanwege privacy redenen. Op de meetpunten 2, 10 en 22 is zowel in 2021 als in 2022 een watermonster genomen (tabel 1).

Het nemen van een eDNA-monster gebeurt door het filteren van 2 liter water uit de vijver of de poel over een eDNA filter (Spitzen – van der Sluijs et al., 2020). De eDNA-methode is gebaseerd op het feit dat alle soorten DNA sporen in hun leefomgeving achterlaten. Dit eDNA kan worden verzameld in milieu monsters van onder andere water, bodem en uitwerpselen. Na de monsternamen wordt het DNA geëxtraheerd en geanalyseerd met behulp van een kwantitatieve PCR (qPCR) met soortspecifieke primers (in dit geval voor Bsal). De eDNA-monsterkits zijn geleverd en geanalyseerd door het Franse onderzoeksinstituut SpyGen (www.spygen.fr). Bij het veldwerk is het RAVON-hygiëneprotocol gevolgd (https://ravon.nl/Portals/2/Bestanden/Publicaties/Hygiene_protocol.pdf).

4 Resultaten

Van de metingen op de 37 unieke locaties is er op drie locaties Bsal aangetroffen (tabel 1, figuur 1). Drie locaties (nummer 2, 11 en 29) zijn zowel in 2021 als in 2022 bemonsterd.

Tabel 1. *De bemonsterde locaties in 2021 en in 2022. De nummers in de eerste kolom corresponderen met de nummers in het kaartje (figuur 1). Het resultaat is aangegeven door een N (negatief voor Bsal) en P (positief voor Bsal). De datum is de datum van monsternamen.*

Nr op kaart	provincie	locatie	resultaat Bsal	datum
1	Limburg	Wormdal	N	5-mei-21
2	Limburg	Heringsbosch	P	5-mei-21
2	Limburg	Heringsbosch	P	11-apr-22
3	Limburg	Schinveldse bossen	N	11-apr-22
4	Limburg	bronpoel Putberg	N	5-mei-21
5	Limburg	Vijlenerbos bronpoel	N	5-mei-21
6	Limburg	poel Fokkebroekweg	N	5-mei-21
7	Limburg	Pepinusbeekdal	N	6-mei-21
8	Limburg	Ijzerenbos	N	10-mei-21
9	Limburg	Meertensgroeve	N	8-mei-21
10	Limburg	Eckelrade	N	27-mei-21
11	Limburg	tuinvijver Bunderbos (1)	P	5-mei-21
11	Limburg	tuinvijver Bunderbos (1)	P	10-mrt-22
12	Limburg	Bunderbos	N	5-mei-21
13	Limburg	tuinvijver Bunderbos (2)	N	10-mrt-22
14	Limburg	Mariënwaard	P	10-mrt-22
15	Limburg	GaiaZOO	N	11-apr-22
16	Gelderland	Brummen	N	4-mei-21
17	Gelderland	Eefde	N	3-mei-21
18	Gelderland	Warnsveld	N	14-mrt-22
19	Gelderland	Gorssel	N	21-mrt-22
20	Gelderland	Vragenderveen	N	16-mrt-22
21	Noord-Holland	Bussum (locatie 1)	N	4-mei-21
22	Noord-Holland	Bussum (locatie 2)	N	4-mei-21
23	Noord-Holland	Hoofddorp	N	3-mei-21
24	Noord-Holland	Heemstede	N	6-mei-21
25	Noord-Holland	Bloemendaal	N	6-mei-21
26	Noord-Holland	anoniem	N	21-jun-21
27	Noord-Holland	anoniem	N	17-jun-21
28	Zuid-Holland	anoniem	N	31-mei-21
29	Groningen	Slochteren	N	12-mei-21
29	Groningen	Slochteren	N	4-apr-22
30	Overijssel	Staphorst	N	12-mei-21
31	Noord-Brabant	Sint Anthonis	N	11-mei-21

32	Noord-Brabant	Liesbos	N	7-apr-22
33	Drenthe	Norg	N	12-mei-21
34	Drenthe	Valthe	N	12-mei-21
35	Zeeland	Zaamslag (locatie 1)	N	10-mei-21
36	Zeeland	Zaamslag (locatie 2)	N	18-mei-21
37	Utrecht	Baarn	N	1-jun-21



Figuur 1. De ligging van de bemonsterde locaties. De nummering komt overeen met de nummering in tabel 1. De rode bolletjes zijn de Bsal positieve locaties. Op de met groene bolletjes aangegeven locaties is geen Bsal gevonden.

4.1 *Wormdal (locatie 1)*

In het Wormdal is in 2015 Bsal aangetroffen (Spitzen – van der Sluijs et al., 2016a). De monitorder in dit gebied meldde een enorme afname van het aantal salamanders. Deze afname betrof in de periode 2000 – 2013 voor de kleine watersalamander 87%, voor de Alpenwatersalamander 97%, voor de kamsalamander 96% en de vinpootsalamander met 94%. In 2015 zijn 22 kleine watersalamanders en 12 Alpenwatersalamanders bemonsterd d.m.v. huidswabs. Eén van de kleine watersalamanders testte positief op Bsal.

Sindsdien wordt vinger aan de pols gehouden op deze locatie. In 2017 (3 mei) zijn 10 Alpenwatersalamanders en 15 kleine watersalamanders bemonsterd én is een eDNA sample genomen. Geen van de dieren en het watermonster testte toen positief op Bsal. Ook in 2021 is de schimmel niet aangetroffen (tabel 1).

4.2 *Schinveld (locatie 2 en 3)*

In een zwemvijver in Schinveld is Bsal aangetroffen. De eigenaar meldt sinds 2018 met regelmaat bijzonderheden. Zo meldde hij in 2018 een tiental dode kikkers en 3 dode salamanders. Bij de dode salamanders staken de darmen uit het lichaam, waardoor we aan predatie dachten. In 2020 werden ook dode salamanders gevonden die ook gepreedeerd leken te zijn en in 2021 vond de eigenaar een bruine kikkerlarve met de darmen eruit, en enkele dode salamanders, waaronder een Alpenwatersalamander (april 2021) die extreem aan het vervellen was én witte plekken op de huid had. Dit dier is getest, maar testte negatief op de aanwezigheid van Bsal. In mei 2021 en in april 2022 werd wél Bsal aangetroffen door middel van het eDNA-monster dat er is genomen. In 2022 zijn er geen zieke of dode dieren gemeld. Dat kan ook komen doordat de eigenaar een jaar op reis is en de tijdelijke bewoners minder alert zijn.

Locatie drie betreft een vijver in de Schinveldse bossen. Deze plek is uitgezocht omdat deze in de buurt van de besmette tuinvijver ligt én omdat er kamsalamander voorkomt (laatste waarneming van twee individuen in april 2021). Het eDNA-monster wat hier in april 2022 is genomen, test negatief.

4.3 *Putberg (locatie 4)*

Op deze locatie is op 5 mei 2021 een mengmonster genomen uit de bronput, de ingegraven drinkbakken en een betonnen poeltje. Lange tijd heeft een uitgezette populatie vuursalamanders zich op deze locatie gehandhaafd. Echter, door de introductie van Bsal is deze populatie uitgestorven. In 2014 en in 2015 zijn twee Alpenwatersalamanders dood aangetroffen (Spitzen – van der Sluijs et al., 2016a). Nadien is geen onderzoek meer gedaan op deze locatie. Het watermonster dat in dit onderzoek is genomen heeft geen aanwezigheid van Bsal aangetoond.

4.4 *Vijlenerbos bronpoel (locatie 5)*

Het Vijlenerbos is ook leefgebied van de vuursalamander. In 2013 en in 2014 zijn er 40 swabs genomen van de Alpenwatersalamander in dit gebied. De dieren werden

bemonsterd o.a. in de Klitserbeek en de Berversbergbeek. Geen van deze dieren testte positief op Bsal. In 2015 zijn er 231 swabs verzameld, waarvan 198 van de Alpenwatersalamander en 33 van de kleine watersalamander. Eén van deze 231 swabs testte positief. In 2016 is nog één swab van een Alpenwatersalamander verzameld en in 2018 en in 2019 ook van twee levende vuursalamanders. In 2019 werd ook een dode vuursalamander gevonden, maar al deze monsters testten negatief voor Bsal.

Er is dus geen recente status van de aanwezigheid en prevalentie van Bsal in het Vijlenerbos. Het mengmonster dat op 5 mei 2021 is genomen van de bronpoel en één betonnen poeltje testte negatief voor Bsal.

4.5 *Vijlenerbos poel Fokkebroekweg (locatie 6)*

Deze poel staat in verbinding met de Klitserbeek. De laatste waarneming van een salamander dateert van 2017. In 2014 en in 2015 zijn er swabs verzameld van Alpenwatersalamanders en kleine watersalamanders, maar deze testten altijd negatief op Bsal. Het eDNA sample van 5 mei 2021 ook.

4.6 *Pepinusbeekdal (locatie 7)*

Op deze locatie zijn in 2014 bij toeval twee dode kleine watersalamanders in een fuik aangetroffen. Deze dieren zijn voor Bsal analyse aangeboden en één van deze twee salamanders testte positief op de schimmel. Nadien is hier geen opvolging aan gegeven. Het sample wat op 6 mei 2021 is genomen, testte negatief voor de schimmel.

4.7 *IJzerenbos (locatie 8)*

In mei 2021 werden op deze locatie enkele kleine watersalamanders gezien met letsels (zie figuur 2). Om te kunnen nagaan of Bsal hier aanwezig is, werd op 10 mei een eDNA-monster genomen. De schimmel is niet aangetroffen.



Figuur 2. Een kleine watersalamander met letsels, gevonden in het IJzerenbos. Foto: Naomi Lambrikkx

4.8 Meertensgroeve (locatie 9)

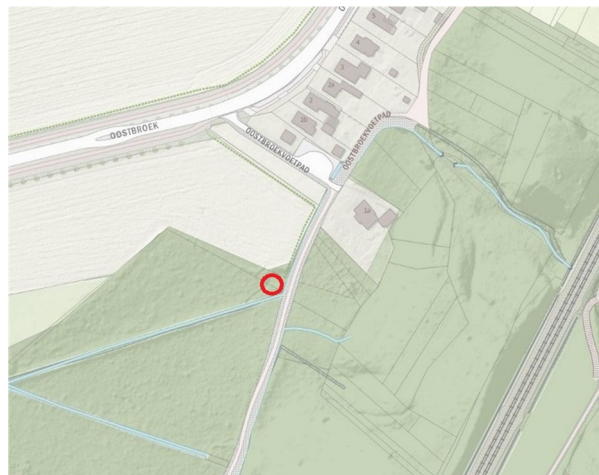
In mei 2018 zijn er op deze locatie 13 swabs van Alpenwatersalamanders genomen. Geen van deze dieren testte positief op Bsal. In 2020 en in 2021 is er wel twee keer een dode vroedmeesterpad gevonden. Beide dieren testten positief op de aanwezigheid van *B. dendrobatidis* (Bd). Het watermonster dat op 8 mei 2021 was genomen was negatief voor Bsal.

4.9 Eckelrade (locatie 10)

De eigenaar van dit perceel heeft aangegeven dat niet alleen de populatie vroedmeesterpadden is ingestort, maar ook dat er de afgelopen jaren steeds minder salamanders worden gezien. Op 27 mei 2021 is een eDNA-monster genomen, maar de schimmel is niet aangetroffen.

4.10 Bunderbos (locatie 11, 12 en 13)

Locatie 11 is een tuinvijver waar al sinds 2015 Bsal wordt aangetroffen. Hier is intensief onderzoek gedaan. In 2014 werd een dode vuursalamander in de tuin gevonden, maar dit dier testte negatief op de schimmel. Vervolgens werden in 2015 52 swabs genomen van kleine watersalamanders en Alpenwatersalamanders. Hiervan testten vier dieren positief op Bsal. In 2016 werden 39 swabs genomen, Bsal werd toen niet gevonden. In 2018 zijn 151 dieren bemonsterd, de prevalentie was toen 3%. In 2019 en in 2021 was de prevalentie respectievelijk 0,3% en 10%. Deze locatie is ook via eDNA opgevolgd. In 2018, 2020, 2021 en in 2022 leverde dit een positieve uitslag op (aanwezigheid Bsal). In 2019 werden 13 eDNA samples genomen (van februari t/m december), maar geen DNA van de schimmel aangetroffen. Opmerkelijk is dat op deze locatie nooit zieke en/of dode watersalamanders worden gemeld.



Figuur 3. De ligging van locatie 12 in het Bunderbos waar een eDNA-monster is genomen.

In het Bunderbos is Bsal wereldwijd voor het eerst opgemerkt. Na een initiële intensieve screening van zowel de vuursalamanders, Alpenwatersalamanders en kleine watersalamanders is dit gestopt in 2021. Op locatie 12 (figuur 3) is een watermonster genomen in een recent opgeschoond poeltje wat er nu geschikt uitziet voor vuursalamanders. Hier is geen Bsal aangetoond. De huidige status van Bsal in het Bunderbos is niet bekend.

Locatie 13 is ook een tuinvijver in het Bunderbos. In de buurt van deze tuin had de eigenaar in 2021 een dode vuursalamander gevonden. Dat dier was negatief voor Bsal, maar gezien

de ligging én de positieve watersalamanders jaarlijks op locatie 10, was dit de reden om hier watermonster te nemen. Er is in dit sample geen Bsal aangetroffen.

4.11 *Mariënwaard (locatie 14)*

De kamsalamander staat onder druk in Limburg. De hier bemonsterde locatie is één van de weinige plekken waar de soort nog aanwezig is. Om deze reden is deze locatie uitgekozen om te bemonsteren op Bsal. Dat hier de schimmel is gevonden heeft grote implicaties voor het beheer en voor de staat van instandhouding van de kamsalamander in Limburg. De kamsalamander heeft een hogere gevoeligheid voor een Bsal-besmetting dan andere watersalamanders. De voorgenomen verbeteringen door Limburgs Landschap om de connectiviteit te verbeteren worden nu even stil gezet om verder onderzoek uit te voeren.

4.12 *GaiaZOO (locatie 15)*

In de dierentuin worden inheemse vuursalamanders uit het Bunderbos opgevangen. Helaas werd hier in 2020 Bsal aangetroffen bij vuursalamanders die in buitenverblijven waren gehuisvest. Nadien is onderzocht of achterhaald kon worden waar in de omgeving (zowel in als buiten de dierentuin) de besmetting nog meer aanwezig was, maar alle bemonsterde salamanders en wateren testten negatief voor Bsal (Gilbert et al. 2022). Het eDNA-monster is ook in april 2022 negatief.

4.13 *Brummen (locatie 16)*

In juni 2020 werden op deze locatie een aantal kleine watersalamanders gevonden. De dieren leken verlamd (bewogen moeizaam) en gingen dan dood. Het verzamelde eDNA-monster in mei 2021 was negatief voor Bsal. Nadien zijn er geen zieke of dode dieren meer waargenomen.

4.14 *Eefde (locatie 17)*

In april 2020 werden er door de eigenaar van de tuinvijver op deze locatie een groot aantal dode kleine water- en kamsalamanders gemeld. Ook waren er twee kikkers dood gegaan. Alle dieren lagen bij elkaar in de buurt. Deze salamanders zijn destijds geanalyseerd door de universiteit Gent en testten negatief voor Bsal. In mei 2021 is een eDNA sample genomen en ook hierin werd de schimmel niet gevonden. Wat de sterfte heeft veroorzaakt is niet bekend. Deze locatie is interessant gezien de nabije ligging ten opzichte van de Bsal-uitbraak in Gorssel.

4.15 *Warnsveld (locatie 18)*

Net als locatie 17, is ook deze locatie interessant wat betreft de ligging nabij Gorssel. In een natuurgebied nabij Warnsveld is in maart 2020 door Natuurmonumenten melding gemaakt van drie dode kamsalamanders. Uiteindelijk is één van deze dieren onderzocht door Dutch Wildlife Health Centre (DWHC) en werd geen Bsal, Bd of ranavirus

aangetroffen. In 2021 is nabij landgoed 't Velde ook een eDNA sample genomen. Deze was negatief voor Bsal.

De hier bemonsterde locatie (locatie 18) is een plek waar uitgezette vroedmeesterpadden voorkomen. Deze soort komt van nature alleen voor in Zuid-Limburg. Deze vroedmeesterpadden zijn enkele tientallen jaren geleden uitgezet een paar huizen verderop. De eigenaar meldde in juli 2021 dat er groene kikkers en vier salamanders (drie kleine watersalamanders en één kamsalamander) waren doodgegaan. Het eDNA-monster in deze tuinvijver was negatief voor Bsal.

In het kader van een ander project is op nog twee locaties in Warnsveld een eDNA sample genomen (maart 2022). Ook hier werd de schimmel niet aangetroffen.

4.16 *Gorssel (locatie 19)*

Deze locatie, een tuinvijver, ligt in het Bsal-uitbraakgebied in Gorssel. De eigenaresse van de tuinvijver geeft in juli 2021 aan dat ze geen kleine watersalamanders meer aantreft. In maart 2022 wordt het eDNA sample verzameld en de dag erna meldt de bewoonster een dode kleine watersalamander. Dit dier lijkt door een predator te zijn aangevallen (de foto toont een wond op de kop). Het eDNA-monster is negatief voor Bsal en op 3 juli 2022 zag de eigenaresse een kleine watersalamander in de vijver.

4.17 *Vragenderveen/Korenburgerveen (locatie 20)*

In mei 2021 werd in het Korenburgerveen een bijna dode kamsalamander gevonden. Dit dier is niet geanalyseerd, maar omdat dit redelijk in de omgeving van Gorssel is, werd besloten om hier in 2022 een eDNA sample te nemen. Dit monster was negatief voor Bsal. In 2022 is in het gebied tijdens de monitoring geen kamsalamander meer waargenomen.

4.18 *Bussum (locatie 21 en 22)*

In 2017 meldden de monitorders van twee poelen, een weilandpoel en een poel nabij een sportcentrum in Bussum een achteruitgang van zowel het aantal salamanders als ook andere amfibieën. In de locatie bij het sportcentrum kwam vroeger ook de kamsalamander voor, maar nu niet meer en ook de kleine watersalamander neemt in aantal af. In mei 2021 zijn op beide plekken eDNA samples genomen en beide waren negatief voor Bsal.

4.19 *Hoofddorp (locatie 23)*

Al in 2015 meldde deze tuinvijvereigenaar veel dode kleine watersalamanders in één van zijn tuinvijvers. Destijds zijn de dieren ingevroren en opgehaald, alleen zijn ze kwijt geraakt en daardoor nooit geanalyseerd. In 2016 zijn in de betreffende vijver nauwelijks nog

salamanders waargenomen. In de tweede vijver op het perceel zaten wél watersalamanders. In 2017 was er weer een massale sterfte in deze vijver (figuur 4). Deze dieren zijn geanalyseerd door de Universiteit Gent en er werd geen Bsal aangetroffen. In mei 2021 is een eDNA sample genomen, maar ook deze was negatief voor de schimmel. Wat de sterfte heeft veroorzaakt is dus onbekend.



Figuur 4. In 2017 werden er op locatie 23 weer veel dode kleine watersalamanders gevonden. De dieren zijn geanalyseerd en Bsal werd niet aangetroffen. Foto: H Biard.

4.20 Heemstede (locatie 24)

Ook in Heemstede werden in 2020 in een tuinvijver veel dode kleine watersalamanders gevonden in enkele dagen tijd.

Drie dieren zijn geanalyseerd op zowel de schimmel *B. dendrobatidis* als op Bsal en voor beide testten de dieren negatief. Ook hier is in mei 2021 een eDNA sample genomen en ook dit monster was negatief voor Bsal.

4.21 Bloemendaal (locatie 25)

In mei 2020 meldden de eigenaren van een tuinvijver in Bloemendaal dode kleine watersalamanders. De dieren waren toen al te ver vergaan om te laten analyseren. Het eDNA sample dat in mei 2021 is genomen kon de schimmel Bsal niet aantonen.

4.22 Locaties 26, 27 en 28

In de omgeving van deze bemonsteringslocaties wonen hobbyisten die salamanders houden in buitenterraria. In deze collecties is Bsal aangetroffen. De eDNA samples zijn in de omgeving van de woningen genomen om te kijken of de schimmel zich buiten de tuinen heeft verspreid. De schimmel is niet aangetroffen.

4.23 Slochteren (locatie 29)

In deze tuinvijver in Slochteren werden in 2017 en in 2020 dode kleine watersalamanders gemeld. Een dier uit 2020 is geanalyseerd en testte negatief op Bsal. In 2020 is ook de vijver volledig leeggehaald en er is nieuw folie in gelegd. In 2021 is een eDNA sample genomen. Dat testte negatief op Bsal, maar omdat er ook in dat jaar meer dode kleine watersalamanders werden gemeld, is ook in 2022 een watermonster genomen. Ook nu werd de schimmel niet waargenomen.

4.24 Staphorst (locatie 30)

De recreatieplas Zwarte Dennen in boswachterij Staphorst is een locatie waar in het verleden een uitbraak van ranavirus is geweest waardoor grote sterfte bij knoflookpadden is geweest (Spitzen – van der Sluijs et al. 2016b). Vanwege deze geschiedenis én de functie van het water als zwemwater waardoor deze door veel mensen wordt bezocht, was de reden hier een eDNA sample te nemen in 2021. De salamanderschimmel werd niet aangetroffen.

4.25 Sint Anthonis (locatie 31)

Begin 2020 kregen we de melding dat er ineens vijf dode Alpenwatersalamanders in een tuinvijver waren gevonden en de dagen erna werden er steeds weer één of twee dood aangetroffen. De vijver bestond al 15 jaar en nooit eerder waren er dode dieren gevonden. Een aantal dieren is in 2020 getest en toen werd Bsal niet aangetroffen. Ook in het eDNA-monster dat in mei 2021 is verzameld is de schimmel niet aangetroffen

4.26 Liesbos (locatie 32)

In dit gebied werden in 2015 kleine watersalamanders gemeld met verwondingen en met bloating (vochtaccumulatie in het lichaam). In juli 2017 vond een collega een dode kamsalamander. Dit dier werd getest op Bsal, maar de schimmel werd niet gevonden. De monitorder in het gebied gaf aan in 2021 én in 2022 geen kamsalamander meer te hebben waargenomen. Het eDNA-monster leverde geen Bsal op.

4.27 Norg (locatie 33)

Deze tuinvijver in Norg heeft al een lange geschiedenis van de aanwezigheid van ranavirus bij groene kikkers. In 2016 werd ranavirus bij een aantal groene kikkers bevestigd door DWHC. Een dode kamsalamander bleek niet besmet te zijn met Bsal. Ook in 2017 werd een dode kamsalamander gevonden. Door andere melders werd in 2021 in Norg een dode ringslang én een dode bruine kikker gemeld. Beide dieren waren niet bewaard om te kunnen analyseren. Niet alleen vanwege de gemelde sterfte en de aanwezigheid van ranavirus was dit een interessante locatie. De kamsalamanders zijn geïntroduceerd in 1990 en ook hebben er vinpootsalamanders in de vijver gezeten (ook een illegale introductie). In de vijver is geen Bsal aangetroffen.

4.28 Valthe (locatie 34)

Deze locatie is uitgekozen omdat zich hier een grote populatie knoflookpadden bevindt die jaarlijks kunnen rekenen op veel bezoek van mensen die graag eens een knoflookpad willen zien. Ook komt op deze locatie de kamsalamander voor. Het is om deze reden dat het besmettingsgevaar hoog wordt ingeschat. Er is geen Bsal aangetoond, maar voorzichtigheid blijft geboden.

4.29 Zaamslag (locatie 35 en 36)

Rondom Zaamslag gaat de kamsalamanderpopulatie al vele jaren gestaag achteruit, maar vooral de laatste jaren lijkt het sneller te gaan, met in 2021 maar twee exemplaren. Het leefgebied lijkt niet veranderd en het is niet duidelijk wat deze achteruitgang veroorzaakt. In de twee wateren waar Bsal is bemonsterd is de schimmel niet gevonden.

4.30 Baarn (locatie 37)

In 2019 waren er in het Baarnse bos meerdere kleine watersalamanders dood gevonden over een periode van twee weken. Tevens zijn in deze omgeving in 2020 en in 2021 stervende padden en misvormde kikkers gemeld. De kikkervisjes én volwassen dieren met misvormde poten zijn ook in 2022 waargenomen (figuur 5). Het eDNA-monster testte negatief op Bsal.



Figuur 5. In 2021 en in 2022 werden in Baarn misvormde groene kikkers gemeld.
Foto's: Anna Luijten

5 Discussie

Het nemen van eDNA-monsters in combinatie met het 'Early Warning System' lijkt een veelbelovende manier om Bsal te kunnen ontdekken. Lopend onderzoek zal duidelijk moeten maken wat de beste periode is om Bsal te kunnen detecteren in het water. Dit lijkt nu het (zeer) vroege voorjaar te zijn. In 2021 zijn ook wel eDNA samples genomen in mei of juni, zoals het nu lijkt buiten de optimale periode.

De bevestiging van Bsal in de tuinvijver in het Bunderbos is waardevol. De schimmel is hier al sinds 2014 aanwezig en blijft dus ook in het water aanwezig. Deze constatering maakt het extra waardevol te voorkomen dat de schimmel zich verder verspreidt en ook op nieuwe locaties zal vestigen. De twee nieuwe locaties (nummer 2 en 14) zijn waardevolle ontdekkingen. Met name locatie 14, waar net plannen werden gemaakt om de populatie kamsalamanders te versterken, is het relevante informatie om in de planvorming mee te nemen.

De locaties waar bemonsterd is in de omgeving van particulieren met salamanders in buitenverblijven waarin in het verleden Bsal is aangetroffen testten negatief. Deze samples zijn wel vrij laat in het seizoen verzameld. Het is goed om in deze omgeving alert te blijven op zieke en dode salamanders.

Belangrijke kanttekening is dat het níet aantonen van Bsal op een bepaalde plek met een eDNA sample niet betekent dat de schimmel hier ook daadwerkelijk niet zit, of nooit heeft gezeten. Het nemen van een eDNA sample betekent dat er alleen op dat specifieke moment op die specifieke locatie geen Bsal in het water is aangetroffen. Veel is nog onbekend over de verspreiding van de schimmel en hiermee dient bij de interpretatie van de uitslagen rekening gehouden te worden.

6 Referenties

DiGiacomo, R.F., Koepsell, T.D. (1986). Sampling for detection of infection or disease in animal populations. *JAVMA* 189, 22-23.

Martel, A. et al. (2013). *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *PNAS* 110(38): 15325-15329.

Martel, A. et al. (2014). Recent introduction of a chytrid fungus endangers Western Palearctic salamanders. *Science* 346(6209): 630-631.

RAVON (2022). Website: www.ravon.nl/soorten/soortinformatie/vuursalamander
toegang: 20 juli 2022

Spitzen - van der Sluijs, A. et al. (2016a). Expanding distribution of lethal amphibian fungus *Batrachochytrium salamandrivorans* in Europe. *Emerging Infectious Diseases* 22, 1286-1288.

Spitzen - van der Sluijs, A.M. (et al.). (2016b). The course of an isolated ranavirus outbreak in a *Pelobates fuscus* population in the Netherlands. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery* 26, 1-5.

Spitzen - van der Sluijs et al. (2020). Using environmental DNA for detection of *Batrachochytrium salamandrivorans* in natural water. *Environmental DNA* 2(4): 565-571.

Gilbert, M., Spitzen - van der Sluijs, A.. (2022). Vuursalamanders en *B. salamandrivorans* in Kerkrade, Stichting RAVON, Nijmegen. .