

Aanvullend natuuronderzoek Vughtse Hoeve te Vught

Aanvullend onderzoek naar kamsalamander, steenuil, huismus en
vleermuizen in het kader vna de wet- en regelgeving voor natuur

Definitief

Sweco Nederland B.V.
Eindhoven, 7 november 2016

Verantwoording

Titel : Aanvullend natuuronderzoek Vughtse Hoeve te Vught
Subtitel : Aanvullend onderzoek naar kamsalamander, steenuil, huismus en vleermuizen in het kader vna de wet- en regelgeving voor natuur
Projectnummer : 341894
Referentienummer : SWNL0194838
Revisie : D1
Datum : 7 november 2016

Auteur(s) : G.R. Meijer MSc
E-mail adres : gijs.meijer@sweco.nl
Gecontroleerd door : ing. J.A. van Vliet
Paraaf gecontroleerd : 
Goedgekeurd door : drs. S. Groot Jebbink MSc mcd
Paraaf goedgekeurd : 
Contact : Sweco Nederland B.V.
Zernikestraat 17
5612 HZ Eindhoven
Postbus 1265
5602 BG Eindhoven
T +31 88 811 66 00
F +31 30 310 04 14
www.sweco.nl

Inhoudsopgave

1	Inleiding	4
1.1	Aanleiding	4
1.2	Plangebied.....	4
1.3	Voorgenomen ontwikkeling.....	5
2	Toetsingskader.....	6
2.1	Flora- en faunawet	6
2.2	Wet natuurbescherming	7
3	Onderzoeksmethode	9
3.1	Methodieken	9
3.1.1	Kamsalamander	9
3.1.2	Steenuil.....	9
3.1.3	Huismus.....	10
3.1.4	Vleermuizen.....	10
3.1.5	Wet natuurbescherming	10
3.2	Overzichtstabel	11
4	Resultaten en effectbepaling	12
4.1	Inleiding	12
4.2	Kamsalamander	12
4.3	Steenuil.....	12
4.4	Huismus.....	13
4.5	Vleermuizen.....	13
4.6	Wet natuurbescherming	15
4.6.1	Resultaten.....	15
5	Conclusie	16

Bijlage 1: eDNA onderzoek kamsalamander

1 Inleiding

1.1 Aanleiding

Ontwikkelingsmaatschappij Ruimte voor Ruimte C.V. is voornemens in plangebied Vughtse Hoeve in Vught woningbouw mogelijk te maken. Voor deze ontwikkeling wordt een nieuw bestemmingsplan opgesteld. In het kader van dit bestemmingsplan is door Sweco Nederland B.V. (voormalig Grontmij Nederland B.V.) een verkennend natuuronderzoek¹ uitgevoerd. Hieruit bleek dat er mogelijk belemmeringen zijn voor de voorgenomen ontwikkeling vanuit de Flora- en faunawet. Het plangebied heeft mogelijk een (essentiële) functie voor de strikt beschermde kamsalamander en vleermuizen (tabel 3 Ffwet) en vogels met jaarrond beschermd leefgebied (steenuil en huismus). Geconcludeerd is dat nader soortgericht onderzoek noodzakelijk is om de effecten op deze soorten te bepalen.

De resultaten van de soortgerichte onderzoeken zijn in dit rapport beschreven. Tevens wordt inzicht gegeven of sprake is van een ontheffingsplicht in de uitvoeringsfase, alsmede of een eventuele ontheffing verleendbaar wordt geacht. In het kader van het bestemmingsplan wordt middels dit aanvullende onderzoek bepaald of het bestemmingsplan uitvoerbaar is in het licht van de Flora- en faunawet.

Daarnaast wordt ingegaan op de nieuwe Wet natuurbescherming. Deze nieuwe wet zal de vigerende wetten die de natuur beschermen (Natuurbeschermingswet 1998, de Flora- en faunawet en de Boswet) samenvoegen en vervangen en treedt op 1 januari 2017 in werking. In de nieuwe Wet natuurbescherming worden onder 'overige soorten', soorten opgenomen die momenteel onder de Flora- en faunawet nog geen bescherming genieten. Dit betreffen dus nieuwe beschermde soorten, op het moment dat de nieuwe Wet natuurbescherming zijn intrede maakt. Het gaat hierbij enkel om soorten binnen de soortgroepen vissen, ongewervelden en planten. De exacte invulling van de Wet natuurbescherming is nu nog niet concreet. Echter, om met het bestemmingsplan in te kunnen spelen op de Wet natuurbescherming, is vooruitlopend op deze nieuwe wetgeving een aanvullende inventarisatie uitgevoerd naar (potentiële) aanwezigheid van deze nieuwe beschermde soorten.

1.2 Plangebied

Het plangebied is gelegen in het zuiden van Vught en wordt begrensd door de Schotsbergdreef, Kraaiengatweg, Esscheweg en het terrein van Health City. Het plangebied was in gebruik als manege en bestaat grotendeels uit paardenweides. Langs de randen van het plangebied liggen houtwallen, bomenrijen, ruigtestroken en overhoekjes. Ten tijde van het verkennend natuuronderzoek (januari 2015) stonden in het plangebied twee grote paardenstallen, waarvan er een gedeeltelijk in gebruik was als café, een kleine houten schuur en een aantal verspreid staande bomen. Ten tijde van onderhavig aanvullend natuuronderzoek was de bebouwing in het plangebied echter gesloopt. De directe omgeving bestaat voornamelijk uit agrarische percelen, bedrijfspanden, moestuinen, een woonwijk, bosschages en bos. De begrenzing van het plangebied is weergegeven in figuur 1.

¹ Verkennend natuuronderzoek Vughtse Hoeve. Grontmij Nederland B.V., referentienummer GM-

1.3 Voorgenomen ontwikkeling

Ontwikkelingsmaatschappij Ruimte voor Ruimte C.V. is voornemens in het plangebied woningbouw mogelijk te maken. De veertig à vijftig beoogde zelfbouwkavels worden bouwrijp opgeleverd, waarbij ook de benodigde infrastructurele werken worden aangelegd. Hiervoor wordt een aantal bomen gekapt, vegetatie verwijderd, grond ontgraven, een watergang gedempt en watergangen verbreed. De benodigde sloop van de stallen en de houten schuur is reeds uitgevoerd. Uitgangspunt is dat de grotere bomen langs de Schotsbergendreef, Kraaiengatweg en Esscheweg zoveel mogelijk behouden blijven, maar er is rekening gehouden met de kap van enkele van deze bomen. Een indicatief verkavelingsplan is weergegeven in figuur 2.



Figuur 1: Begrenzing plangebied Vughtse Hoeve (rood omlijnd). Bron: Google Maps.



Figuur 2: Indicatief verkavelingsplan van plangebied Vughtse Hoeve.

2 Toetsingskader

2.1 Flora- en faunawet

De Flora- en faunawet regelt de bescherming van soorten planten en dieren in ons land. De beschermde soorten zijn op grond van het Vrijstellingenbesluit onderverdeeld in verschillende beschermingscategorieën, de zogeheten 'tabel 1-soorten', 'tabel 2-soorten' en 'tabel 3-soorten'. Vogels zijn niet in deze categorieën ingedeeld.

De toetsing in het kader van de Flora- en faunawet vindt plaats aan de hand van de volgende in het kader van ruimtelijke ontwikkeling relevante verbodsbepalingen:

- artikel 8: het is verboden beschermde planten te plukken, te verzamelen, af te snijden, uit te steken, te vernielen, te beschadigen, te ontwortelen of op enigerlei andere wijze van hun groeiplaats te verwijderen;
- artikel 9: het is verboden beschermde dieren te doden, te verwonden, te vangen, te bemachtigen of met het oog daarop op te sporen;
- artikel 10: het is verboden beschermde dieren opzettelijk te verontrusten;
- artikel 11: het is verboden nesten, holen of andere voortplantings- of vaste rust- of verblijfplaatsen van beschermde dieren te beschadigen, te vernielen, uit te halen, weg te nemen of te verstoren.

De zwaarte van toetsing is afgestemd op de gunstige staat van instandhouding van soorten. Hierbij wordt er onderscheid gemaakt in de volgende groepen met een eigen toetsingsregime:

- **Algemene soorten (tabel 1-soorten)**

Wat betreft ruimtelijke ontwikkelingen geldt een vrijstelling. Er hoeft in dit kader geen ontheffing aangevraagd te worden.

- Overige soorten (tabel 2-soorten)

Wat betreft ruimtelijke ontwikkelingen geldt een vrijstelling, indien wordt gewerkt volgens een door de minister van EZ (voorheen EL&I, LNV) goedgekeurde gedragscode. Indien dit niet het geval is, dan moet ontheffing aangevraagd worden, deze valt onder de lichte toets (geen aantasting van de gunstige staat van instandhouding van de soort).

- Soorten bijlage IV Habitatrichtlijn en bijlage 1 AMvB (tabel 3-soorten)

Voor deze soorten moet wat betreft ruimtelijke ontwikkelingen een ontheffing aangevraagd worden. De ontheffingsaanvraag valt onder de zware toets, hetgeen inhoudt dat:

- er sprake dient te zijn van een bij de wet genoemd belang;
- er geen andere bevredigende oplossing mogelijk is;
- er geen afbreuk wordt gedaan aan de gunstige staat van instandhouding van de betreffende soort(en).

Vogels zijn niet ingedeeld in bovengenoemde categorieën. Alle inheemse vogelsoorten zijn beschermd. Het is daarom bijvoorbeeld verboden nestelende en/of broedende vogels te verstoren, eieren te rapen of nesten en andere vaste rust- en verblijfplaatsen te vernietigen. Uitgangspunt hierbij is dat nesten van vogels alleen beschermd zijn indien deze in gebruik zijn tijdens het broedseizoen. Voor een aantal vogelsoorten (genoemd in de 'Aangepaste lijst jaarrond beschermde vogelnesten' van het ministerie van EZ) die jaarlijks van het zelfde nest gebruik maken of geen eigen nest kunnen bouwen geldt een uitzondering. Nesten van deze soorten (categorie 1-4 soorten) worden beschouwd als vaste rust- en verblijfplaats in de zin van artikel 11 van de Flora- en faunawet. Deze nesten zijn jaarrond beschermd, mits niet permanent verlaten. Voor categorie 5 soorten geldt jaarronde bescherming van nesten alleen indien sprake is van zwaarwegende ecologische redenen.

Om te voorkomen dat nestelende en/of broedende vogels verstoord worden, dienen versturende werkzaamheden altijd zo veel mogelijk buiten het broedseizoen te worden uitgevoerd en dient gecontroleerd te worden of mogelijk jaarrond beschermde nesten worden aangetast door de werkzaamheden. Het beschermingsregime voor vogels komt overeen met dat van tabel 3-soorten. Ontheffing voor vogels met jaarrond beschermde nesten kan slechts worden verleend wanneer er geen andere bevredigende oplossing bestaat en indien geen afbreuk wordt gedaan aan de gunstige staat van instandhouding van de soort. Daarnaast kan alleen ontheffing worden verkregen indien er sprake is van een in de wet genoemd belang. Dit betreft voor vogels alleen belangen die te maken hebben met openbare veiligheid, luchtvaartveiligheid, onderzoek en volksgezondheid (geen ruimtelijke ontwikkelingen).

2.2 Wet natuurbescherming

De belangrijkste vigerende wetten die de natuur beschermen, zijn de Natuurbeschermingswet 1998, de Flora- en faunawet en de Boswet. Deze wetten worden samengevoegd tot één wet: de Wet natuurbescherming. Deze nieuwe wet treedt op 1 januari 2017 in werking.

Uitzonderingen daargelaten, wordt de Provincie bevoegd gezag ten aanzien van soortenbescherming en neemt deze taak dus over van de Rijksdienst voor Ondernemend Nederland (RVO). In de Wet natuurbescherming gaan drie beschermingsregimes voor soorten gelden met elk hun eigen verbodsbepalingen:

- Vogelrichtlijnsoorten;
- Soorten van Habitatrichtlijn Bijlage IV;
- Overige soorten.

Ten aanzien van Vogelrichtlijnsoorten (alle van nature in ons land voorkomende vogelsoorten) en soorten van Habitatrichtlijn Bijlage IV verandert er weinig ten opzichte van de huidige situatie (Ffwet). De tekst van de verbodsbepalingen is echter beter afgestemd op de tekst uit Europese regelgeving in de vorm van de Vogelrichtlijn ofwel Habitatrichtlijn.

Onder 'Overige soorten' worden de in de bijlage van Wet natuurbescherming genoemde soorten bedoeld. Een aantal soorten die onder de huidige Flora- en faunawet zwaarder beschermd is (tabel 2 en/of 3 Ffwet) valt buiten de in de Wet natuurbescherming genoemde beschermingscategorieën. Deze soorten zijn bij de inwerkingtreding van de Wet natuurbescherming dus niet meer beschermd. Het betreft met name vis- en plantensoorten. De nieuwe wet biedt daarnaast bescherming aan enkele soorten die momenteel onder de Flora- en faunawet nog niet zijn beschermd. Dit betreft met name enkele planten- en insectensoorten. Voor soorten die onder de Wet natuurbescherming beschermd zijn, geldt een vergelijkbaar stelsel van verbodsbepalingen als in de Flora- en faunawet het geval is. Dat betekent dat voortplantingsplaatsen en rustplaatsen (inclusief functionele leefomgeving) van beschermde soorten niet (opzettelijk) verstoord of vernietigd mogen worden en dat exemplaren van beschermde soorten niet (opzettelijk) mogen worden gedood of verwond.

Op dit moment is nog niet bekend welk beschermingsregime gaat gelden voor de categorie 'overige soorten' (soorten die niet staan op Bijlage IV van de Habitatrichtlijn). De Provincies en het ministerie van EZ hebben de vrijheid om soorten binnen deze categorie van soorten vrij te stellen van de ontheffingsplicht uit de nieuwe wet.

3 Onderzoeksmethode

3.1 Methodieken

Hieronder volgt per soort(groep) een beschrijving van de gehanteerde onderzoeksmethode. De inventarisaties zijn uitgevoerd conform de vigerende soortenstandaarden en/of richtlijnen. Aanvullend is gebruik gemaakt van de meest recente verspreidingsgegevens uit de Nationale Databank Flora en Fauna (NDFD). In paragraaf 3.2 is een tabel opgenomen met een overzicht van de verschillende veldbezoeken. Daarnaast is de methode beschreven van de aanvullende inventarisatie naar nieuwe (onder de Wet natuurbescherming) beschermde soorten.

3.1.1 *Kamsalamander*

In het verkennend onderzoek is geconcludeerd dat aanwezigheid van de kamsalamander niet op voorhand uitgesloten kan worden. In het plangebied is potentieel geschikt land- en voortplantingsbiotoop aanwezig.

Aanvullend onderzoek naar de kamsalamander is uitgevoerd conform de richtlijnen van de soortenstandaard van de soort (RVO, 2014). In de periode februari – maart zijn op avonden met geschikte weersomstandigheden twee veldbezoeken uitgevoerd om eventuele migratie naar voortplantingswater waar te nemen. Daarnaast zijn geschikte wateren met een RAVON schepnet geïnventariseerd op aanwezigheid van eitjes en larven en volwassen dieren. Daarnaast is aanwezigheid van kamsalamanders onderzocht door middel van eDNA onderzoek. Environmental DNA (eDNA) is een nieuwe methode om de aanwezigheid van soorten in een water aan te tonen. De methode is gebaseerd op het feit dat alle in het water levende dieren via faeces, huidcellen en urine DNA in het water achterlaten. Door watermonsters te nemen en het DNA hieruit te extraheren, is het mogelijk de aanwezigheid van een soort in het water aan te tonen zonder dat de soort zelf gevangen hoeft te worden (bron: RAVON). De sampling van de watermonsters is uitgevoerd door Sweco, conform de handleiding van de sampleset aangeleverd door Datura. De DNA analyse van de samples is uitgevoerd door Datura.

3.1.2 *Steenuil*

Uit het verkennend onderzoek blijkt dat het plangebied geen geschikte nestlocaties biedt voor de steenuil. Echter, het plangebied is wel mogelijk onderdeel van essentieel foerageergebied van steenuilen uit de directe omgeving.

Voor het vaststellen van mogelijke territoria van steenuilen, is gewerkt conform de soortenstandaard van de steenuil (RVO, 2014) en is de gestandaardiseerde methodiek van STONE (Steenuil Overleg Nederland) gehanteerd. Op drie avonden met geschikte weersomstandigheden zijn playbackmomenten toegepast. Met playbacks worden vogelgeluiden afgespeeld om een territoriale roep van de steenuil uit te lokken en een indicatie te krijgen van de aanwezigheid van een paar of een individu. Steenuilen roepen intensief in de periode rond schemering van half februari tot half april. Conform de soortenstandaard is afwezigheid van broedende steenuilen aangetoond als tijdens drie gerichte veldbezoeken in de periode van 15 februari tot en met 15 april geen aanwezigheid kan worden aangetoond.

3.1.3 *Huismus*

Uit het verkennend natuuronderzoek blijkt dat er geen huismusnesten zijn aangetroffen in het plangebied, maar dat de houten schuur geschikte nestlocaties biedt voor de soort en de groene elementen zijn mogelijk onderdeel van essentieel leefgebied van de huismus. De houten schuur was ten tijde van het aanvullend onderzoek reeds gesloopt. Derhalve heeft het onderzoek zich gericht op de mogelijke functie van de groene elementen als essentieel leefgebied van de huismus.

Onderzoek naar de aanwezigheid van huismussen is uitgevoerd conform de soortenstandaard van de soort (RVO, 2014). Op twee ochtenden bij geschikte weersomstandigheden in de periode april tot en met 15 mei is het plangebied en directe omgeving gecontroleerd op de aanwezigheid van de huismus.

3.1.4 *Vleermuizen*

Uit het verkennend natuuronderzoek blijkt dat de paardenstallen in het plangebied geschikte vaste rust- en/of verblijfplaatsen bieden voor vleermuizen. Ook in enkele grotere bomen langs de randen in het plangebied zitten ruimtes die in potentie geschikt zijn voor vleermuizen. Daarnaast hebben de houtwallen en bomenrijen langs het plangebied mogelijk een functie als (essentiële) vliegroute.

Voorafgaande aan het vleermuisonderzoek is echter gebleken dat de paardenstallen reeds gesloopt waren. Daarnaast zijn de boomholtes nader geïnspecteerd. Hieruit is gebleken dat de vermeende holtes te oppervlakkig waren om te functioneren als vaste rust- en/of verblijfplaats voor vleermuizen. Derhalve is enkel aanvullend vleermuisonderzoek uitgevoerd naar de functie van de bomenrijen als vliegroute.

Het aanvullende onderzoek naar vleermuizen is uitgevoerd conform het vigerende vleermuisprotocol (versie 2013) dat is opgesteld door het Netwerk Groene Bureaus en de Zoogdierverseniging, in overleg met de Dienst Landelijk Gebied en de Gegevensautoriteit Natuur. Op basis van de potentie van het plangebied voor vleermuizen en de te verwachten soorten, is conform het vleermuisprotocol de onderzoeksinspanning bepaald. Op twee avonden met geschikte weersomstandigheden, uitgevoerd in de maanden mei en september 2016, heeft inventarisatie plaatsgevonden. De inventarisatie is uitgevoerd met een heterodyne batdetector, voorzien van time expansion (type: Petterson D240x) en opnameapparatuur. Voor een nadere analyse van de geluidsopnames is gebruik gemaakt van het softwareprogramma Batsound 4.

3.1.5 *Wet natuurbescherming*

In de nieuwe Wet natuurbescherming worden onder 'overige soorten', soorten opgenomen die onder de Flora- en faunawet nog geen bescherming genieten. Dit betreffen dus nieuwe beschermde soorten, op het moment dat de nieuwe Wet natuurbescherming zijn intrede maakt (verwacht per 1 januari 2017). Het gaat hierbij enkel om soorten binnen de soortgroepen vissen, ongewervelden en planten. De exacte invulling van de Wet natuurbescherming is momenteel nog niet concreet. Om voor het bestemmingsplan in te kunnen spelen op deze nieuwe wetgeving is een aanvullende inventarisatie uitgevoerd naar (potentiële) aanwezigheid van deze nieuwe beschermde soorten. De inventarisatie bestaat uit een bronnenonderzoek en een habitatgeschiktheidsbeoordeling.

Ter inventarisatie van de actuele verspreiding van deze nieuwe beschermde soorten in Nederland is de NDFF geraadpleegd. Tevens zijn verschillende verspreidingsatlassen van gegevensbeherende instanties (SOVON, RAVON, FLORON, de vlinderstichting etc.) geraadpleegd. Dit bronnenonderzoek brengt samen met een habitatgeschiktheidsbeoordeling de nieuwe beschermde soorten in beeld die in het plangebied (kunnen) voorkomen. Vervolgens is bepaald of soorten beïnvloed kunnen worden door voorgenomen activiteiten.

3.2 Overzichtstabel

In totaal zijn zeven veldbezoeken afgelegd aan het plangebied. De inventarisaties zijn uitgevoerd door een ter zake kundige ecooloog van Sweco Nederland B.V. In onderstaande tabel is een overzicht van de verschillende veldbezoeken weergegeven.

Tabel 3.8 Data, soortgroep, doel, moment en weersomstandigheden veldbezoeken

Datum	Soortgroep	Moment onderzoek	Weersomstandigheden
10-03-2016	Steenuil, kamsalamander	avond	6°C, zwaar bewolkt (droog), windkracht 2
31-03-2016	Steenuil, kamsalamander	avond	8°C, bewolkt (droog), windkracht 3
07-04-2016	Steenuil	avond	13°C, zwaar bewolkt (droog), windkracht 3
25-04-2016	Huismus, kamsalamander, vleermuizen (nadere inspectie mogelijke verblijfplaatsen)	ochtend/middag	8°C, half bewolkt (droog), windkracht 3
09-05-2016	Huismus, kamsalamander (nemen watersamples)	ochtend/middag	22°C, half bewolkt (droog), windkracht 3
19-05-2016	Vleermuizen (vliegroutes foerageergebied)	avond	13°C, onbewolkt, windkracht 2
13-09-2016	Vleermuizen	avond	24°C, onbewolkt, windkracht 2

4 Resultaten en effectbepaling

4.1 Inleiding

In onderstaande paragrafen worden per soortgroep de resultaten van de soortgerichte inventarisaties beschreven. Hierbij wordt ingegaan op aanwezigheid van (zwaarder) beschermde soorten, de effecten van de ontwikkeling op deze soorten en of hierbij verbodsbepalingen van de Flora- en faunawet worden overtreden. Daarnaast wordt inzichtelijk gemaakt of er vervolgpcedures doorlopen moeten worden voorafgaand aan vaststelling van het bestemmingsplan.

4.2 Kamsalamander

Tijdens de inventarisatierondes in maart zijn geen migrerende kamsalamanders aangetroffen in het plangebied of op aangrenzende wandel- en fietspaden en wegen. Tijdens de inventarisatie en het bemonsteren van de potentieel geschikte wateren in en rondom het plangebied met een steeknet zijn geen eitjes van de kamsalamander en geen larvale, juveniele of volwassen exemplaren van de kamsalamanders aangetroffen. Uit de eDNA analyse blijkt dat er geen eDNA van de kamsalamander is aangetroffen in de bemonsterde wateren. De rapportage van de eDNA analyse², uitgevoerd door Datura is opgenomen als bijlage 1 van onderhavig rapport.

Analyse en effectbepaling

Conform de richtlijnen uit de soortenstandaard is met de uitgevoerde inventarisaties in voldoende mate aangetoond dat de kamsalamander niet voorkomt in het plangebied en in het omringende water. Effecten zijn dan ook uit te sluiten. Met de voorgenomen ontwikkeling worden wat betreft de kamsalamander geen verbodsbepalingen vanuit de Flora- en faunawet overtreden en er is geen noodzaak tot een ontheffing.

4.3 Steenuil

Tijdens de inventarisatierondes zijn op de playbackmomenten twee reacties verkregen in de vorm van roepende mannetjes (zie figuur 3). Een exemplaar riep vanuit een bosschage bij een boerenerf, circa 220 meter ten zuidoosten van het plangebied. Het andere mannetje steenuil bevond zich op een boerenerf circa 280 meter ten zuiden van het plangebied.

Analyse en effectbepaling

Uit het steenuilonderzoek blijkt dat er in de directe omgeving van het plangebied twee territoria van de steenuil aanwezig zijn. Het is aannemelijk dat de nestlocaties van deze uilen zich bevinden op de boerenerven circa 220 en 280 meter van het plangebied. Steenuilen verblijven het hele jaar in hun relatief kleine territoria. Het activiteitsgebied rond de nestplaats is slechts enkele honderden meters (bron: soortenstandaard steenuil). Het functionele leefgebied van de steenuilen bevindt zich buiten het plangebied. Rondom deze boererven is optimaal leefgebied aanwezig voor de steenuil in de vorm van kleine landschapselementen (bosschages, houtwallen, grasland en (moes)tuinen). Gelet op de afstand van het plangebied en de tussenliggende wegen, wordt niet verwacht dat steenuilen uit de omgeving structureel foerageren in het plangebied. Er is in ieder geval geen sprake van essentieel leefgebied van de steenuil in het plangebied. Met de voorgenomen ontwikkeling worden wat betreft de steenuil geen verbodsbepalingen vanuit de Flora- en faunawet overtreden en er is geen noodzaak voor een ontheffingsaanvraag.

² van Bochove K. 2016. Kamsalamander eDNA onderzoek. Rapport RA2016174-1, Datura, Wageningen



Figuur 3: Puntwaarnemingen van roepende steenuilen (gele stippen) en paartje huismus (blauwe stip) ten opzichte van het plangebied (rood kader).

4.4 Huismus

Ten tijde van het huismusonderzoek was de houten schuur reeds gesloopt. Overige bebouwing in het plangebied bood geen geschikte nestlocaties voor de huismus. Er heeft dus geen onderzoek plaats kunnen vinden naar eventuele aanwezigheid van jaarrond beschermde nesten in het plangebied. Wel heeft onderzoek plaatsgevonden naar het gebruik van het plangebied door huismussen uit de omgeving. Tijdens de inventarisatierondes voor de huismus, is in nabijgelegen bebouwing een paartje aangetroffen (zie figuur 3). Deze vogels zijn echter niet in het plangebied zelf aangetroffen en vertoonden geen binding met het plangebied. Het functionele leefgebied van deze huismussen betreft de tuininrichting rondom deze bebouwing en bevindt zich buiten het plangebied.

Analyse en effectbepaling

Middels het huismussenonderzoek is vastgesteld dat het plangebied geen onderdeel is van essentieel leefgebied van huismussen uit de omgeving. Met de voorgenomen ontwikkeling worden wat betreft de huismus geen verbodsbepalingen vanuit de Flora- en faunawet overtreden en is een ontheffingsplicht in de uitvoeringsfase niet van toepassing.

4.5 Vleermuizen

Zoals beschreven in paragraaf 3.1.4 is voorafgaand aan de inventarisaties het plangebied opnieuw bekeken. Hieruit bleek dat de voor vleermuizen geschikte bebouwing (paardenstallen) reeds gesloopt was. Het is niet bekend of voorafgaande aan de sloop vleermuisonderzoek heeft plaatsgevonden. Uit nadere inspectie van de boomholtes is gebleken dat deze holtes niet geschikt waren voor vleermuizen.

De holtes waren te oppervlakkig om geschikt te zijn als vaste rust en/of verblijfplaatsen. Aangezien aanwezigheid van vaste rust- en/of verblijfplaatsen in de nieuwe situatie uitgesloten is, is enkel vleermuisonderzoek uitgevoerd naar de functie van het plangebied en omliggende bomenrijen en houtwallen als foerageergebied en/of vliegroute.

Tijdens de inventarisaties zijn drie vleermuissoorten aangetroffen; de gewone dwergvleermuis, laatvlieger en rosse vleermuis. De gewone dwergvleermuis foerageerde in beperkte aantallen rondom de houtopstanden en bomenrijen in en langs het plangebied. Daarnaast zijn enkele passerende exemplaren aangetroffen langs de oostelijke bomenlaan van de Esscheweg en de zuidelijke bomenlaan van de Berghuizenestraat. Langs de bomenlaan van de Esscheweg zijn tevens een tweetal langsvliegende laatvliegers waargenomen. Deze vlogen vanuit het noorden in zuidelijke richting. Vleermuizen gebruiken dergelijke lijnvormige elementen ter oriëntatie in het landschap en deze vliegroutes kunnen een belangrijke verbinding zijn tussen hun verblijfplaatsen en foerageergebied. Hierbij wordt opgemerkt dat de vleermuizen beide bomenrijen aan weerszijden van de wegen gebruikte als vliegroute. Rosse vleermuizen zijn alleen waargenomen op de zuidgrens en ten zuiden van het plangebied. Hier foerageerden enkele exemplaren boven de bomen en graslanden. Ter indicatie zijn puntwaarnemingen van foeragerende en passerende vleermuizen en vastgestelde vliegroutes weergegeven in figuur 4.

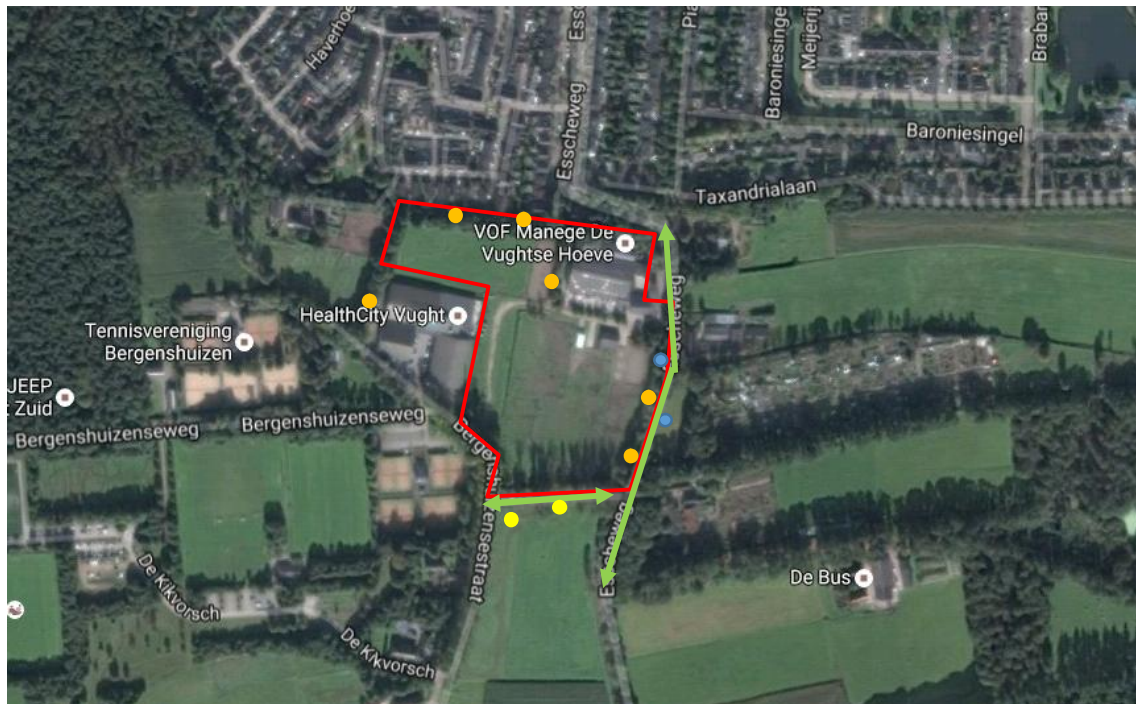
Analyse en effectbepaling

Op basis van het vleermuisonderzoek is de functie van het plangebied voor vleermuizen in kaart gebracht. Aanwezigheid van vaste rust- en/of verblijfplaatsen is in de huidige situatie uitgesloten. Geschikte bebouwing was reeds gesloopt en holtes in bomen zijn niet geschikt voor vleermuizen. Foeragerende vleermuizen (gewone dwergvleermuis, laatvlieger en rosse vleermuis) zijn aangetroffen rondom de opgaande vegetatie langs de randen van het plangebied. Het grootste deel van het plangebied bestaat uit open (paarden)weides en wordt zeer beperkt gebruikt als foerageergebied. De bomenlanen langs de Esscherweg en Berghuizenestraat hebben een functie als vliegroute voor diverse gewone dwergvleermuizen en enkele laatvliegers.

Foerageergebieden en vliegroutes zijn alleen beschermd indien ze van essentieel belang zijn voor het behoud van de functionaliteit van verblijfplaatsen. Op basis van het planontwerp (zie figuur 2) blijven de structuren die gebruikt worden als foerageergebied en vliegroute grotendeels behouden. Voor de gewone dwergvleermuis, rosse vleermuis en laatvlieger geldt dat er voldoende alternatief, gelijkwaardig foerageergebied is in de directe omgeving. Derhalve is geen sprake van essentieel foerageergebied in het plangebied. Daarnaast wordt met de groenstructuur en toekomstige tuinrichtingen het plangebied mogelijk zelfs interessanter als foerageergebied voor soorten als de gewone dwergvleermuis.

De vastgestelde vliegroutes verbinden verblijfplaatsen ten noorden van het plangebied (in bebouwde kom Vught), met de bosrijke foerageergebieden ten zuiden van het plangebied. Voor de vliegroute langs de bomenlaan van de Esscherweg zijn geen gelijkwaardige alternatieven, waardoor sprake is van een essentiële vliegroute. Op basis van het planontwerp blijven de bomenrijen functioneel als vliegroute voor de gewone dwergvleermuis en laatvlieger. Deze worden slechts op enkele plekken onderbroken voor de realisatie van ontsluitingswegen. Hiervoor dienen mogelijk enkele bomen gekapt te worden aan de zijde van het plangebied. De gaten die daarmee zullen ontstaan tussen de bomen, zullen overbrugbaar zijn voor de gewone dwergvleermuis en laatvlieger. Daarnaast geldt dat aan de overzijde van de wegen (Esscherweg en Berghuizenestraat) ook een bomenrij aanwezig is, welke tevens gebruikt (kunnen) worden als vliegroute. Wel dient met het verlichtingsplan rekening gehouden te worden met de functie van de bomenrijen als vliegroute voor vleermuizen. Alle vleermuissoorten zijn namelijk in meer of mindere mate gevoelig voor lichtverstoring. Uitstraling van licht richting deze bomenrijen dient zoveel mogelijk beperkt te worden. Dit kan bijvoorbeeld gedaan worden door gebruik te maken van straatverlichting met lage armatuur en/of afschermkappen.

De maatregelen kunnen in de vorm van gebruiksbeperkingen opgenomen worden in het bestemmingsplan. Zolang de functionaliteit van de bomenrijen gewaarborgd kan worden, zijn er voor wat betreft vleermuizen geen belemmeringen vanuit de Flora- en faunawet aan de orde. Er worden dan immers geen verbodsbepalingen vanuit de Flora- en faunawet overtreden. Indien er nieuwe verlichting toegepast moet worden, dient het verlichtingsplan afgestemd te worden met een deskundige op het gebied van vleermuizen.



Figuur 3: Indicatieve puntwaarnemingen van foeragerende en langsvliegende vleermuizen (oranje stip = gewone dwergvleermuis, gele stip = laatvlieger, blauwe stip = rosse vleermuis) en vastgestelde vliegroutes (groene pijlen) ten opzichte van het plangebied (rood kader).

4.6 Wet natuurbescherming

In de nieuwe Wet natuurbescherming worden onder 'overige soorten', soorten opgenomen die onder de Flora- en faunawet nog geen bescherming genieten. Dit betreffen dus nieuwe beschermde soorten, op het moment dat de nieuwe Wet natuurbescherming zijn intrede maakt (verwacht per 1 januari 2017). Om voor het bestemmingsplan in te kunnen spelen op de Wet natuurbescherming is een aanvullende inventarisatie uitgevoerd naar (potentiële) aanwezigheid van deze nieuwe beschermde soorten. De inventarisatie bestaat uit een bronnenonderzoek en een habitatgeschiktheidsbeoordeling.

4.6.1 Resultaten

Op basis van bestaande (verspreidings)gegevens blijken behoudens de kleine ijsvogelvlinder geen recente waarnemingen van nieuwe beschermde soorten (onder de Wet Natuurbescherming) bekend te zijn uit de omgeving van het plangebied. Het habitat van deze vlinder bestaat uit gevarieerde, vochtige gemengde bossen of loofbossen, zoals elzenbroekbos (bron: vlindernet). Het plangebied is ongeschikt als leefgebied voor deze soort. Ook voor overige nieuwe beschermde soorten geldt dat aanwezigheid kan worden uitgesloten, op basis van actuele verspreidingsgegevens en habitatseisen van de soorten en aanwezige (voedselrijke) biotopen in het plangebied. Het is dan ook uitgesloten dat de voorgenomen ontwikkeling effect zal hebben op nieuwe beschermde soorten.

5 Conclusie

Flora- en faunawet

Op basis van de uitgevoerde soortgerichte onderzoeken en bekende gegevens is gebleken dat het plangebied geen (essentiële) functie heeft voor de kamsalamander, steenuil of huismus of vleermuizen. De bomenrijen aan weerszijden van de Esscheweg en Broekhuizensestraat (grenzend aan het plangebied) hebben een functie als essentiële vliegroute voor diverse gewone dwergvleermuizen en enkele laatvliegers. Zolang er bij het verlichtingsplan rekening gehouden wordt met de functie van de bomenrijen als vliegroute voor vleermuizen, zijn er geen belemmeringen vanuit de Flora- en faunawet. De functionaliteit van de bomenrijen als vliegroute kan gewaarborgd worden door uitstraling van licht richting deze elementen zoveel mogelijk te beperken. Het verlichtingsplan dient afgestemd te worden met een ter zake kundige ecooloog.

Op basis van het verkennend en het aanvullend natuuronderzoek wordt geconcludeerd dat het bestemmingsplan uitvoerbaar is in het licht van de Flora- en faunawet, mits gewaarborgd kan worden dat de functionaliteit van de vliegroute behouden blijft.

Nieuwe Wet natuurbescherming

In de nieuwe Wet natuurbescherming (intrede per 1 januari 2017) worden onder 'overige soorten', soorten opgenomen die onder de Flora- en faunawet nog geen bescherming genieten. Op basis van actuele verspreidingsgegevens en habitatseisen van de soorten en aanwezige biotopen in het plangebied, is aanwezigheid van nieuwe (onder de Wet natuurbescherming) beschermde soorten uitgesloten. Effecten van de voorgenomen ontwikkeling op deze soorten zijn dan ook op voorhand uitgesloten.

Bijlage 1

eDNA onderzoek kamsalamander

Kamsalamander eDNA onderzoek.



Colofon

Titel	Kamsalamander eDNA onderzoek.
Tekst, foto's en samenstelling	K. van Bochove
In opdracht van	Sweco
Naam opdrachtgever	G. Meijer
Rapportnummer	RA2016174-1
Datum oplevering rapport	27 mei 2016
Aantal pagina's	8
Wijze van citeren	van Bochove K. 2016. Kamsalamander eDNA onderzoek. Rapport RA2016174-1, Datura, Wageningen
Laboratorium analist	J. Rook



Datura

Gevestigd te:
Johan Buziastraat 55
6708 NR Wageningen
Nederland

Postadres laboratorium:
t.a.v. Datura (NCB)
Sylviusweg 72
2333 BE, Leiden
Nederland

0031(0)629455328
www.datura.nl
keesvanbochove@datura.nl

Inhoudsopgave

1. Doelstelling.....	4
2. Methode.....	4
1.1 Sampling.....	4
1.2 Laboratoriumanalyse.....	4
1.3 Kwaliteitswaarborging.....	5
1.3.1 Hoe vals positieve waarnemingen voorkomen worden.....	5
1.3.2 Hoe vals negatieve waarnemingen voorkomen worden.....	6
3. Resultaten.....	8

1. Doelstelling

Analysen van een water sample op aanwezigheid van eDNA van kamsalamander (*Triturus cristatus*) in opdracht van Sweco.

2. Methode

1.1 Sampling

De sampling is uitgevoerd door Sweco.

1.2 Laboratoriumanalyse

De eDNA samples zijn geanalyseerd op de aanwezigheid van eDNA van kamsalamander. Het analyseren van een eDNA samples vindt plaats in drie stappen. Eerst wordt het eDNA op het filter geconcentreerd en gezuiverd. Vervolgens wordt een controle analyse uitgevoerd om te testen of eDNA detectie in een sample eventueel geïnhibeerd wordt door storende stoffen. Tenslotte wordt het eDNA gedetecteerd met behulp van een real-time quantitative PCR.

1. Het sample is geconcentreerd in een pellet door 35 minuten te centrifugeren (7830g, 6 °C). Vervolgens is het DNA in de pellet gezuiverd met behulp van de Qiagen Dneasy Blood & Tissue Kit. Storende stoffen als humuszuren kunnen detectie van het eDNA inhiberen wat kan leiden tot vals negatief resultaat. Met deze stap zijn dergelijke inhiberende stoffen zo veel mogelijk verwijderd.
2. Er is een controle uitgevoerd om na te gaan of eDNA detectie in een sample geïnhibeerd wordt. Dit is gedaan door een bekende hoeveelheid van een fragment artificieel DNA toe te voegen. Vervolgens is de concentratie van dit fragment artificieel DNA gemeten. Dit is zowel gedaan in een reactie waar een hoeveelheid sample aan toegevoegd is, als in een reactie waar geen sample aan toegevoegd is. Als DNA detectie in een sample geïnhibeerd wordt, dan is de gemeten concentratie artificieel DNA in de reactie waarin sample toegevoegd wordt lager ten opzichte van de reactie waaraan geen artificieel DNA aan toegevoegd is. Met name in zuur water, waarin veel organische deeltjes aanwezig kan inhibitie optreden. In dergelijk geval wordt een extra zuivering stap uitgevoerd of wordt het sample verdund. Vervolgens wordt opnieuw gekeken of de inhiberende stoffen voldoende verwijderd zijn.
3. Detectie van eDNA vindt plaats door middel van een real-time quantitative PCR. Het principe achter deze techniek is dat een specifiek deel van het DNA zeer vaak vermenigvuldigd (geamplificeerd) wordt. Datura maakt gebruik van soort-specifieke primers die uitsluitend DNA van de doelsoort vermenigvuldigen. Datura gebruikt bovendien een soort-specifieke probes (een soort primer) die uitsluitend binden aan eDNA van de doelsoort. Binding van de probe aan het vermenigvuldigde eDNA van de doelsoort veroorzaakt een fluorescent signaal. Dit signaal wordt gedetecteerd met behulp van een qPCR platform (CFX96 Touch™ van Bio-Rad). De qPCR

detectie wordt uitgevoerd met 12 replica's. Het aantal positieve replica's is een indicatie voor de concentratie eDNA. Het is echter (vooralsnog) niet mogelijk om op basis van de concentratie van eDNA de populatiedichtheid te bepalen. De qPCR detectie wordt uitgevoerd met de TaqMan® Environmental Mastermix 2.0 (Life Technologies®). Naast het eDNA sample worden samples geanalyseerd waarin waaraan geen sample is toegevoegd. Deze moeten negatief zijn. Zodoende kan bevestigd worden dat de analyse schoon is uitgevoerd en er geen contaminatie optreedt. Tenslotte worden ook enkele reacties geanalyseerd waaraan een bekende concentratie DNA is toegevoegd. Deze reacties moeten positief zijn. Dit bevestigt dat de analyse juist is uitgevoerd.

1.3 Kwaliteitswaarborging

1.3.1 Hoe vals positieve waarnemingen voorkomen worden

Het optreden van zowel vals positieve als vals negatieve waarnemingen wordt tot het minimum beperkt. Vals positieve waarnemingen kunnen op drie manieren ontstaan:

- De gebruikte primers en probe zijn niet specifiek;
- Er vindt contaminatie plaats in het laboratorium;
- Er vindt contaminatie plaats in het veld.

Hieronder wordt aangegeven hoe vals positieve waarnemingen voorkomen worden. Omdat de kans op vals positieve waarnemingen zeer klein is, kunnen we niet exact kwantificeren hoe groot de kans daadwerkelijk is. Datura kan daarom niet 100 % zeker garanderen dat vals positieve waarnemingen nooit optreden. In de praktijk (middels validatie studies) nemen we echter geen vals positieve waarnemingen waar. Het is daarom aannemelijk dat vals positieve waarnemingen niet optreden.

Het voorkomen van vals positieve waarnemingen door het ontwerp en validatie van specifieke primers en probes:

1. Er wordt gebruik gemaakt van een **2-staps** qPCR protocol, hetgeen de kans op aspecifieke detectie verkleint;
2. Gebruik van zeer **specifieke primers** waarmee uitsluitend eDNA van de doelsoort gedetecteerd kan worden. De primers zijn ontwikkeld met behulp van specialistische software;
3. Een qPCR detectie wordt uitgevoerd met behulp van een zeer specifieke **probe**. Deze probe hecht uitsluitend aan DNA van de doelsoort, hetgeen resulteert in een fluorescent signaal;
4. De primers en probe zijn in het laboratorium getest. Eerst is getest of de qPCR detectie inderdaad negatief resultaat geeft na het toevoegen van DNA van (verwante) vissoorten;
5. Vervolgens is de methode **gevalideerd** door het testen van veldsamples. Er zijn eDNA samples verzameld op locaties waar de doelsoort niet voorkomt. Er werd geen eDNA gedetecteerd in deze samples. Zodoende kon aangetoond worden dat de methode niet resulteert in positieve detectie als de doelsoort niet aanwezig is.

Om vals positieve waarnemingen te voorkomen werkt Datura in een specifiek voor (e)DNA ingerichte laboratorium omgeving en worden strikte procedures gevolgd:

1. Verschillende onderdelen van de analyse workflow worden uitgevoerd in fysiek gescheiden laboratorium ruimtes. Het samenstellen van de eDNA sample kits en het voorbereiden van de qPCR reagentia vindt plaats in een **DNA clean room**. Dit is een ruimte waarin geen DNA samples aanwezig zijn. Zodoende kunnen we garanderen dat er geen DNA aanwezig is in de eDNA sample kits en de reagentia (zoals de primers en probes) die later gebruikt worden in de eDNA analyses. Het extraheren van de eDNA samples gebeurt in een **pre-PCR laboratorium**. Dit is een ruimte waarin uitsluitend lage concentraties DNA aanwezig zijn. Vervolgens worden hier de eDNA samples samen met de qPCR reagentia in een 96-well plaat gepipetteerd. Deze plaat wordt luchtdicht afgesloten. Tenslotte wordt de qPCR uitgevoerd in een **post-PCR laboratorium**. In dit laboratorium wordt het eDNA vermeerderd en hier zijn dus een hoge concentraties DNA aanwezig.
2. Er wordt een **unidirectionele workflow** gehanteerd om contaminatie van de DNA clean room en het pre-PCR laboratorium te voorkomen. Dit houdt in dat materialen die eenmaal in het post-PCR laboratorium geweest zijn niet meer terug mogen naar de DNA clean room en het pre-PCR laboratorium. Ook mogen medewerkers van Datura niet dezelfde dag van een post-PCR laboratorium terug naar de DNA clean room en het pre-PCR laboratorium.
3. In iedere analyse worden **controle analyses** uitgevoerd. Zo worden er samples geëxtraheerd waaraan geen slootwater wordt toegevoegd (zogenaamde extractie controles). In de qPCR worden naast de extractie controles ook negatieve PCR controles meegenomen. Zodoende kan heel nauwkeurig gemonitord worden of er inderdaad geen contaminatie optreedt.

Om contaminatie in het veld te voorkomen worden de volgende maatregelen genomen:

1. Het **sampling protocol** van Datura wordt gevolgd. Dit protocol schrijft een werkwijze specifieke werkwijze voor. In de praktijk is gebleken dat er geen contaminatie plaats vindt als dit protocol gevolgd wordt;
2. Er dient rekening gehouden te worden met **waterverplaatsingen**. De sampling wordt daarom uitgevoerd op een moment dat er weinig stroming is. Zo worden eDNA samples niet verzameld direct na (hevige) regenval. Ook wordt er rekening gehouden met kunstmatig opwekte stroming, bijvoorbeeld bij wisseling van zomer- naar winterpeil.

1.3.2 Hoe vals negatieve waarnemingen voorkomen worden

Naast vals positieve waarnemingen kunnen ook vals negatieve waarnemingen optreden. Maatregelen die genomen worden om vals negatieve waarnemingen te voorkomen:

1. Per sample worden **20 subsamples** verzameld. Hiermee wordt de kans vergroot dat eDNA in het sample terecht komt.
2. Een zeer gevoelige **qPCR detectie** wordt uitgevoerd met behulp van **12 replica's**. Wanneer minder replica's uitgevoerd worden kan er minder gevoelig gedetecteerd worden. Meer dan 12 qPCR replica's leidt echter niet tot gevoeliger detectie;
3. Gebruik van een **zeer korte merker** van maximaal 100 basepaar;
4. In ieder sample wordt **vastgesteld of de qPCR detectie geïnhibeerd** wordt door storende

stoffen. Indien dit het geval wordt er een **extra zuiveringstap** uitgevoerd. Vervolgens wordt nogmaals getest of de inhiberende stoffen er inderdaad geen inhibitie meer optreed (zie methode voor een uitgebreidere beschrijving);

5. Er wordt altijd een **positieve controle** van doelsoort DNA meegenomen in de qPCR detectie. Deze controle moet altijd resulteren in positieve detectie. Ook als alle samples negatief zijn, kan zodoende vastgesteld worden dat de detectie juist is uitgevoerd;

Uit diverse **validatie studies** blijkt dat de eDNA detectiekans voor amfibieën en vissen stilstaande en zwak stromende wateren 90-99% is. Er is dus altijd een kleine kans dat eDNA niet gedetecteerd wordt, ook al is de doelsoort wel aanwezig.

3. Resultaten

Het sample bevatte geen eDNA van kamsalamander.

Er is geen amplificatie waargenomen in de negatieve controle reacties waar geen sample aangevoegd is. De positieve controle reacties waar DNA uit weefsel van kamsalamander aan toegevoegd is werden naar verwachting wel geamplificeerd. Dit bewijst dat de analyse juist is uitgevoerd.

Humuszuren kunnen een qPCR reactie inhiberen wat kan leiden tot vals positief resultaat. Daarom wordt altijd een interne controle mee geanalyseerd om vast te kunnen stellen of er sprake is van inhibitie. Er werd geen significante afwijking gevonden in de Cq-waarde van de interne controles waar sample aan toegevoegd ten opzichte van de reacties waar geen sample aan toegevoegd is. Dit laat zien dat er geen noemenswaardige inhibitie heeft opgetreden.

Samenvattend, de eDNA analyse is met succes uitgevoerd en er is geen eDNA van kamsalamander aangetoond.

Tabel 2. Resultaten van eDNA analyse.

Sample nummer	Aantal positieve reacties kamsalamander
2039	0/12