



QUICKSCAN FLORA EN FAUNA

ONDERHOUD N212, WOERDEN



ECOLOGISCH ADVIES
EN ONDERZOEK

MOS, J

QUICKSCAN FLORA EN FAUNA

ONDERHOUD N212, WOERDEN

MOS, J

14 DECEMBER 2021



ECOLOGISCH ADVIES
EN ONDERZOEK

Postadres: Goudreinette 10
6922 AE DUIVEN

KvK nr: 72271108

Tel: 06 12 77 77 78
E-mail: info@mos-ecologie.nl
Website: <http://www.mos-ecologie.nl>



ECOLOGISCH ADVIES
EN ONDERZOEK

Postadres: Goudreinette 10
6922 AE DUIVEN

KvK nr: 72271108

Tel: 06 12 77 77 78
E-mail: info@mos-ecologie.nl
Website: <http://www.mos-ecologie.nl>

Status: Definitief

Versie: 1.0

Datum: 14 DECEMBER 2021

Titel: Quicksan flora en fauna

Subtitel: Onderhoud N212, Woerden

Omslagfoto('s): N212, juli 2021 (MOS-Ecologie)

Projectnummer: -

Opdrachtgever: KWS Infra bv

Postbus 60

1110 AB DIEMEN

Opsteller: ir. J. (Jeroen) Mos

Paraaf:

MOS – Ecologisch Advies en Onderzoek is niet aansprakelijk voor gevolgschade, alsmede voor schade welke voortvloeit uit toepassingen van de resultaten van werkzaamheden of andere gegevens verkregen van MOS – Ecologisch Advies en Onderzoek; opdrachtgever vrijwaart MOS – Ecologisch Advies en Onderzoek voor aanspraken van derden in verband met deze toepassing.

© MOS – Ecologisch Advies en Onderzoek.

Dit rapport is vervaardigd op verzoek van opdrachtgever hierboven aangegeven en is zijn eigendom. Niets uit dit rapport mag worden verveelvoudigd en/of openbaar gemaakt worden d.m.v. druk, fotokopie, microfilm of op welke andere wijze dan ook, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de opdrachtgever hierboven aangegeven MOS – Ecologisch Advies en Onderzoek, noch mag het zonder een dergelijke toestemming worden gebruikt voor enig ander werk dan waarvoor het is vervaardigd.

Inhoudsopgave

1	Inleiding.....	5
2	Plangebied.....	6
2.1	Huidige situatie	6
2.2	Voorgenomen ingreep.....	8
3	Onderzoeksmethode	8
3.1	Veldbezoek	8
3.2	Bureaustudie	8
3.3	Nader onderzoek.....	8
4	Resultaten, te verwachten effecten en maatregelen	9
4.1	Soortenbescherming.....	9
4.1.1	Broedvogels	9
4.1.2	Vleermuizen	10
4.1.3	Grondgebonden zoogdieren.....	10
4.1.4	Reptielen.....	11
4.1.5	Amfibieën.....	11
4.1.6	Planten.....	12
4.1.7	Vissen.....	12
4.1.8	Vlinders en libellen	12
4.1.9	Overige soorten.....	12
4.2	Gebiedsbescherming – Natura 2000.....	13
4.3	Natuurnetwerk Nederland (NNN).....	13
5	Samenvatting	14
	Bijlage 1 Wetgeving en beleid.....	16
	Bijlage 2 Nader onderzoek waterspitsmuis.....	20

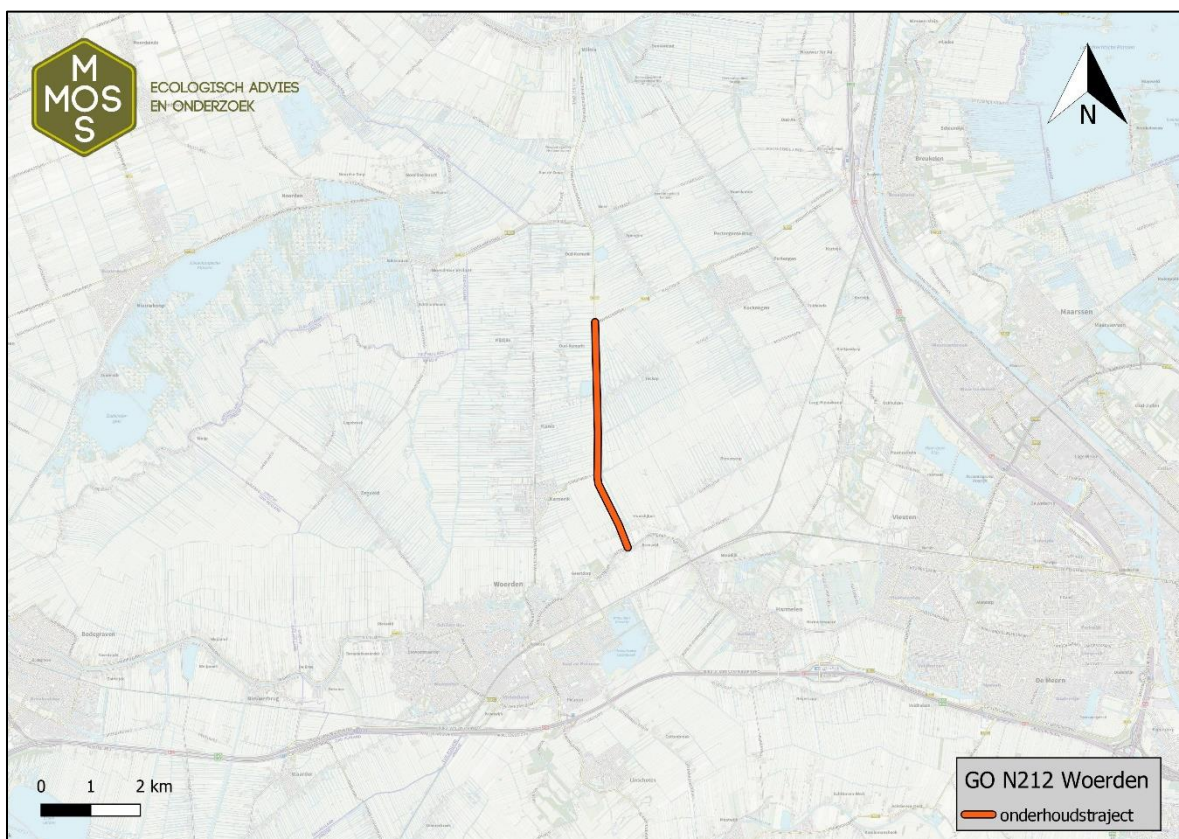
1 Inleiding

KWS Infra bv is voornemens om werkzaamheden uit te voeren in het kader van het groot onderhoud aan en een lokale reconstructie ter plaatse van de N212 te Woerden (afbeelding 1).

Binnen (en in de omgeving van) het onderhoudstraject kunnen mogelijk dieren en planten aanwezig zijn die beschermd zijn in het kader van de Wet natuurbescherming (Wnb) of gebieden die vallen onder het Natura 2000-netwerk, deel uitmaken van het Natuurnetwerk Nederland (NNN) of vallen onder overig relevant provinciaal beleid. Om een eerste indruk te krijgen van de mogelijke raakvlakken met eventueel aanwezige natuurwaarden heeft KWS Infra bv aan MOS – Ecologisch Advies en Onderzoek de opdracht gegeven een quickscan uit te voeren met als doel de potentie van het onderhoudstraject en de directe omgeving te beoordelen voor de aanwezigheid van strikt beschermde flora en fauna.

Onderhavige quickscan voorziet, in het licht van de Wet natuurbescherming, onderdeel soorten- en gebiedsbescherming alsmede het Natuurnetwerk Nederland (NNN), in een overzicht van de raakvlakken van de voorgenomen ingreep met beschermde natuurwaarden. In bijlage 1 is een nadere uitleg van het wettelijk kader opgenomen.

Uit de quickscan blijkt of door de voorgenomen werkzaamheden negatieve effecten op plant- en diersoorten, of gebieden behorende tot Natura 2000 of het NNN zijn te verwachten of dat er, om de ingreep volledig te kunnen toetsen, nader onderzoek benodigd is. In onderhavig geval is in deze fase reeds een nader onderzoek naar waterspitsmuis uitgevoerd en in dit rapport geïntegreerd. Tevens wordt beoordeeld of er noodzaak is tot het aanvragen van een ontheffing of vergunning in het kader van de vigerende wet- en regelgeving.



Afbeelding 1. Topografische locatie onderhoudstraject N212 te Woerden.

2 Plangebied

2.1 Huidige situatie

Het plangebied betreft het ruim 4,5 kilometer lange 80km-traject van de N212 van de N401 t.h.v. Kockengen naar de N198 te Breeveld tussen hmp 8.2 en hmp 12.8 (gemeente Woerden, provincie Utrecht). In afbeelding 2 is de ligging van het onderhoudstraject weergegeven op een luchtfoto.

Het plangebied bestaat hoofdzakelijk uit een 2-baans asfalt wegdek met enkele rotondes. De aangrenzende wegberm bestaat grotendeels de eerste ruime meter uit een goed onderhouden korte grasberm en/of een kruidenvegetatie. Op het zuidelijk deel bevindt zich aan weerszijden een bomensingel en verspreidt langs het traject zijn op enige afstand van de weg solitaire bomen, hagen en bosschages aanwezig. Vanaf de N405 Spruitweg tot aan de N401 naar het noorden is aan de westzijde evenwijdig aan de N212 een fietspad aanwezig. Verder aan de oost- en westzijde bevindt zich een vaart- en sloten structuur variërend in breedte over de lengte van het traject. De ruimere omgeving bestaat voornamelijk uit polderlandschap dominerend in wei- en akkerlanden doorsneden met watergangen.

Ter plaatse van de voorgenomen reconstructie aan de N405 Spruitweg is oppervlak weiland aanwezig en twee watergangen met goed begroeide oeverzone (rietkraag) en een geleidende wilgensingel langs de een parallelweg.

In afbeelding 3 en 4 zijn enkele impressiefoto's opgenomen van respectievelijk het onderhoudstraject N212 en de reconstructie locatie N405 Spruitweg.



Afbeelding 2. Luchtfoto met ligging onderhoudstraject N212 tussen de N401 t.h.v. Kockengen en de N198 Breeveld.



Afbeelding 3. Impressiefoto's onderhoudstraject N212 Woerden (Mos-Ecologie, juli 2021).



Afbeelding 4. Impressiefoto's locatie reconstructie N405 Spruitweg (Mos-Ecologie, juli 2021).

2.2 Voorgenomen ingreep

In 2022 staat onderhoud gepland aan de N212. Hierbij zullen 1 á 2 lagen asfalt over de gehele lengte van het traject (4,5km) worden verwijderd en vervangen. Aanvullend zal ter plaatse van de kruising met de N405 Spruitweg een reconstructie plaatsvinden waarbij dempwerkzaamheden plaatsvinden. In het kader van de reconstructie zullen geen bomen worden gekapt.

3 Onderzoeksmethode

3.1 Veldbezoek

Om de potentie van het onderhoudstraject voor de aanwezigheid van streng beschermde soorten flora en fauna te beoordelen, is in het kader van onderhavige natuuronderzoek op 28 juli 2021 door dhr. J. Mos, adviseur ecologie bij MOS – Ecologisch Advies en Onderzoek, een veldbezoek uitgevoerd.

Tijdens het veldbezoek is door middel van een quickscan het habitat ter plaatse van het onderhoudstraject N212, de reconstructie t.h.v. de N405 Spruitweg en de directe omgeving beoordeeld op potentie voor en aanwezigheid van streng beschermde soorten.

3.2 Bureaustudie

In combinatie met het veldbezoek is op basis van een literatuurstudie een inschatting gemaakt van de te verwachten soort(groep)en binnen het plangebied en de directe omgeving. Hierbij is gebruik gemaakt van de meest recente verspreidingsgegevens uit landelijke en provinciale bronnen. Naargelang de relevantie voor het inschatten van het effect van de voorgenomen ingreep (in het licht van de aanwezigheid van voor streng beschermde soorten geschikt habitat), zijn verspreidingsgegevens specifiek in het rapport opgenomen. Daarnaast is op hoofdlijnen beoordeeld of ten aanzien van landelijke (Natura 2000) en eventuele relevante provinciale gebiedsbescherming (NNN), effecten zijn te verwachten door de voorgenomen ingreep.

3.3 Nader onderzoek

Naar aanleiding van het veldbezoek is eind 2021 een nader onderzoek ¹uitgevoerd naar de aanwezigheid van waterspitsmuis. Hiervoor is een eDNA analyse uitgevoerd van oeverbodemmonsters. Zie voor de opzet en achtergrond van deze analyse het onderzoeksrapport van Datura in bijlage 2.

¹ Van Bochove K., J. Rook 2021. eDNA onderzoek waterspitsmuis Rapport RA21188, Datura, Wageningen.

4 Resultaten, te verwachten effecten en maatregelen

In dit hoofdstuk worden de voor de potentieel te verwachten soorten/of soortgroepen de effecten van de voorgenomen onderhoudswerkzaamheden toegelicht en vindt een toetsing plaats aan de verbodsbepaling zoals opgenomen in de Wnb. Daarnaast worden indien noodzakelijk de maatregelen beschreven die noodzakelijk zijn om mogelijke overtreding van verbodsbepalingen te voorkomen.

4.1 Soortenbescherming

4.1.1 Broedvogels

4.1.1.1 Jaarrond beschermde nesten

Categorie 1 t/m 4²

Uit verspreidingsgegevens is de aanwezigheid bekend van onder andere buizerd, havik en sperwer (categorie 4). Tijdens het veldbezoek zijn langs het onderhoudstraject N212 geen geschikte nestlocaties binnen het projectgebied of in de directe omgeving vastgesteld waarvan deze soorten gedurende het broedseizoen gebruik kunnen maken. Ook de voorgenomen activiteiten in het kader van groot onderhoud, zal gezien de aard en uitvoeringsduur geen gevolgen hebben voor een in de verdere omgeving aanwezig jaarrond beschermd nestplaats.

Het habitat ter plaatse van de reconstructie t.h.v. de Spruitweg kan deel uitmaken van het leefgebied van steenuil. In de direct aangrenzende wilgen zijn tijdens het veldbezoek geen potentiële nestplaatsen aangetroffen echter zijn deze in de verdere omgeving van het plangebied niet op voorhand uit te sluiten. Ook het deels om te vormen weiland (deels infrastructuur en deels watergang en waterberging) kan in potentie deel uitmaken van het foerageergebied van deze soort. Gezien de beperkte aard van de ingreep wordt verwacht dat er geen sprake is van verstoring van een in de omgeving aanwezige broedgeval. Ook het relatief beperkte ruimtebeslag zal geen significante negatieve gevolgen hebben voor een eventueel in de omgeving aanwezige nestplaats. In de omgeving blijft voldoende toegankelijk foerageergebied aanwezig.

De aanwezigheid van of overige broedvogelsoorten waarvan het nest een jaarrond beschermde status geniet en valt onder categorie 1 t/m 4, zijn gezien het aanwezige habitat binnen de invloedssfeer van de werkzaamheden niet te verwachten.

Maatregelen: geen.

Categorie 5³

Door het ontbreken van geschikte broedlocaties binnen de invloedssfeer van de werkzaamheden is de aanwezigheid van soorten uit categorie 5, doorgaans holenbroeders, niet te verwachten. Eventueel in de omgeving aanwezige nesten van categorie 5 soorten ondervinden gezien de aard en duur van de werkzaamheden hiervan naar verwachting geen hinder.

Maatregelen: geen.

² Categorie 1.: nesten die, behalve gedurende het broedseizoen als nest, buiten het broedseizoen in gebruik zijn als vaste rust- en verblijfplaats (voorbeeld: de steenuil); Categorie 2. nesten van koloniebroeders die elk broedseizoen op dezelfde plaats broeden en die daarin zeer honkvast zijn of afhankelijk van bebouwing of biotoop. De (fysieke) voorwaarden voor de nestplaats zijn vaak zeer specifiek en limitatief beschikbaar (voorbeelden: roek, gierzwaluw en huismus); Categorie 3. nesten van vogels, zijnde geen koloniebroeders, die elk seizoen op dezelfde plaats broeden en daarin zeer honkvast zijn of afhankelijk van bebouwing. De (fysieke) voorwaarden voor de nestplaats zijn vaak zeer specifiek en limitatief beschikbaar (voorbeelden: ooievaar, kerkuil en slechtvalk); Categorie 4. nesten van vogels die jaar in jaar uit gebruik maken van hetzelfde nest en die zelf niet of nauwelijks in staat zijn (zelf) een nest te bouwen (voorbeelden: boomvalk, buizerd en ransuil).

³ Categorie 5.: nesten van vogels die weliswaar vaak terugkeren naar de plaats waar zij het jaar daarvoor hebben gebroed of de directe omgeving daarvan, maar die wel over voldoende flexibiliteit beschikken om zich elders te vestigen als de broedplaats verloren is gegaan (voorbeelden: oeverzwaluw, kokmeeuw) zijn buiten het broedseizoen niet beschermd.

4.1.1.2 Algemene soorten

Binnen het onderhoudstraject zelf zijn nestlocaties uitgesloten gezien de aanwezigheid van alleen verharding. Gezien de aard en schaal van het werk zal hier ook geen sprake zijn van aantasting van een broedgeval in de omgeving van de werkzaamheden. Ter plaatse van de reconstructie t.h.v. de Spruitweg is de aanwezigheid van o.a. watervogels in het broedseizoen niet uitgesloten. Er zijn voldoende mogelijkheden in en nabij de rietkraag en oeverzone waar deze soorten tot broeden kunnen komen.

De aantasting van een nestlocatie van algemene soorten broedvogels tijdens het broedseizoen is strijdig met artikel 3.1 uit de Wnb. Om eventuele aantasting en daarmee overtreding van verbodsbepalingen uit de Wnb te voorkomen, dienen maatregelen te worden getroffen.

Maatregelen: Om vernietiging van een nestlocatie en daarmee overtreding van de Wet natuurbescherming te voorkomen dienen de werkzaamheden in het kader van de reconstructie t.h.v. de Spruitweg bij voorkeur buiten het seizoen te starten of volledig daarbuiten plaats te vinden.

4.1.2 Vleermuizen

In de omgeving van de N212 is de aanwezigheid bekend van onder andere ruige dwergvleermuis, rosse vleermuis, watervleermuis, gewone dwergvleermuis en laatvlieger (NDFF, 2021; Broekhuizen *et al.*, 2016⁴). Een deel van deze soorten heeft verblijfplaatsen in bomen en een deel bevindt zich in bebouwing. Daarnaast maken vleermuizen gebruik van landschapsstructuren zoals bomenlanen, dijken en watergangen als oriëntatie in het landschap en kan een plangebied deel uitmaken van het foerageergebied waar soorten jacht maken op hun prooidieren. Per leefgebiedfunctie wordt vervolgens beschreven of binnen het plangebied hiervoor een potentiële rol aanwezig is.

4.1.2.1 Verblijfplaatsen binnen en nabij het plangebied

Binnen het onderhoudstraject en in de directe nabijheid is geen bebouwing aanwezig of ontbreken voor vleermuizen potentiële holtebomen die hinder kunnen ondervinden van de voorgenomen ingreep. Op basis van de quickscan kan de aanwezigheid van een vaste voortplantings- of rustplaatsen van vleermuizen binnen het plangebied en de directe omgeving worden uitgesloten.

Maatregelen: geen.

4.1.2.2 Vliegroutes en foerageergebied

De aanwezige water- en slootstructuren kunnen theoretisch functioneren als vliegroute voor vleermuizen, een verbinding van verblijfplaatsen tussen de woonkernen en foerageerlocaties in het buitengebied.

De (indirecte) aantasting van een vaste voortplantings- of rustplaats van vleermuizen is strijdig met artikel 3.5 uit de Wnb. Om eventuele (indirecte) aantasting en daarmee overtreding van verbodsbepalingen uit de Wnb te voorkomen, dienen maatregelen te worden getroffen.

Maatregelen: Om verstoring van een eventuele aanwezige vliegroute en daarmee een mogelijke overtreding van de Wet natuurbescherming te voorkomen, dient de tijdens werkzaamheden in de actieve periode van vleermuizen (1 april-1 december), uitstraling van werkverlichting naar de watergangen in de directe omgeving te worden voorkomen.

4.1.3 Grondgebonden zoogdieren

In de omgeving van de N212 zijn enkele waarnemingen bekend van waterspitsmuis (NDFF, 2021). Werkzaamheden vinden in het kader van het groot onderhoud hoofdzakelijk plaats op de bestaande weg waar geen geschikt habitat aanwezig is. Ter plaats van de reconstructie t.h.v. de Spruitweg zijn gezien

⁴ Broekhuizen, S., K. Spoelstra, J.B.M. Thissen, K.J. Canters & J.C. Buys (redactie) 2016. Atlas van de Nederlandse zoogdieren. - Natuur van Nederland 12. Naturalis Biodiversity Center & EIS Kenniscentrum Insecten en andere ongewervelden, Leiden.

het waterrijke habitat met dichte oeverbegroeiing in potentie mogelijkheden voor waterspitsmuis om te verblijven. Op basis van de specifieke habitatseisen die overige streng beschermde soorten grondgebonden zoogdieren doorgaans aan hun habitat stellen, is een verblijffunctie van deze soortgroep ook hier uitgesloten.

De (indirecte) aantasting van een vaste voortplantings- of rustplaats van waterspitsmuis is strijdig met artikel 3.10 uit de Wnb. Om eventuele (indirecte) aantasting en daarmee overtreding van verbodsbepalingen uit de Wnb te voorkomen, dienen maatregelen te worden getroffen.

Maatregelen: Om de aanwezigheid van waterspitsmuis vast te stellen is een eDNA onderzoek uitgevoerd van oeverbodemmonsters ter plaatse van de te dempen/ aan te tasten watergangen. Door het ontbreken van genetisch materiaal in de betreffende monsters kan op basis van het eDNA onderzoek de aanwezigheid van waterspitsmuis binnen de invloedssfeer van de ingreep worden uitgesloten. Zie voor de opzet en achtergrond van deze analyse het onderzoeksrapport van Datura in bijlage 2.

4.1.4 Reptielen

In de omgeving is op enkele plaatsen de strikt beschermde ringslang vastgesteld (NDFF, 2021). Werkzaamheden vinden in het kader van het groot onderhoud hoofdzakelijk plaats op de bestaande weg waar geen geschikt habitat aanwezig is. Ter plaats van de reconstructie t.h.v. de Spruitweg zijn gezien het waterrijke habitat met dichte oeverbegroeiing in potentie mogelijkheden voor ringslang om te verblijven. Door het ontbreken van geschikte broeihopen of ander natuurlijke materialen is er geen sprake zijn van een voortplantingsfunctie en gezien het tamelijk natte karakter zonder schuilmogelijkheden is een overwinterlocatie eveneens uitgesloten. Derhalve geldt alleen dat in het kader van de zorgplicht gedurende de uitvoering rekening dient te worden gehouden met een eventueel aanwezig individu ter plaatse van de oeverzones en watergangen.

Op basis van de specifieke habitatseisen die reptielen doorgaans aan hun habitat stellen en de verspreidingsgebieden is een verblijffunctie van overige streng beschermde soorten reptielen uitgesloten.

Maatregelen: Tijdens de uitvoering dient, in het kader van de zorgplicht, aandacht te zijn voor een onverhoopt aanwezig individu van ringslang. Doden en verwonden dient hierbij te worden voorkomen. De werkzaamheden dienen in een richting te worden uitgevoerd en bij het aantreffen van een exemplaar dient deze zelfstandig te kunnen vluchten alvorens de werkzaamheden worden vervolgt.

4.1.5 Amfibieën

In de directe omgeving is de strikt beschermde rugstreeppad vastgesteld en in de verdere omgeving tevens heikikker (NDFF, 2021). Werkzaamheden vinden in het kader van het groot onderhoud hoofdzakelijk plaats op de bestaande weg waar geen geschikt habitat aanwezig is.

Ter plaats van de reconstructie t.h.v. de Spruitweg zijn gezien het waterrijke habitat met dichte oeverbegroeiing in potentie mogelijkheden voor amfibieën om te verblijven. Rugstreeppad komt doorgaans voor in pioniershabitat met tijdelijk, snel opwarmend water. Dit pioniershabitat is ter plaatse niet aanwezig waardoor met voldoende zekerheid kan worden gesteld dat deze soort niet binnen het plangebied aanwezig is.

Voor heikikker geldt dat op basis van de habitatkenmerken en de waarnemingen in de directe omgeving is het aannemelijk dat deze soort zich ook binnen het plangebied kan voorkomen. Aantasting van een vaste voortplantings- of rustplaats van heikikker is strijdig met artikel 3.5 uit de Wnb. Om eventuele aantasting en daarmee overtreding van verbodsbepalingen uit de Wnb te voorkomen, dienen maatregelen te worden getroffen.

Door het ontbreken van de specifieke eisen die strikt beschermde soorten amfibieën doorgaans stellen aan habitat, zijn overige vaste voortplantings- of rustplaatsen van deze soortgroep binnen het plangebied uitgesloten.

Maatregelen: Gezien de aanwezigheid van heikikker in de direct aangrenzende slootstructuren en het voor heikikker geschikte habitat binnen het plangebied, is het zeer aannemelijk dat de soort zich ook binnen de invloedsfeer van de ingreep bevindt. Ondanks dat de soort niet fysiek is vastgesteld in dit onderzoek is de kans op aanwezigheid dusdanig groot dat het geoorloofd er vanuit te gaan dat de soort werkelijk aanwezig is en een aanvullende onderzoek in de actieve periode van 2021 achterwegen te laten.

Derhalve dient een ontheffing Wet natuurbescherming ter worden aangevraagd. Ter onderbouwing van de aanvraag dient een activiteitenplan te worden opgesteld met hierin opgenomen de noodzakelijk te treffen mitigerende maatregelen.

4.1.6 Planten

Binnen en in de omgeving van het plangebied zijn geen waarnemingen bekend van streng beschermde soorten vaatplanten. Streng beschermde soorten stellen doorgaans specifieke eisen aan de groeiplaats. De huidige situatie is ter plaatse van het onderhoudstraject geheel verhard en kent ter plaatse van de reconstructie een agrarisch karakter waarbij kan worden gesteld dat op basis van dit habitat groeiplaatsen van streng beschermde soorten vaatplanten niet aanwezig zijn.

Maatregelen: geen.

4.1.7 Vissen

Op basis van bekende verspreidingsgegevens en het aanwezige habitat (alleen ter plaatse van de reconstructie t.h.v. de Spruitweg) is de aanwezigheid van streng beschermde soorten vissen binnen het plangebied uitgesloten.

Maatregelen: geen.

4.1.8 Vlinders en libellen

Streng beschermde soorten vlinders en libellen stellen specifieke eisen aan het habitat waaronder de aanwezigheid van waardplanten. Binnen het plangebied is dergelijk habitat niet aanwezig waardoor de aanwezigheid van beschermde vlinders en libellen binnen de invloedsfeer van de werkzaamheden wordt uitgesloten.

Maatregelen: geen.

4.1.9 Overige soorten

Van de overige soorten beschermde insecten, slakken en weekdieren zijn een groot aantal aan water gebonden. Van andere terrestrische soorten zijn beperkte verspreidingsgegevens in de literatuur aanwezig en zijn er geen waarnemingen van deze soorten bekend binnen en in de directe omgeving van het plangebied. Doorgaans stellen deze soorten specifieke eisen aan het habitat. De aanwezigheid van overige beschermde insecten, slakken en weekdieren wordt gezien de bekende verspreidingsgegevens en het ontbreken van geschikt habitat binnen het plangebied uitgesloten.

Maatregelen: geen.

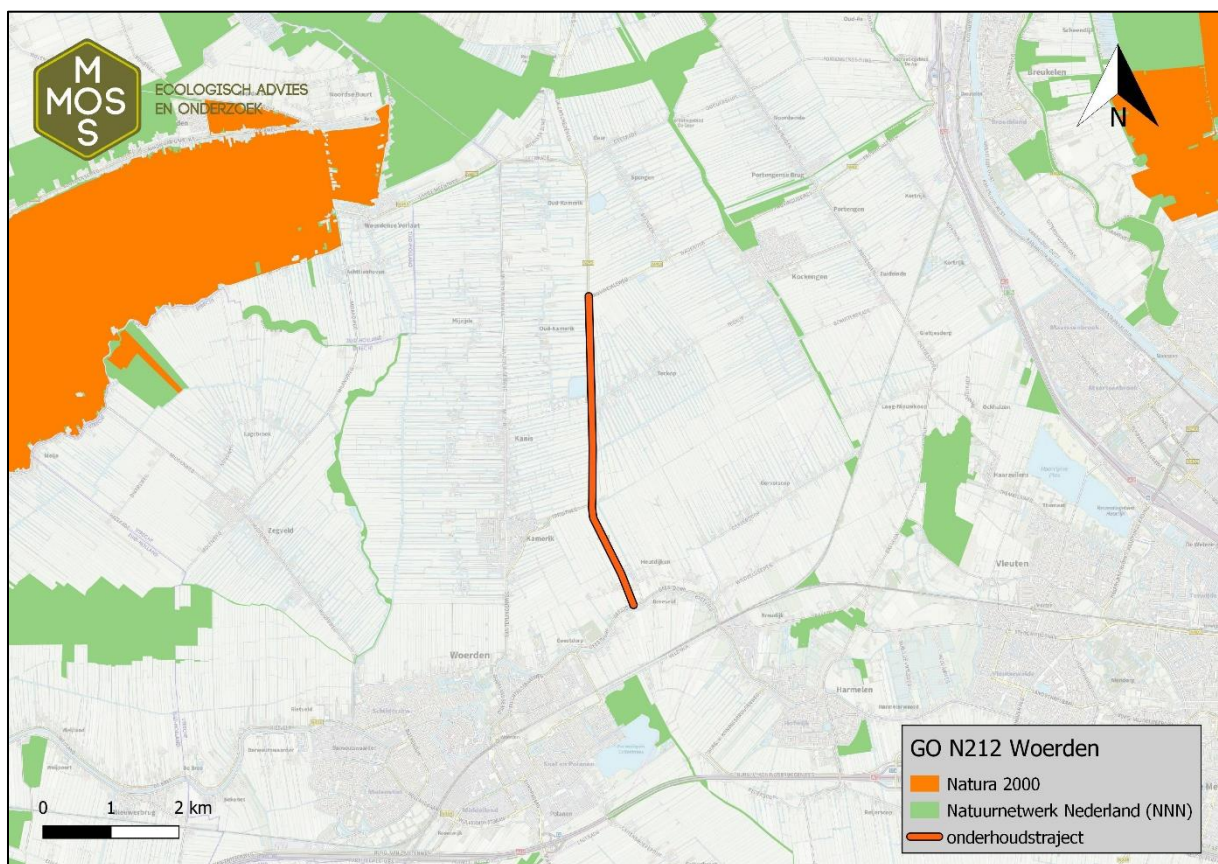
4.2 Gebiedsbescherming – Natura 2000

Het onderhoudstraject is gelegen op ruim 3.500 meter ten oosten van een gebied dat deel uitmaakt van het Natura 2000-gebied Nieuwkoopse Plassen & De Haeck (afbeelding 5).

Op basis van de afstand tot het betreffende Natura 2000-gebied en de aard van de ingreep worden negatieve gevolgen voor de instandhoudingsdoelstellingen van dit Natura 2000-gebied niet verwacht. Verder toetsing en of een vergunning aanvraag is niet noodzakelijk.

4.3 Natuurnetwerk Nederland (NNN)

Oppervlak NNN is gelegen op minimaal 1.000m ten zuiden van het onderhoudstraject evenals op ruimere afstand richting het oosten en westen (afbeelding 5). Op basis van de ligging van het onderhoudstraject buiten het NNN-gebied en de aard van de ingreep wordt aantasting van de kernkwaliteiten van het NNN uitgesloten. Nadere toetsing in het kader van het NNN is niet noodzakelijk.



Afbeelding 5. Locatie onderhoudstraject N212 ten opzichte van Natura 2000 en het NNN.

5 Samenvatting

In dit hoofdstuk zijn samengevat de raakvlakken van de voorgenomen werkzaamheden aan de N212 te Woerden met de Wet natuurbescherming, onderdelen soorten- en gebiedsbescherming evenals het Natuurnetwerk Nederland.

Soortenbescherming

Tabel I. Samenvatting toetsing Wnb onderdeel soortenbescherming werkzaamheden N212 te Woerden.

Soorten / Soortgroep	Functie	Effect	Maatregelen	Ontheffings-aanvraag/artikel
Broedvogels				
categorie 1t/m4	-	-	-	-
categorie 5 en algemene soorten	-	-	-	-
Vleermuizen				
diverse soorten	vliegroute langs aangrenzende watergangen	indirecte aantasting verblijfplaats(en) in de omgeving door verstoring werkverlichting	voorkomen aanlichten watergangen directe omgeving gedurende de actieve periode van vleermuizen (1 april-1 december)	nee art. 3.5
Grondgebonden zoogdieren				
waterspitsmuis	niet aanwezig o.b.v. eDNA onderzoek	-	-	-
Reptielen en amfibieën				
ringslang	incidenteel exemplaar watergang/oever reconstructielocatie Spruitweg	doden en verwonden tijdens dempwerkzaamheden	zorgplicht (artikel 1.1) bij aantreffen individu	nee art. 3.10
Amfibieën				
heikikker	vaste rust- en voortplantingsplaats watergang/oever reconstructielocatie Spruitweg	mogelijke vernietiging vast- rust of verblijfplaats	treffen van mitigerende maatregelen	ja* art. 3.5
Planten				
-	-	-	-	-
Vissen				
-	-	-	-	-
Vlinders en libellen				
-	-	-	-	-
Overige soorten				
-	-	-	-	-

* Maatregelen dienen te worden getroffen om de functie van de vaste rust- en/of voortplantingsplaats te garanderen. Deze maatregelen dienen te worden vastgelegd in een activiteitenplan en door middel van een ontheffingsaanvraag ter beoordeling te worden voorgelegd aan het bevoegd gezag.

Gebiedsbescherming-Natura 2000 en Natuurnetwerk Nederland (NNN)

Op basis van de afstand tot het meest nabijgelegen Natura 2000- en NNN-gebied en de aard van de ingreep wordt aantasting van de instandhoudingsdoelen van het Natura 2000 gebied en de kernkwaliteiten van het NNN uitgesloten. Nadere toetsing en/of een vergunningaanvraag wordt niet noodzakelijk geacht.

Bijlage 1 Wetgeving en beleid

Wet natuurbescherming

Sinds 1 januari 2017 is de Wet natuurbescherming (Wnb) van kracht. De provincies bepalen voor hun gebied het beleid met betrekking tot de natuur en zijn verantwoordelijk voor de vergunningen en ontheffingen. De Rijksoverheid is daarnaast verantwoordelijk voor ontheffingsaanvragen bij rijksprojecten, de gedragscodes en internationaal beleid. Ten aanzien van de Wnb zijn in het kader van ruimtelijke inrichting, ontwikkeling en ingrepen de volgende onderdelen van belang: de bescherming van soorten flora en fauna, gebieden (Natura 2000) en houtopstanden. Onderstaand wordt per onderdeel een globale toelichting gegeven.

Soortenbescherming

De Wnb kent een apart beschermingsregime voor soorten van de Vogelrichtlijn (artikel 3.1 Wnb), een apart beschermingsregime voor soorten van de Habitatrichtlijn, het Verdrag van Bern en het Verdrag van Bonn (artikel 3.5 Wnb) en een apart beschermingsregime voor andere soorten, die vanuit nationaal oogpunt beschermd worden (artikel 3.10 Wnb). Elk van deze beschermingsregimes kent zijn eigen verbodsbepalingen en vereisten voor vrijstelling of ontheffing van de verboden. Daarnaast heeft elke provincie voor de nationaal beschermde soorten een lijst opgesteld met soorten die in desbetreffende provincie zijn vrijgesteld.

Tabel 1: Verbodsbepalingen Vogelrichtlijn

Vogelrichtlijn Artikel 3.1 Wnb
1. Het is verboden opzettelijk van nature in Nederland in het wild levende vogels van soorten als bedoeld in artikel 1 van de Vogelrichtlijn te doden of te vangen. 2. Het is verboden opzettelijk nesten, rustplaatsen en eieren van vogels als bedoeld in het eerste lid te vernielen of te beschadigen, of nesten van vogels weg te nemen. 3. Het is verboden eieren van vogels als bedoeld in het eerste lid te rapen en deze onder zich te hebben. 4. Het is verboden vogels als bedoeld in het eerste lid opzettelijk te verstoren. 5. Het verbod, bedoeld in het vierde lid, is niet van toepassing indien de storing niet van wezenlijke invloed is op de staat van instandhouding van de desbetreffende vogelsoort.
<u>Toelichting:</u> Het is mogelijk om ontheffing aan te vragen voor de genoemde verbodsbepalingen. Deze aanvraag wordt getoetst op de volgende aspecten: – Er is geen andere bevredigende oplossing (alternatievenafweging); – Aanwezigheid geldig wettelijk belang conform Vogelrichtlijn waaronder: 'in het belang van de volksgezondheid of openbare veiligheid'; – Er is geen verslechtering van de staat van instandhouding van de desbetreffende soort.

Alle broedvogels in Nederland zijn gedurende het broedseizoen beschermd (art 3.1 en 3.5 Wnb) en in sommige gevallen ook buiten deze periode. Hierbij wordt door het bevoegd gezag onderscheid gemaakt tussen soorten uit de beschermingscategorie 1 t/m 4: jaarrond beschermde nesten (verblijfplaatsen van vogels die hun verblijfplaats het hele jaar gebruiken), categorie 5: niet-jaarrond beschermde vogelnesten (verblijfplaatsen van vogels die regelmatig naar hun verblijf terugkeren en over voldoende flexibiliteit beschikken en 'overige soorten' (vogels die jaarlijks een nieuw nest maken dat alleen in het broedseizoen beschermd is). Na gelang de beschermingsstatus van het nest dienen maatregelen te worden getroffen om de functie van de nestlocatie te behouden. Provincies kunnen ook hier eigen beleid voeren ten aanzien van de categorisering van soorten. Dit geldt o.a. voor de provincies Limburg en Overijssel.

Tabel 2: Verbodsbepalingen Habitatrichtlijn

Habitatrichtlijn Artikel 3.5 Wnb	
1.	Het is verboden in het wild levende dieren van soorten, genoemd in bijlage IV, onderdeel a, bij de Habitatrichtlijn, bijlage II bij het Verdrag van Bern of bijlage I bij het Verdrag van Bonn, in hun natuurlijk verspreidingsgebied opzettelijk te doden of te vangen.
2.	Het is verboden dieren als bedoeld in het eerste lid opzettelijk te verstoren.
3.	Het is verboden eieren van dieren als bedoeld in het eerste lid in de natuur opzettelijk te vernielen of te rapen.
4.	Het is verboden de voortplantingsplaatsen of rustplaatsen van dieren als bedoeld in het eerste lid te beschadigen of te vernielen.
5.	Het is verboden planten van soorten, genoemd in bijlage IV, onderdeel b, bij de Habitatrichtlijn of bijlage I bij het Verdrag van Bern, in hun natuurlijke verspreidingsgebied opzettelijk te plukken en te verzamelen, af te snijden, te onwortelen of te vernielen.
<u>Toelichting:</u> Onder de Wnb geldt dat het voor streng beschermde soorten zoals opgenomen in artikel 3.5 mogelijk is om bij ruimtelijke ontwikkelingen te werken volgens een door de minister goedgekeurde gedragscode. Hierbij geldt een vrijstelling van de verbodsbepalingen uit artikel 3.5. Naast het werken volgens een goedgekeurde gedragscode kan voor soorten zoals opgenomen in artikel 3.5 van de Wnb bij overtreding van de verbodsbepalingen een ontheffing worden aangevraagd. De aanvraag wordt beoordeeld op de volgende aspecten: – Er is geen andere bevredigende oplossing (alternatievenafweging); – Aanwezigheid geldig wettelijk belang conform Habitatrichtlijn waaronder: 'in het belang van de volksgezondheid, de openbare veiligheid of andere dwingende redenen van groot openbaar belang, met inbegrip van redenen van sociale of economische aard en met inbegrip van voor het milieu wezenlijke gunstige effecten'; – Er wordt geen afbreuk gedaan aan het streven de populaties van de betrokken soort in hun natuurlijke verspreidingsgebied in een gunstige staat van instandhouding te laten voortbestaan.	

Tabel 3: Verbodsbepalingen Andere soorten

Andere soorten Artikel 3.10 Wnb	
1.	Onverminderd artikel 3.5, eerste, vierde en vijfde lid, is het verboden:
a.	in het wild levende zoogdieren, amfibieën, reptielen, vissen, dagvlinders, libellen en kevers van de soorten, genoemd in de bijlage, onderdeel A, bij deze wet, opzettelijk te doden of te vangen;
b.	de vaste voortplantingsplaatsen of rustplaatsen van dieren als bedoeld in onderdeel a opzettelijk te beschadigen of te vernielen, of
c.	vaatplanten van de soorten, genoemd in de bijlage, onderdeel B, bij deze wet, in hun natuurlijke verspreidingsgebied opzettelijk te plukken en te verzamelen, af te snijden, te onwortelen of te vernielen.
<u>Toelichting:</u> Voor deze soorten geldt een vrijstelling wanneer aantoonbaar gewerkt wordt volgens een door de minister goedgekeurde gedragscode. Naast het werken volgens een goedgekeurde gedragscode kan voor soorten uit de categorie 'andere soorten' van de Wnb bij overtreding van de verbodsbepalingen een ontheffing worden aangevraagd. De aanvraag wordt beoordeeld op de volgende aspecten: – Er is geen andere bevredigende oplossing (alternatievenafweging); – Aanwezigheid geldig wettelijk belang waaronder: 'in het algemeen belang'; – Er wordt geen afbreuk gedaan aan het streven de populaties van de betrokken soort in hun natuurlijke verspreidingsgebied in een gunstige staat van instandhouding te laten voortbestaan.	

Gebiedsbescherming (Natura 2000)

De gebiedsbescherming is vastgelegd in artikel 2.1 t/m 2.11 van de Wnb. Natuurgebieden of andere gebieden die belangrijk zijn voor flora en fauna kunnen aangewezen worden als Europese Vogelrichtlijn en/of Habitatrichtlijngebieden (Natura 2000). De verplichtingen uit de Vogel- en Habitatrichtlijngebieden zijn in Nederland opgenomen in de Wnb. Op grond van deze wet is het verboden projecten of andere handelingen te realiseren of te verrichten die, gelet op de instandhoudingsdoelstelling, de kwaliteit van de natuurlijke habitattypen en de habitats van soorten kunnen verslechteren, of een verstorend effect kunnen hebben op de soorten waarvoor het gebied is aangewezen. Voor activiteiten of projecten die schadelijk kunnen zijn voor de beschermde natuur geldt een vergunningplicht. Deze vergunningen worden verleend door de provincies of door de minister van EZ.

Voortoets

Bij plannen in, of in de nabijheid (externe werking) van, een Natura 2000-gebied dienen initiatiefnemers in een oriënterende fase (voortoets) in overleg met het bevoegd gezag te onderzoeken of het plan een significant negatief effect op de instandhoudingsdoelstellingen van het betreffende Natura 2000-gebied kan hebben. De voortoets geeft een aanwijzing over de mogelijke negatieve effecten voor Natura 2000-gebieden. In de voortoets verzamelt de initiatiefnemer op hoofdlijnen informatie over de mogelijke gevolgen van zijn activiteiten voor de beschermde natuurgebieden. Hierbij wordt onder andere gebruik gemaakt van de 'effectenindicator' van het ministerie. Die informatie wordt ter beoordeling bij de provincie aangeleverd die vervolgens komt tot een van de volgende uitspraken:

- Er is zeker geen effect. In dat geval heeft de initiatiefnemer geen vergunning nodig en kan hij verder gaan met zijn activiteiten of doorgaan met een aanvraag omgevingsvergunning.
- Indien er een kans is op significant negatieve effecten geldt een vergunningplicht voor projecten (art. 2.7, lid 2 Wnb) op basis van een Passende Beoordeling.

Passende beoordeling

Een passende beoordeling is erop gericht om, op basis van de beste wetenschappelijke kennis, alle aspecten van het plan of project te inventariseren - die op zichzelf of in combinatie met andere activiteiten of plannen - de instandhoudingsdoelstellingen van Natura 2000- gebieden in gevaar kunnen brengen. Daarbij dienen ook, indien noodzakelijk, de mitigerende maatregelen te worden betrokken. Wanneer uit de passende beoordeling alsnog de zekerheid wordt verkregen dat de activiteit niet leidt tot significant negatieve effecten, kan de activiteit doorgang vinden. Om bij mogelijk significant negatieve gevolgen toch een plan te kunnen vaststellen of een vergunning te kunnen verlenen dient te worden voldaan aan de "ADC-criteria". Dit betekent dat:

- A – alternatieve oplossingen voor het plan ontbreken;
- D – er dwingende redenen van groot openbaar belang zijn, en
- C – de initiatiefnemer compenserende maatregelen vooraf en tijdig treft.

Zorgplicht

De Wnb gaat uit van de *zorgplicht* (artikel 1.11 Wnb). De zorgplicht houdt in dat een ieder voldoende zorg in acht dient te nemen voor de in het wild levende dieren en planten en voor hun directe leefomgeving.

Tabel 4: Zorgplicht Wet natuurbescherming

Zorgplicht (artikel 1.11 Wnb)	
1.	Een ieder neemt voldoende zorg in acht voor Natura 2000-gebieden, bijzondere nationale natuurgebieden en voor in het wild levende dieren en planten en hun directe leefomgeving.
2.	De zorg, bedoeld in het eerste lid, houdt in elk geval in dat een ieder die weet of redelijkerwijs kan vermoeden dat door zijn handelen of nalaten nadelige gevolgen kunnen worden veroorzaakt voor een Natura 2000-gebied, een bijzonder nationaal natuurgebied of voor in het wild levende dieren en planten:
a.	dergelijke handelingen achterwege laat, dan wel,
b.	indien dat achterwege laten redelijkerwijs niet kan worden gevergd, de noodzakelijke maatregelen treft om die gevolgen te voorkomen, of
c.	voor zover die gevolgen niet kunnen worden voorkomen, deze zoveel mogelijk beperkt of ongedaan maakt.

Natuurnetwerk Nederland (NNN)

Het Natuurnetwerk Nederland (NNN) is het Nederlands netwerk van bestaande en nieuw aan te leggen natuurgebieden. Het nationaal beleid met betrekking tot de gebiedsbescherming van het Natuurnetwerk Nederland is vastgelegd in de Structuurvisie Infrastructuur en Ruimte (SVIR). De rijksoverheid heeft de bruto begrenzing van het NNN vastgesteld, de provincies zijn bevoegd om dit netto te begrenzen. De juridische borging van de nationale ruimtelijke belangen die in de SVIR worden aangewezen vindt plaats via het Besluit algemene regels ruimtelijke ordening (Barro).

'Nee, tenzij' principe

Voor NNN-gebieden geldt dat het natuurbelang prioriteit heeft en dat andere activiteiten niet mogen leiden tot aantasting van de natuurdoelen. Voor het NNN geldt het 'nee, tenzij' principe. Dit betekent dat nieuwe plannen of projecten niet zijn toegestaan als deze oppervlak of de wezenlijke kenmerken en (potentiële) waarden van het NNN significant aantasten. Uitzonderingen hierop zijn wanneer sprake is van redenen van groot openbaar belang en er geen reële alternatieven zijn buiten het gebied dat deel uitmaakt van de NNN. De schade dient in dat geval door mitigerende maatregelen zoveel mogelijk beperkt te worden. De restschade dient te worden gecompenseerd. Bij het NNN is geen sprake van externe werking.

Bijlage 2 Nader onderzoek waterspitsmuis

eDNA onderzoek waterspitsmuis



Colofon

Titel	eDNA onderzoek waterspitsmuis
Tekst, foto's en samenstelling	K. van Bochove, J. Rook
In opdracht van	Mos Ecologisch Advies en Onderzoek
Naam opdrachtgever	Jeroen Mos
Rapportnummer	RA21188
Datum oplevering rapport	18 november 2021
Aantal pagina's	7
Wijze van citeren	van Bochove K., J. Rook 2021. eDNA onderzoek waterspitsmuis Rapport RA21188, Datura, Wageningen.



Datura Molecular Solutions BV

Gevestigd te:

Agro Bussiness Park 10
6708 PW Wageningen
Nederland

0031(0)643288093
www.datura.nl
suzan.roemaat@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 vals positieve waarnemingen worden voorkomen	5
2.3.2 Hoe vals negatieve waarnemingen worden voorkomen (qPCR)	6
3. Resultaten	7

1. Doelstelling

De doelstelling van onderhavig onderzoek is het aantonen van de aan- of afwezigheid van waterspitsmuis (*Neomys fodiens*) aan de hand van (e)DNA onderzoek. Hiervoor is gebruik gemaakt van bodemmonsters. Dit onderzoek is uitgevoerd in opdracht van Mos Ecologisch Advies en Onderzoek.

2. Methode

2.1 Bemonstering

De bemonstering is uitgevoerd door een medewerker van Mos Ecologisch Advies en Onderzoek. In totaal zijn er 2 bodemmonsters geleverd aan het laboratorium van Datura Molecular Solutions B.V..

Tabel 1. monsterinformatie

Monster nummer	Type	Locatie
60649	Bodem	Zone Zuid
60653	Bodem	Zone Noord

2.2 Laboratoriumanalyse

De monsters zijn getest op de aanwezigheid van eDNA van waterspitsmuis. 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 geïnhibeerd wordt door storende stoffen. Tenslotte wordt het eDNA gedetecteerd met behulp van een real-time quantitative PCR.

1. Het eDNA in het bodemmonster is geëxtraheerd met behulp van de Qiagen Dneasy Blood & Tissue kit. Storende stoffen als humuszuren kunnen detectie van het eDNA inhiberen wat kan leiden tot vals negatief resultaat. 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 geïnhibeerd 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 geïnhibeerd 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 DNA van de doelsoort vermenigvuldigen. Datura werkt gebruikt bovendien een soort-specifieke probes (een soort primer)

die uitsluitend binden aan eDNA van de doelsoort. Binding van de probe aan het vermenigvuldigde eDNA van de doelsoort 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 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 vals positieve waarnemingen worden voorkomen

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 vrijwel niet optreden.

Het voorkomen van vals 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 (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 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 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 geen slotwater 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 vals negatieve waarnemingen worden voorkomen (qPCR)

Naast vals positieve waarnemingen kunnen ook vals 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 vals negatieve waarnemingen aanzienlijk verkleind worden. Maatregelen die genomen worden om vals 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 geïnhibeerd** wordt door storende stoffen. Indien dit het geval is wordt er een **extra zuiveringstap** uitgevoerd. Vervolgens wordt nogmaals getest of de inhiberende stoffen er inderdaad geen inhibitie meer optreedt (zie methode voor een uitgebreidere beschrijving);

5. Er wordt altijd een **positieve controle** van de doelsoort DNA 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.

3. Resultaten

In de bodemonsters is geen eDNA van waterspitsmuis gedetecteerd. Een overzicht van het resultaat van dit onderzoek wordt weergegeven in tabel 2.

Iedere analyse is uitgevoerd met behulp van 12 qPCR 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 waterspitsmuis in het betreffende monster. Indien er een score van "0/12" is verkregen, betekent dit dat er geen eDNA van de doelsoort in het betreffende monster is aangetroffen. Indien er minstens 1 positieve replica is in een monster (i.e. '1/12' of hoger) 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 (e.g. '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, werd naar verwachting wel geamplificeerd. Dit geeft aan dat de analyse juist is uitgevoerd.

Tabel 2: Resultaten qPCR analyses.

Monsternummer	Type	Resultaat
60649	Bodem	0/12
60653	Bodem	0/12