

Natuuronderzoek

Woningbouwlocatie

Oijense Zij

Oss

Onze referentie: 301993



Colofon

Opdrachtgever

Gemeente Oss
De heer D. van Dun
Raadhuislaan 2
5341 GM OSS



Dossiergegevens

Onze referentie: 301993
Status rapport: v1.0



Projectteam

Projectverantwoordelijke: Dennis Slotboom
Specialist Natuur en Ecologie: Jasper Verhaar en Dennis Slotboom
Kwaliteitscontrole: Dennis Slotboom

Contactgegevens

info@Cobra-adviseurs.nl
www.Cobra-adviseurs.nl
T. 088 - 262 72 00

Bedrijfsgegevens

KvK Eindhoven 17232157
Btw-nr. NL 8199.70.220.B01
IBAN NL90 INGB 0008 5217 90

Centraal postadres

Franssenstraat 66
5434 SJ Vianen (NB)

 Cobra boomadviseurs  Cobra planadviseurs  Cobra ecoadviseurs  Cobra geoadviseurs  Cobra groenjuristen

Samenvatting

In opdracht van gemeente Oss heeft Cobra onderzoek uitgevoerd in projectgebied 'Oijense Zij' in Oss. Het gaat om onderzoek naar de soorten grote modderkruiper, poelkikker en verschillende soorten vleermuizen, die in het kader van de Wet natuurbescherming (Wnb) beschermd zijn. Het projectgebied wordt herontwikkeld. Daarbij kunnen negatieve effecten op genoemde soorten niet uitgesloten worden. U wilt weten hoe u moet handelen binnen het kader van de Wnb.

Werkwijze

Wij hebben de methode 'environmental DNA' (eDNA) toegepast voor het onderzoek naar grote modderkruiper. Voor poelkikker hebben wij twee gerichte veldbezoeken uitgevoerd en onze bevindingen laten verifiëren door een vakspecialist op het gebied van poelkikkers van RAVON. Daarnaast hebben wij het Kennisdocument Poelkikker van BIJ12 gebruikt. Het vleermuisonderzoek hebben wij uitgevoerd volgens het Vleermuisprotocol 2017. Hiervoor zijn twee veldbezoeken uitgevoerd en is gebruik gemaakt van een batdetector.

Resultaten

Grote modderkruiper

Wij hebben redelijkerwijs kunnen uitsluiten dat grote modderkruipers aanwezig zijn in het projectgebied. U hoeft verder geen rekening te houden met grote modderkruipers.

Poelkikker

Wij hebben redelijkerwijs kunnen uitsluiten dat er poelkikkers in het projectgebied aanwezig zijn. U hoeft verder geen rekening te houden met poelkikkers.

Vleermuizen

Vleermuizen maken nauwelijks gebruik van het projectgebied zelf. Maar gewone dwergvleermuizen gebruiken een groenstrook net buiten het projectgebied als essentieel foerageergebied. Houd daarom rekening met deze soort. Laatvlieger maakt ook gebruik van deze groenstrook. Maar er is in dit geval slechts sprake van een klein onderdeel van een groter netwerk aan foerageerlocaties voor deze soort.

Wet natuurbescherming

Alle vleermuizen zijn strikt beschermd onder de Wnb. Het werk kan leiden tot overtreding van artikel 3.5 lid 2 en lid 4 Wnb. Maar door te werken onder bepaalde randvoorwaarden, kunt u overtreding voorkomen. Belangrijkste randvoorwaarde is het onder voorwaarden toepassen van kunstverlichting.

Inhoud

1	Inleiding	4
2	Situatie en planvorming	5
3	Werkwijze	7
3.1	Grote modderkruiper	7
3.2	Poelkikker	7
3.3	Vleermuizen	8
4	Resultaten	10
4.1	Grote modderkruiper	10
4.2	Poelkikker	10
4.3	Vleermuizen	10
5	Conclusie en advies	12
5.1	Onderzoeksvragen	12
5.2	Randvoorwaarden	13

Bijlage 1. Onderzoeksrapport eDNA grote modderkruiper

Bijlage 2. Waarnemingen vleermuizen

1

Inleiding

Wij hebben soortgericht onderzoek uitgevoerd in projectgebied 'Oijense Zij' in Oss. Het onderzoek is uitgevoerd in de periode september 2018 - mei 2019. Jasper Verhaar en Dennis Slotboom (beide specialist natuur & ecologie) hebben het veldwerk uitgevoerd. Jasper Verhaar heeft dit rapport is opgesteld. Dennis Slotboom heeft het inhoudelijk gecontroleerd.

Aanleiding en doel

Dit onderzoek is uitgevoerd omdat gemeente Oss het projectgebied bouwrijp wil maken en er woningbouw wil realiseren. Dit heeft mogelijk effect op diverse soorten die in het kader van de Wet natuurbescherming beschermd zijn. Uit onze eerdere quickscan Natuur (met ons kenmerk 301894) bleek namelijk dat het projectgebied mogelijk een functie vervult voor grote modderkruiper, poelkikker en verschillende soorten vleermuizen. Om dit vast te stellen, moet een nader onderzoek uitgevoerd worden. Als uit het nader onderzoek blijkt dat daadwerkelijk essentiële functies voor deze soorten aanwezig zijn, moet mogelijk een ontheffing worden aangevraagd.

Onderzoeksvragen

Wij beantwoorden met dit onderzoek de volgende vragen:

- Maken vleermuizen, poelkikker en grote modderkruiper gebruik van het projectgebied?
- Wat is de potentiële waarde van het projectgebied voor vleermuizen, poelkikker en grote modderkruiper?
- Welke vervolgstappen zijn noodzakelijk in het kader van de Wet natuurbescherming?

Hebt u na het lezen van dit rapport nog vragen?

Neem dan gerust contact met ons op. Wij zijn bereikbaar op 088-262 72 00.

Uw veelzijdig specialist,




Joost Verhagen
Directeur Cobra

Vianen, 18 september 2019

2

Situatie en planvorming

Onderzoeksgebied

Het onderzoeksgebied bevindt zich in de bebouwde kom van Oss. Het onderzoeksgebied ligt tussen de Spitsbergerweg aan de noordzijde, de Oijenseweg aan de westzijde, Sportpark de Rusheuvel aan de oostzijde en de Westhaag en Haagpoort in het zuiden. Op afbeelding 1 is het onderzoeksgebied globaal gemarkeerd.

Afbeelding 1. Onderzoeksgebied (rood kader)



De situatie

Het onderzoeksgebied omvat enkele landbouwpercelen die in gebruik zijn als hooiland of maïsakker. Het gehele terrein is omrand met vaak ondiepe sloten. Achter de sloten liggen bermen of tuinen, vaak voorzien van bomenrijen. Aan de Spitsbergerweg staan oude knotwilgen, aan de zuid- en oostzijde met name gewone essen of elzen. Aan de westzijde staan weer overwegend knotwilgen en elzen. Verder zijn er nog twee ondiepe, smalle sloten die het gebied kruisen van noord naar zuid. Bovendien is er nog een waterpartij aanwezig tussen het onderzoeksgebied en de achtertuinen van de woningen aan de Haagsloot. Die staat in verbinding met de omliggende sloten. Op foto 1 t/m 4 is de situatie afgebeeld.

Planvorming

Gemeente Oss wil de woningbouwlocatie ontwikkelen tot woonwijk. Het uitgangspunt is dat de sloten om het onderzoeksgebied en de omliggende bermen met de meeste bomen gehandhaafd blijven. Mogelijk worden enkele bomen verwijderd vanwege nieuwe infrastructuur. De smalle sloten die door het onderzoeksgebied lopen, zullen waarschijnlijk verdwijnen.

Foto 1. Essenrij langs sportvelden



Houtwal met elzen westzijde



Foto 2. Knotwilgen aan de Spitsbergerweg



Sloot en groenstrook tussen Westhaag en Haagpoort



Foto 3. Waterpartij bij de Haagpoort



Smalle sloot kruisend door het onderzoeksgebied



Foto 4. Perceel met hooiland



Perceel met maïs



3 Werkwijze

3.1 Grote modderkruiper

Environment DNA

Om de aanwezigheid van grote modderkruiper vast te stellen of uit te sluiten, hebben wij de methode 'environmental DNA' (eDNA) toegepast. Deze methode is zeer geschikt voor het aantonen van aan- of afwezigheid van grote modderkruiper in het water. Door watermonsters te nemen en hieruit in het laboratorium het DNA te extraheren, is het mogelijk de aanwezigheid van een soort in het water aan te tonen. De soort zelf hoeft daarvoor niet gevangen te worden.

Monstername en laboratoriumanalyse

Datura Molecular Solutions B.V. heeft op 2 oktober 2018 drie watermonsters verzameld op locaties die wij hebben aangegeven. Deze locaties zijn zo gekozen dat alle voor grote modderkruiper geschikte habitats worden onderzocht. Vervolgens zijn de watermonsters in het laboratorium geanalyseerd. Een volledige beschrijving van de werkwijze, inclusief de bemonsterde trajecten, is te vinden het onderzoeksrapport van Datura Molecular Solutions B.V. in bijlage 1.

3.2 Poelkikker

Kennisdocument Poelkikker

Bij het uitvoeren van dit onderzoek hebben het Kennisdocument Poelkikker van BIJ12 (juli 2017) gebruikt. In het kennisdocument staan onder andere aanbevelingen over onderzoeksmethoden en optimale onderzoeksperioden en -omstandigheden.

Veldwerk

Wij hebben het projectgebied op drie momenten bezocht en met verschillende methoden onderzoek uitgevoerd naar poelkikkers. Hieronder lichten wij deze methoden toe. Een overzicht van het uitgevoerde veldwerk staat in tabel 1.

Zoeken naar volwassen dieren en determineren

Tijdens alle veldbezoeken hebben wij gezocht naar volwassen groene kikkers. Wanneer we deze aantreffen, hebben we deze gevangen met een schepnet. Met de gevangen exemplaren in de hand hebben wij bepaald of het gaat om bastaardkikker of poelkikker. Hierbij hebben wij gekeken naar de vorm en afmeting van de graafknobbel aan de achterpoten. Deze is bij poelkikker hoog en symmetrisch. Bij bastaardkikker is de knobbel aan een zijde afgevlakt en dus asymmetrisch.

Luisteren naar kooractiviteit

Tijdens alle veldbezoeken hebben wij gelet op kooractiviteit van poelkikker.

Tabel 1. Overzicht van uitgevoerde veldbezoeken voor poelkikker

	Bezoek 1	Bezoek 2	Bezoek 3
Datum	20-09-2018	10-10-2018	22-05-2019
Start- /eindtijd	18.45 - 19.45 uur	14.30 - 16.00 uur	20.30 - 21.30 uur
Onderzoeker	Jasper Verhaar	Jasper Verhaar	Jasper Verhaar
Methode	Zoeken naar volwassen kikkers Luisteren naar kooractiviteit	Zoeken naar volwassen kikkers Determineren in de hand Luisteren naar kooractiviteit	Zoeken naar volwassen kikkers Luisteren naar kooractiviteit
Temperatuur	20°C	22°C	18°C
Windkracht	2 Bft	1 Bft	1 Bft
Windrichting	ZW	O	NW

Poelkikkerdeskundige van RAVON

Wij hebben foto's van gevangen groene kikkers voorgelegd aan een poelkikkerdeskundige van RAVON. Samen met deze deskundige hebben wij een conclusie getrokken over de kikker soort die wij in het onderzoeksgebied hebben aangetroffen.

3.3 Vleermuizen

Vleermuisprotocol

Het onderzoek hebben wij uitgevoerd volgens het Vleermuisprotocol 2017. Dit protocol is ontwikkeld door het Netwerk Groene Bureaus en goedgekeurd door zoogdiervereniging VZZ, Gegevens Autoriteit Natuur (GAN) en het Ministerie van LNV.

Onderzoeksinspanning

Om het aantal onderzoeksronden te bepalen, zijn wij ervan uitgegaan dat het projectgebied mogelijk onderdeel is van een essentieel foerageergebied en/of vliegroue voor vleermuizen. Tijdens onze eerdere quickscan hebben wij verblijfplaatsen van vleermuizen in het projectgebied al kunnen uitsluiten. Met het vleermuisprotocol als uitgangspunt betekent dit dat wij minimaal twee veldbezoeken van minimaal twee uur moeten uitvoeren, gericht op de functionaliteit van het projectgebied als foerageergebied en vliegroue. Een overzicht van het uitgevoerde veldwerk vindt u in tabel 2.

Tabel 2. Overzicht van uitgevoerde veldbezoeken voor vleermuizen

	Bezoek 1	Bezoek 2
Datum	20-09-2018	22-05-2019
Start-/eindtijd	19.45 - 21.45 uur	21.40 - 23.40 uur
Onderzoeker	Jasper Verhaar Dennis Slotboom	Jasper Verhaar
Methode	Batdetector	Batdetector
Temperatuur	20°C naar 15°C	18°C
Windkracht	1 Bft	1 Bft
Windrichting	ZW	NW

Functionaliteit projectgebied

Tijdens een veldbezoek (wij zijn minimaal een kwartier voor zonsondergang aanwezig) hebben wij gelet op aan- en langsvliegende vleermuizen. Wij hebben ook gelet op de omgeving om vast te stellen vanuit welke richtingen vleermuizen komen of waar zij naartoe vliegen. Wij leggen vast wat voor gedrag de vleermuizen vertonen. Denk aan langsvliegen, foerageren of het uiten van sociale roepen. Het gedrag geeft inzicht in de functionaliteit van het projectgebied als foerageergebied en vliegroute.

Gebruikte apparatuur

Tijdens de inventarisatieronden hebben wij een batdetector van het type Petterson D240X gebruikt. Met deze detector is het mogelijk om zowel naar het hetrodyne als het time expansion-signaal te luisteren. Hetrodyning maakt het door de vleermuis geproduceerde geluid 'live' voor ons hoorbaar. Op basis van dit geluid brengen wij een vleermuis op naam. Bij een aantal soorten is dit niet voldoende betrouwbaar. In dat geval wordt een fragment opgenomen en vertraagd afgespeeld. Dit heet time expansion. De met de batdetector opgenomen geluiden analyseren wij later op de pc met het programma BatExplorer.

Gebiedsanalyse

Na afloop van de veldbezoeken brengen wij de gebiedsfuncties van het projectgebied in kaart. Ook brengen wij in beeld waar zich kansrijke gebieden voor de aangetroffen vleermuissoorten bevinden.

Geldigheid onderzoek

In principe is de geldigheid van dit onderzoek naar vleermuizen ten minste één jaar. Onder bepaalde omstandigheden of in bepaalde gevallen kan ook na enkele jaren nog worden teruggegrepen op de resultaten uit dit onderzoek. Laat u in dat geval voorlichten door uw adviseur.

4 Resultaten

4.1 Grote modderkruiper

Resultaten

In geen van de watermonsters is eDNA van grote modderkruiper aangetoond. Een volledige beschrijving van de resultaten vindt u in het onderzoeksrapport van Datura Molecular Solutions B.V. in bijlage 1.

4.2 Poelkikker

Resultaten veldbezoek 10 oktober 2018

Wij hebben drie volwassen groene kikkers in een vochtige greppel in het noorden van het projectgebied gevangen. Determinatie van deze exemplaren wijst uit dat het gaat om bastaardkikkers. De graafknobbel is namelijk weliswaar hoog, maar niet perfect symmetrisch. Elders in het projectgebied hebben wij geen (poel)kikkers waargenomen of horen roepen.

Resultaten veldbezoek 20 september 2018 en 22 mei 2019

Tijdens deze twee veldbezoeken hebben wij geen (poel)kikkers waargenomen of horen roepen in of nabij het projectgebied.

4.3 Vleermuizen

Resultaten

Wij hebben gewone dwergvleermuizen en een enkele laatvlieger waargenomen. Hieronder beschrijven wij per veldbezoek waar en wanneer wij deze hebben waargenomen. Ook beschrijven wij het gedrag dat deze vleermuizen vertonen. Onze waarnemingen zijn per veldbezoek gevisualiseerd op een kaart in bijlage 2. Op afbeelding 2 en 3 vindt u weergaven van de geluidsopnamen van laatvlieger en gewone dwergvleermuis.

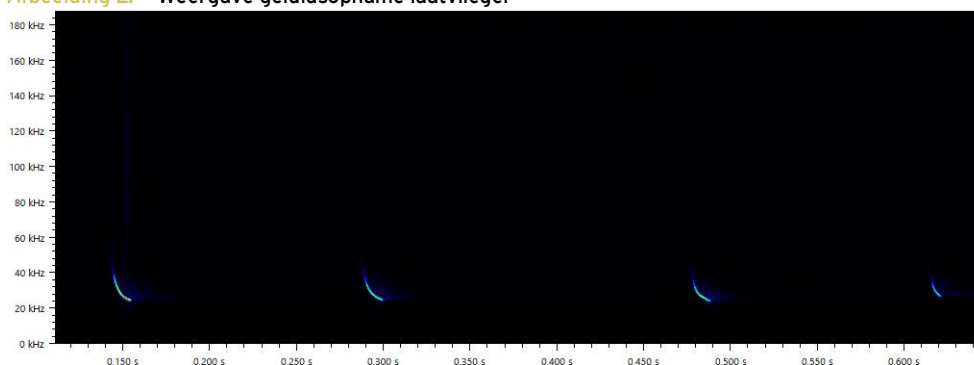
Waarnemingen 20 september 2018

In de schemering hebben wij één laatvlieger overvliegend waargenomen. Deze vloog vanuit de zuidelijk gelegen woonwijk, over het midden van het projectgebied, in noordelijke richting. Deze laatvlieger maakte duidelijk geen gebruik van bomen aan de zijden van het projectgebied. Gedurende onze aanwezigheid gebruikten twee gewone dwergvleermuizen de watergang en de aangrenzende groenstrook net buiten de zuidzijde van het projectgebied (tussen Westhaag en Haagpoort) om te foerageren.

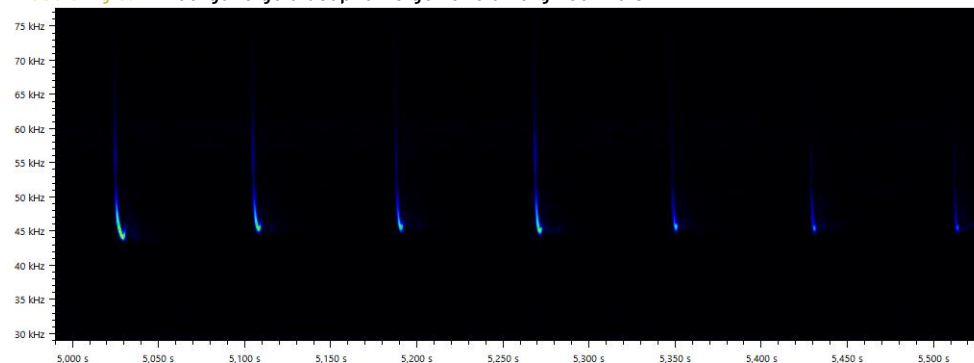
Waarnemingen 22 mei 2019

Twee laatvliegers waren foeragerend aanwezig boven de boomkronen van de groenstrook tussen Westhaag en Haagpoort. Even later foerageerden daar ook twee gewone dwergvleermuizen. Anders dan de laatvliegers, maken de gewone dwergvleermuizen meer gebruik van het gebied boven de naastgelegen watergang. De laatvliegers waren na ongeveer drie kwartier niet meer aanwezig op deze locatie. De gewone dwergvleermuizen bleven er gedurende ons veldbezoek wel foerageren. In en nabij het projectgebied hebben wij verder geen activiteit van vleermuizen waargenomen. Wel bevindt zich ten westen van het projectgebied een belangrijk foerageergebied voor laatvlieger. Het betreft de waterpartij ten noorden van de straat Het Eiland. Hier foerageerden gedurende ons veldbezoek ten minste vijf laatvliegers boven het water.

Afbeelding 2. Weergave geluidsopname laatvlieger



Afbeelding 3. Weergave geluidsopname gewone dwergvleermuis



5

Conclusie en advies

5.1 Onderzoeksvragen

In dit hoofdstuk geven wij antwoord op de onderzoeksvragen en gaan wij in op de te nemen vervolgstappen.

Maken vleermuizen, poelkikker en grote modderkruiper gebruik van het projectgebied?

Vleermuizen

Wij hebben twee soorten vleermuizen in en in de directe nabijheid van het projectgebied waargenomen. Het gaat om gewone dwergvleermuis en laatvlieger. Alle waargenomen vleermuizen hebben wij met voldoende zekerheid op soortniveau kunnen determineren op basis van visuele waarnemingen en geluidsanalyse. Gebruik van het projectgebied door andere soorten vleermuizen kunnen wij redelijkerwijs uitsluiten. Wij hebben namelijk geen andere soorten waargenomen tijdens de (zoals aanbevolen in het Vleermuisprotocol 2017) geleverde onderzoeksinspanning.

Poelkikker

Wij hebben tijdens drie gerichte veldbezoeken geen poelkikkers waargenomen in het projectgebied. Wel hebben wij op één moment drie exemplaren van een groene kikkersoort aangetroffen en gevangen. Maar wij hebben deze met voldoende zekerheid en in overleg met een poelkikkerdeskundige van RAVON als bastaardkikker kunnen determineren, op basis van de afmeting en vorm van de graafknobbel. Het Kennisdocument Poelkikker stelt dat bij het aantreffen van alleen bastaardkikkers kan worden aangenomen dat poelkikker niet aanwezig is. Wij kunnen daarom redelijkerwijs uitsluiten dat poelkikker in het projectgebied aanwezig is.

Grote modderkruiper

In geen van de watermonsters is eDNA van grote modderkruiper aangetoond. De methode eDNA is een erkend betrouwbare methode voor het aantonen van de aan- of afwezigheid van grote modderkruiper. Daarmee kan worden vastgesteld dat grote modderkruiper afwezig is in de onderzochte sloten en dus niet voorkomt in het projectgebied.

Wat is de potentiële waarde van het projectgebied voor vleermuizen, poelkikker en grote modderkruiper?

Het projectgebied heeft op dit moment geen waarde voor poelkikker en grote modderkruiper. Voor gewone dwergvleermuis en laatvlieger geldt dat gebieden op zeer geringe afstand van het projectgebied worden gebruikt als foerageergebied. Hierna volgt per vleermuissoort een toelichting op deze conclusie.

Gewone dwergvleermuis

De waargenomen gewone dwergvleermuizen hebben met name baat bij de beschutting van bomen in de groenstrook tussen Westhaag en Haagpoort, net ten zuiden van het projectgebied. Hier zijn tijdens een aanzienlijk deel van de nacht constant enkele foeragerende vleermuizen actief. Het is goed mogelijk dat het steeds om dezelfde individuen gaat en dat het gebied voor die exemplaren essentieel is. Het projectgebied zelf is niet van belang voor gewone dwergvleermuizen.

Laatvlieger

Enkele individuen maken (net als gewone dwergvleermuis) gebruik van de groenstrook tussen Westhaag en Haagpoort net buiten het projectgebied om er te foerageren. Maar dit hebben wij slechts kortstondig en slechts tijdens één veldbezoek waargenomen. Hieruit blijkt dat de groenstrook waarschijnlijk niet dagelijks door deze soort wordt gebruikt als foerageergebied en dat er in de omgeving goede alternatieven te vinden zijn. Ten minste één van deze alternatieven bevindt zich enkele honderden meters verderop ten noorden van de straat Het Eiland, buiten het projectgebied. Hier ligt een waterpartij die waarschijnlijk wel een essentieel foerageergebied is voor laatvliegers.

Welke vervolgstappen zijn noodzakelijk in het kader van de Wet natuurbescherming?

Grote modderkruiper, poelkikker en laatvlieger

Grote modderkruiper en poelkikker zijn niet in het projectgebied aanwezig. Voor deze soorten zijn dan ook geen vervolgstappen noodzakelijk in het kader van de Wet natuurbescherming. Voor laatvlieger zijn geen vervolgstappen nodig omdat er geen sprake is van een essentieel foerageergebied.

Gewone dwergvleermuis

Voor gewone dwergvleermuis zijn wel specifieke maatregelen nodig. Door de aanleg van een woonwijk kan kunstlicht van lichtmasten en tuinverlichting de groenstrook namelijk minder donker maken. Zo wordt dit relatief belangrijke foerageergebied minder geschikt en zijn de vleermuizen gedwongen alternatieve foerageerlocaties te vinden. Dit kan op den duur leiden tot het verlaten van verblijfplaatsen in de omgeving en daarmee vindt overtreding plaats van artikel 3.5 lid 4 Wnb. Daarnaast kan tijdelijke bouwverlichting leiden tot verstoring van foeragerende vleermuizen in hun actieve periode. Ook verstoren is een overtreding van de Wnb, namelijk artikel 3.5 lid 2. Een specifieke maatregelen is daarom het vermijden van zowel permanente als tijdelijke lichtverstoring. In paragraaf 5.2 lichten we dit verder toe.

5.2 Randvoorwaarden

Het is niet nodig een ontheffing aan te vragen voor het aantasten van essentieel foerageergebied van gewone dwergvleermuis en het verstoren van deze soort als u het werk uitvoert volgens deze randvoorwaarden:

- Als u tijdelijke bouwverlichting toepast in de voor vleermuizen actieve periode (doorgaans tussen half maart en half november), moet deze verlichting opgesteld worden aan de rand van het projectgebied. Richt de verlichting af van de groenstrook tussen Westhaag en Haagpoort.

- Verwerk eventuele nieuwe toe te passen openbare verlichting voor woonerven of straten aan de rand van het projectgebied en richt de verlichting af van de groenstrook tussen Westhaag en Haagpoort.
- Neem in de verkoopvoorwaarden van eventuele percelen grenzend aan de groenstrook tussen Westhaag en Haagpoort op dat de groenstrook niet verlicht mag worden (behoudens sfeerverlichting in tuinen).

Bijlage 1

Onderzoeksrapport eDNA grote modderkruiper

eDNA onderzoek naar grote modderkruiper



Colofon

Titel	eDNA onderzoek naar grote modderkruiper.
Tekst, foto's en samenstelling	K. van Bochove en J. Rook
In opdracht van	Cobra advissurs
Naam opdrachtgever	J. Verhaar
Projectnummer opdrachtgever	301894
Rapportnummer	RA2018093
Datum oplevering rapport	10-10-2018
Aantal pagina's	8
Wijze van citeren	van Bochove K. 2018. eDNA onderzoek naar grote modderkruiper. Rapport RA2018093, Datura, Huissen.
Laboratorium analist	J. Rook



Datura Molecular Solutions BV

Gevestigd te:
Brouwketel 1
6851 ZX Huissen
Nederland

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

jitske.rook@datura.nl
0031(0)628022473
www.datura.nl

Inhoudsopgave

1. Doelstelling.....	4
2. Methode.....	4
2.1 Sampling	4
2.2 Laboratorium analyse	5
2.3 Kwaliteitswaarborging	5
2.3.1 Hoe vals positieve waarnemingen voorkomen worden	5
2.3.2 Hoe vals negatieve waarnemingen voorkomen worden	7
3. Resultaten	8

1. Doelstelling

Vaststellen van de aan- of afwezigheid van eDNA van grote modderkruiper (*Misgurnus fossilis*) in watersamples in opdracht van Cobra adviseurs.

2. Methode

2.1 Sampling

Het veldwerk is uitgevoerd door Kees van Bochove van Datura Molecular Solutions B.V. op 2 oktober 2018. Er zijn drie watermonsters verzameld op de door Cobra adviseurs aangegeven locaties (zie figuur 1). Per monster, zijn er langs een traject van circa 100 meter, 27 subsamples van 35 mL verzameld. Deze 27 subsamples zijn vermengt tot één monster. Per sample is ongeveer één liter water gefiltreerd. Het sample is in het veld gefiltreerd met behulp van een polyethersulfone filter met een porie grootte van 0,22 µm. Het eDNA van de doelsoorten blijft achter op het filter. Het filter is geconserveerd in een CTAB buffer totdat het eDNA geëxtraheerd is in het laboratorium van Datura.



Figuur 1. Bemonsterde locaties.

2.2 Laboratorium analyse

De eDNA samples zijn geanalyseerd op de aanwezigheid van eDNA van grote modderkruiper. Het analyseren van een eDNA sample 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 eDNA is geëxtraheerd door middel van een phenol chloroform DNA extractie. Gedurende de extractie lost het filter op waardoor al het DNA vrij komt. Storende stoffen als humuszuren kunnen detectie van het eDNA inhiberen wat kan leiden tot vals negatief resultaat. Gedurende de extractie zijn deze 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 sample toegevoegd is. Voornamelijk in zuur water, waarin veel organische deeltjes aanwezig zijn kan inhibitie optreden. In een dergelijk geval wordt een extra zuiveringsstap 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 kwantitatieve PCR (qPCR). 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. Bovendien wordt een soort-specifieke probe gebruikt (een soort primer) die uitsluitend bindt 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 qPCR reacties uitgevoerd 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.

2.3 Kwaliteitswaarborging

2.3.1 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 de 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.

Hoe het optreden vals positieve waarnemingen voorkomen wordt door degelijk 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 de 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;

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 ingericht 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 hoge concentraties DNA aanwezig.

Om vals positieve waarnemingen te voorkomen werkt Datura in een specifiek voor eDNA ingericht laboratorium omgeving en worden strikte procedures gevolgd:

1. 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.
2. In iedere analyse worden **controle analyses** uitgevoerd. Zo worden er samples geëxtraheerd waaraan geen slotwater 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 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 opgewekte stroming, bijvoorbeeld bij wisseling van zomer- naar winterpeil.

2.3.2. Hoe vals negatieve waarnemingen voorkomen worden

Naast vals positieve waarnemingen kunnen ook vals negatieve waarnemingen optreden. Daarnaast is uit diverse validatie studies gebleken dat het eDNA in sommige gevallen niet gedetecteerd wordt, ook al is de doelsoort wel aanwezig. Maatregelen die genomen worden om vals negatieve waarnemingen te voorkomen:

1. Per sample worden **26 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. Van ieder sample wordt **vastgesteld of de qPCR detectie geïnhibeerd** wordt door storende stoffen. Indien dit het geval is wordt er een **extra zuiveringstap** uitgevoerd. Vervolgens wordt nogmaals getest of er inderdaad geen inhibitie meer optreedt (zie methode voor een uitgebreidere beschrijving);
5. Er wordt altijd een **positieve controle** reactie van doelsoort DNA meegenomen in de qPCR detectie. Deze controle reactie moet altijd resulteren in positieve detectie. Ook als alle samples negatief zijn, kan zodoende vastgesteld worden dat de detectie juist is uitgevoerd.

3. Resultaten

In geen van de samples is eDNA van grote modderkruiper aangetoond (tabel 1). Daarmee is vastgesteld dat grote modderkruiper afwezig is in de onderzochte sloten.

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

Humuszuren kunnen een qPCR reactie inhiberen wat kan leiden tot vals negatief resultaat. Daarom wordt altijd een interne controle mee geanalyseerd om vast te stellen of er sprake is van inhibitie. Er werd geen significante afwijking gevonden. Er was in dit geval dan ook geen sprake van inhibitie.

Samenvattend, de eDNA analyses zijn met succes uitgevoerd. Grote modderkruiper is afwezig in de onderzochte sloten.

Tabel 1. Resultaten van eDNA analyse.

Sample nummer	Aantal positieve reacties grote modderkruiper
20911	0/12
20920	0/12
20947	0/12

Bijlage 2

Waarnemingen vleermuizen

Veldbezoek 1 - 20 september 2018

○ Foeragerend
→ Overvliend





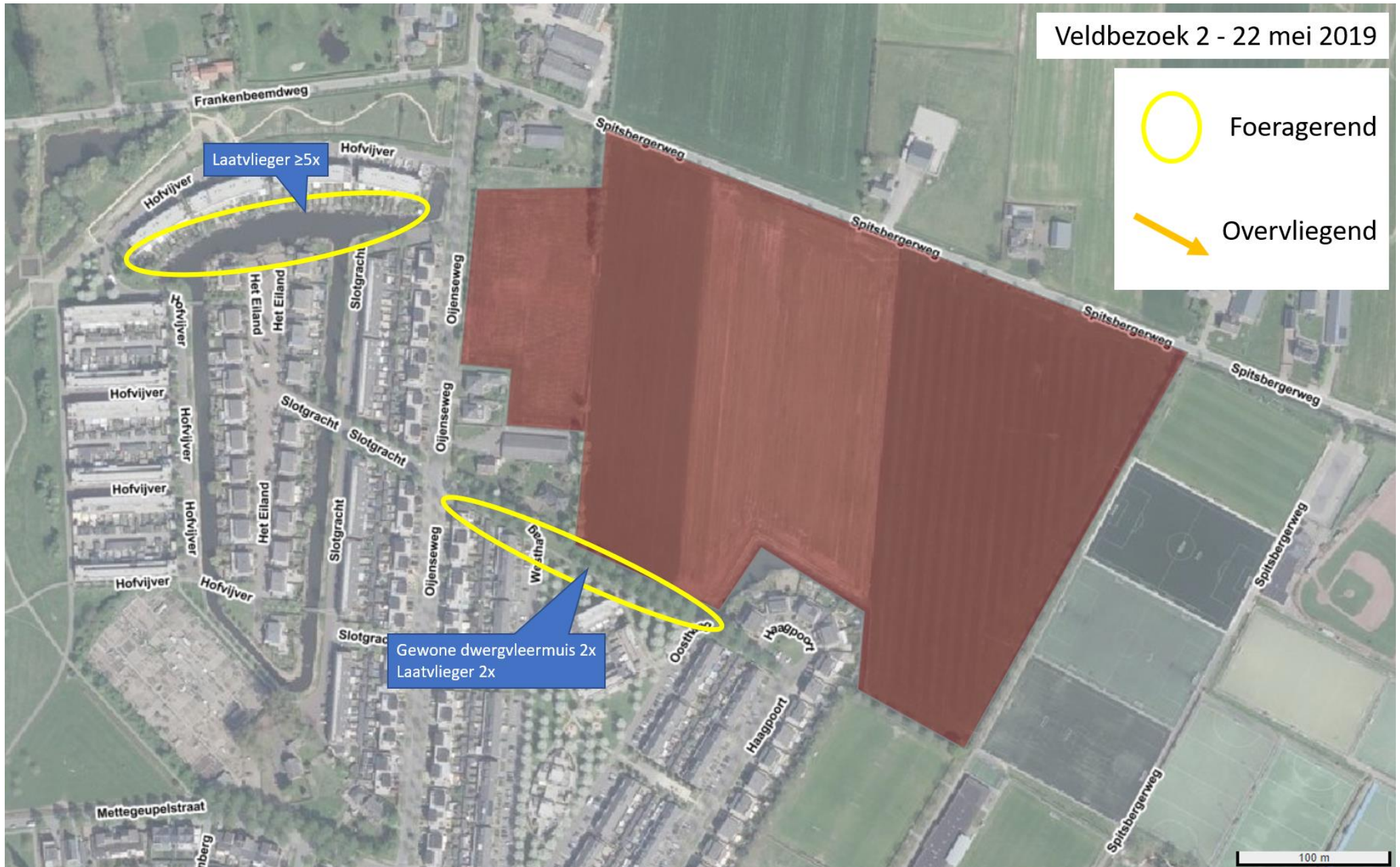
Gewone dwergvleermuis 2x

Laatvlieger 1x

100 m

Veldbezoek 2 - 22 mei 2019

-  Foeragerend
-  Overvliend



Laatvlieger $\geq 5x$

Gewone dwergvleermuis 2x
Laatvlieger 2x

100 m



Voor meer informatie over
Cobra bezoek onze websites
www.Cobra-Adviseurs.nl
info@Cobra-Adviseurs.nl