

An aerial photograph of a landscape. On the left, a green field is visible. A dark, winding path or river runs through the center. To the right of the path, there is a dense forest of trees with light green and yellow foliage. The right side of the image is a solid orange-red background with white text.

Ruimte. Mensen. Toekomst.

HAM 4 Aalst

Vervolgonderzoek grote modderkruiper

Definitief

colofon

projectnaam
HAM 4 Aalst

datum
28 mei 2025

projectnummer
P04273

opdrachtgever
Woonstichting De Kernen

BRO
projectleider
GvdS

opgesteld door
LBo

interne controle
MvdS

bron kapt
BRO

Willemsplein 2
5211 AK 's-Hertogenbosch
+31 (0)73 208 91 55
info.bro@movares.nl
www.movares.com

movares  smart
urban
engineering



Inhoudsopgave

1	Inleiding	4
1.1	Aanleiding	4
1.2	Doel	4
2	Omschrijving plangebied	5
2.1	Huidige situatie	5
2.2	Toekomstige situatie	5
3	Werkwijze	7
3.1	Grote modderkruiper	7
4	Resultaten	8
4.1	Grote modderkruiper	8
4.2	Overige soorten	8
5	Effectenbeoordeling en toetsing	10
5.1	Grote modderkruiper	10
5.2	Overige soorten	10
6	Conclusie	11
7	Bronnen	12
8	Verklarende Woordenlijst	13

Bijlage 1: Protocol eDNA

1 Inleiding

1.1 Aanleiding

Opdrachtgever is voornemens een bestaande woonwijk in Aalst uit te breiden. Middels een verkennend flora- en faunaonderzoek (quickscan), uitgevoerd door BRO¹, is vastgesteld dat het plangebied geschikte leefgebied bevat voor de grote modderkruiper. Naar aanleiding hiervan is nader onderzoek uitgevoerd in het seizoen van 2025, om de aanwezigheid van de grote modderkruiper vast te stellen dan wel met voldoende zekerheid uit te sluiten. In dit rapport worden de resultaten van dit nader onderzoek gepresenteerd.

1.2 Doel

Dit onderzoek zal antwoord geven op de volgende vragen:

- Is er leefgebied aanwezig van de grote modderkruiper?
- Leiden de werkzaamheden tot verlies of verstoring van het leefgebied?
- Leidt de ontwikkeling tot vergunningsplichtige flora- en fauna-activiteiten uit de Omgevingswet en is een vergunningsaanvraag noodzakelijk?

Indien bij aanwezigheid van de beschermde soort het treffen van maatregelen noodzakelijk is, omdat het huidige leefgebied komt te vervallen/wordt verstoord, dan zullen deze (ten behoeve van een vergunningsaanvraag) voldoende moeten worden onderbouwd middels een separaat activiteitenplan. Hierbij moet vast komen te staan dat de functies die het plangebied heeft voor de soort behouden blijft. Ook dient te worden getoetst of de huidige staat van instandhouding van de soort niet in het geding is.

Ten behoeve van het eventueel indienen van een vergunningsaanvraag dienen ook aspecten als doel, (wettelijk) belang en alternatievenafweging

te worden onderbouwd. Deze eventuele vervolgfase ten behoeve van een vergunningstraject maakt geen deel uit van onderhavig vervolgonderzoek.

¹ BRO is lid van het Netwerk Groene Bureaus (NGB). Het NGB is de brancheorganisatie voor groene adviesbureaus en heeft als doel kwaliteitsbevordering en belangenbehartiging. Onze werkzaamheden voeren wij dan ook uit volgens de door het NGB vastgestelde gedragscode (versie juni 2008, laatst aangevuld 11 februari 2021). De medewerkers binnen de discipline ecologie voldoen aan de door het Ministerie van EZ genoemde voorwaarden voor ter zake deskundigen op het gebied van ecologisch onderzoek.

2 Omschrijving plangebied

2.1 Huidige situatie

Het plangebied is gelegen ten oosten van het plaatsje Aalst. Het gebied ligt ten zuiden van de Maas-Waalweg en ten oosten van de Waterlelie en Watermunt. Ten westen van het plangebied is een woonwijk aanwezig, ten oosten zijn met name akkers aanwezig. In figuur 1 is de topografische ligging van het plangebied weergegeven.

Het plangebied bestaat momenteel uit een akker, welke is ingezaaid met een graansoort. In het noorden en oosten zijn sloten aanwezig op de perceelsgrens. Ook lopen er sloten door het plangebied heen. Er is geen bebouwing aanwezig binnen het plangebied. Ook opgaand groen ontbreekt binnen het plangebied.

In figuur 2 is een luchtfoto van het plangebied en de directe omgeving weergegeven. De figuren 4 t/m 9 geven een impressie van het plangebied, middels foto's die zijn genomen tijdens het verkennende veldbezoek.

2.2 Toekomstige situatie

In de toekomstplannen wordt het plangebied bouwrijp gemaakt. Vervolgens zullen woningen worden gerealiseerd. Er zijn in totaal 60 woningen voorzien, waarvan 4 vrijstaande woningen, 20 rijwoningen (waarvan 8 seniorenwoningen) 16 beneden- bovenwoningen en 20 rug- aan rugwoningen. In het noorden zal de sloot worden verbreed en zal er verspreid over het plangebied groen worden aangebracht. Figuur 3 geeft een beeld van de toekomstige situatie.



Figuur 1: Topografische kaart ligging plangebied (1:25.000)



Figuur 2: Luchtfoto plangebied en directe omgeving



Figuur 3: Toekomstige situatie plangebied



Figuur 4: Plangebied gezien vanuit noordwestelijke hoek



Figuur 5: Sloot in het westen van het plangebied



Figuur 6: Sloot in het midden/zuiden van het plangebied



Figuur 7: Plangebied gezien vanuit het zuidoosten



Figuur 8: Plangebied gezien vanuit het noordoosten



Figuur 9: Begroeide sloot in het noorden van het plangebied

3 Werkwijze

3.1 Grote modderkruiper

Ten aanzien van de grote modderkruiper is er conform het Kennisdocument Grote Modderkruiper van BIJ12 gebruik gemaakt van een combinatie van inventarisatiemethoden. In maart en april van het jaar 2025 zijn er twee veldbezoeken uitgevoerd. Tijdens het eerste veldbezoek in maart zijn er voor de schepnetinventarisatie samples van het water genomen welke zijn getest op de aanwezigheid van eDNA van de grote modderkruiper. Hierbij zijn de eDNA sampling sets van Sylphium gebruikt. Iedere set bevat het volgende:

- eDNA Dual Filter Capsule with Valve Connector;
- 60 ml Syringe;
- 3.5 Sample Preservation Solution in 5 ml Syringe (includes xenobiotic internal positive control);
- Luer-lock Male Caps (2x).
- Storage bag.

Voor het afnemen van de monsters is de volgende strategie gevolgd:

- Er is een absoluut monstervolume van 0,75 liter aangehouden;
- Elke 300 meter is er een nieuw monster genomen;
- Een monster bestaat uit deelmonsters, waarbij er bij voorkeur om de 10 meter langs de genomen wordt om de afstand tussen twee monsters te overbruggen;
- Bemonster in de voorkeursniche;
- Bemonster in het juiste seizoen.

Een uitgebreide toelichting op het gebruik van de sampling sets is toegevoegd als bijlage. Per watergang is er één sample genomen met de monsterhengel van Sylphium, waarbij er om de 10 meter is gestoken. In totaal zijn er vijf samples verzameld (zie figuur 14 voor de bemonsterde watergangen).

Tijdens beide veldbezoeken zijn de watergangen door middel van een schepnet geïnterviewd op de aanwezigheid van de grote modderkruiper. Hierbij is om de 10 meter in de watergangen geschept. Voor de schepnetinventarisaties is gebruik gemaakt van het standaardmodel van Ravon, met een maaswijdte van 3 millimeter en een netgrootte van 70x40 cm.

Tabel 1: overzicht veldbezoeken

Datum	Type onderzoek	Tijdsduur onderzoek	Weer	Temperatuur
04-03-2025	Grote modderkruiper	08:30 – 11:00	Wind gemiddeld 1 Bft Zonnig Geen neerslag	6°C
11-04-2025	Grote modderkruiper	14:00 – 17.00	Wind gemiddeld 1 Bft Half bewolkt Geen neerslag	20°C

4 Resultaten

4.1 Grote modderkruiper

Tijdens de schepnetinventarisaties zijn geen grote modderkruipers gevangen binnen de aanwezige watergangen. In figuur 14 zijn de geïnventariseerde watergangen weergegeven. De verzamelde samples zijn door laboratorium Sylphium geanalyseerd en negatief bevonden op DNA van de grote modderkruiper.

4.2 Overige soorten

Tijdens de schepnetinventarisaties is er in de meest noordelijke watergang, grenzend aan de Maas-Waalweg een schoolje bittervoorns gevangen (zie figuur 10). Deze soort was in grote getalen aanwezig. Ook zijn er verschillende zwanenmossels gevangen, deze soort wordt door de bittervoorn benut om eitjes in af te zetten (zie figuur 11). Naast voornoemde soorten zijn er ook driedoornige stekelbaarzen en een baars gevangen (zie figuur 12 en 13).



Figuur 10: Bittervoorn



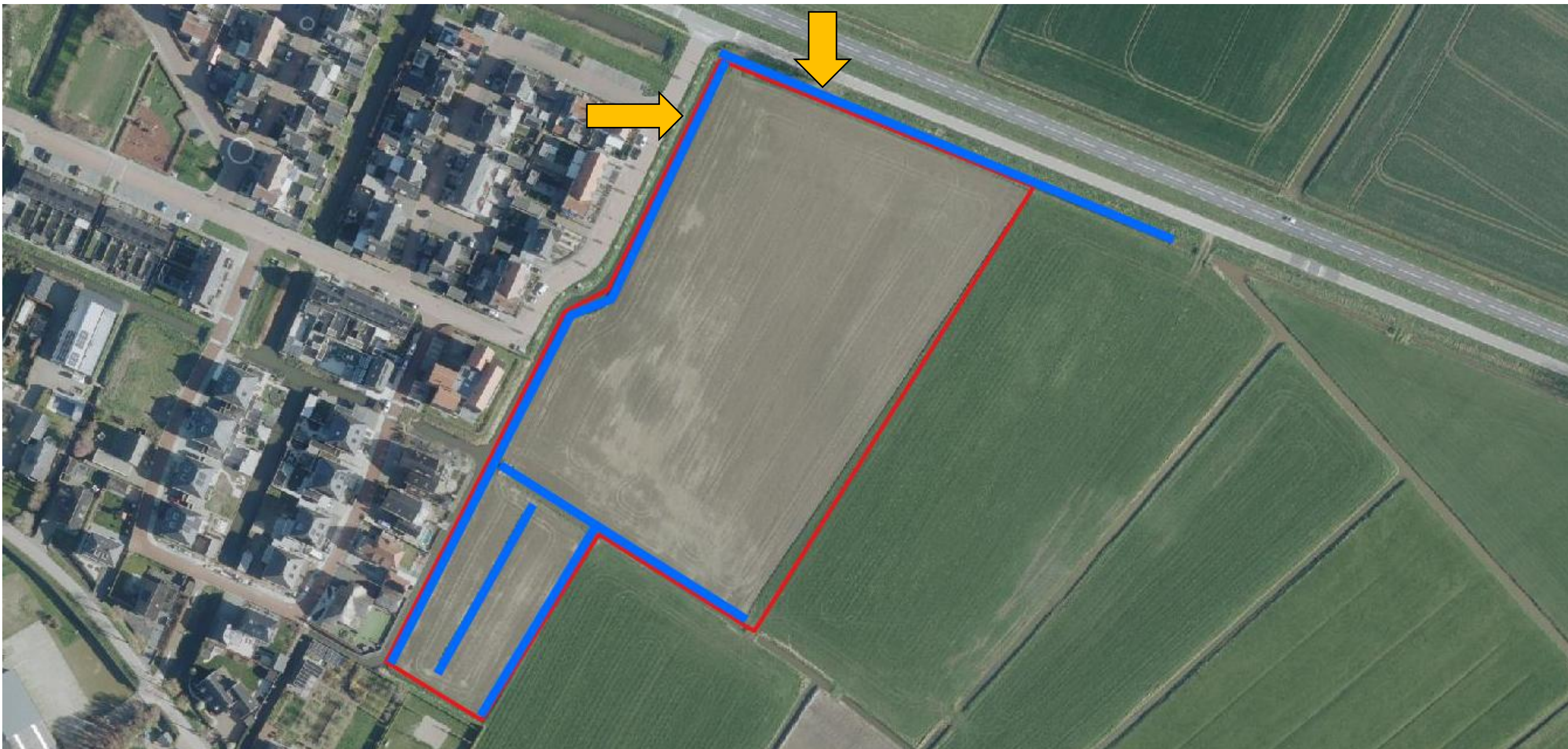
Figuur 11: Juveniele zwanenmossel



Figuur 12: Driedoornige stekelbaars tussen school bittervoorns



Figuur 13: Baars



Figuur 14: Locaties bemonsterde watergangen (blauwe lijnen) en locaties waargenomen bittervoorns (gele pijlen) ten opzichte van het plangebied (rood omlijnd)

5 Effectenbeoordeling en toetsing

5.1 Grote modderkruiper

Binnen en in de directe omgeving van het plangebied zijn geen exemplaren van de grote modderkruiper waargenomen. Ook zijn de verzamelde watermonsters negatief bevonden op het DNA van deze soort. Vanwege voornoemde kan de aanwezigheid van de grote modderkruiper binnen het plangebied worden uitgesloten. Hierdoor kan een negatief effect op deze soort eveneens worden uitgesloten.

5.2 Overige soorten

Aangezien er meerdere vissoorten aanwezig zijn in de watergangen welke verbreed gaan worden dient ervoor gezorgd te worden dat deze soorten geen negatief effect ondervinden van deze werkzaamheden. Een ecologisch werkprotocol dient opgesteld te worden voorafgaand aan de start van de werkzaamheden waarin maatregelen en aanbevelingen staan om verstoring en het doden van dieren te voorkomen.

Andere diersoorten als vogels, zoogdieren en amfibieën kunnen in het plangebied aanwezig zijn. Hiervoor geldt de zorgplicht. Dit houdt in dat men zorg moet dragen voor aanwezige individuen, ook algemene soorten. Men moet deze dieren de tijd geven om het plangebied te verlaten. Weinig mobiele soorten als egel of pad kunnen met beleid naar buiten het plangebied worden verplaatst.

Daarnaast zijn broedende vogels en hun nesten tijdens het broedseizoen beschermd. Geadviseerd wordt om het opgaand groen binnen het plangebied buiten het broedseizoen te verwijderen, om verstoring van broedende vogels te voorkomen. Het broedseizoen loopt gemiddeld van half maart tot half augustus. Geldend is echter de aanwezigheid van een broedgeval.

6 Conclusie

Binnen het plangebied is de aanwezigheid van de grote modderkruiper uitgesloten. Vervolgstappen wat betreft deze soort zijn niet noodzakelijk.

Wel dienen de volgende maatregelen in acht te worden genomen:

- Een ecologisch werkprotocol dient te worden opgesteld om te voorkomen dat de aquatische soorten die zich in de verbreden watergangen bevinden een negatief effect ondervinden van de werkzaamheden;
- De eventuele kap van opgaand groen dient buiten het broedseizoen te worden uitgevoerd. Het broedseizoen loopt globaal van half maart t/m half augustus;
- Met betrekking tot de zorgplicht dienen eventueel aangetroffen dieren tijdens de werkzaamheden de kans te krijgen om het plangebied zelfstandig te verlaten. Bij soorten als egel en gewone pad kunnen de dieren met beleid verplaatst worden naar een veilige plek buiten het plangebied.

Tabel 2: Overzicht aanwezigheid beschermde soorten en te nemen type maatregelen

Soortgroep	Aanwezig	Aantal	Overtreding	Maatregelen
Grote modderkruiper	Nee	-	Nee	Geen maatregelen aan de orde
Overige soorten ²	Ja	Bittervoorn, zwanenmossel, driedoornige stekelbaars en baars	Te voorkomen	Opstellen ecologisch werkprotocol

² Dit betreft soorten die niet honkvast zijn en/of waarvan de nest/verblijfplaats niet jaarrond is beschermd. Echter mogen de nesten/verblijfplaatsen met eieren of jongen niet worden verstoord/verwijderd. Hieromtrent dient per complex de situatie qua planning en werkzaamheden te worden afgestemd met de begeleidend ecooloog.

7 Bronnen

- Kennisdocument Grote Modderkruiper, versie 2.0 BIJ12 oktober 2021
- Ministerie van Economische Zaken 2016. Soortenbescherming bij ruimtelijke ingrepen. Lees hier wat de Wet natuurbescherming daarover regelt. Versie 1.3, december 2016. Ministerie van Economische Zaken, Den Haag.
- RAVON. Reptielen, amfibieën- en vissenonderzoek Nederland.
- Soortinventarisatieprotocollen in het kader van de Wet nabtuurbescherming, versie november 2023
- SOVON Vogelonderzoek Nederland 2018. Vogelatlas van Nederland. Kosmos Uitgevers, Utrecht.

8 Verklarende Woordenlijst

Activiteitenplan

Een activiteitenplan dient als begeleidend document voor een vergunning. In het activiteitenplan zijn maatregelen verwoord waarmee de functionaliteit van een rust- of verblijfplaats van een beschermde soort behouden blijft en schade aan individuen wordt voorkomen.

Expert Judgement

Inschatting van een deskundige op grond van zijn/haar kennis en ervaring.

Foerageerhabitat

Het gebied waarbinnen een soort voedsel zoekt.

Foerageren

Zoeken en vinden van voedsel door dieren (jachtgebied).

Functioneel leefgebied

Hiermee wordt het gebied dat is benodigd om de functionaliteit van een voortplantingsplaats of van een vaste- rust of verblijfplaats te behouden. Een nestlocatie of voortplantingsplaats kan bijvoorbeeld alleen succesvol functioneren, wanneer er voldoende habitat (schuilgelegenheid, voedsel etc.) van voldoende kwaliteit aanwezig is om te kunnen paren, eieren te leggen en jongen groot te brengen.

Gunstige staat van instandhouding

Er is sprake van een gunstige staat van instandhouding van een soort of habitatype als de omstandigheden waarin de soort of het habitatype voorkomt perspectief bieden op een duurzaam voortbestaan van die soort of dat habitatype.

Habitat

Omvat de plaatsen waar een bepaald organisme voorkomt doordat de abiotische en biotische factoren (niet levende en levende natuur) van die plaatsen voldoen aan de eisen en toleranties die het organisme stelt om te kunnen overleven, groeien en zich voortplanten.

Kraamverblijfplaats

Voortplantingsplaats van vleermuizen. Het gaat hierbij vaak om de vrouwelijke exemplaren van een kolonie (ook wel kraamgroep genoemd) die gezamenlijk hun jongen grootbrengen. De aantallen vleermuizen in een kraamgroep kun oplopen tot meerdere honderden exemplaren.

Mitigerende maatregelen

Maatregelen die negatieve effecten bij een ingreep voorkomen of reduceren.

Omgevingscheck

Een omgevingscheck wordt uitgevoerd bij verlies van leefgebied van een jaarrond beschermde functie van een soort die door een ingreep (tijdelijk) verloren gaat. De omgeving van de ingreep wordt door een ter zake deskundige beoordeeld op aanwezigheid van voldoende alternatief leefgebied en/of potentiële verblijfplaatsen.

Vergunning voor een flora- en fauna-activiteit

De Omgevingswet en de Bal bevatten regels om planten- en diersoorten die vrij in het wild leven te beschermen. Om deze kwetsbare soorten te beschermen bevat de Bal een aantal verbodsbepalingen. Onder bepaalde voorwaarden mogen de activiteiten wel doorgaan, daarvoor kan een vergunning voor een flora- en fauna-activiteit aan de orde zijn. Een vergunning is een besluit waarmee een uitzondering op een wettelijk verbod wordt gemaakt.

Populatie

Een biologische populatie is een groep individuen van dezelfde soort die zich onderling voortplant en als zodanig geïsoleerd is van andere zulke groepen.

Rode Lijst

Rode Lijsten laten zien welke soorten zijn verdwenen en welke soorten in een gebied sterk zijn achteruitgegaan of zeldzaam zijn. Er bestaan verschillende Rode Lijsten. Voor vogels, voor zoogdieren, planten, paddenstoelen, insecten en voor allerlei andere soortgroepen. Rode Lijsten hebben geen officiële juridische status. Plaatsing op de lijst maakt een diersoort dus nog geen 'beschermde diersoort' in de zin van de Omgevingswet. De Rode Lijsten hebben in de praktijk wel een belangrijke signaleringfunctie. Door de Rode Lijst te raadplegen, kunnen alle instellingen die met natuurbehoud te maken hebben rekening houden met bedreigde soorten.

Vaste rust- of verblijfplaats

Een plek binnen het leefgebied van een soort die essentieel is voor de levenscyclus van een individu. De Omgevingswet omschrijft niet exact wat een vaste rust- of verblijfplaats is. Dit is soortafhankelijk.

Bijlage 1: Protocol eDNA



eDNA sampling set

Instructions and validation

#SYL009

Document date: 4 December 2024

For general laboratory and research use only.

Table of Contents

1. Introduction	4
1.1. Specifications.....	4
1.2. Kit contents	5
1.3. Notices and disclaimers.....	5
2. Sampling guidelines and precautions	6
3. Protocol.....	8
4. Validation and comparison of eDNA filter systems	11
4.1. Experimental set-up	11
4.2. Filtration	11
4.3. DNA isolation.....	11
4.4. Analysis.....	12
4.5. Results	12
4.5.1. Filtration volume.....	12
4.5.2. Quantitative eDNA analysis	13
4.5.3. eDNA recovery	13
4.6. Conclusions.....	14
References	15
Appendix A:.....	16
Removing air bubbles from eDNA dual filter capsule	16

1. Introduction

This single-use DNA filter capsule is specially designed for on-site filtering of large quantities of (environmental) water with a negligible risk of cross-contamination. The enclosed filter membranes have an optimal pore size for environmental DNA (eDNA) filtration to collect all the eDNA without rapid clogging. The filter capsule is compact due to the design with two separate membranes that provide a huge membrane surface. The eDNA double filter capsule can be closed with “luer lock caps” after use, is suitable for in capsule lysing and preserving and can be stored at room temperature. During eDNA extraction from the capsule, all solid residues remain on the membrane and do not interfere with further downstream processing. The eDNA dual filter capsule meets all requirements as stated in CEN/TC 230 – Water analysis – N 1229.

1.1. Specifications

• Filter unit type:	Closed capsule
• Effective filter area	69 cm ² (dual filter system)
• Filter membrane	Polyethylene sulfon (PES)
• Pore size	0.8 µm
• Maximum inlet pressure	3.1 Bar (45 psi)
• In and outlet fittings	Luer-lock female
• Size:	108 mm x 52 mm x 130 mm (L x W x H)
• Cartridge material	Non-toxic Acrylonitrile butadiene styrene (ABS)
• Sterilization method	Production sterile

1.2. Kit contents

- eDNA Dual filter capsule with valve connector
- 50 mL syringe
- 3 mL sample preservation solution in a 5 mL syringe (with a xenobiotic internal positive control)
- Luer-lock male caps (2x)
- Storage bag

Optional equipment and disposables:

- Sampling rod (SYL003)
- Waste bag

1.3. Notices and disclaimers

This product is developed, designed, and sold for research purposes only. Sylphium molecular ecology (Trade name of Eelco Wallaart b.v.) does not take any responsibility and is not liable for any damage caused through use of this product, be it indirect, special, incidental or consequential damages (including but not limited to damages for loss of business, loss of profits, interruption or the like).

2. Sampling guidelines and precautions

All Sylphium eDNA detection kits are designed and validated to have a single DNA molecule sensitivity (see specific validation reports associated with each analysis). Maximization of the chance of detection is therefore completely dependent on the success of getting the target DNA molecules into the eDNA Dual Filter Capsule. The maximum detection probabilities of different species groups with eDNA are shown in **Table 1**.

Species group	Detection probability	Reference
Semi-aquatic mammals	≥95%	Sales et al. 2015
Fish	≥95%	Wood et al. 2010
Amphibians	≥95%	Caren et al. 2018
Mollusks	91.7%	Marshall et al. 2022

Table 1. Detection probability of different species groups with eDNA.

The maximum probability of detection can only be achieved with the correct sampling method. The following sampling guidelines (based on literature and experiments) should be taken into account to have the maximum detection probability, no eDNA cross-contamination between samples, and a proper registration of samples:

- **Minimum sample volume of 0.75 liters.** Take a new capsule if the eDNA Dual Filter Capsule becomes clogged with particles before the minimum sample volume is reached. The eDNA Dual Filter Capsules from the same location can be pooled afterwards and analyzed as one sample.
- **A new sample must be taken every 300 meters.**
- **A sample consists of sub-samples of 60 mL.** These are preferably taken every 10 meters along the shore to bridge the distance between two samples.
- **Ecological knowledge is important.** Samples should be taken at the preferred niche (location) and seasonal occurrence based on ecological knowledge of the target organism.
- **Historical DNA can be preserved in sediment layers for several years.** Avoid sampling or disturbing sediments to only gain knowledge of recent occurrences of the target organism.
- **Ensure proper registration of the samples.** Sample sets supplied for analysis in Sylphium's laboratory have a unique sample number. This sample number (E number) is used in Sylphium's analysis reports.
- **A sampling rod can be used for sampling from shore.** If the water is easily accessible, the sampling rod does not need to be used, but can still be useful.

- **The samples contain as few particles or plant material as possible.** Do not sample in water that has recently been stirred or otherwise disturbed and therefore contains a lot of soil particles. Surface water is also preferred because the upper part of the water column contains the fewest particles. These particles may contain, among other things, humic acids, which can disrupt the analyses.
- **Clean reusable material with 10 times diluted thin bleach** (available in the supermarkets). This destroys DNA and thereby prevents cross-contamination between sample locations. **Important:** do not use thick bleach, as it contains disruptive factors that interfere with the analysis process.

3. Protocol

1. Connect the valve connector to the syringe (**Figure 1**).
2. (Optional) Place the 60 mL syringe with the attached eDNA filter capsule into the opening of the sampling rod (**Figure 2**). Make sure that the handle of the plunger slides into the groove of the inner tube.



Figure 1. Syringe connected to an eDNA filter capsule.



Figure 2. Syringe placed into a sampling rod.

3. Place the inlet of the eDNA dual filter capsule into the water and ensure the syringe and sampling rod do **not** come into contact with the water. This prevents DNA contamination between sample locations. Draw water into the syringe by pulling back the plunger (**Figure 3A**) or the inner tube on the other end of the sampling rod (**Figure 3B**). **Important:** Avoid air bubbles in the filter, as they can cause it to malfunction. To prevent air from being drawn in, release the syringe plunger or inner tube from the sampling rod before lifting the dual filter capsule out of the water. If air bubbles do appear in the filter, they can easily be removed (see Appendix A for instructions).



Figure 3. Taking water samples using the eDNA dual filter capsule without (**A**) and with (**B**) sampling rod.

4. Empty the syringe by pushing the syringe plunger or the inner tube at the other end of the sampling rod (**Figure 4**). It is not necessary to disconnect the syringe from the sampling rod or to keep the inlet of the dual filter capsule submerged in water.



Figure 4. Emptying syringe to prepare for the next sub-sample.



Figure 5. Example of sub-sample locations.

5. Repeat this operation until the filter is clogged. One liter of water (approximately 16 full syringes) is sufficient in most cases for a maximum detection probability. Take a new filter capsule when the filter becomes clogged. It is recommended to take multiple sub-samples at the same location. For example, take a sub-sample (1 full syringe of 60 mL) every 10 meters (**Figure 5**).
6. When finished, remove all water from the eDNA dual filter capsule by lifting the filter out of the water and using the syringe to draw air through the filter (**Figure 6**). Keep the eDNA dual filter capsule connected to the valve connector and the syringe during this step. **Important: failing to remove all water will result in degradation of eDNA.**



Figure 6. Drying eDNA dual filter capsule.



Figure 7. Sample preservation of filter membrane.



Figure 8. Ready for send-off.

7. Remove the double filter capsule from the silicone tubing connected to the connector. Place the blue cap of the 5 mL syringe on the outlet of the filter capsule. Connect the 5 mL syringe with the sample preservation solution to the inlet of the capsule (**Figure 7**). Hold down the filter capsule and push the preservation solution into the capsule.
8. Pull the plunger back to 3 mL to release pressure and remove the syringe from the dual filter capsule. It is not necessary to remove all the air from the dual filter capsule. Place the other blue cap on the inlet of the filter capsule.
9. Place the eDNA Dual filter capsule, both syringes and valve connector back into the sample bag. **These materials are required during eDNA isolation.** The sample bag is now ready to be send to the lab (**Figure 8**). If samples are analysed by Sylphium molecular ecology, please send the samples by regular mail (preferably by registered mail) to the following address:

Sylphium molecular ecology
PO Box 11107
9700 CC Groningen
The Netherlands

Please inform us that the samples have been sent by sending an email to info@sylphium.com

4. Validation and comparison of eDNA filter systems

4.1. Experimental set-up

The eDNA dual filter capsules were compared with commonly used filtering methods used in the eDNA research, namely the Sterivex™ filter units and PES filter funnels (**Table 1**). Quantitative detection of the fish species *Rutilus rutilus* (SYL139) was used to compare the recovery of eDNA with these filter systems.

	eDNA Dual filter	Sterivex™	Filter funnel
Manufacturer	Sylphium	Merck	Sarstedt
Filter area (cm²)	69	10	65
Material	PES	PES	PES
Pore seize	0.8	0.22	0.2
Closed capsule	Yes	Yes	No

Table 2. Filters used in this study.

4.2. Filtration

Water was collected with barrels from the river “De beek”, Drenthe, Netherlands. After collection, the vessels were taken to the laboratory and filtered. Each filter system was tested in triplicate. A vacuum pump with a vacuum of 0.85 bar was used during the filtration. Filtration was stopped after 10 minutes. The maximum volume of filtered water was recorded per filter (**Table 1**). The water was stirred with a magnetic stirrer during the filtration to avoid sedimentation. The filter capsules are filled with Sample preservation solution according to the Sylphium manuals (SYL001 and SYL009). The filter membrane of the filter funnel was cut with a scalpel from the funnel and transferred with all residues to a 15 mL tube containing 2 mL of Sample preservation solution.

4.3 DNA isolation

eDNA was isolated from the samples with the Environmental DNA isolation kit (Sylphium, SYL002) according to the protocol. One mL of each isolate was processed, the remaining isolate was kept as a backup.

4.4. Analysis

The efficiency of the filters was compared with a quantitative eDNA analysis (SYL139) targeting the common fish species *Rutilus rutilus*. The analysis was performed according to the protocol associated with this qPCR kit. Each filter was determined 8-fold compared to a simultaneously analyzed calibration line with known target DNA concentrations.

4.5. Results

4.5.1. Filtration volume

All filters were clogged within 10 minutes and the maximum filtration volume was reached for each type of filter. The mean maximum filtration volumes were; 2333 mL for the eDNA dual filter capsule, 95 mL for the Sterivex™ and 277 mL for the filter funnel (**Figure 9**).

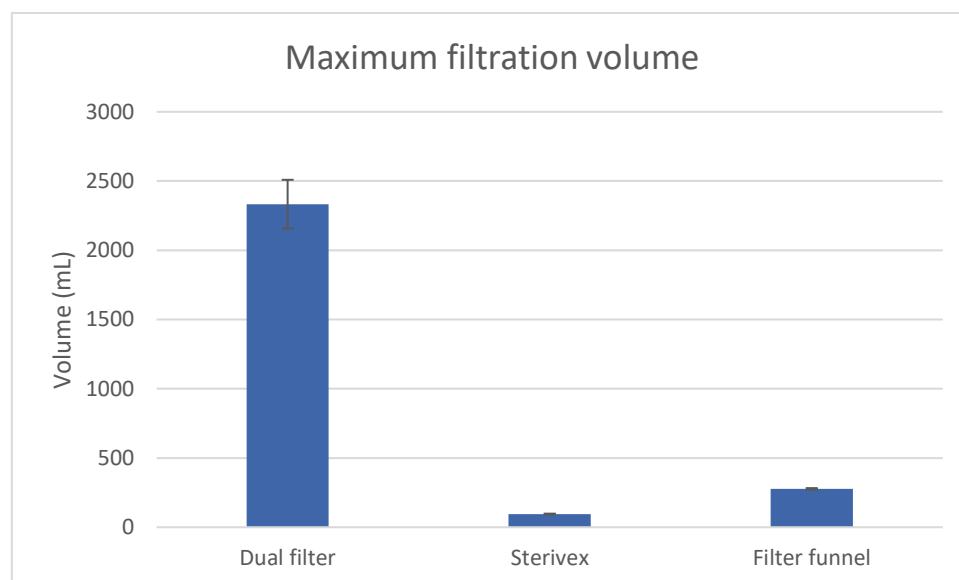


Figure 9. Maximum filtration volume of the eDNA Dual filter capsule, Sterivex™ and filter funnel determined in triplicate. The error bars represent the standard deviation.

4.5.2. Quantitative eDNA analysis

The absolute amount of eDNA collected and isolated from the filter systems was determined with a quantitative eDNA analysis (SYL139) targeting the common fish species *Rutilus rutilus* for each filter type. This resulted in the following values; 1.2×10^5 fragments for the eDNA Dual filter capsule, 5.2×10^3 fragments for the Sterivex™ and 1.3×10^4 fragments for the filter funnel (**Figure 10**).

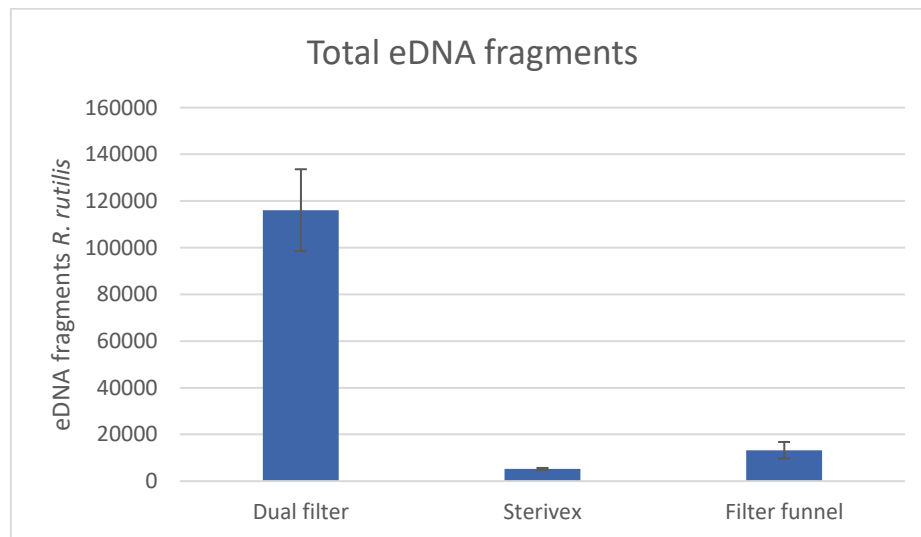


Figure 10. Total eDNA fragments per filter type. The error bars represent the standard deviation.

4.5.3. eDNA recovery

To determine differences in eDNA uptake and recovery of the filter systems used, the concentration of eDNA fragments was calculated per mL of filtered water and compared between each filter system (**Figure 11**). There were no statistically significant differences, in eDNA uptake and recovery, between filter systems, as determined by a one-way ANOVA ($F(2,6) = 0.564$, $p = 0.596$; **Figure 11**).

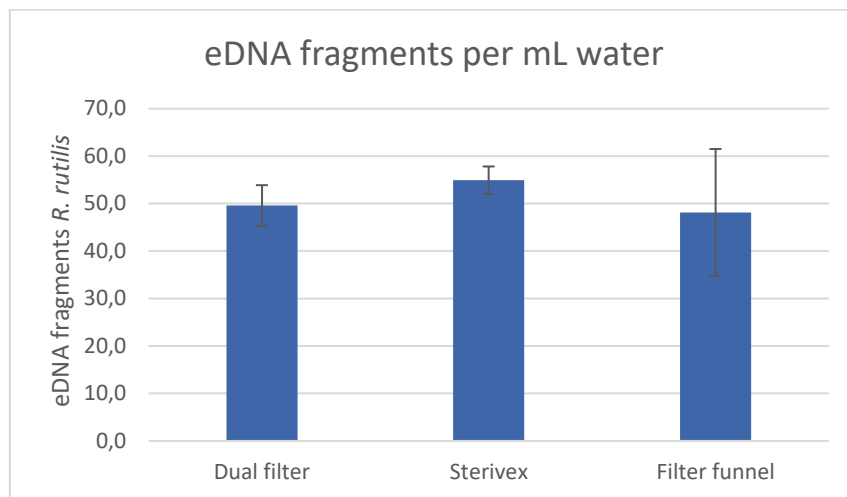


Figure 11. eDNA fragments per mL per filter type. The error bars represent the standard deviation.

4.6. Conclusions

The eDNA dual filter capsule is capable of filtering much more water than competing systems. The maximum filter volume is 10 times as high as a funnel filter and even 20 times as high as a Sterivex™ capsule. The eDNA dual filter capsule also collects much more eDNA than the competing systems. The eDNA dual filter capsule collects 20 times more eDNA compared to a Sterivex™ and 10 times more than a filter funnel. There is no difference between the filter systems in the amount of eDNA obtained per unit volume of the sample water. All eDNA is recovered with the used filter systems.

The eDNA double filter capsule and the Sterivex™ meet all requirements as stated in CEN / TC 230 - Water Analysis - N 1229. Both systems are closed capsules, which prevents cross contamination during sampling. The filter funnel is an open system and requires additional measures to meet all criteria as stated in CEN / TC 230 - Water analysis - N 1229.

References

- Caren S. Goldberg, Katherine M. Strickler, Alexander K. Fremier, Degradation and dispersion limit environmental DNA detection of rare amphibians in wetlands: Increasing efficacy of sampling designs. *Science of The Total Environment*. 2018; 633: 695-703
- Marshall, N. T., Symonds, D. E., Dean, C. A., Schumer, G., & Fleece, W. C. (2022). Evaluating environmental DNA metabarcoding as a survey tool for unionid mussel assessments. *Freshwater Biology*, 67, 1483– 1507.
- Sales, NG, McKenzie, MB, Drake, J, et al. Fishing for mammals: Landscape-level monitoring of terrestrial and semi-aquatic communities using eDNA from riverine systems. *J Appl Ecol*. 2020; 57: 707– 716.
- Wood, ZT, Erdman, BF, York, G, Trial, JG, Kinnison, MT. Experimental assessment of optimal lotic eDNA sampling and assay multiplexing for a critically endangered fish. *Environmental DNA*. 2020; 2: 407– 417.

Appendix A:

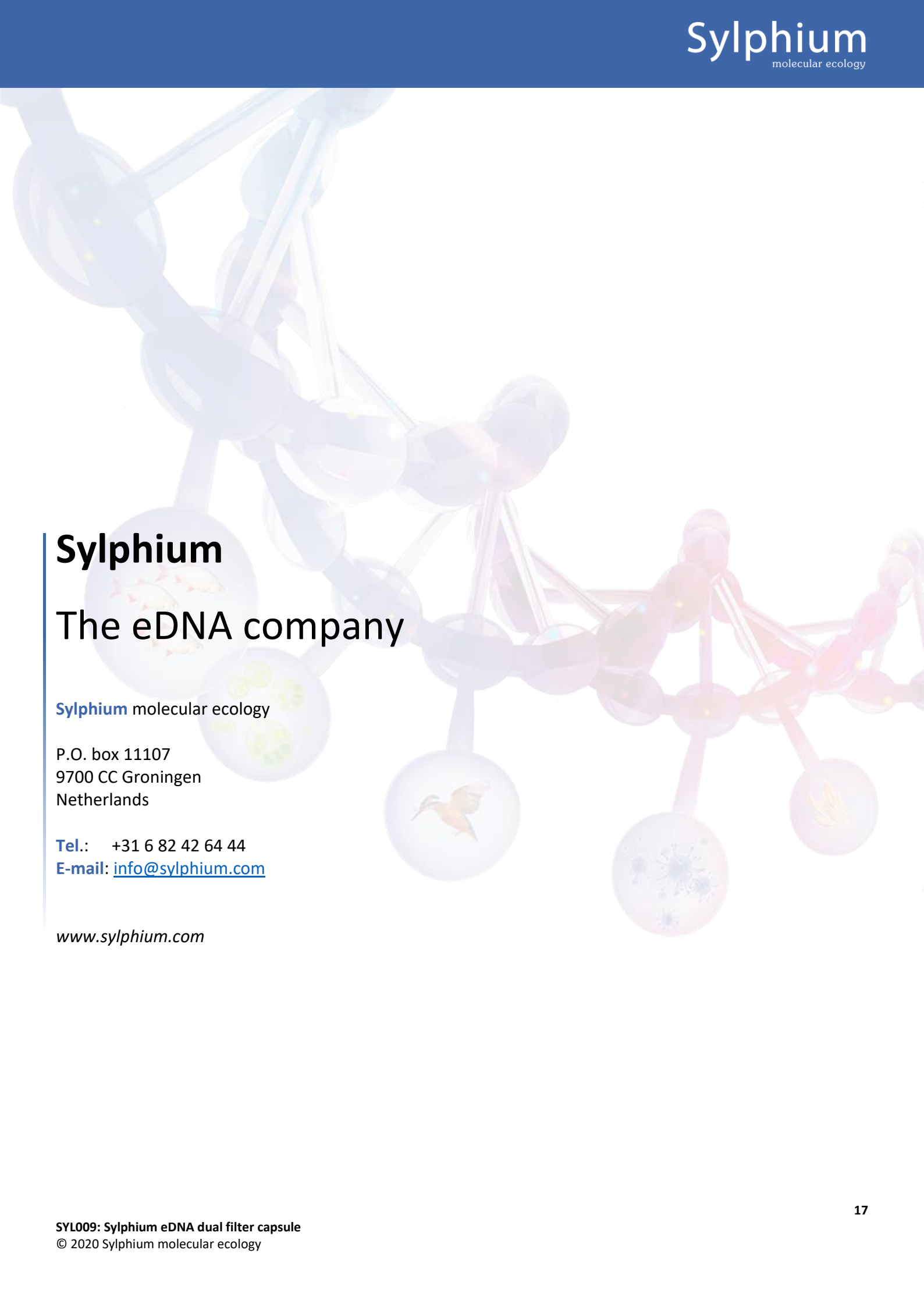
Removing air bubbles from eDNA dual filter capsule

Air bubbles block the filter membrane and have a negative effect on the filter capacity. These air bubbles are easy to remove from the capsule.

Remove the 60 mL syringe from the sample rod and remove the dual filter capsule from the silicone tubing connected to the connector. Fill the syringe with sample water and connect the syringe to the outlet of the eDNA dual filter capsule. Hold the capsule upwards and push the syringe plunger until all air bubbles have been expelled from the capsule. Reconnect the capsule and syringe to the valve connector and place them back into the sample rod. Proceed with sampling.



Removing air bubbles from the eDNA dual filter capsule



Sylphium

The eDNA company

Sylphium molecular ecology

P.O. box 11107
9700 CC Groningen
Netherlands

Tel.: +31 6 82 42 64 44

E-mail: info@sylphium.com

www.sylphium.com

Ruimte. Mensen. Toekomst.

Amsterdam

Nachtwachtlaan 20
1058 EA Amsterdam
+31 (0)20 506 19 99

's-Hertogenbosch

Willemssplein 2
5211 AK 's-Hertogenbosch
+31 (0)73 208 91 55

Venlo

Industriestraat 94
5931 PK Tegelen
+31 (0)77 373 06 01

info.bro@movares.nl
www.movares.com

