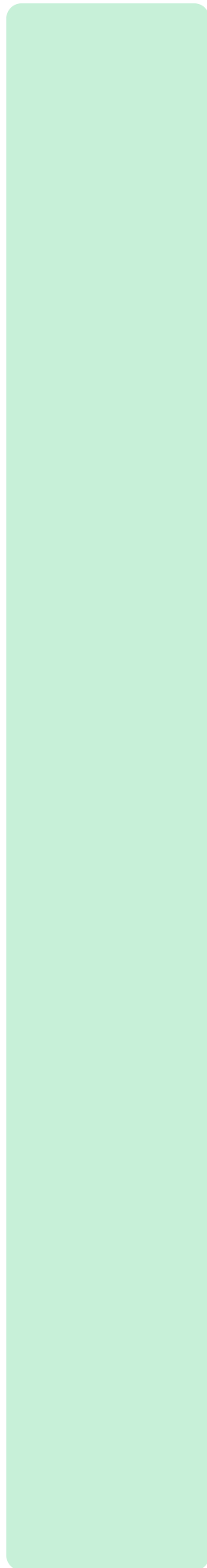


Bijlagen bij toelichting

Bijlage 8 Nader onderzoek ecologie



**Nader onderzoek beschermde soorten
Rijzenburg, Elst**



Colofon

Titel : Nader onderzoek beschermde soorten Rijzenburg, Elst

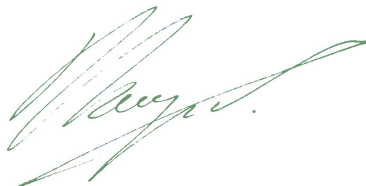
Projectnummer: .. : 17781a

Opdrachtgever ... : De Bunte vastgoed BV
Postbus 8029
6710 AA Ede

Datum : 11-7-2018
Status rapport ... : eindrapport / definitief
Bestand : 17781a - eind vs 2.wpd

Opdrachtnemer .. : De Groene Ruimte BV
Postbus 400
6700 AK Wageningen
tel. 0317-423969
dgr@dgr.nl www.dgr.nl

Handtekening voor akkoord directie,
Naam : ir. P.A.W.M. Raaijmakers
Handtekening: ... :



Auteursrecht : De auteursrechten van dit rapport rusten bij zowel opdrachtgever als opdrachtnemer, tenzij schriftelijk anders is/wordt overeengekomen. Alleen degenen bij wie het auteursrecht rust zijn gerechtigd het rapport voor eigen gebruik te vermenigvuldigen, te verspreiden of toe te passen, alsook om het ter informatie aan derden openbaar te maken tegen onderling (= zij bij wie het auteursrecht rust) overeengekomen voorwaarden (kosten, citeren, gebruiken, wijzigen etc).

Aansprakelijkheid . : Raadpleging van en eventuele verdere handelingen met/op basis van het door De Groene Ruimte BV geleverde product vallen buiten elke verantwoordelijkheid van opdrachtgever en/of De Groene Ruimte BV.



INHOUD

1. INLEIDING	2
2. NADER ONDERZOEK GROTE MODDERKRUIPER	3
2.1. Uitvoering	3
2.2. Resultaten	3
2.3. Conclusie Grote modderkruiper	3
3. NADER ONDERZOEK VLEERMUIZEN	4
3.1. Uitvoering	4
3.2. Resultaten	4
3.3. Conclusie vleermuizen	5
3.4. Overige waarnemingen tijdens het nader onderzoek	5
4. CONCLUSIE EN AANBEVELINGEN	7
BRONNEN	9

Bijlagen

- Bijlage 1. Beknopte verslagen per veldbezoek
- Bijlage 2. Rapportage eDNA Grote modderkruiper (Datura).

I. INLEIDING

De Bunte Vastgoed BV wil het plangebied 'De Rijzenburg' aan de Rijksweg Noord 86-88 te Elst (Gld) herontwikkelen ('handeling'). In dat kader is in opdracht van De Bunte Vastgoed BV in 201 een ecologische quickscan uitgevoerd (De Groene Ruimte, 2017).

Uit die quickscan is gebleken, dat de aanwezigheid van vaste verblijfplaatsen van beschermde vleermuizen en van de beschermde Grote modderkruiper niet konden worden uitgesloten. Omdat door een handeling geen beschermde soorten mogen worden verstoord, is zekerheid nodig over de aan- of afwezigheid van deze beschermde soorten. Om dat vast te stellen is in 2017 in opdracht van De Bunte vastgoed BV nader veldonderzoek uitgevoerd naar vleermuizen en Grote modderkruiper. Het onderzoeksgebied is in de volgende figuur weergegeven; voor een beschrijving van het onderzoeksgebied en de voorgenomen handeling wordt verwezen naar de in 2017 uitgevoerde quickscan.

Onderzoeksgebied voor vleermuizen (lichtgroen) en plangebied (rood omlijnd).
(bron ondergrond: Google Earth)



In voorliggende rapportage worden de werkwijze, resultaten, conclusies en aanbevelingen beschreven van het uitgevoerde onderzoek naar Grote modderkruiper (hoofdstuk 2) en vleermuizen (hoofdstuk 3). De eindconclusies en aanbevelingen zijn samengevat in hoofdstuk 4. Als bijlage zijn de veldverslagen (bijlage 1) en de integrale rapportage van de door Datura uitgevoerde eDNA-analyse naar Grote modderkruiper (bijlage 2) bijgevoegd.



2. NADER ONDERZOEK GROTE MODDERKRUIPER

2.1. Uitvoering

Op 27 april 2017 is een mengmonster genomen volgens de methode van Datura, van twee sloten in het plangebied; de sloot langs de Rijksweg-Noord en de sloot langs de noordrand van het perceel. Het mengsel is volgens protocol behandeld en door Datura opgehaald voor analyse.

Veldbezoek Grote modderkruiper

Datum en tijd	Weersomstandigheden
27-04-2017 9.15u-9.45u	droog, wisselend bewolkt, 23°C, broeierig warm, , nagenoeg windstil

2.2. Resultaten

Uit de analyse door Datura blijkt dat er in het mengmonster geen e-DNA van Grote modderkruiper is aangetroffen.

De door Datura aangeleverde rapportage is integraal toegevoegd (bijlage 2).

2.3. Conclusie Grote modderkruiper

- Er is geen e-DNA van Grote modderkruiper aangetroffen in het mengmonster.
- Op basis daarvan wordt ervan uitgegaan dat de Grote modderkruiper niet in het plangebied voorkomt.

3. NADER ONDERZOEK VLEERMUIZEN

3.1. Uitvoering

In het plangebied is overeenkomstig het vleermuisprotocol gericht nader onderzoek uitgevoerd naar vaste verblijfplaatsen van vleermuizen (zomer-, paar- en kraamverblijfplaatsen Gewone dwergvleermuis en Gewone grootoorvleermuis en zomer- en paarverblijfplaatsen Ruige dwergvleermuis en Laatvlieger in het bijzonder). Daartoe zijn in voorjaar/zomer van 2017 een avond- en een ochtendbezoek gebracht; in nazomer/najaar zijn twee avondbezoeken gebracht (zie schema).

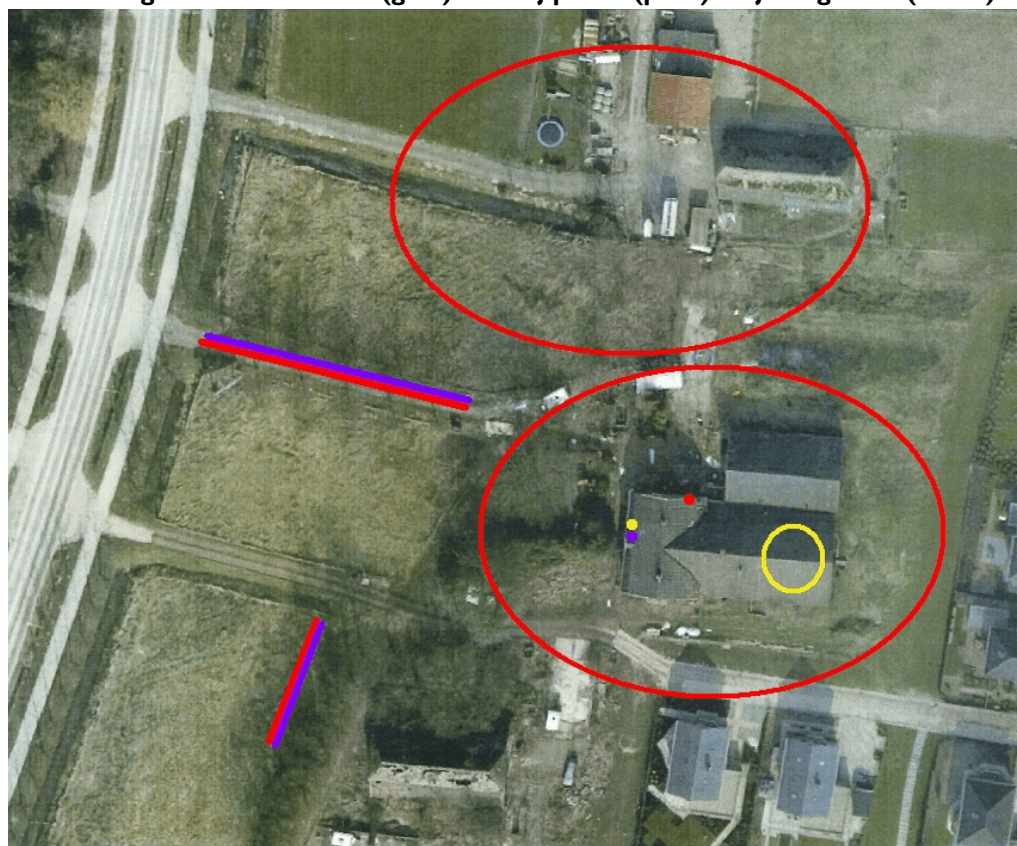
Veldbezoeken vleermuizen

Datum en tijd	Weersomstandigheden
22-05-2017 10.50u-23.55u	droog, wisselend bewolkt, 23°C, broeierig warm, , nagenoeg windstil
22-06-2017 3.25u -5.20u	warm, droog, vrijwel geheel helder, 19°C, nagenoeg windstil
31-08-2017 20.35 -23.30u	warm, droog, vrijwel geheel helder, 15°C, nagenoeg windstil
20-09-2017 19,45u-22.45u	warm, droog, vrijwel geheel helder, 14°C, nagenoeg windstil

3.2. Resultaten

De resultaten zijn in de volgende figuur samengevat.

- Gewone dwergvleermuis (rood): verblijfplaats (punt), paarterritorium (cirkels) en jachtgebied (lijn);
- Ruige dwergvleermuis (paars): verblijfplaats (punt) en jachtgebied (lijn);
- Gewone grootoorvleermuis (geel): verblijfplaats (punt) en jachtgebied (cirkel).





Uit het onderzoek blijkt dat het onderzoeksgebied voor drie soorten vleermuizen drie typen verblijfplaatsen herbergt:

- paarplaats en zomerverblijf:
 - Gewone dwergvleermuis in de kopse gevel aan de noordzijde van het woonhuis en zomers ook in de daklijst aan de voorgevel.
 - enkele Ruige dwergvleermuizen (westgevel woonhuis);
- paarterritorium:
 - Gewone dwergvleermuis rondom bebouwing;
- kraamverblijfplaatsen:
 - Er zijn geen kraamverblijfplaatsen aanwezig;
- jachgebieden (niet essentieel):
 - esdoornlaan (Gewone dwergvleermuis en Ruige dwergvleermuis);
 - knotwilgen (Gewone dwergvleermuis en Ruige dwergvleermuis);
 - de deel van de boerderij (Gewone grootoorvleermuis).
- Het pand wordt niet gebruikt als winterverblijfplaats omdat er geen spouwruimte aanwezig is en het gebouw door de slechte staat erg tochtig is. De aanwezige kelders zijn gecontroleerd op overwinterende dieren; deze werden niet aangetroffen.

Er zijn tijdens het onderzoek geen waarnemingen gedaan van Laatvlieger; de soort ontbreekt zowel in het plangebied als in de omgeving.

3.3. Conclusie vleermuizen

- Er is een paarplaats van Gewone dwergvleermuis aanwezig in het boerderijhuis. De verblijfplaats wordt gedurende het groeiseizoen gebruikt, maar niet in de winter. Er maken 1 tot 5 dieren van gebruik.
- Er is een zomerverblijfplaats van Ruige dwergvleermuis aanwezig in het pand. Het betreft waarschijnlijk mannelijke dieren. Er maken circa 3-5 dieren gebruik van. De verblijfplaats is niet in gebruik als paarplaats.
- Er is een zomerverblijfplaats van Gewone grootoorvleermuis aanwezig. De dieren verblijven in de daklijst van het woonhuis. Het gaat om enkele dieren. In de nazomer wordt gejaagd in het gebouw op de deel. De verblijfplaats wordt niet als paarplaats gebruikt.
- Er zijn geen vaste verblijfplaatsen van Laatvlieger aanwezig in het plangebied.
- De boomstructuren in het plangebied zijn van belang als jachtgebied voor de aanwezige vleermuizen. Het betreft geen essentieel jachtgebied omdat de wijde omgeving net zo geschikt is als jachtgebied.

3.4. Overige waarnemingen tijdens het nader onderzoek

Tijdens het nader onderzoek zijn waarnemingen gedaan van fauna die van belang kunnen zijn bij de uitvoering van de herontwikkeling met betrekking tot de zorgplicht.

- Nogmaals is duidelijk vast komen te staan dat in het plangebied geen Steenuilen of andere uilensoorten hun nestplaats hebben. Wel is ten westen van het plangebied de Steenuil waargenomen. Er is ook mogelijk in de omgeving een Kerkuil aanwezig. Het plangebied vormt geen essentieel jachtgebied voor deze uilensoorten.
- Broedgevallen van Boerenzwaluw en Witte kwikstaart zijn in het boerderijhuis aangetroffen. In en rond de ruïne zijn broedgevallen van Zwartkop, Grasmus en Merel aangetroffen. Mogelijk broedt ook Fazant in dit gedeelte.

- In de sloten van het plangebied zijn Middelste groene kikkers gehoord
- In het plangebied is de Gewone pad aangetroffen.



4. CONCLUSIE EN AANBEVELINGEN

Ontheffing

- Door de handeling worden vaste verblijfplaatsen van Gewone dwergyleermuis, Ruige dwergyleermuis en Gewone grootoorvleermuis verstoord. Om de werkzaamheden te mogen uitvoeren dient daarvoor door de provincie een ontheffing te worden afgegeven.
- Aanbevolen wordt om bij de provincie Gelderland een ontheffing aan te vragen voor verstoring van vaste verblijfplaatsen van Gewone dwergvleermuis, Ruige dwergvleermuis en Gewone grootoorvleermuis. De versturende werkzaamheden mogen pas worden uitgevoerd nadat een ontheffing is verleend, en mogen alleen worden uitgevoerd onder de voorwaarden die in de ontheffing zijn opgenomen. Geadviseerd wordt om de in het kader van de verleende ontheffing te nemen voorzorgsmaatregelen op te nemen in een ecologisch werkprotocol (zie verder).

Broedgevallen

- In het boerderijhuis zijn onder ander broedgevallen van Boerenwaluw en Witte kwikstaart te verwachten. In het gebied van de ruïne van de doorrijschuur zijn verschillende broedgevallen te verwachten zoals Zwartkop, Grasmus, Fazant en dergelijke. Broedgevallen van vogels zijn te allen tijde beschermd. Indien de handeling wordt uitgevoerd in het seizoen dat broedgevallen aanwezig kunnen zijn, dan dient ervoor gezorgd te worden dat er geen broedgevallen worden verstoord.
- Geadviseerd wordt om voorafgaand aan de start van de werkzaamheden een broedgevallencheck uit te voeren. Indien broedgevallen aanwezig blijken, dan dienen de versturende werkzaamheden te worden opgeschort totdat het broedgeval is voltooid. Tevens wordt geadviseerd om, voorafgaand aan het broedseizoen en ná een broedgevallencheck, de te slopen opstallen ontoegankelijk te maken voor vogels, bijvoorbeeld door deze met steigerdoek te overspannen. Geadviseerd wordt de voorzorgsmaatregelen ter voorkoming van verstoring van broedgevallen op te nemen in een ecologisch werkprotocol (zie verder).

Zorgplicht

- Voor alle planten- en diersoorten geldt de wettelijke zorgplicht. Deze houdt in dat al het redelijke moet worden gedaan om verstoring van planten en dieren te voorkomen of te beperken.
- Geadviseerd de in het kader van de zorgplicht te nemen voorzorgsmaatregelen op te nemen in een ecologisch werkprotocol (zie verder).

Ecologisch werkprotocol

- Een ecologisch werkprotocol is een praktische leidraad voor de planner en de uitvoerder. Het omvat een chronologisch overzicht met te ondernemen acties en te nemen voorzorgsmaatregelen, met als doel om de ecologische aspecten in de planning en uitvoering te integreren en daardoor de uitvoering zo soepel mogelijk te laten verlopen.
- Geadviseerd wordt om een ecologisch werkprotocol op te (laten) stellen, waarin op uitvoeringsniveau is opgenomen welke ecologische maatregelen (zowel de

voorwaarden uit de ontheffing als maatregelen in het kader van de wettelijke zorgplicht voor algemene soorten die in het plangebied) tijdens de handeling genomen dienen te worden, uitgezet in de tijd en de fasering van de handeling.



BRONNEN

De Groene Ruimte, 2017. *Quickscan Wet Natuurbescherming herontwikkeling 'De Rijenburg'*. - Onderzoeksrapport 17769, in opdracht van SPA WNP ingenieurs

Dienst Regelingen van het Ministerie van EL&I, 2014a. *Soortenstandaard Gewone dwergvleermuis (*Pipistrellus pipistrellus*), versie 2.0.*

Dienst Regelingen van het Ministerie van EL&I, 2014b. *Soortenstandaard Ruige dwergvleermuis (*Pipistrellus nathusii*), versie 2.0.*

Dienst Regelingen van het Ministerie van EL&I, 2014c. *Soortenstandaard Gewone grootoorvleermuis (*Plecotus auritus*), versie 2.0.*

Vleermuisvakberaad Netwerk Groene Bureaus, Zoogdiervereniging en Gegevensautoriteit Natuur, 2013. *Vleermuisprotocol 2017, maart 2017*

BIJLAGE I. BEKNOPTE VERSLAGEN PER VELDBEZOEK

Veldbezoek d.d. 27 april 2017

- Tijdstip : 09.15u - 09.45u
Weer : Wisselend bewolkt, droog, broeierig warm, 19°C, nagenoeg
windstil
Medewerker(s) . : Rienk Noordhuis
- Werkzaamheden : Monsternamen ten behoeve van onderzoek naar Grote modder-
kruiper
- Resultaten : • In het monster is geen e-DNA van Grote modderkruiper
aangetroffen.
- Overig : • Geen Huismussen op het dak van de boerderij waargenomen.



Veldbezoek d.d. 22 mei 2017

Tijdstip : 21.40u - 23.40u
Weer : Half bewolkt, droog, ca. 22°C, nagenoeg windstil
Medewerker(s) . : Rienk Noordhuis

Werkzaamheden : Inventarisatie verblijfplaatsen vleermuizen

Resultaten :

- Rond 22.00u is een uitvliegende Gewone dwergvleermuis van de zuidwesthoek van het woonhuis van de boerderij waargenomen. Daarna bleef er telkens bij deze plek, de zuidzijde van het boerderijhuis, en onder de twee grote bomen een Gewone dwergvleermuis jagen. Het dier werd af en toe vergezeld door een tweede of derde soortgenoot. Deze zijn niet uitvliegend gezien. De genoemde verblijfplaats werd een enkele keer nog met een draaibeweging benaderd.
- Tweemaal is na de uitvliegtijd een Ruige dwergvleermuis waargenomen. Eenmaal ten noorden van het gebouw en éénmaal onder de twee grote bomen voor het woongedeelte.
- Op de deel zijn enkele vlindervleugels gevonden van recente datum (winter-voorjaar 2017). Er is gepost op de deel, maar er is geen Gewone grootoorvleermuis waargenomen.

Overig :

- Op het erf werd af en toe de Middelste groene kikker gehoord.
- Er is geen bij het boerderijhuis of elders in het plangebied geen Steenuil waargenomen. Wel is op meer dan 200m afstand ten noordwesten van het plangebied een Steenuil gehoord.

Veldbezoek d.d. 22 juni 2017

Tijdstip : 03.25u - 05.20u
Weer : Warm, droog, nagenoeg windstil, vrijwel geheel helder, ca. 19°C
Medewerker(s) . : Rienk Noordhuis

Werkzaamheden : Inventarisatie verblijfplaatsen vleermuizen

- Resultaten :
- Bij het begin van het bezoek een jagende Ruige dwergvleermuis en Gewone dwergvleermuis in de oprijlaan met esdoorns. Tevens rond het boerderijhuis een jagende Gewone dwergvleermuis.
 - Tussen 04.20 en 04.40u zwermgedrag van circa zes Gewone dwergvleermuis. Aanvliegbewegingen op twee plaatsen langs de daklijst van de voorgevel, bij de regenpijp en ten westen ervan. Tevens werd aangevlogen bij de zuidgevel op de hoek met de voorgevel, waar bij het vorige bezoek een uitvlieger is waargenomen. Overduidelijk is dat hier en in de daklijst een verblijfplaats is.
Na heftig te hebben gezwermd verdwenen enkele van de Gewone dwergvleermuizen overigens naar elders.
 - Bij het zwermen werden ook 1 tot 3 Ruige dwergvleermuizen waargenomen en tenminste 1 Gewone grootoorvleermuis (opname gemaakt en de soort bevestigd). Beiden waren korte tijd aanwezig en verdwenen in de daklijst. Dit was rond 04.30u.
 - De Gewone dwergvleermuizen hebben enkele keren hun sociale roep laten horen en koloniegeluiden ontbraken. De conclusie is dat het hier dus om een zomerverblijfplaats van mannelijke dieren gaat en niet om een kraamkolonie. Zomerverblijfplaatsen van Ruige dwergvleermuis en Gewone grootoorvleermuis (elk één).
- Overig :
- In de ingestorte schuur broeden tenminste twee Boerenzwaluwen en een Witte kwikstaart.
 - Op de deel was een wel doorvoede Gewone pad aanwezig. Middelste groene kikkers riepen rondom het huis veelvuldig.
 - Steenuilen zijn niet gehoord. Huismussen zijn niet in de boerderij aangetroffen, maar mogelijk wel Ringmussen. De Holenduif is niet gezien. Achter een luik aan de noordzijde broedde een Boomkruiper.
Bij de doorrijschuur zijn Grasmus, Zwartkop en Merel aangetroffen. Verder waren Kneutjes aanwezig en is een Grote bonte specht waargenomen. Over vlogen Visdief, Kleine mantelmeeuw en Nijlgans.



Veldbezoek d.d. 31 augustus 2017

Tijdstip : 20.35u - 23.30u
Weer : Grotendeels helder, vrijwel geen wind, 15°C, droog
Medewerker(s) . : Rienk Noordhuis

Werkzaamheden : Inventarisatie verblijfplaatsen vleermuizen

- Resultaten :
- Bij het woonhuis van de boerderij vloog vroeg in de veldtijd een Gewone dwergvleermuis uit. Deze vloog daarna steeds rondjes rond het woonhuis en ten zuiden van de gehele boerderij. Er werd fanatiek geroepen en soms vlogen er twee tot drie dieren van deze soort. De uitvliegplek was de dakrand aan de noordgevel van het woonhuis.
 - De bomenlaan is een veel gebruikt jachtgebied voer in elk geval Gewone dwergvleermuis (enkele) en Ruige dwergvleermuis (1-2).
 - Op de deel in het boerderijhuis is tot driemaal toe rond 22.25u een Gewone grootoorvleermuis gehoord. Het dier vloog dus binnen rond. Er zijn geen nieuwe vlindervleugeltjes gevonden.
 - De Ruige dwergvleermuis werd ook enkele malen gehoord bij het boerderijhuis en dus in de bomenlaan.
 - Bij het erf ten noorden van de Rijzenburg (rieten dak) is ook een tweede roepend mannetje van de Gewone dwergvleermuis gehoord.
 - Er zijn geen overige vleermuissoorten waargenomen.
- Conclusie :
- Zie vorige bezoek: een paarplaats van de Gewone dwergvleermuis en een zomerverblijfplaats van Ruige dwergvleermuis en Gewone grootoorvleermuis.
- Overig :
- Een mogelijke Kerkuil is gehoord in de omgeving van het plangebied. Er zijn geen Steenuilen gehoord en er zijn geen sporen van Steenuil in het pand aangetroffen.

Veldbezoek d.d. 20 september 2017

Tijdstip : 19.45u - 22.45u
Weer : Grotendeels helder, geen wind, droog 14 °C
Medewerker(s) . : Rienk Noordhuis

Werkzaamheden : Inventarisatie verblijfplaatsen vleermuizen

- Resultaten :
- Bij de noordelijke kopgevel van het woonhuis is een uitvliegende Gewone dwergvleermuis waargenomen. Ook toonden enkele Gewone dwergvleermuizen aanvliegbewegingen aan de daklijst op de voorgevel van het pand. Er werd later op de avond rond het gehele pand geroepen door een Gewone dwergvleermuis. Het dier werd vaak vergezeld door één tot enkele dieren van de Gewone of Ruige dwergvleermuis.
 - Gedurende de gehele veldtijd waren er één tot enkele Ruige dwergvleermuizen aan het jagen rond de boerderij of elders op het plangebied.
 - In de oprijlaan met de esdoornen werd telkens door één tot enkele dwergvleermuizen gejaagd. Bij de rij knotwilgen is een jagende Gewone dwergvleermuis en een jagende Ruige dwergvleermuis aangetroffen.
 - Er zijn geen waarnemingen gedaan van de Gewone grootoorvleermuis.
 - Er is een waarschijnlijke Tweekleurige vleermuis over het plangebied gevlogen. Een opname is gemaakt. De vleermuis heeft geen binding met het plangebied.
- Conclusie :
- Een verblijfplaats van de Gewone dwergvleermuis is aangetroffen aan de noordelijke gevel van het woonhuis. De verblijfplaats bevindt zich hier tussen het dakbeschot en de muur. Er is ook in het najaar waarschijnlijk sprake van het gebruik van het woonhuis door Ruige dwergvleermuizen.
- Overig :
- Ten noordwesten van het plangebied is een roepende Steenuil gehoord. In het plangebied zijn geen uilen waargenomen.



BIJLAGE 2. RAPPORTAGE E-DNA GROTE MODDERKRUIPER (DATURA)

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	De Groene Ruimte
Naam opdrachtgever	R. Noordhuis
Rapportnummer	RA2017241
Datum oplevering rapport	18 mei 2017
Aantal pagina's	8
Wijze van citeren	van Bochove K. 2017. eDNA onderzoek naar grote modderkruiper Rapport RA20172, Datura, Wageningen
Laboratorium analist	J. Rook



Datura molecular solutions BV

Gevestigd te:
Johan Buziastraat 55
6708 NR Wageningen
Nederland

Postadres laboratorium:
t.a.v. Jitske Rook
Sylviusweg 72
2333 BE, Leiden
Nederland

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

Vaststellen van de aan- of afwezigheid van eDNA van grote modderkruiper (*Misgurnus fossilis*) in een watersample in opdracht van De Groene Ruimte.

2. Methode

1.1 Sampling

De bemonstering is uitgevoerd door De Groene Ruimte.

1.2 Laboratoriumanalyse

Het eDNA sample is 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 met behulp van de Qiagen Blood & Tissue kit. Door het toevoegen van verschillende buffers wordt het DNA gezuiverd en geconcentreerd. 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 artificieel DNA toegevoegd is. Met name in zuur water, waarin veel organische deeltjes aanwezig zijn kan inhibitie optreden. In een dergelijk geval wordt een extra zuiverings 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. 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.

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 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.

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 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;
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 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.
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 optreed.

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.

1.3.2 Hoe vals negatieve waarnemingen voorkomen worden

Naast vals positieve waarnemingen kunnen ook vals negatieve waarnemingen optreden. Uit diverse **validatie studies** blijkt dat de eDNA detectiekans voor amfibieën en vissen in 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. Maatregelen die genomen worden om vals negatieve waarnemingen te voorkomen:

1. Per sample worden minimaal **25 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

Er is geen eDNA van grote modderkruiper aangetoond (zie tabel 1).

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 kunnen stellen of er sprake is van inhibitie. Er werd geen significante afwijking gevonden in de Cq-waarde van de interne controle, waar een sample aan toegevoegd is ten opzichte van de reacties waar geen sample aan toegevoegd is. Dit wijst er op dat de qPCR reactie niet geïnhibeerd werd.

Samenvattend, de eDNA analyse is met succes uitgevoerd. Er is geen eDNA van grote modderkruiper aangetoond.

Tabel 1. Resultaten van eDNA analyse.

Sample nummer	Aantal positieve reacties grote modderkruiper
2019	0/12