



adviseurs in
ruimtelijke
ontwikkeling

Nader onderzoek Wet natuurbescherming

Westervoort, De Pals 40

Gemeente Westervoort

Datum: 14 november 2023

Projectnummer: 190133.03

INHOUD

1	Inleiding	3
1.1	Aanleiding	3
1.2	Plangebied	3
1.3	Kwaliteitsborging	6
1.4	Definitie product	7
2	Wettelijk kader	8
2.1	Verboden en zorgplicht	8
2.2	Opzetvereiste	9
2.3	Vrijstelling, gedragscodes en ontheffing	9
3	Ecologie van soorten	11
3.1	Kleine marters	11
3.2	Steenmarter	11
3.3	Kamsalamander	11
3.4	Poelkikker	12
3.5	Rugstreeppad	12
4	Onderzoekmethodiek	13
4.1	Kleine marters (bunzing, hermelijn en wezel)	13
4.2	Steenmarter	14
4.3	Kamsalamander	15
4.4	Poelkikker	16
4.5	Rugstreeppad	17
5	Resultaten en effectbeoordeling	18
5.1	Kleine marters (bunzing, hermelijn en wezel)	18
5.2	Steenmarter	19
5.3	Kamsalamander	19
5.4	Poelkikker	19
5.5	Rugstreeppad	20
5.6	Overige soorten	21
6	Conclusie en advies	24
6.1	Ontheffing Wet natuurbescherming nodig?	24
6.2	Ontheffing aanvragen	24
6.3	Preventieve maatregelen rugstreeppad en ringslang	25
6.4	Broedperiode en zorgplicht	26
6.5	Vervolgstappen	26
	Geraadpleegde literatuur	27

Bijlage 1

1 Inleiding

1.1 Aanleiding

Aan De Pals 40 te Westervoort bevindt zich een voormalig agrarisch perceel, dat momenteel in gebruik is als paardenweide. De initiatiefnemer is voornemens acht nieuwbouwwoningen ter plaatse te realiseren. Hiertoe wordt de aanwezige vegetatie verwijderd en de grond bouwrijp gemaakt.

Voor de vaststelling van een nieuw bestemmingsplan is het noodzakelijk dat de haalbaarheid ervan wordt aangetoond. Er dient daarom vanuit de ecologie onderzocht te worden of met de ruimtelijke ontwikkelingen die het plan toestaat sprake is van overtreding van de geldende natuurwet- en regelgeving. In dit kader heeft SAB reeds een quick scan natuur (SAB, 2022) uitgevoerd. Uit deze quick scan blijkt dat op voorhand de aanwezigheid en/of verblijfplaatsen van kleine marters (bunzing, hermelijn en wezel), steenmarter, kamsalamander, poelkikker en rugstreeppad kan worden uitgesloten. Voorliggende rapportage zet de bevindingen van het nader onderzoek naar deze soorten uiteen.

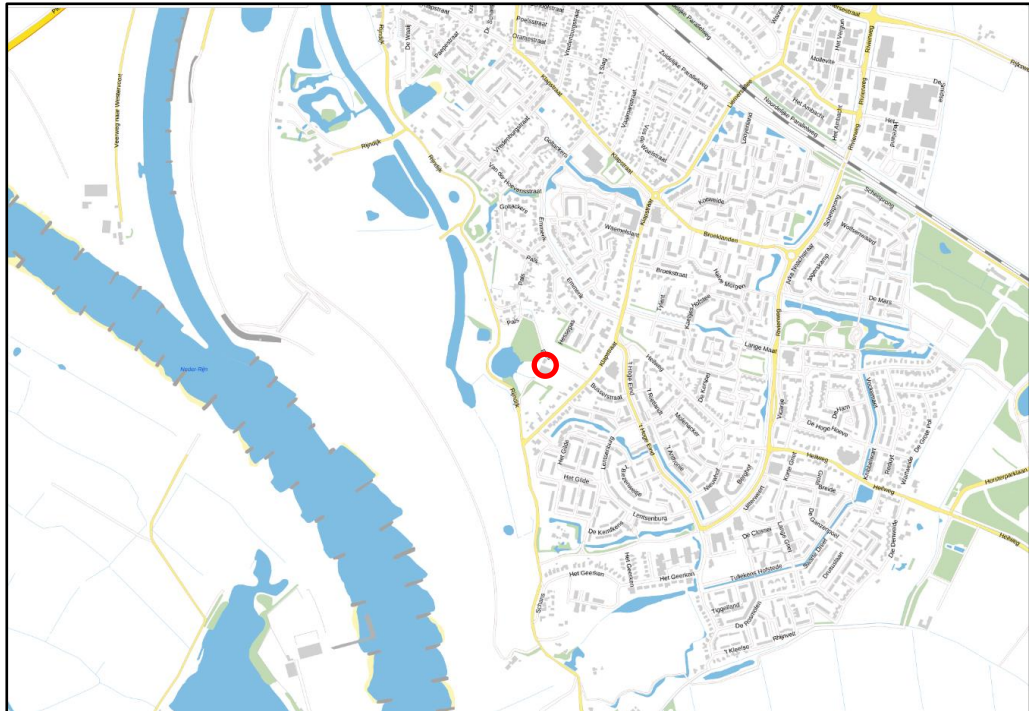
Het doel van het hierna beschreven onderzoek is om de aan- of afwezigheid aan te tonen van voornoemde soorten en om vast te stellen wat de functies van het plangebied en het omliggende terrein voor deze soorten zijn. Uiteindelijk wordt op basis van deze bevindingen een advies uitgebracht over de wettelijke consequenties hiervan en eventuele vervolgstappen die noodzakelijk zijn.

1.2 Plangebied

1.2.1 *Huidige situatie*

Het plangebied bevindt zich binnen de bebouwde kom van Westervoort (gemeente Westervoort, provincie Gelderland). In de bredere omgeving van Westervoort bevinden zich voornamelijk agrarische gronden. Het plangebied bevindt zich ten oosten van de Nederrijn.

De directe omgeving van het plangebied kenmerkt zich door de aanwezigheid van woningen. Ten (noord)westen is een poel en een watergang gelegen. Verder naar het westen bevindt zich de Rijn en haar uiterwaarden. Navolgende afbeeldingen geven de globale ligging van het plangebied weer.



Topografische kaart met de globale ligging van het projectgebied (rood omkaderd). Bron:



Luchtfoto met de globale ligging van het projectgebied (rood omkaderd). Bron: PDOK.

Op 10 mei 2023 zijn door de ontwikkelaar navolgende foto's gemaakt. Deze geven een impressie van het plangebied alsmede de directe omgeving van het plangebied. Het plangebied is in de huidige staat in gebruik als paardenweide. De woning blijft behouden in de huidige staat.



Impressie van het projectgebied op 10 mei 2023 en directe omgeving. Het plangebied is in de huidige situatie in gebruik als paardenweide.

1.2.2 Toekomstige situatie

In de toekomstige situatie zal nieuwbouw in het plangebied zijn gerealiseerd. Dit zal gaan om ongeveer acht woningen. De woningen betreffen een mix van vrijstaande woningen en enkele twee-onder-één-kapwoningen. De kavels worden omzoomd door beukenhagen. Zie navolgende afbeelding voor de toekomstige situatie.

Voor de nieuwbouw wordt de bestaande vegetatie verwijderd en de grond bouwrijp gemaakt. Het woonhuis in het noordwestelijke deel blijft behouden.



Stedenbouwkundig plan De Pals 40 (Bron: Jan Jansen bouwkundig adviseurs).

1.3 Kwaliteitsborging

Kwaliteit van het ecologisch onderzoek en het geleverde product staat bij SAB hoog in het vaandel. Mede daarom zijn wij aangesloten bij het Netwerk Groene Bureaus (NGB); de brancheorganisatie voor groene adviesbureaus. Om te allen tijde aan onze standaard te voldoen, hanteren wij de volgende werkwijze:

- Het onderzoek wordt uitgevoerd conform geldige onderzoeksprotocollen, zoals het vleermuisprotocol (2021), de kennisdocumenten van BIJ12 (2017) en de soortinventarisatieprotocollen van het NGB (2017).
- Het afwijken van de protocollen vindt enkel plaats indien dit ecologisch goed te onderbouwen en te rechtvaardigen is.
- Het onderzoek wordt enkel uitgevoerd door deskundigen op het gebied van de betreffende soorten. Ecologen in opleiding tot deskundige zijn tijdens veldonderzoek altijd onder begeleiding van een deskundige. Onder een ecologisch deskundige verstaan we iemand met aantoonbare ervaring en kennis op het gebied van soortspecifieke ecologie en die voldoet aan één of meerdere van onderstaande punten (www.rvo.nl):
 - 1 Hij/zij heeft een afgeronde hbo- of universitaire opleiding, met als zwaartepunt (Nederlandse) ecologie;
 - 2 Hij/zij heeft een afgeronde mbo-opleiding, met als zwaartepunt de Wet natuurbescherming, soortenherkenning en zorgvuldig handelen ten opzichte van die soorten;
 - 3 Hij/zij is werkzaam voor een ecologisch adviesbureau, zoals een bureau dat is aangesloten bij het Netwerk Groene Bureaus;

- 4 Hij/zij zet zich aantoonbaar actief in op het gebied van de soortenbescherming en is werkzaam of aangesloten bij de volgende Nederlandse organisaties: Zoogdiervereniging, RAVON, Stichting Das en Boom, Vogelbescherming Nederland, Vlinderstichting, Natuurhistorisch Genootschap, KNNV, NJN, IVN, EIS Nederland, FLORON, SOVON, STONE, Staatsbosbeheer, Natuurmonumenten, De Landschappen en Stichting Beheer Natuur en Landelijk gebied;
 - 5 Hij/zij zet zich aantoonbaar actief in op het gebied van de monitoring en/of bescherming van de Nederlandse natuur.
- Nadat het eerste conceptrapport gereed is, beoordeelt een collega het rapport op inhoud en vorm. De auteur verwerkt de geplaatste opmerkingen of bespreekt deze met de beoordelaar om zo tot een eensluidend advies te komen.

1.4 Definitie product

Het product wat in deze rapportage geleverd wordt is een “nader onderzoek beschermde soorten” conform de begrippenlijst van het Netwerk Groene Bureaus (NGB 2020) en omvat daarmee alle eisen die het NGB aan dit product stelt.

2 Wettelijk kader

De bescherming van dier- en plantensoorten is geregeld in de Wet natuurbescherming (wetten.overheid.nl). De artikelen waarin in dit hoofdstuk naar wordt verwezen, komen allen uit deze wet.

2.1 Verboden en zorgplicht

Voor een aantal soorten is door middel van verboden een beschermingsregime opgenomen. Er is een apart beschermingsregime voor vogelrichtlijnsoorten (artikelen 3.1 tot en met 3.4), voor habitatrichtlijnsoorten (artikelen 3.5 tot en met 3.9) en voor andere soorten (artikelen 3.10 en 3.11).

Naast de beschermde dier- en plantensoorten geldt op basis van artikel 1.11 van de Wet natuurbescherming voor al de in het wild levende soorten ook een zorgplicht. Iedereen dient voldoende zorg in acht te nemen voor deze soorten en hun directe leefomgeving. Dit houdt onder meer in dat men negatieve gevolgen voor aanwezige soorten zo veel mogelijk beperkt door het nemen van alle maatregelen die redelijkerwijs kunnen worden verwacht.

2.1.1 *Vogelrichtlijnsoorten*

Voor ruimtelijke ingrepen zijn de volgende verboden relevant, zoals vermeld in artikel 3.1: het is verboden om van nature in Nederland in het wild levende vogels opzettelijk te doden of te vangen, het is verboden opzettelijk nesten, rustplaatsen en eieren van deze soorten te beschadigen of te vernielen of nesten van vogels weg te nemen. Ook is het verboden deze soorten opzettelijk te storen wanneer dit van wezenlijke invloed is op de staat van instandhouding van de soort.

De verboden in de wet zorgen voor een goede bescherming van nesten van alle in het wild levende vogelsoorten tijdens het broedseizoen. Globaal loopt het broedseizoen van half maart tot half augustus, maar ook de nesten van broedende vogels buiten deze periode zijn beschermd. Daarnaast zijn van een aantal vogelsoorten de nesten jaarrond beschermd, dus ook als ze niet als broedlocatie worden gebruikt. Het betreft dan over het algemeen soorten die hun nest het gehele jaar als verblijfplaats gebruiken of soorten die niet of nauwelijks in staat zijn om een eigen nest te bouwen.

2.1.2 *Habitatrichtlijnsoorten*

Voor ruimtelijke ingrepen zijn de volgende verboden relevant, zoals vermeld in artikel 3.5: het is verboden om soorten van de Habitatrichtlijn en van de verdragen van Bonn en Bern, in hun natuurlijke verspreidingsgebied opzettelijk te doden, te vangen of te verstoren, om eieren opzettelijk te vernielen, om voortplantings- of rustplaatsen te beschadigen en om planten van de Habitatrichtlijn en van het verdrag van Bern opzettelijk te onwortelen of te vernielen.

2.1.3 Andere soorten

Naast de Vogelrichtlijnsoorten en de Habitatrichtlijnsoorten worden in de wet nog een aantal andere dier- en plantensoorten beschermd. Voor deze soorten zijn bij ruimtelijke ingrepen de volgende verboden relevant, zoals is weergegeven in artikel 3.10: het is verboden de beschermde diersoorten opzettelijk te doden of te vangen en om de vaste voortplantings- of rustplaatsen te beschadigen en het is verboden om de beschermde plantensoorten opzettelijk te plukken, onwortelen of te vernielen.

2.2 Opzetvereiste

Bij veel van de hierboven genoemde verboden is er sprake van een opzetvereiste. Zo is het verboden om vogelnesten *opzettelijk* te beschadigen. In de wet wordt bij deze opzet uitgegaan van 'voorwaardelijke opzet'. Bij voorwaardelijke opzet is men zich bij het handelen bewust van de mogelijke negatieve consequenties, terwijl men de handeling toch uitvoert (Europese Commissie, 2007). Een voorbeeld van voorwaardelijke opzet is iemand die in het voorjaar een boom omzaagt en daarbij 'per ongeluk' een vogelnest beschadigt. De persoon had niet de opzet dit nest te beschadigen. Maar in de broedtijd van vogels is er wel een aanzienlijke kans dat er in een boom een vogel nestelt. Er kan daarom toch sprake zijn van opzettelijke beschadiging van het nest; voorwaardelijke opzet.

2.3 Vrijstelling, gedragscodes en ontheffing

Provinciale Staten kunnen in een verordening een vrijstelling verlenen van de bovenstaande verboden (artikel 3.10, lid 2). De provincie Gelderland heeft besloten voor een aantal algemeen voorkomende zoogdiersoorten en amfibieën een vrijstelling te verlenen, voor handelingen die men verricht in het kader van ruimtelijke inrichting en ontwikkeling en voor handelingen in het kader van bestendig beheer en onderhoud. Het betreft de soorten aardmuis, bosmuis, dwergmuis, dwergspitsmuis, egel, gewone bosspitsmuis, haas, huisspitsmuis, konijn, ondergrondse woelmuis, ree, rosse woelmuis, tweekleurige bosspitsmuis, veldmuis, vos, woelrat, bruine kikker, gewone pad, kleine watersalamander, meerkikker en middelste groene kikker.

Daarnaast zijn de in paragraaf 2.1.1 beschreven verboden niet van toepassing op handelingen die men uitvoert in het kader van ruimtelijke inrichting of ontwikkeling of bestendig beheer en onderhoud, wanneer men die handelingen uitvoert conform een goedgekeurde gedragscode (artikel 3.31). Gedragscodes kunnen daarbij zowel gebruikt worden voor de omgang met de Vogelrichtlijnsoorten, de Habitatrichtlijnsoorten als de andere beschermde soorten. Wel geldt voor de Vogelrichtlijnsoorten en de Habitatrichtlijnsoorten de aanvullende eis dat de handelingen die men uitvoert een wettelijk belang dienen uit de Vogelrichtlijn en Habitatrichtlijn (artikel 3.31, lid 1 onder d). Het gaat dan onder meer om handelingen in het belang van de volksgezondheid, openbare veiligheid of ter bescherming van flora en fauna.

Tot slot kunnen Gedeputeerde Staten, wanneer er geen andere bevredigende oplossing bestaat, onder bepaalde voorwaarde een ontheffing verlenen van de verboden (artikel 3.8 lid 1 en artikel 3.10 lid 2). Ook hierbij geldt voor vogelrichtlijnsoorten en

habitatrichtlijnsoorten dat aan de handelingen die men verricht een wettelijk belang van de Vogelrichtlijn respectievelijk de Habitatrichtlijn ten grondslag dient te liggen (artikel 3.8 lid 5). Voor de andere beschermde soorten zijn, naast deze wettelijke belangen, ook nog aanvullende belangen geldig (artikel 3.10 lid 2).

3 Ecologie van soorten

3.1 Kleine marters

3.1.1 *Bunzing*

De bunzing heeft een voorkeur voor een kleinschalig landschap met voldoende schuil-mogelijkheden en water in de nabijheid. De soort kan ook voorkomen in een be-bouwde omgeving met veel groen en in open bossen. De bunzing maakt zijn schuil-plaats in oude hopen van konijn, mol, vos en das, maar ook steenhopen, holle bomen en boomwortels worden als schuilplaats gebruikt (Bouwens, 2017).

3.1.2 *Hermelijn*

De hermelijn leeft in een kleinschalig landschap waar voldoende dekking en open wa-ter aanwezig is. De soort mijdt bossen en de bebouwde kom. Als verblijfplaats worden meestal oude mollen of konijnenholen gebruikt, maar de soort kan ook voorkomen in bijvoorbeeld holten in bomen, of houtstapels (Bouwens, 2017). Een gang of hol met een doorsnede van vijf centimeter is al groot genoeg om een hermelijn te huisvesten.

3.1.3 *Wezel*

De wezel is niet gebonden aan een bepaald landschapstype maar heeft een voorkeur voor een kleinschalig (cultuur-) landschap. Een vereiste is wel dat er voldoende dek-king aanwezig is, bijvoorbeeld in de vorm van bosschages, houtstapels of heggen. De soort komt ook wel voor in een groene bebouwde omgeving. De soort mijdt natte ge-bieden. Als verblijfplaats gebruiken ze onder meer houtstapels, oude hopen van mui-zen, ratten en konijnen (Bouwens, 2017).

3.2 Steenmarter

De steenmarter leeft bij voorkeur in een kleinschalig, parkachtig landschap. De soort is met name aanwezig in de nabijheid van dorpen, boerderijen en ook steden. Ele-menten als groenstroken, heggen, bosjes en greppels zijn belangrijk voor het vinden van voedsel en als dekking. Binnen zijn leefgebied heeft de steenmarter vele schuil-plaatsen, zoals boomholtes, takkenhopen, dicht struweel en ruimtes in bebouwing. Hier bewoont de soort bijvoorbeeld zolders, kruipruimtes of ruimtes in de spouw (www.zoogdiervereniging.nl).

3.3 Kamsalamander

De kamsalamander komt voor in kleinschalige landschappen met bossen, heggen en struwelen. Dieren trekken half maart naar het voorplantingsbiotoop dat bestaat uit ma-tig voedselrijke tot voedselrijke stilstaande wateren met een goed ontwikkelde onder-watervegetatie. Een poel mag niet geheel beschaduwd zijn en moet permanent water bevatten. De soort heeft een leefgebied in een straal van 300 tot 500 meter rond het voortplantingswater en overwintert tussen november en februari op vorstvrije locaties

onder takenstapels of stenen. Sommige kamsalamanders blijven gedurende het hele jaar in het water (Creemers & van Delft, 2009; Goverse et al. 2015).

3.4 Poelkikker

De poelkikker leeft vooral in gebieden met zwak zure, oligotrofe, schone, stilstaande wateren (vennen en hoogveenputten) in bos, heide en hoogveen maar ook in graslanden, agrarische kleipolders met kwel, laagveen, uiterwaarden en op ruderaal terrein. De poelkikker wordt slechts zelden aangetroffen bij grote vijvers, meren of stromende wateren. Hij heeft een voorkeur voor onbeschaduwde wateren met een begroeide oeverzone. De larven leven in de bovenste waterlagen en in de snel opwarmende ondiepe oeverzones. In vergelijking met de meerkikker is de poelkikker vaker in kleinere wateren en in voedselarmere situaties te vinden. Buiten de voortplantingstijd kan hij ook worden aangetroffen in weilanden en bossen die op enige afstand van het water liggen.

Poelkikkers zijn typische waterkikkers. Ze zijn zowel 's nachts als overdag actief. 's Nachts zijn ze vaak op het land om voedsel te zoeken. De poelkikker eet alles wat beweegt en kleiner is dan het dier zelf, zoals insecten, wormen en slakken. De larven eten algen, zoöplankton, macrofauna en larven van verwanten en soortgenoten.

Het zijn zon- en warmteminnende dieren. De trek naar de voortplantingswateren start afhankelijk van het weer, wanneer ze uit hun winterslaap komen, tussen half maart en eind april. Als de luchttemperatuur 10 à 12 graden of meer wordt, meestal eind april of begin mei, wordt er gepaard. Het merendeel van de vrouwtjes zet in de tweede helft van mei de eieren af in eiklumpen. Een vrouwtje van de poelkikker zet 600 – 3000 eieren per seizoen af. In twee maanden tijd ontwikkelen de larven zich tot juveniele dieren. De metamorfose wordt tussen half juli en eind september voltooid. In de loop van het volgende jaar worden ze geslachtsrijp en het daaropvolgende jaar nemen ze deel aan de voortplanting. Poelkikkers verlaten vanaf oktober de waterkant en gaan op zoek naar een overwinteringsplaats op het land. Ze graven zich dan in de grond in, of kruipen in muizenholletjes of onder stronken. De overwinteringsplaatsen liggen afhankelijk van het landschapstype binnen de 100 à 200 meter van het water. Het grootste deel van de populatie gaat in winterslaap op het land, incidenteel overwinteren exemplaren in het water (Creemers & van Delft, 2009, Goverse et al. 2015).

3.5 Rugstreeppad

De rugstreeppad is een bewoner van zandige terreinen met een hoge dynamiek zoals duinen, uiterwaarden, opgespoten terreinen, heidevelden en akkers. Ook komt de soort op minder natuurlijke terreinen voor, zoals braakliggende terreinen of bouwlocaties. Deze soort is een echte pionier die zich ingraaft in kaal braakliggend terrein en haar eitjes legt in ondiepe kale poeltjes en plassen, maar ook slootjes en venen kunnen geschikt leefgebied zijn. De dieren verlaten half maart de winterverblijfplaats. Voortplanting begint half april en kan doorgaan tot in augustus. Mannetjes verblijven de gehele voortplantingsperiode in het water. Vrouwtjes daarentegen verlaten na de eierafzet het water weer. De rugstreeppad overwintert op het land, de dieren hebben eind oktober allemaal het water weer verlaten (Creemers & van Delft, 2009).

4 Onderzoeksmethodiek

4.1 Kleine marters (bunzing, hermelijn en wezel)

De aanwezigheid van kleine marterachtigen kan worden vastgesteld door het gebruik van verschillende methoden. In dit geval zijn twee zogenaamde ‘struikrovers’ en één losse cameraval toegepast.

De struikrover is een buis met een Strike force wildcamera van het type HD Pro X, model BTC-5HDPX waarmee kleine marters kunnen worden waargenomen (zoogdiervereniging.nl). Bij de ingang van de buis is een lokmiddel geplaatst; een blikje sardines op olie. De camera is op fotostand gezet, waarbij het drie foto’s per trigger maakt. De struikrovers zijn op een geschikte locatie geplaatst; op een beschutte, afgelegen plek.

Wanneer onderzoek in de actieve periode (maart tot en met augustus) van de dieren wordt gedaan, dan dienen de onderzoeksinstrumenten minimaal 6 weken op de onderzoekslocatie te worden geplaatst (Bouwens 2017).

Er zijn 2 struikrovers op 14 juni 2023 geplaatst en zes weken later, op 26 juli 2023 augustus 2023 weer opgehaald. De locaties van de struikrovers zijn:

- Struikrover roze: In het zuidenwesten van het plangebied in bosschage.
- Struikrover violet: In het zuiden van het plangebied, ten midden van de bosschage.

Daarnaast is er één losse cameraval gebruikt voor dit onderzoek. Voor het cameravalonderzoek zijn Bushnell cameravallen van het type Trophy Cam HD Brown, Model 119874 gebruikt. Deze werd aan een boom opgehangen, waarbij deze op een plek werd gericht die potentieel geschikt kan zijn voor de aanwezigheid van marterachtigen. De cameraval maakte drie foto’s achter elkaar per trigger. Deze is geplaatst op 26 juli 2023 en heeft zes weken in de actieve periode gestaan. De cameraval is opgehaald op 6 september 2023. De locatie van de losse camera is:

- Cameraval lila: Ten noordwesten van het plangebied, naast de oprit van de woning.

Zie navolgende afbeelding voor de locaties van de struikrovers en losse cameraval. De aanwezigheid van kleine marters in het plangebied kan uitgesloten worden als geen waarnemingen zijn gedaan door middel van cameravalonderzoek (struikrovers en losse cameraval).



In het plangebied zijn twee struikrovers in het zuiden (driehoek roze en violet) en één losse cameraval ten noordwesten van het plangebied (pentagoon lila) aanwezig geweest.

4.2 Steenmarter

Het onderzoek naar de steenmarter is niet aan bepaalde protocollen of onderzoeksvoorwaarden gebonden. De steenmarter is het gehele jaar actief en daarom kan onderzoek naar de soort het gehele jaar uitgevoerd worden.

Uit de quick scan natuur (SAB, 2022) werd benoemd dat in de opgaande begroeiing aan de randen van het plangebied mogelijk functioneel leefgebied van de steenmarter aanwezig was. Derhalve is hier sporenonderzoek uitgevoerd. Steenmarters laten herkenbare vraatsporen, uitwerpselen en loopsporen achter. Vraatsporen die steenmarters kunnen achterlaten zijn bijvoorbeeld: leeggegeten eieren, leeggegeten huiden van kleine zoogdieren, afgebeten veren of afgebeten koppen. Uitwerpselen van de steenmarter zijn 8-10 centimeter lang, 10-12 mm dik en in een punt uitlopend. Vaak zijn ook resten van vruchten in de uitwerpselen te zien. In de omgeving van een verblijfplaats worden uitwerpselen vaak op dezelfde plek gedeponeerd, een zogenaamde latrine. Hierdoor zijn de uitwerpselen ook makkelijk herkenbaar als steenmarteruitwerpselen. Loopsporen van steenmarter zijn makkelijk te verwarren met die van de op de steenmarter lijkende boommarter. De pootafdrukken zijn 30-40 mm breed en 30-35 mm lang aan de voorvoet. Afdrukken van de achtervoet zijn 43 breed en 35 mm lang. De vindplaats kan uitsluitsel bieden of het een loopspoor van een steenmarter of een boommarter betreft (Diepenbeek, 1999).

Het veldbezoek waarbij gezocht werd naar sporen ter hoogte van opgaande begroeiing aan de randen van het plangebied zijn gecombineerd met het plaatsen van de struikrovers:

-14 juni 2023, 14:00 – 15:00 uur

Daarnaast is in het gehele plangebied onderzoek naar de aanwezigheid van de steenmarter gecombineerd met het onderzoek naar kleine marterachtigen, namelijk cameravallen en 'struikrovers'.

De aanwezigheid van de steenmarter in het plangebied kan uitgesloten worden als met het veldbezoek geen sporen zijn aangetoond en/of geen waarnemingen zijn gedaan door middel van cameravalonderzoek (struikrovers en losse cameraval).

4.3 Kamsalamander

4.3.1 Onderzoeklocaties

Voor de kamsalamander is geen geschikt voortplantingswater in het plangebied aanwezig. Echter uit de quick scan natuur (SAB, 2022) blijkt dat in de omgeving wel waterlichamen aanwezig zijn die potentieel geschikt zijn als voortplantingswater voor de kamsalamander. Derhalve is onderzocht waar zich poelen en/of watergangen in de omgeving bevinden die geschikt zijn als voortplantingswater voor de kamsalamander. Ook is gekeken of deze dicht genoeg bij het plangebied liggen waardoor de kamsalamander het plangebied als overwinteringshabitat kan gebruiken. De afstand die de kamsalamander tussen voortplantingswater en overwinteringsgebied aflegt bedraagt maximaal 100 tot enkele honderden meters (BIJ12, 2017i). Tenslotte is beoordeeld of tussen de waterlichamen en het plangebied onoverkomelijke barrières aanwezig zijn, zoals verharde wegen, open weilanden en akkers en veel bebouwing. Op basis van deze beoordeling zijn er drie waterlichamen onderzocht, namelijk twee (geïsoleerde) poelen en één watergang in de omgeving.

4.3.2 Methode

Om de aan- of afwezigheid van deze soort te bepalen is gebruik gemaakt van eDNA-onderzoek. In totaal zijn drie monsters genomen; één monster per waterlichaam (poel of watergang). De monsternamen hebben plaatsgevonden conform het eDNA filter samplingprotocol van Datura (www.datura.nl). Hierbij worden per monster 28 submonsters van het water genomen waarna het water gefilterd wordt en het filter in pipetjes met conserverende vloeistof wordt gestopt. Datura onderzoekt vervolgens de monsters middels soortspecifieke DNA-analyse of DNA aanwezig is van de kamsalamander. De monsternamen hebben plaatsgevonden op 11 juli 2023.

Volgens het sampleprotocol dient langs een traject van tussen de 50 en 200 meter gesampled te worden. Echter was dit bij de gesampledde waterlichamen niet haalbaar. Bij de grotere poel was namelijk de kade slechts op één plek toegankelijk, wegens begroeiing of een te hoog/stijl talud. Dit bleek echter wel het meest geschikte deel van de poel door de aanwezigheid van onderwatervegetatie. Met name met het oog op aanwezigheid van (grote) vissen in de grote poel, is hier de kans op predatie het laagst. Hier is een traject van circa 35 meter gesampled. De kleinere poel was door grote wilgen beschaduwd, tevens was er weinig onderwatervegetatie aanwezig. Bij deze poel was ook enkel de westzijde toegankelijk en is hier een traject van 35 – 50 m gesampled. Bij de watergang is tevens langs een traject van circa 35 meter

gesampled, aangezien de rest van de oever niet geschikt was (te stijl talud) en/of niet toegankelijk wegens vegetatie of hekwerk/perceelgrenzen. Tevens is wel het meest geschikte deel van de oever gesampled op basis van de aanwezigheid van onderwatervegetatie. Op basis van het samplen van de meest geschikte delen van de waterlichamen en het nemen van voldoende subsamples kan gesteld worden dat de samples representatief zijn voor het aantonen van de aan- of afwezigheid van de kamsalamander.



Waterlichamen in de omgeving onderzocht op aanwezigheid kamsalamander. Het betreft de twee poelen en één watergang (aangegeven in blauw). In geel zijn de sample-locaties per waterlichaam aangegeven.

4.4 Poelkikker

Het nader onderzoek naar het leefgebied van de poelkikker is uitgevoerd conform het kennisdocument van de poelkikker (BIJ12, 2017e). Er hebben twee veldbezoeken plaatsgevonden om te luisteren naar kooractiviteit van de poelkikker in de periode mei tot en met juni. Hierbij zijn de waterlichamen in de directe omgeving van het plangebied onderzocht, namelijk de watergang ten westen en de twee poelen zoals aangegeven in voorgaande afbeelding. Tijdens de veldbezoeken is geluisterd naar kooractiviteit van de poelkikker in het plangebied. Voor de poelkikker geldt dat dit één van de groene kikkers is. Deze soorten zijn moeilijk van elkaar te onderscheiden en kunnen deels met elkaar voortplanten. De veldbezoeken waarbij geluisterd is naar kooractiviteit zijn uitgevoerd op:

- 10 mei 2023, 22:30 – 23:50 uur
- 31 mei 2023, 22:50 – 23:50 uur

4.5 Rugstreeppad

Het nader onderzoek naar het leefgebied van de rugstreeppad dient plaats te vinden volgens bepaalde richtlijnen zoals verwoord in het Kennisdocument van de Rugstreeppad (BIJ12, 2017). Het vaststellen van aanwezigheid van deze soort kan op drie verschillende manieren, het vaststellen van kooractiviteit, het vaststellen van ei-snoeren en/of larven en het aantonen van exemplaren door zichtwaarneming. Omdat het aantonen van exemplaren een zeer arbeidsintensieve methode is, heeft het aantonen van voortplanting door kooractiviteit of ei-snoeren de voorkeur.

Kooractiviteit vindt tussen de tweede helft van april en in juli plaats. De meeste kooractiviteit vindt plaats tussen half april en mei. In deze periode moeten er bij geschikte weersomstandigheden (warme, windstille avonden en nachten, vaak na zware regenval) minimaal twee avonden worden geluisterd, bij voorkeur moeten deze avonden gespreid over de periode plaatsvinden, één aan het begin en één aan het einde van de periode. Om aanwezigheid uit te sluiten moet midden juli nogmaals bij geschikte weersomstandigheden geluisterd worden. Hierbij zijn de waterlichamen in de directe omgeving van het plangebied onderzocht, namelijk de watergang ten westen en de twee poelen zoals aangegeven in voorgaande afbeelding.

De veldbezoeken waarbij geluisterd is naar kooractiviteit zijn uitgevoerd op:

- 10 mei 2023, 22:30 – 23:50 uur
- 31 mei 2023, 22:50 – 23:50 uur
- 18 juli 2023, 21:50 – 22:50 uur

5 Resultaten en effectbeoordeling

5.1 Kleine marters (bunzing, hermelijn en wezel)

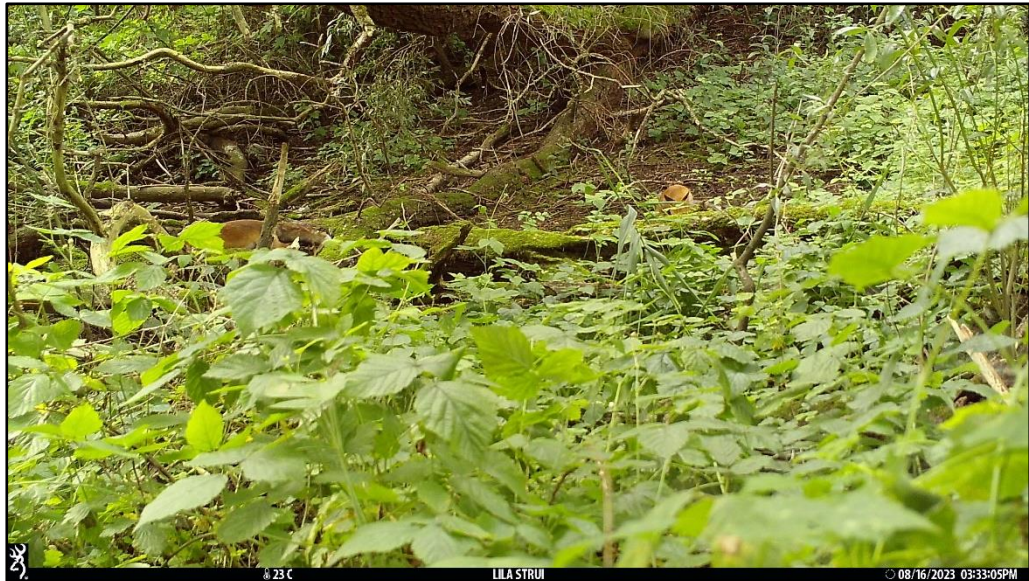
Op geen van de struikrovers of losse camera zijn kleine marters geregistreerd. Daarnaast is wel een andere beschermde soort, namelijk ringslang vastgelegd, zie hiervoor paragraaf 5.6.2. Tevens zijn algemene soorten waargenomen, zoals ware muizen, maar ook vrijgestelde soorten als vos en egel. Zie hiervoor navolgende afbeeldingen.



Bosmuis waargenomen door struikrover violet op 15 juni 2023 om 03:54.



Egel waargenomen door struikrover roze op 15 juni 2023 om 04:25.



Twee vossen waargenomen op cameraval lila op 16 augustus 2023 om 15:33

Al met al kan met de toepassing van beide methoden gesteld worden dat kleine marters (bunzing, hermelijn, wezel) niet in het plangebied aanwezig zijn. Deze soorten ondervinden derhalve geen negatief effect met de geplande ruimtelijke ontwikkeling.

5.2 Steenmarter

Met het uitgevoerde onderzoek zijn geen aanwijzingen gevonden voor de aanwezigheid van de steenmarter. Er zijn geen sporen aangetroffen. Ook zijn op de cameravalen geen steenmarters gefotografeerd. Tenslotte zijn ook geen zichtwaarnemingen van de steenmarter gedaan. We kunnen derhalve stellen dat in ieder geval geen essentiële elementen, zoals voortplantingsplaatsen, in en direct rond het plangebied aanwezig zijn. Mogelijk maakt de steenmarter wel incidenteel gebruik van de boschage direct naast het plangebied, maar er kan gesteld worden dat er geen essentieel leefgebied van de steenmarter verloren gaat bij de voorgenomen plannen. Deze soort ondervindt derhalve geen negatief effect met de geplande ruimtelijke ontwikkeling.

5.3 Kamsalamander

Uit de eDNA-monsters blijkt dat geen DNA van de kamsalamander in de bemonsterde poelen en watergang aanwezig is. Daarom kan gesteld worden dat er geen landhabitat van de kamsalamander in het plangebied aanwezig is en het plangebied ook niet als leefgebied gebruikt worden. Deze soort ondervindt derhalve geen negatief effect met de geplande ruimtelijke ontwikkeling. Zie rapportage van Datura (Kool, L. & Rook, J., 2023) in de bijlage.

5.4 Poelkikker

Tijdens de veldbezoeken voor de poelkikker werd nooit kooractiviteit van de poelkikker waargenomen. Wel werden elke avond roepende bastaardkikkers en/of

rugstreeppadden waargenomen. Ook sprongen regelmatig kikkers van de oever de sloot in. Vanwege het ontbreken van roepende poelkikkers, kan ervan uitgegaan worden dat geen voortplanting van poelkikkers in deze wateren plaatsvindt. Derhalve kan aanwezigheid van landhabitat van de poelkikker in het plangebied uitgesloten worden. Het is daarom ook uitgesloten dat essentieel leefgebied van de poelkikker verloren gaat bij de voorgenomen plannen. Deze soort ondervindt derhalve geen negatief effect met de geplande ruimtelijke ontwikkeling.

5.5 Rugstreeppad

5.5.1 Resultaten

Bij de drie veldbezoeken zijn rugstreeppadden waargenomen door middel van koorzang. Bij de watergang het meest ten westen van het plangebied is een groep rugstreeppadden van circa 10-20 dieren waargenomen. Daarnaast is er een overreden rugstreeppad waargenomen op de naastliggende Ringdijk. Dit wijst erop dat voortplantingsplaatsen van rugstreeppadden aanwezig zijn in de watergang circa 200 meter ten westen van het plangebied. Tevens wordt opgemerkt dat bij aanvang van de veldbezoeken ten behoeven van het nader onderzoek is geconstateerd dat het plangebied in andere staat verkeerde dan ten tijde van het veldbezoek van de quick scan natuur (SAB, 2022). Er was namelijk geen sprake meer van braakliggend terrein en enkel van paardenweide in het plangebied.

5.5.2 Effectenbeoordeling

De rugstreeppad is aanwezig in de buurt van het plangebied. Tijdens het onderzoek is echter geen directe relatie met het plangebied vastgesteld. Gezien de huidige staat en gebruik van het plangebied, namelijk paardenweide, zijn er momenteel geen geschikte elementen aanwezig voor de rugstreeppad. Er is namelijk geen zanderig/braakliggend terrein aanwezig en/of sprake van ondiepe poelen in het plangebied. Gezien de nabijheid van voortplantingswater en de afstand die de rugstreeppad kan afleggen (enkele kilometers), kan deze soort het plangebied echter wel bereiken. Volgens het Kennisdocument Rugstreeppad (2017) kunnen juveniele individuen gedurende dispersie (juni tot en in oktober) tot wel 5 kilometer afleggen. Daarnaast kan de rugstreeppad bij migratie van voortplantingswater naar landhabitat eind oktober tot enkele honderden meters afleggen. Als bij de ontwikkeling van het plangebied het terrein braakliggend zal worden, kan de rugstreeppad derhalve in een later stadium van het plangebied gebruik maken. De rugstreeppad is namelijk een pioniersoort die al binnen enkele dagen of weken nieuw gebied kan koloniseren. De kans op aanwezigheid van individuen van deze beschermde amfibiesoort in het plangebied is op dit moment uitgesloten. Met de geplande ruimtelijke ontwikkeling kan echter zonder preventieve maatregelen sprake zijn van het doden of verwonden van individuen van deze soort.

5.6 Overige soorten

5.6.1 Gierzwaluw

5.6.1.1 Resultaten

Bij het plaatsen van de struikrovers ten behoeven van het nader onderzoek van de kleine marters, werden sporen van de gierzwaluw aangetroffen in de noordelijk geö-rienteerde daknok, zie navolgende afbeelding. Ten tijden van de quick scan natuur (SAB, 2022), waren dergelijke sporen nog niet aanwezig. Echter werd ook opgemerkt dat de daknok mogelijk geschikt was als nestlocatie voor de gierzwaluw.



Sporen van gierzwaluw in daknok, duidend op een mogelijke nestplaats

5.6.1.2 Effectenbeoordeling

Gezien de oriëntatie van de woning naar de straatzijde en dat de woning behouden zal blijven in het planvoornemen, worden er geen negatieve effecten verwacht op de gierzwaluw door de ontwikkeling. Derhalve is een overtreding van de Wet natuurbescherming ten aanzien van de gierzwaluw uitgesloten.

5.6.2 Ringslang

5.6.2.1 Resultaten

Gedurende het onderzoek ten behoeve van de kleine marters, zijn meerdere waarnemingen gedaan van de ringslang door de struikrovers, zie navolgende afbeelding. In totaal zijn er vier waarnemingen gedaan door beiden struikrovers gelegen in het struweel ten zuiden van het plangebied:

Struikrover violet:

- 30 juni 2023 om 05:56 uur

Struikrover roze:

- 11 juli 2023 om 09:46 uur
- 18 juli 2023 om 12:22 uur
- 18 juli 2023 om 13:41 uur



Ringslang waargenomen door struikrover violet op 30 juni 2023 om 05:56.



Ringslang waargenomen door struikrover roze op 11 juli om 09:46.

5.6.2.2 Effectenbeoordeling

De kans op aanwezigheid van individuen van deze beschermde reptielensoort in het plangebied is klein, maar kan niet op voorhand uitgesloten worden. De ringslang is gebonden aan waterrijke habitats, zoals ten westen van het plangebied. Gezien de huidige staat en gebruik van het plangebied, namelijk paardenweide, zijn er momenteel geen geschikte elementen aanwezig voor de ringslang. Echter is aangetoond dat de ringslang incidenteel van het aangrenzende struweel gebruik maakt. Met de geplande ruimtelijke ontwikkeling kan derhalve zonder maatregelen sprake zijn van het doden of verwonden van individuen van deze soort.

6 Conclusie en advies

6.1 Ontheffing Wet natuurbescherming nodig?

In het plangebied is onderzoek verricht naar de aanwezigheid van essentiële elementen van kleine marters (bunzing, hermelijn, wezel), steenmarter, kamsalamander, poelkikker en rugstreeppad. Daarnaast zijn er waarnemingen gedaan van de gierzwaluw en ringslang.

Kleine marters (bunzing, hermelijn en wezel), steenmarter, kamsalamander en poelkikker zijn tijdens het onderzoek niet vastgesteld in het plangebied en daarvan zijn dan ook geen essentiële elementen in het plangebied aanwezig. Daarom is met de geplande ruimtelijke ontwikkeling geen negatief effect op deze soorten te verwachten. Van een overtreding van verbodsbepalingen van de Wet natuurbescherming is dan ook geen sprake. Voor deze soorten is derhalve een ontheffing Wet natuurbescherming niet nodig.

De gierzwaluw is in de directe omgeving van het plangebied aanwezig, maar met de geplande ruimtelijke ontwikkeling is geen negatief effect te verwachten op deze soort. Omdat geen negatief effect te verwachten is, kan gesteld worden dat geen sprake van een overtreding van verbodsbepalingen zal zijn met de geplande ruimtelijke ontwikkeling. Voor deze soorten is derhalve een ontheffing Wet natuurbescherming niet nodig.

De rugstreeppad en ringslang zijn in de nabijheid van het plangebied waargenomen. In de huidige staat van het plangebied, namelijk als paardenweide, zijn geen essentiële elementen voor deze soorten aanwezig. Gezien de nabijheid van waargenomen individuen kan incidenteel voorkomen in het plangebied niet op voorhand worden uitgesloten. Echter, met simpele maatregelen in de aanlegfase (zie paragraaf 6.3), is met de geplande ruimtelijke ontwikkeling geen negatief effect te verwachten. Er zal in dat geval geen overtreding van verbodsbepalingen plaatsvinden. Een ontheffing Wet natuurbescherming is dan niet nodig. Indien deze maatregelen niet (voldoende) getroffen worden, is wel een reële kans op negatieve effecten op de betreffende soorten. In dat geval is sprake van een overtreding van de Wet natuurbescherming. Om de geplande werkzaamheden dan toch door te kunnen laten gaan, zijn mitigerende maatregelen noodzakelijk, en is mogelijk een ontheffing Wet natuurbescherming noodzakelijk.

Daarnaast dient te allen tijde rekening gehouden te worden met broedende vogels en de zorgplicht.

6.2 Ontheffing aanvragen

Het uitvoeren van ruimtelijke ingrepen waarbij beschermde soorten worden verstoord is wettelijk gezien mogelijk als men in het bezit is van een ontheffing Wet natuurbescherming. Een dergelijke ontheffing dient voor dit project aangevraagd te worden bij de provincie Gelderland (indien van toepassing).

Bij het indienen van een aanvraag ontheffing Wet natuurbescherming dient een projectplan te worden opgesteld. In dit plan wordt onder andere de verspreiding van de betreffende beschermde soort in het plangebied verwoord alsmede het (wettelijk) belang van de ingreep onderbouwd. Daarnaast dient een uitgebreide alternatievenafweging plaats te vinden over waarom de verstoring van vaste rust- en verblijfplaatsen niet is te voorkomen.

Een ontheffing wordt enkel verleend als voldoende mitigerende maatregelen worden getroffen om zoveel mogelijk schade aan de aanwezige beschermde soorten en elementen te voorkomen. Daarnaast dient te allen tijde rekening gehouden te worden met alle broedende vogels en de zorgplicht.

6.3 Preventieve maatregelen rugstreepad en ringslang

De rugstreepad komt voor in de uiterwaarden ten westen van het plangebied en er zijn waarnemingen gedaan van de ringslang in het struweel naast het plangebied. In de huidige staat van het plangebied, namelijk als paardenweide, zijn geen essentiële elementen voor deze soorten aanwezig en kan het voorkomen van deze soorten worden uitgesloten. Echter kan gezien de nabijheid van waargenomen individuen incidenteel voorkomen in het plangebied niet op voorhand worden uitgesloten in een later stadium. Om het schaden of doden van de rugstreepad en ringslang gedurende de werkzaamheden te voorkomen, dient voorkomen te worden dat de rugstreepad en ringslang het plangebied kunnen betreden. Derhalve dient door een deskundig ecologisch bedrijf (ruim) voor aanvang van de werkzaamheden reptielen- en amfibieën-schermen geplaatst te worden rondom het plangebied. Het reptielen- en amfibieën-scherm dient ten minste te voldoen aan de omschrijving van het kennisdocument rugstreepad (BIJ12, 2017). Hierin staan maatregelen beschreven om invulling te geven aan de zorgplicht/zorgvuldig handelen om het werkgebied ontoegankelijk te maken voor de rugstreepad. De schermen dienen van stevig plastic of worteldoek van minimaal 50 centimeter hoog te zijn. Deze dienen minimaal 10 centimeter ingegraven in de grond te worden. Er is geen documentatie van dergelijke vereisten voor een reptielenscherm ten behoeve van de ringslang. Echter is aangetoond uit onderzoek door stichting RAVON naar de effectiviteit van rasters (reptielen- en amfibieënschermen) dat lage rasters (0,4 meter) kunnen worden beklommen door grotere ringslangen (Struijk, R.P.J.H., 2010). Derhalve dient in overleg met een deskundige op het gebied van ringslangen ontwerp en aanleg van het reptielen- en amfibieënscherm te worden uitgevoerd. Aangezien geconstateerd is dat zowel de ringslang als rugstreepad geen gebruik maken van het plangebied in de winterrustperiode, dienen de schermen in deze periode geplaatst te worden. Voor de rugstreepad is de winterrustperiode van medio oktober tot en met maart en voor de ringslang van november tot en met februari. Daarom geldt dat de schermen gerealiseerd dienen te worden in de overlappende periode van november tot en met februari. Wanneer de schermen gerealiseerd zijn, dienen deze regelmatig op kieren en op overhangende vegetatie gecontroleerd te worden. De voorzieningen die getroffen zijn om het gebied ontoegankelijk te maken moeten zodanig beheerd worden dat ze hun functie te allen tijden kunnen vervullen. De reptielen- en amfibieënschermen dienen weer verwijderd worden, wanneer alle werkzaamheden gereed zijn.

6.4 Broedperiode en zorgplicht

De zorgplicht van de Wet natuurbescherming is altijd van toepassing. Iedereen moet voldoende zorg in acht nemen voor alle in het wild levende dieren, planten en hun leefomgeving. Dit kan bijvoorbeeld door de werkzaamheden te verrichten buiten kwetsbare periodes (het voortplantings- en winterslaapseizoen). Ook kan er gefaseerd worden gewerkt om dieren de kans te geven om te vluchten.

Broedende vogels, vanaf het bouwen van het nest tot het uitvliegen van de jongen, zijn strikt beschermd. De broedende vogels en hun jongen mogen niet verstoord, verwond en gedood worden. Daarnaast mogen in gebruik zijnde nesten ook niet beschadigd en vernield worden. Zonder maatregelen kan dit bij ruimtelijke ingrepen wel gebeuren. Er is echter voor ruimtelijke ontwikkelingen geen vrijstelling hiervoor te verkrijgen in het kader van de Wet natuurbescherming. Wij adviseren daarom om de werkzaamheden buiten de broedperiode te starten, zodat er vanwege de dan aanwezige verstoring geen vogels in de buurt gaan broeden. De werkzaamheden kunnen dan vervolgens wel in de broedperiode doorlopen.

6.5 Vervolgstappen

- Pas de mitigerende maatregelen uit paragraaf 6.3. toe om overtreding van verbodsbepalingen te voorkomen;
- Indien aan deze maatregelen niet (volledig) kan worden voldaan moet door een deskundig ecooloog beoordeeld worden of alsnog een ontheffing Wet natuurbescherming nodig is;
- Houd rekening met broedende vogels;
- Houd rekening met de zorgplicht.

Geraadpleegde literatuur

BIJ12, 2017. Kennisdocument Gierzwaluw *Apus apus*, versie 1.0, juli 2017. BIJ12, Utrecht.

BIJ12, 2017. Kennisdocument Rugstreeppad *Bufo calamita*, versie 1.0, juli 2017. BIJ12, Utrecht.

Bouwens, 2017. Handreiking Kleine Marters in relatie tot soortbescherming. Provincie Noord-Brabant, 's-Hertogenbosch.

Datura Molecular Solutions BV, 2023. Kool, L & Rook, J. eDNA Rapport eDNA onderzoek kamsalamander RA 23143. 31 juli 2023, Wageningen.

Ministerie EZLI. 2012. Memorie van toelichting bij Wet natuurbescherming. Kamerstuk.

Ministerie EZ. 2015. Memorie van antwoord bij Wet natuurbescherming. Kamerstuk Eerste Kamer der Staten-Generaal.

Netwerk Groene Bureaus, 2017. Soortinventarisatieprotocollen in het kader van de Wet natuurbescherming (versie juli 2017). Netwerk Groene Bureaus, Odijk.

Netwerk Groene Bureaus, Definitielijst Netwerk Groene Bureaus 2020, 16 januari 2020.

SAB, 2022. Quick scan natuur. Westervoort, Pals 40. SAB, Arnhem.

Struijk, R.P.J.H., 2010. Rasters voor reptielen: een verkennende studie. Stichting RAVON, Nijmegen.

Websites:

www.bij12.nl

www.ndff.nl

www.rijksoverheid.nl

www.sovon.nl

www.vleermuizenindestad.nl

www.vogelbescherming.nl

www.wetten.nl

www.zoogdiervereniging.nl

Bijlage 1



eDNA onderzoek kamsalamander



In opdracht van SAB

Colofon

Titel	eDNA onderzoek kamsalamander
Tekst, foto's en samenstelling	Lindy Kool, Jitske Rook
In opdracht van	SAB
Naam opdrachtgever	René van Gestel
Kenmerk opdrachtgever	190133.03
Rapportnummer	RA23143
Datum opstelling	31 juli 2023
Aantal pagina's	7
Contactpersoon vanuit Datura	Lindy Kool
Wijze van citeren	Kool, L. & Rook, J. 2023 eDNA. Rapport eDNA onderzoek kamsalamander RA23143, Datura Molecular Solutions BV, Wageningen



Datura Molecular Solutions BV

Gevestigd te:
Agro Business Park 10
6708 PW Wageningen
Nederland

+31(0)643288093
www.datura.nl
suzan.wellens@datura.nl

Inhoudsopgave

1. Doelstelling	4
2. Methode	4
2.1 Bemonstering	4
2.2 Laboratoriumanalyse	4
2.3 Kwaliteitswaarborging	5
2.3.1 Hoe fout positieve waarnemingen worden voorkomen	5
2.3.2 Hoe fout negatieve waarnemingen worden voorkomen (qPCR)	6
3. Resultaten	7

1. Doelstelling

De doelstelling van dit onderzoek is het aantonen van de aan- of afwezigheid van kamsalamander (*Triturus cristatus*) aan de hand van (e)DNA onderzoek. Hiervoor is gebruik gemaakt van eDNA watermonsters. Dit onderzoek is uitgevoerd in opdracht van SAB.

2. Methode

2.1 Bemonstering

De bemonstering is uitgevoerd door een medewerker van SAB volgens gestandaardiseerde protocollen van Datura (opvraagbaar). Er zijn drie watermonsters verzameld en aangeleverd aan het laboratorium van Datura (Tabel 1). De bemonsteringen zijn uitgevoerd op 11 juli 2023.

Tabel 1: monsterinformatie; Westervoort, De Pals 40

Monsternummer	Type	Locatie
2008548	Water	grot poel (2-0)
2008564	Water	lange watergang voorzijde
2008565	Water	kleine poel voorzijde

2.2 Laboratoriumanalyse

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

1. Het eDNA in de watermonsters is geëxtraheerd middels een chloroform-phenol extractie. Storende stoffen als humuszuren kunnen detectie van het eDNA inhiberen wat kan leiden tot fout negatief resultaat. Gedurende de extracties zijn deze inhiberende stoffen zo veel mogelijk verwijderd.
2. Er wordt altijd een controle uitgevoerd om na te gaan of eDNA detectie in een monster geïnhibeed wordt. Dit wordt gedaan door een bekende hoeveelheid van een fragment artificieel DNA toe te voegen. Vervolgens wordt de concentratie gemeten van dit fragment artificieel DNA. Dit wordt zowel gedaan in een reactie waar een hoeveelheid monster aan toegevoegd wordt, als in een reactie waar geen monster aan toegevoegd wordt. Als DNA detectie in een monster geïnhibeed wordt, dan is de gemeten concentratie artificieel DNA in de reactie waarin monster toegevoegd wordt lager ten opzichte van de reactie waaraan geen monster aan toegevoegd is. Met name in zuur water, waarin veel organische deeltjes aanwezig zijn kan inhibitie optreden. In een dergelijk geval wordt een extra zuivering stap uitgevoerd of wordt het monster 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 hechten aan DNA van de doelsoort

en dit vervolgens vermenigvuldigen. Datura werkt bovendien met 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 resulteert in 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. Daardoor kan zeer gevoelig gedetecteerd worden. De qPCR detectie wordt uitgevoerd met behulp van de TaqMan® Environmental Mastermix 2.0 (Life Technologies®). Naast het eDNA monster worden PCR reacties uitgevoerd waaraan geen monster 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 fout positieve waarnemingen worden voorkomen

Het optreden van zowel fout positieve als fout negatieve waarnemingen wordt tot het minimum beperkt. Fout 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 fout positieve waarnemingen voorkomen worden. Omdat de kans op fout positieve waarnemingen zeer klein is, kunnen we niet exact kwantificeren hoe groot de kans daadwerkelijk is. Datura kan daarom niet 100% zeker garanderen dat fout positieve waarnemingen nooit optreden. In de praktijk (middels validatie studies) nemen we echter geen fout positieve waarnemingen waar. Het is daarom aannemelijk dat fout positieve waarnemingen vrijwel niet optreden.

Het voorkomen van fout positieve waarnemingen door het ontwerp en validatie van specifieke primers en probes (bij qPCR):

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 diverse andere (verwante) soorten;
5. Vervolgens is de methode gevalideerd door het testen van veldmonsters. Er zijn eDNA monsters verzameld op locaties waar de doelsoort niet voorkomt. Er werd geen eDNA gedetecteerd in deze monsters. Zodoende kon aangetoond worden dat de methode niet resulteert in positieve detectie als de doelsoort niet aanwezig is.

Om fout 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 monster kits en het voorbereiden van de qPCR reagentia vindt plaats in een DNA clean room. Dit is een ruimte waarin geen DNA monsters aanwezig zijn. Zodoende kunnen we garanderen dat er geen DNA aanwezig is in de eDNA monster kits en de reagentia (zoals de primers en probes) die later gebruikt worden in de eDNA analyses. Het extraheren van de eDNA monsters gebeurt in een eDNA laboratorium. Dit is een ruimte waarin uitsluitend lage concentraties DNA aanwezig zijn. Vervolgens worden hier de eDNA monsters 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 eDNA 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 eDNA laboratorium. Ook medewerkers van Datura mogen niet dezelfde dag van een post-PCR laboratorium terug naar een ruimte waarin weinig DNA aanwezig is.
3. In iedere analyse worden controle analyses uitgevoerd. Zo worden er monsters geëxtraheerd waaraan DNase free water is 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:

Het bemonsteringsprotocol 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.

2.3.2 Hoe fout negatieve waarnemingen worden voorkomen (qPCR)

Naast fout positieve waarnemingen kunnen ook fout negatieve waarnemingen optreden. Er is dus altijd een kleine kans dat eDNA niet gedetecteerd wordt, ook al is de doelsoort wel aanwezig. Door meerdere monsters te nemen kan de kans op fout negatieve waarnemingen aanzienlijk verkleind worden. Maatregelen die genomen worden om fout negatieve waarnemingen te voorkomen:

1. Per monster worden meerdere submonsters verzameld. Hiermee wordt de kans vergroot dat eDNA in het monster terecht komt.
2. Een zeer gevoelige qPCR detectie in eDNA water- en bodemonsters 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 monster wordt vastgesteld of de qPCR detectie geïnhibeeerd wordt door storende stoffen. Indien dit het geval is wordt er een extra zuiveringstap uitgevoerd. Vervolgens wordt nogmaals getest of de inhiberende stoffen nog invloed hebben en er inderdaad geen inhibitie meer optreedt (zie methode voor een uitgebreidere beschrijving);
5. Er wordt altijd een positieve DNA controle van de doelsoort meegenomen in de qPCR detectie. Deze controle moet altijd resulteren in positieve detectie. Ook als alle monsters negatief zijn, kan zodoende vastgesteld worden dat de detectie juist is uitgevoerd.

eDNA onderzoek kamsalamander | 6

3. Resultaten

Er is in de watermonsters geen eDNA van kamsalamander gedetecteerd.

Een overzicht van de resultaten van dit onderzoek wordt weergegeven in Tabel 2. Iedere analyse is uitgevoerd met behulp van 12 replica's (zie 2.2 Laboratoriumanalyse). De resultaten worden weergegeven als het aantal replica's (van de 12 replica's) dat positief scoorde voor eDNA van de doelsoorten in de betreffende monsters. Als er een score van "0/12" is verkregen, betekent dit dat er geen eDNA van de doelsoort in het betreffende monster is gedetecteerd. Als er minstens 1 positieve replica is verkregen (bijvoorbeeld '1/12' of hoger) dan betekent dit dat er eDNA van de doelsoort is gedetecteerd. Het aantal positieve replica's is een grove maat voor de concentratie eDNA van de doelsoort: bij een laag aantal positieve replica's (bijvoorbeeld '1/12') is de verwachting dat de eDNA concentratie van de doelsoort zeer laag is.

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

Tabel 2: Resultaten van de qPCR analyses van de watermonsters met 12 replica's.

Monsternummer	Type	Resultaat kamsalamander
2008548	Watermonster	0/12
2008564	Watermonster	0/12
2008565	Watermonster	0/12