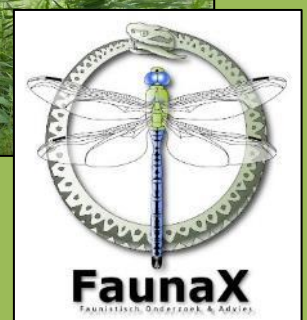
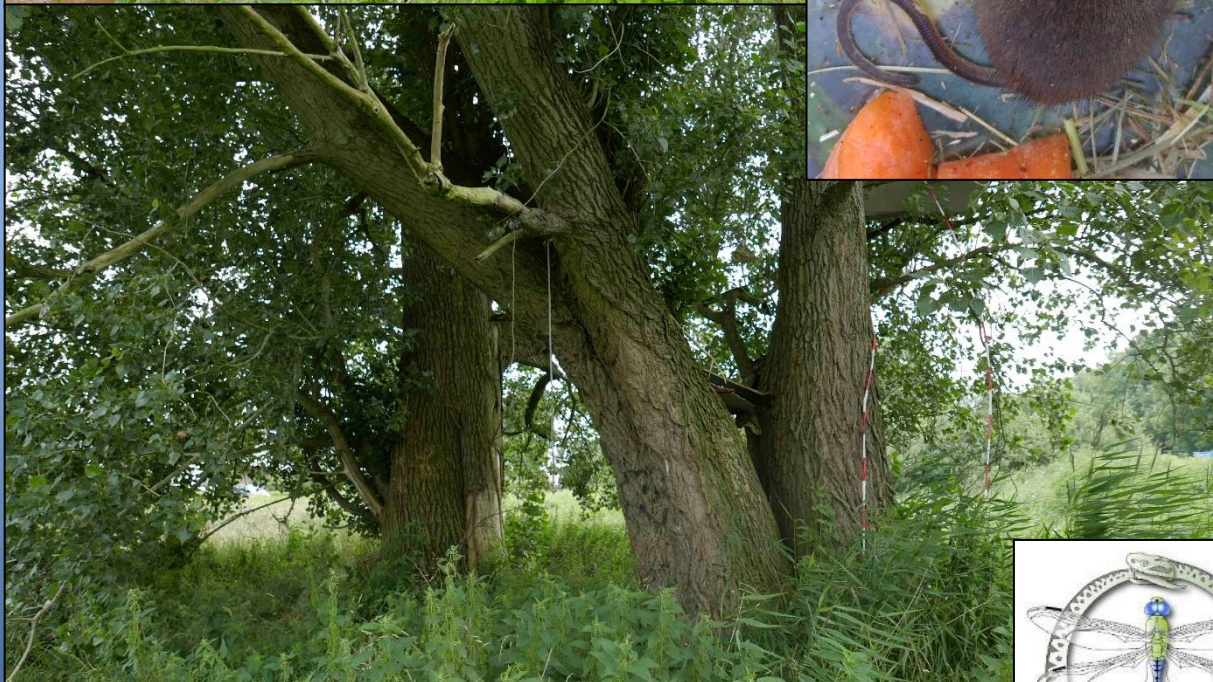


Toetsing Wet natuurbescherming (Wnb)

Ecologisch nader onderzoek nieuwbouw Tjalling Koopmans College aan de Reidroas te Hurdegaryp



COLOFON



BUREAU FAUNAX

Badweg 40 B
8401 BL Gorredijk

0513-435024

info@faunax.nl

www.faunax.nl

Lid van Netwerk Groene Bureaus



Toetsing Wet natuurbescherming

Ecologisch nader onderzoek nieuwbouw Tjalling Koopmans College aan de Reidroas te Hurdegaryp

Gorredijk, oktober 2017

In opdracht van:
Plannen-makers

Contactpersoon:
Dhr. C. Vaartjes

Uitvoering:
Bureau FaunaX

Veldwerk:
Mevr. S.A. Mulder & dhr. J. Groen

Rapportage:
Mevr. S.A. Mulder

Autorisatie:
Mevr. W. de Boer-Pronk

Foto voorpagina:
Impressie van het plangebied

© Bureau FaunaX. Gebruik en overname van gegevens alleen toegestaan met volledige bronvermelding:
Bureau FaunaX (2017). Toetsing Wet natuurbescherming. Ecologisch nader onderzoek nieuwbouw Tjalling Koopmans College aan de Reidroas te Hurdegaryp. Rapport 17102, Bureau FaunaX, Gorredijk.

Disclaimer: In deze rapportage worden de resultaten van een onafhankelijk onderzoek behandeld. Bureau FaunaX heeft een adviserende rol en spreekt zich niet uit over de wenselijkheid van het plan waarop dit onderzoek betrekking heeft. Dit onderzoek is zo zorgvuldig en nauwkeurig mogelijk uitgevoerd. Het voorkomen van beschermde soorten is echter onvoorspelbaar. Aan dit rapport kunnen geen rechten worden ontleend. Op dit onderzoek zijn onze algemene voorwaarden van toepassing, zoals gedeponeerd bij de Kamer van Koophandel te Leeuwarden.

INHOUDSOPGAVE

1.	INLEIDING.....	1
1.1	Aanleiding	1
1.2	Ligging en karakteristiek van de planlocatie	1
2.	METHODIEK	2
2.1	Groene glazenmaker	2
2.2	Grote modderkruiper.....	4
2.3	Vleermuizen	4
2.4	Waterspitsmuis	5
3.	RESULTATEN	7
3.1	Groene glazenmaker	7
3.2	Grote modderkruiper.....	7
3.3	Vleermuizen	7
3.4	Waterspitsmuis	7
4.	SAMENVATTING EN CONCLUSIES	9
5.	BRONNEN EN LITERATUUR.....	10
	BIJLAGE I Plangrens (rood)en inrichting toekomstige situatie	11
	BIJLAGE II Rapportage eDNA onderzoek Datura	13

1. INLEIDING

1.1 Aanleiding

Het Tjalling Koopmans College, momenteel gevestigd aan de Easter Omwei 7 te Hurdegaryp, is voornemens een nieuwe schoolgebouw te realiseren aan de Reidroas. Met het oog op de realisatie van deze school moet een bestemmingsplanprocedure worden doorlopen. In het kader hiervan heeft Bureau FaunaX in opdracht van Plannen-makers een ecologische quickscan uitgevoerd naar de (potentieel) in het plangebied voorkomende, onder de Wet natuurbescherming (Wnb) beschermde, natuurwaarden (Bureau FaunaX, 2017). Uit dit onderzoek kwam naar voren dat binnen de invloedssfeer van de voorgenomen werkzaamheden de beschermde soorten groene glazenmaker, grote modderkruiper, vleermuizen en waterspitsmuis kunnen voorkomen. Omdat negatieve effecten op deze soorten derhalve niet op voorhand kunnen worden uitgesloten heeft Bureau FaunaX in september en oktober 2017 nader onderzoek naar het voorkomen van deze soorten uitgevoerd. Onderhavige rapportage geeft de resultaten van dit ecologisch nader onderzoek weer.

1.2 Ligging en karakteristiek van de planlocatie

Het plangebied bevindt zich aan de Reidroas in het noorden van Hurdegaryp in de gemeente Tytsjerksteradiel (provincie Fryslân). Ten noordwesten van het plangebied ligt de spoorlijn tussen Leeuwarden en Groningen (figuur 1.1). In de huidige situatie bestaat de locatie uit een sterk verruigd grasland met een hoogopgaande vegetatie van overjarige kruiden. Langs de noordzijde staan centraal in het plangebied twee oude populieren en meer naar het westen jonge opslag van wilg. Deze opslag bevindt zich langs de zuidzijde van een kwelsloot, die de scheiding van het plangebied met de Rijksstraatweg vormt. Deze sloot staat in directe verbinding met de zandwinplas ten westen van Hardegarijp, de Groote Wielen in het westen en het Ottema-Wiersmareservaat en Sippenfennen in het noorden.



Figuur 2.1. Krabbenscheer *Stratiotes aloides* in de kwelsloot langs de noordzijde van het plangebied.

Het onderzoek naar de aanwezigheid van de groene glazenmaker heeft bestaan uit een onderzoek aan de hand van environmentel DNA (eDNA). De eDNA methode is gebaseerd op het feit dat alle in het water levende dieren, waaronder libellen(larven), via faeces, huidcellen en urine DNA in het water achterlaten en hiermee traceerbaar zijn. Voordelen van eDNA ten opzichte van traditionele inventarisatietechnieken zijn dat het onderzoek minder intensief van aard is, er geen verstoring van de soort plaatsvindt en de methode voor veel soorten een hogere detectiekans heeft. Ook voor de detectie van eDNA van de groene glazenmaker is de methode een succesvolle gebleken (Herder, Termaat & Valentini, 2013). Met het oog op het aantonen van de aanwezigheid van deze libelle(larven) in de kwelsloot ten noorden van het plangebied is deze op vrijdag 8 september 2017 intensief bemonsterd (figuur 2.2). Hierbij is één sample genomen, bestaand uit 26 kleine subsamples die verspreid over de kwelsloot zijn verzameld. Deze subsamples zijn verzameld in een steriele samplingzak. Het verzamelde water is vervolgens gefilterd met behulp van een vacuümpomp, waarna het (eDNA bevattende) filter is overgebracht in een conserverende buffer (figuur 2.2). Hierin blijft het eDNA goed, totdat het sample in het laboratorium geanalyseerd wordt. De analyse van het sample is uitgevoerd door Datura Molecular Solutions BV in Leiden.



Figuur 2.2. Sampling eDNA groene glazenmaker en grote modderkruiper. Links filtratie slootwater met behulp van een vacuümpomp, rechts overdracht filter met eDNA in conserverende buffer.

2.2 Grote modderkruiper

De grote modderkruiper *Misgurnus fossilis* is een zeer kritische soort van stilstaand tot zeer langzaam stromend, ondiep water met een goed ontwikkelde modderlaag (10-30 cm dik met een harde ondergrond) en een structuurrijke vegetatie (Melis en Koopmans 2015). Vaak is er sprake van een kwelsituatie. De grote modderkruiper leeft solitair, maar van nature wel in grote aantallen betrekkelijk dicht bij elkaar. De kwelsloot langs de noordzijde van het plangebied vormt in potentie een geschikt habitat voor de soort. Ook deze soort kan worden aangetoond door middel van eDNA: in de afgelopen jaren is gebleken dat deze methode een meer betrouwbare methode vormt voor het aantonen van de grote modderkruiper dan traditionele vangstmethoden (Herder, Valentini & Kranenbarg, 2012, De Bruin et al, 2017). Dit eDNA onderzoek is tezamen met het onderzoek naar de groene glazenmaker uitgevoerd op 8 september 2017 (voor een uitgebreide omschrijving van de werkwijze, zie §2.1). De analyse van het sample is uitgevoerd door Datura Molecular Solutions BV in Leiden.

2.3 Vleermuizen

Bij de ecologische quickscan is het plangebied beoordeeld op mogelijk aanwezige waarden voor vleermuizen (Bureau FaunaX, 2017). Vanwege de grote hoogte van de oude populieren in het plangebied en de aanwezigheid van een dicht bladerdek konden deze bomen tijdens de quickscan niet volledig worden geïnspecteerd. Kleinschalige zomer- of paarverblijfplaatsen van individuele dieren, bijvoorbeeld in de vorm van kleine holtes of loszittend schors, konden derhalve niet op voorhand worden uitgesloten.

Het nader onderzoek naar de aanwezigheid van zomer- en/of paarverblijven van vleermuizen is uitgevoerd conform het Vleermuisprotocol (Vleermuisvakberaad, 2017). Dit onderzoek heeft uit twee avondbezoeken, op 4 en 25 september 2017. Conform het protocol bevond zich een periode van minimaal 10 dagen tussen beide bezoeken. Tabel 1.1 geeft een overzicht van de uitgevoerde inventarisatierondes. Voor de determinatie van vleermuizen is gebruikgemaakt van een batdetector van het type D240X Petterson, gecombineerd met opnameapparatuur en gespecialiseerde determinatiesoftware (het programma 'Batsound') en een lichtsterke zaklamp.

Tabel 1.1. Overzicht veldbezoeken nader onderzoek verblijfplaatsen vleermuizen Schoolstraat 7 en 7a.

Datum	Periode	Begin- eindtijd	Zon onder
04-09-2017	Paartijd – avond	21:30-23:40	20:18
25-09-2017	Paartijd - avond	19:50-21:50	19:28

2.4 Waterspitsmuis

De kwelsloot langs de noordzijde van het plangebied vormt mogelijk het leefgebied van de waterspitsmuis *Neomys fodiens*, een soort van schoon, zowel vrij snel stromend als stilstaand water met een goed ontwikkelde oevervegetatie en met oevers die ruig begroeid zijn, variërend van vochtige kruidenrijke vegetaties tot elzenbroekbos. Waterspitsmuizen leven vooral solitair en hebben hun eigen territoria veelal langs de waterkant (Broekhuizen et al, 2016). In Nederland heeft de waterspitsmuis een zeer versnipperde verspreiding, maar hij komt het meest voor in de waterrijke provincies Friesland en Overijssel. Het plangebied valt binnen het verspreidingsgebied van de waterspitsmuis en de oevers van de watergang binnen de invloedssfeer van de werkzaamheden. Op grond hiervan is nader onderzoek naar het voorkomen van de soort binnen het plangebied nodig geacht (Bureau FaunaX, 2017).

Het onderzoek naar de waterspitsmuis is uitgevoerd conform de de landelijke standaardmethodiek, opgesteld door de Zoogdierenvereniging en het Netwerk Groene Bureaus. Bij dit onderzoek wordt gewerkt met life-traps ofwel inloopvallen van het type Longworth-Heslinga. Hiermee worden kleine zoogdieren levend gevangen, zodat ze na onderzoek weer in vrijheid kunnen worden gesteld. Het verblijfsdeel van de val wordt bij het onderzoek gevuld met droog hooi en voer in de vorm van winterpeen en meelwormen (respectievelijk voor dieren met een plantaardig en dierlijk dieet). Dit voer dient zowel als lokmiddel als ter vergroting van de overlevingskansen van eenmaal gevangen dieren.

Het op de aanwezigheid van waterspitsmuis te onderzoeken gebied, het gedeelte van de kwelsloot dat parallel aan het plangebied (bijlage I) loopt, heeft een lengte van circa 100 à 150 m. Langs deze kwelsloot is één raai vallen uitgezet. Deze raai bestond uit 20 vallen, die paarsgewijs op een onderlinge afstand van ongeveer 10 m in de oever van de sloot zijn geplaatst. Door te werken met paarsgewijs geplaatste vallen wordt de kans verkleind dat algemene soorten alle vallen bezetten, waardoor minder algemene soorten gemist kunnen worden. Figuur 2.3 geeft een weergave van de locaties van de vallenparen; langs de noordwestzijde van het plangebied, tussen vallenpaar 1 en 2, maakte een dichte begroeiing van riet, wilgen en braam het plaatsen van vallen langs de watergang onmogelijk.

De vallen zijn op vrijdag 6 oktober geplaatst. Hierna hebben ze eerst gedurende twee dagen met lokaas 'open' gestaan, met geblokkeerd vangmechaniek. Op deze wijze kregen de muizen de mogelijkheid om te wennen aan de aanwezigheid van de nieuwe objecten in hun omgeving. Na deze zogenaamde prebait-periode zijn de vallen op zondagavond 8 oktober op scherp gezet en vervolgens van 8 tot en met 10 oktober vijf keer gecontroleerd: drie maal 's ochtends en twee maal 's avonds, met tussen de controles een periode van ongeveer 12 uur. Na iedere

controle zijn de vallen gecontroleerd en indien noodzakelijk bijgevuld met vers voer en/of droog hooi. In totaal zijn bij het onderzoek 100 vangkansen gecreëerd (20 vallen maal 5 bezoeken). De gevangen muizen zijn tot op soortniveau geïdentificeerd en vervolgens weer vrijgelaten. De vangsten zijn gedeeltelijk fotografisch gedocumenteerd.



Figuur 2.1. Locaties vallenparen onderzoek waterspitsmuis. Bron: www.bing.com/maps.

3. RESULTATEN

3.1 Groene glazenmaker

Er is bij de analyse van het sample door Datura Molecular Solutions BV in Leiden geen eDNA van groene glazenmaker aangetoond, het sample scoorde negatief op de soort. In bijlage II is de onderzoeksrapportage van de analyses door Datura bijgevoegd. Op grond van dit gegeven, aangevuld met het onbreken van vliegende imago's tijdens zowel de ecologische quickscan (3 augustus) en het bemonsteren van de kwelsloot op eDNA (8 september) in de vliegtijd van de soort, kan worden geconstateerd dat de kwelsloot geen leefgebied vormt voor de groene glazenmaker. Negatieve effecten ten gevolge van eventuele werkzaamheden aan deze watergangen zijn op deze soort niet van toepassing.

3.2 Grote modderkruiper

Uit de resultaten van het eDNA onderzoek komt ook naar voren dat de kwelsloot langs de noordzijde van het plangebied negatief scoort op de aanwezigheid van de grote modderkruiper (zie bijlage II). Dit leidt ook voor deze soort tot de conclusie dat er geen negatieve effecten optreden ten gevolge van eventuele werkzaamheden aan deze watergang en dat nader onderzoek, dan wel het aanvragen van een ontheffing bij het bevoegd gezag, niet van toepassing is.

3.3 Vleermuizen

Tijdens het avondbezoek van 4 september (zie tabel 1.1) zijn gewone dwergvleermuis *Pipistrellus pipistrellus* en ruige dwergvleermuis *Pipistrellus nathusii* foeragerend waargenomen boven de kwelsloot langs de noordzijde van het plangebied en de aanplant van zomereik langs de Rijksstraatweg. De gewone dwergvleermuis produceerde hierbij regelmatig sociale (balts)geluiden. Naast de gewone en ruige dwergvleermuis werd enkele malen een passerende rosse vleermuis *Nyctalus noctula* gehoord. Het tweede avondbezoek op 25 september gaf eenzelfde resultaat. Verondersteld wordt dat de gewone dwergvleermuis een (of meerdere) verblijfplaats(en) heeft in de kantoorpanden ten oosten van het plangebied dan wel in de bomen aan weerszijden van de Rijksstraatweg (buiten het plangebied). Het gedeelte van de kwelsloot ten oosten van de oude populieren wordt door gewone en ruige dwergvleermuis gebruikt als foerageergebied en vliegroute. Zowel deze watergang als de hierlangs aanwezige aanplant langs de Rijksstraatweg wordt ten gevolge van de voorgenomen plantonwikkeling echter niet wezenlijk aangetast, waardoor geen foerageergebied verdwijnt. Bovendien is er voldoende alternatief foerageergebied beschikbaar in de directe omgeving. In en direct rond de oude populieren is, anders dan een enkel passerend individu, geen activiteit van vleermuizen waargenomen. Verblijfplaatsen in de populieren kunnen worden uitgesloten. Op grond van deze waarnemingen kunnen negatieve effecten op (verblijfplaatsen van) vleermuizen worden uitgesloten. Nader onderzoek of het aanvragen van een ontheffing bij het bevoegd gezag is voor deze soortgroep niet nodig.

3.4 Waterspitsmuis

Bij het onderzoek naar de waterspitsmuis is de doelsoort bij geen van de controlerondes aangetroffen. Wel zijn diverse dwergmuizen *Micromys minutus* (minimaal 4 individuen maar vermoedelijk meer), een huisspitsmuis *Crocidura russula* (hervangst zelfde individu ronde 3 bij ronde 5) en een veldmuis *Microtus arvalis* in de vallen aangetroffen (tabel 3.1 en figuur 3.1). Op

grond van deze onderzoeksresultaten kan het voorkomen van de waterspitsmuis in de kwelsloot langs de noordzijde van het plangebied worden uitgesloten. Nader onderzoek of het aanvragen van een ontheffing bij het bevoegd gezag is voor deze soort niet nodig.

Tabel 3.1. Resultaten nader onderzoek waterspitsmuis met behulp van life-traps.

Soort	1 (ochtend)	2 (avond)	3 (ochtend)	4 (avond)	5 (ochtend)
Dwergmuis	2	4	2	2	3
Huisspitsmuis	-	-	1	-	1
Veldmuis	-	-	-	1	-



Figuur 3.1. Dwergmuis (links) en huisspitsmuis (rechts) in de inloopvallen bij het muizenonderzoek.

4. SAMENVATTING EN CONCLUSIES

Het Tjalling Koopmans College, momenteel gevestigd aan de Easter Omwei 7 te Hurdegaryp, is voornemens een nieuwe schoolgebouw te realiseren aan de Reidroas. In opdracht van Plannemakers heeft Bureau FaunaX ecologisch nader onderzoek uitgevoerd naar de aanwezigheid van de onder de Wnb beschermde groene glazenmaker, grote modderkruiper en waterspitsmuis in de kwelsloot langs de noordzijde van het plangebied, alsmede naar de aanwezigheid van zomer- en paarverblijfplaatsen van vleermuizen in de oude populieren in het plangebied. Geen van de doelsoorten is bij het nader onderzoek aangetroffen. Op grond van de uitkomsten van dit nader onderzoek en die van de ecologische quickscan (Bureau FaunaX, 2017) kan worden gesteld dat negatieve effecten op onder de Wnb beschermde soorten flora en fauna ten gevolge van de voorgenomen nieuwbouw aan de Reidroas te Hurdegaryp niet van toepassing zijn.

Wel geldt dat de overige aanbevelingen uit de ecologische quickscan onverminderd van toepassing zijn (Bureau FaunaX, 2017):

- Broedvogels: binnen het plangebied kunnen enkele algemeen voorkomende vogels tot broeden komen. Alle broedgevallen zijn onder de Wnb beschermd. Met de meeste broedvogels kan relatief eenvoudig rekening worden gehouden door de werkzaamheden buiten de broedtijd uit te voeren en/of wanneer concrete broedgevallen aanwezig zijn. Voor het broedseizoen wordt over het algemeen de periode 15 maart tot en met 15 juli aangehouden. Het broedseizoen is echter afhankelijk van klimatologische omstandigheden en kan zowel eerder als later beginnen, dan wel eindigen. Van belang is dat elk broedgeval beschermd is tot de jongen zelfstandig zijn uitgevlogen. Wanneer het niet mogelijk is om buiten het broedseizoen te werken, kan het gebied waar de werkzaamheden plaatsvinden ruim voor het broedseizoen ongeschikt worden gemaakt (en gehouden) voor broedvogels. Het plangebied moet dan wel direct voorafgaand aan de uitvoer van de werkzaamheden door een ter zake kundige worden gecontroleerd. Indien sprake blijkt van broedgevallen dan kan worden gekeken of locatiespecifieke maatregelen mogelijk zijn dan wel moeten de werkzaamheden worden uitgesteld tot er geen sprake meer is van broedgevallen.
- Zorgplicht: in de Wnb is een zorgplicht opgenomen. Deze schrijft voor dat men verplicht is om alles wat redelijkerwijze mogelijk is, te doen of juist te laten om schade aan wilde planten en dieren zoveel als mogelijk te voorkomen. Dit kan bijvoorbeeld tot uiting worden gebracht door altijd zo te werken, dat dieren kunnen ontsnappen en/of deze te verplaatsen naar een geschikt biotoop. Deze algemene zorgplicht geldt voor elke soort en elk individu in Nederland.

5. BRONNEN EN LITERATUUR

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.

Bruin A. de, F. Spikmans. J. Kranenbarg & J. Herder, 2017. Verspreidingsonderzoek grote modderkruiper Waterschap Rivierenland 2013 en 2016. Actualisatie verspreiding en strategie instandhouding. Stichting RAVON, Nijmegen.

Bureau FaunaX, 2017. Toetsing Wet natuurbescherming. Quicksan nieuwbouw Tjalling Koopmans College te Hurdegaryp. Rapport 17094, Bureau FaunaX, Gorredijk.

Herder, J., A. Valentini & J. Kranenbarg, 2012. Detectie van grote modderkruipers met Environmental DNA. *H₂O*, nummer 3 2012.

Herder, J., T. Termaat & A. Valentini, 2013. Environmental DNA als inventarisatiemethode van libellen. *Vlinders*, nummer 2 2013.

Melis, J. & M. Koopmans, 2015. *Fiskatlas Fryslân*, verspreiding en ecologie van de zoetwatervissen in Fryslân. Bornmeer, Gorredijk.

Vleermuisvakberaad, Netwerk Groene Bureaus en Zoogdiervereniging, 2017. Vleermuisprotocol 2017, maart 2017. www.netwerkgroenebureaus.nl en www.zoogdiervereniging.nl.

BIJLAGE I Plangrens (rood) en inrichting toekomstige situatie



project
**Nieuwbouw School voor
 Persoonlijk Onderwijs te Hurdergeryp
 Tjalling Koopmans College**
 opdrachtgever
**Stichting voor Persoonlijk Onderwijs
 Meeuwenlaan 134-136 te Amsterdam**
 omschrijving
Bestemmingsplankaart

Ziegler | Branderhorst
 stedenbouw en architectuur

Bestemmingsplan: 12	T: 020 271 048 1000
2014 G.P. Rotterdam	W: info@zieglerbranderhorst.nl
ontworpen:	SB, H.
198	198_01
type:	school
in:	24 april 2017
schaal:	1:500
1:500	7 juni 2017
formaat:	A3
A3	A4

BIJLAGE II Rapportage eDNA onderzoek Datura

eDNA onderzoek naar grote modderkruiper en groene glazenmaker



In opdracht van Bureau Faunax

Colofon

Titel	eDNA onderzoek naar grote modderkruiper en groene glazenmaker
Tekst, foto's en samenstelling	K. van Bochove
In opdracht van	Bureau FaunaX
Naam opdrachtgever	J. Groen
Rapportnummer	RA2017288
Datum oplevering rapport	21 september 2017
Aantal pagina's	7
Wijze van citeren	van Bochove K. 2017. eDNA onderzoek naar grote modderkruiper en groene glazenmaker. Rapport RA2017288, Datura, Wageningen
Laboratorium analist	J. Rook



Datura Molecular Solutions BV

Gevestigd te:
Johan Buziastraat 55
6708 NR Wageningen
Nederland

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

0031(o)629455328 www.datura.nl

Inhoudsopgave

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

1. Doelstelling

Vaststellen van de aan- of afwezigheid van eDNA van grote modderkruiper (*Misgurnus fosillis*) en groene glazenmaker (*Aeshna viridis*) in opdracht van Bureau FaunaX.

2. Methode

2.1 Sampling

De bemonstering is uitgevoerd door Bureau FaunaX.

2.2 Laboratorium analyse

De eDNA samples zijn geanalyseerd op de aanwezigheid van eDNA van grote modderkruiper en groene glazenmaker. Het analyseren van een eDNA sample vindt plaats in drie stappen. Eerst wordt het eDNA op het filter geconcentreerd en gezuiverd. Vervolgens wordt een controle analyse uitgevoerd om te testen of eDNA detectie in een sample eventueel geïnhibeerd wordt door storende stoffen. Tenslotte wordt het eDNA gedetecteerd met behulp van een real-time quantitative PCR.

1. Het eDNA is geëxtraheerd door middel van een phenol chloroform DNA extractie. Gedurende de extractie lost het filter op waardoor al het DNA vrij komt. Storende stoffen als humuszuren kunnen detectie van het eDNA inhiberen wat kan leiden tot vals negatief resultaat. Gedurende de extractie zijn deze inhiberende stoffen zo veel mogelijk verwijderd.
2. Er is een controle uitgevoerd om na te gaan of eDNA detectie in een sample geïnhibeerd wordt. Dit is gedaan door een bekende hoeveelheid van een fragment artificieel DNA toe te voegen. Vervolgens is de concentratie van dit fragment artificieel DNA gemeten. Dit is zowel gedaan in een reactie waar een hoeveelheid sample aan toegevoegd is, als in een reactie waar geen sample aan toegevoegd is. Als DNA detectie in een sample geïnhibeerd wordt, dan is de gemeten concentratie artificieel DNA in de reactie waarin sample toegevoegd wordt lager ten opzichte van de reactie waaraan geen sample toegevoegd is. Voornamelijk in zuur water, waarin veel organische deeltjes aanwezig zijn kan inhibitie optreden. In een dergelijk geval wordt een extra zuiveringsstap uitgevoerd of wordt het sample verdund. Vervolgens wordt opnieuw gekeken of de inhiberende stoffen voldoende verwijderd zijn.
3. Detectie van eDNA vindt plaats door middel van een real-time kwantitatieve PCR (qPCR). Het principe achter deze techniek is dat een specifiek deel van het DNA zeer vaak vermenigvuldigd (geamplificeerd) wordt. Datura maakt gebruik van soort-specifieke primers die uitsluitend DNA van de doelsoort vermenigvuldigen. Bovendien wordt een soort-specifieke probe gebruikt (een soort primer) die uitsluitend bindt aan eDNA van de doelsoort. Binding van de probe aan het vermenigvuldigde eDNA van de doelsoort veroorzaakt een fluorescent signaal. Dit signaal wordt gedetecteerd met behulp van een qPCR platform (CFX96 Touch™ van Bio-Rad). De qPCR detectie wordt uitgevoerd met 12 replica's. Het aantal positieve replica's is een indicatie voor de

concentratie eDNA. Het is echter (vooralsnog) niet mogelijk om op basis van de concentratie van eDNA de populatiedichtheid te bepalen. De qPCR detectie wordt uitgevoerd met de TaqMan® Environmental Mastermix 2.0 (Life Technologies®). Naast het eDNA sample worden qPCR reacties uitgevoerd waaraan geen sample is toegevoegd. Deze moeten negatief zijn. Zodoende kan bevestigd worden dat de analyse schoon is uitgevoerd en er geen contaminatie optreedt. Tenslotte worden ook enkele reacties geanalyseerd waaraan een bekende concentratie DNA is toegevoegd. Deze reacties moeten positief zijn. Dit bevestigt dat de analyse juist is uitgevoerd.

2.3 Kwaliteitswaarborging

2.3.1 Hoe vals positieve waarnemingen voorkomen worden

Het optreden van zowel vals positieve als vals negatieve waarnemingen wordt tot het minimum beperkt. Vals positieve waarnemingen kunnen op drie manieren ontstaan:

- De gebruikte primers en de probe zijn niet specifiek;
- Er vindt contaminatie plaats in het laboratorium;
- Er vindt contaminatie plaats in het veld.

Hieronder wordt aangegeven hoe vals positieve waarnemingen voorkomen worden. Omdat de kans op vals positieve waarnemingen zeer klein is, kunnen we niet exact kwantificeren hoe groot de kans daadwerkelijk is. Datura kan daarom niet 100 % zeker garanderen dat vals positieve waarnemingen nooit optreden. In de praktijk (middels validatie studies) nemen we echter geen vals positieve waarnemingen waar. Het is daarom aannemelijk dat vals positieve waarnemingen niet optreden.

Hoe het optreden vals positieve waarnemingen voorkomen wordt door degelijk ontwerp en validatie van specifieke primers en probes:

1. Er wordt gebruik gemaakt van een **2-staps** qPCR protocol, hetgeen de kans op aspecifieke detectie verkleint;
2. Gebruik van zeer **specifieke primers** waarmee uitsluitend eDNA van de doelsoort gedetecteerd kan worden. De primers zijn ontwikkeld met behulp van specialistische software;
3. Een qPCR detectie wordt uitgevoerd met behulp van een zeer specifieke **probe**. Deze probe hecht uitsluitend aan DNA van de doelsoort, hetgeen resulteert in een fluorescent signaal;
4. De primers en de probe zijn in het laboratorium getest. Eerst is getest of de qPCR detectie inderdaad negatief resultaat geeft na het toevoegen van DNA van (verwante) vissoorten;

Vervolgens is de methode **gevalideerd** door het testen van veldsamples. Er zijn eDNA samples verzameld op locaties waar de doelsoort niet voorkomt. Er werd geen eDNA gedetecteerd in deze samples. Zodoende kon aangetoond worden dat de methode niet resulteert in positieve detectie als de doelsoort niet aanwezig is.

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

1. Verschillende onderdelen van de analyse workflow worden uitgevoerd in fysiek gescheiden laboratorium ruimtes. Het samenstellen van de eDNA sample kits en het voorbereiden van de qPCR reagentia vindt plaats in een **DNA clean room**. Dit is een ruimte waarin geen DNA samples aanwezig zijn. Zodoende kunnen we garanderen dat er geen DNA aanwezig is in de eDNA sample kits en de reagentia (zoals de primers en probes) die later gebruikt worden in de eDNA analyses. Het extraheren van de eDNA samples gebeurt in een **pre-PCR laboratorium**. Dit is een ruimte waarin uitsluitend lage concentraties DNA aanwezig zijn. Vervolgens worden hier de eDNA samples samen met de qPCR reagentia in een 96-well plaat gepipetteerd. Deze plaat wordt luchtdicht afgesloten. Tenslotte wordt de qPCR uitgevoerd in een **post-PCR laboratorium**. In dit laboratorium wordt het eDNA vermeerderd en hier zijn dus hoge concentraties DNA aanwezig.

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

2. Er wordt een **unidirectionele workflow** gehanteerd om contaminatie van de DNA clean room en het pre-PCR laboratorium te voorkomen. Dit houdt in dat materialen die eenmaal in het post-PCR laboratorium geweest zijn niet meer terug mogen naar de DNA clean room en het pre-PCR laboratorium. Ook mogen medewerkers van Datura niet dezelfde dag van een post-PCR laboratorium terug naar de DNA clean room en het pre-PCR laboratorium.
3. In iedere analyse worden **controle analyses** uitgevoerd. Zo worden er samples geëxtraheerd waaraan geen slootwater wordt toegevoegd (zogenaamde extractie controles). In de qPCR worden naast de extractie controles ook negatieve PCR controles meegenomen. Zodoende kan heel nauwkeurig gemonitord worden of er inderdaad geen contaminatie optreed.

Om contaminatie in het veld te voorkomen worden de volgende maatregelen genomen:

1. Het **sampling protocol** van Datura wordt gevolgd. Dit protocol schrijft een specifieke werkwijze voor. In de praktijk is gebleken dat er geen contaminatie plaats vindt als dit protocol gevolgd wordt;
2. Er dient rekening gehouden te worden met **waterverplaatsingen**. De sampling wordt daarom uitgevoerd op een moment dat er weinig stroming is. Zo worden eDNA samples niet verzameld direct na (hevige) regenval. Ook wordt er rekening gehouden met kunstmatig opgewekte stroming, bijvoorbeeld bij wisseling van zomer- naar winterpeil.

2.3. 2. Hoe vals negatieve waarnemingen voorkomen worden

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

1. Per sample worden **26 subsamples** verzameld. Hiermee wordt de kans vergroot dat eDNA in het sample terecht komt.

2. Een zeer gevoelige **qPCR detectie** wordt uitgevoerd met behulp van **12 replica's**. Wanneer minder replica's uitgevoerd worden kan er minder gevoelig gedetecteerd worden. Meer dan 12 qPCR replica's leidt echter niet tot gevoeliger detectie;
3. Gebruik van een **zeer korte merker** van maximaal 100 basepaar;
4. Van ieder sample wordt **vastgesteld of de qPCR detectie geïnhibeerd** wordt door storende stoffen. Indien dit het geval is wordt er een **extra zuiveringstap** uitgevoerd. Vervolgens wordt nogmaals getest of er inderdaad geen inhibitie meer optreedt (zie methode voor een uitgebreidere beschrijving);
5. Er wordt altijd een **positieve controle** reactie van doelsoort DNA meegenomen in de qPCR detectie. Deze controle reactie moet altijd resulteren in positieve detectie. Ook als alle samples negatief zijn, kan zodoende vastgesteld worden dat de detectie juist is uitgevoerd.

3. Resultaten

Er is geen eDNA van grote modderkruiper of groene glazenmaker aangetoond (tabel 1).

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

Humuszuren kunnen een qPCR reactie inhiberen wat kan leiden tot vals negatief resultaat. Daarom wordt altijd een interne controle mee geanalyseerd om vast te stellen of er sprake is van inhibitie. Er werd een significante afwijking gevonden in de Cq-waarde. De Cq-waarde van de interne controles waar een sample aan toegevoegd is ten opzichte van de reacties waar geen sample aan toegevoegd is waren hoger. Het sample is om deze reden 2x verdund.

Samenvattend, de eDNA analyses zijn met succes uitgevoerd. Er is geen eDNA van grote modderkruiper of groene glazenmaker aangetoond.

Tabel 1. Resultaten van eDNA analyse.

Sample nummer	Aantal positieve reacties grote modderkruiper	Aantal positieve reacties groene glazenmaker
2965	0/12	0/12