

Aanvullend natuuronderzoek hoogspanningsstation Simonshaven 380kV

Soortgerichte onderzoeken naar potentieel jaarrond beschermde nesten (boomvalk, buizerd en slechtvalk), bever en noordse woelmuis in het kader van de Wet natuurbescherming



Sweco Nederland B.V.
Onderwerp

Natuuronderzoek
hoogspanningsstation
Simonshaven

Projectnummer

51010255

Klant

TenneT TSO B.V.

Versie

D0

Datum

05-10-2023

Auteur

Barry van der Veeke

Document referentie

NL23-648800269-54723

Gecontroleerd door

Raisja Spijker

Vrijgegeven door

Pauline Maas

Inhoudsopgave

1	Inleiding	4
1.1	Aanleiding	4
1.2	Doel	4
2	Planbeschrijving	5
2.1	Ligging plangebied	5
2.2	Voorgenomen werkzaamheden/ activiteiten	5
3	Onderzoeksmethodiek	7
3.1	Jaarrondbeschermde nestenonderzoek	7
3.2	Bever	8
3.3	Noordse woelmuis	9
4	Resultaten en effectbeoordeling	10
4.1	Nestenonderzoek	10
4.1.1	Resultaten	10
4.1.2	Effectbeoordeling	12
4.2	Bever	14
4.2.1	Resultaten	14
4.2.2	Effectbeoordeling	15
4.3	Noordse woelmuis	15
4.3.1	Resultaten	15
4.3.2	Effectbeoordeling	16
5	Conclusie	18
5.1	Algehele conclusie	18
5.2	Nestenonderzoek	19
5.3	Bever	19
5.4	Noordse woelmuis	19
5.5	Vervolgstappen	19
	Referenties	21

Bijlage 1: Samenvatting Verkennend natuuronderzoek station Simonshaven 380kV

Bijlage 2: Toetsingskader Wnb: soortenbescherming

Bijlage 3: Onderzoek Datura eDNA Bodemsampling

1 Inleiding

1.1 Aanleiding

TenneT TSO B.V. (hierna TenneT) is voornemens tot de aansluiting van het windpark IJmuiden Ver Beta en Gamma op het landelijke hoogspanningsnet. Om deze aansluiting te kunnen realiseren is het noodzakelijk dat hoogspanningsstation Simonshaven 380kV (SMH380) schakelbaar wordt gemaakt.

Om aan de transportcapaciteit -met name naar Botlek en Pernis- te voldoen is tevens de realisatie van een 150kV-pocket in dat gebied nodig die gevoed wordt door SMH380. Onderdeel van het realiseren van deze zogenaamde 'loadpocket' is de bouw van drie transformatoren op hoogspanningsstation SMH380 en drie verbindingen tussen deze transformatoren en stations Botlek en Geervliet - Noorddijk.

In de rapportage 'Verkennd Natuuronderzoek station Simonshaven 380kV' is reeds inzichtelijk gemaakt welke beschermde soorten(groepen) aanwezig of te verwachten zijn binnen het projectgebied en/of de invloedssfeer van het projectgebied die beschermd zijn conform de Wet natuurbescherming en die mogelijk negatief beïnvloed worden met de werkzaamheden (Spijker, 2023). Een overzichtstabel met de conclusies van dit onderzoek is opgenomen in Bijlage 1, het gaat om de volgende soorten/ soortgroepen:

Soortgericht onderzoek:

- Vogels met jaarrond beschermde nesten.
- Noordse woelmuis.
- Bever.

Ecologisch werkprotocol/mitigerende maatregelen:

- Vleermuizen.
- Amfibieën.
- Vissen.
- Vogels tijdens het broedseizoen.

Voor de vogels met jaarrond beschermde nesten, noordse woelmuis en bever is soortgericht onderzoek noodzakelijk. Voor de andere soortgroepen is het mogelijk te werken via een ecologisch werkprotocol en door mitigerende maatregelen te treffen.

Deze rapportage geeft de resultaten van het soortgericht onderzoek en gaat dus in op de aanwezigheid van vogels met jaarrond beschermde nesten, noordse woelmuis en bever. In dit rapport wordt toegelicht of er sprake is van overtreding van verbodsbepalingen en de noodzaak en verleenbaarheid van een ontheffing.

1.2 Doel

Het doel van dit onderzoek is om duidelijkheid te verkrijgen over de vraag of door de voorgenomen ontwikkeling verbodsbepalingen uit de Wet natuurbescherming worden overtreden. Indien sprake is van een overtreding van de verbodsbepalingen uit de Wet natuurbescherming, dan is voor de ingreep een ontheffing op grond van de Wet natuurbescherming vereist. Het toetsingskader voor de Wet natuurbescherming soortenbescherming is opgenomen in Bijlage 2.

2 Planbeschrijving

2.1 Ligging plangebied

Het Hoogspanningsstation Simonshaven ligt aan de Oud Hoenderhoekseweg nr.10 in Geervliet. Het plangebied is gelegen in het buitengebied van de gemeente Nissewaard (provincie Zuid-Holland). In de omgeving liggen de dorpen Zuidland, Simonshaven, Biert en de stad Spijkenisse, zie Figuur 2-1. De rivier die langs de locaties stroomt is de Bernisse.



Figuur 2-1 Ligging van het plangebied.

2.2 Voorgenomen werkzaamheden/ activiteiten

De uitbreiding van SMH380 zal gefaseerd worden gerealiseerd.

- 1) In fase 1 worden de bestaande takken 1 en 2 zodanig ingericht dat deze schakelbaar worden, waarbij de inrichting (nagenoeg) gelijk zal zijn aan de bestaande tak 3.
- 2) In fase 2 worden takken 4 en 5 ingericht conform takken 1, 2 en 3.

- 3) Fase 3 betreft het verplaatsen van een deel van de bestaande bovengrondse hoogspanningsverbinding van station Simonshaven 380kV naar Maasvlakte 380kV.
- Mast 067 wordt verzwaaard op de huidige locatie.
 - mast 068 verplaatst in noordelijke richting op het eigen terrein van TenneT.

4) Fase 4 betreft de bouw van drie transformatoren met drie compensatiespoelen.

Voor fase 3 en 4 is een bestemmingsplanherziening nodig en ter onderbouwing van de uitvoerbaarheid zullen diverse onderzoeken worden uitgevoerd.

In het kader van een ander TenneT-project zullen er kabelverbindingen worden aangelegd van de nieuwe transformatoren naar hoogspanningsstations Botlek en Geervliet - Noorddijk.

3 Onderzoeksmethodiek

3.1 Jaarrondbeschermdde nestenonderzoek

Het onderzoek naar het gebruik van de aanwezige potentieel jaarrond beschermdde nesten is uitgevoerd conform de telrichtlijnen voor buizerd (Sovon, z.d.). Deze richtlijn geeft aan hoe onderzoek uitgevoerd dient te worden om te voldoen aan de vereisten vanuit de soortbescherming in de natuurwetgeving. In deze richtlijn is opgenomen dat er minimaal twee bezoeken uitgevoerd moeten worden in de periode februari tot en met half juli.

In totaal zijn drie gerichte veldbezoeken uitgevoerd, waarbij een onderzoeksinspanning is geleverd van minimaal één uur per nest. De bezoeken zijn uitgevoerd bij juiste omstandigheden, dit zijn: na zonsopkomst, goede weersomstandigheden, in de geschikte periode en met een tussenperiode van minimaal tien dagen. Activiteit is onderzocht op basis van aanwezige exemplaren en verse sporen aan/bij de nesten. In Tabel 3-1 is een overzicht van de bezoekmomenten en weersomstandigheden weergegeven. Aan alle randvoorwaarden van het onderzoek is voldaan en er is gedegen ecologisch onderzoek uitgevoerd waarmee de aan- of afwezigheid met voldoende zekerheid kan worden vastgesteld. De nesten die zijn onderzocht zijn weergegeven in Figuur 3-1, nest 1, 2 en 3 betreffen nesten in masten en nesten 4 en 5 betreffen nesten in bomen.

Tabel 3-1: Bezoekmomenten en weersomstandigheden onderzoek.

Datum	Weer	Onderzoeker	Soorten
10-02-2023	5 °C, droog, 3 Bft ZW	Raisja Spijker	Nestencontrole en bever
16-03-2023	13 °C, droog, 4 Bft ZO	Barry van der Veeke	Nestencontrole en bever
14-04-2023	8 °C, droog, 3 Bft ZO	Robin van Buijtenen en Barry van der Veeke	Nestencontrole, bever en noordse woelmuis

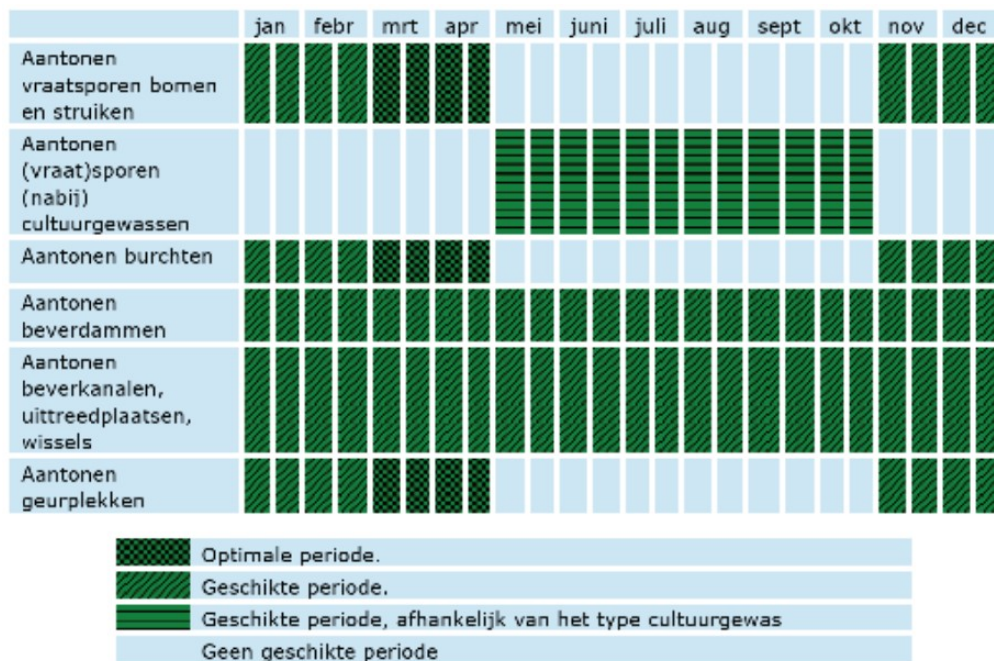


Figuur 3-1: Aangetroffen nesten rondom hoogspanningsstation die mogelijk in gebruik zijn door een jaarrond beschermde soort (Spijker, 2023).

3.2 Bever

Het onderzoek naar het gebruik van het gebied door de bever is uitgevoerd conform het Kennisdocument Bever (BIJ12, 2017a). Dit Kennisdocument geeft aan hoe onderzoek uitgevoerd dient te worden om te voldoen aan de vereisten vanuit de soortbescherming in de natuurwetgeving. Middels dit onderzoek is in beeld gebracht waar de voortplantingsplaatsen, rustplaatsen en ander leefgebied zoals routes of foerageergebied zich bevinden. Activiteit is onderzocht op basis van verse sporen zoals knaagsporen, beverhoutjes, burchten, dammen, beverkanalen, uittreedplaatsen en wissels.

In het Kennisdocument Bever is aangegeven dat twee inventarisatierondes nodig zijn. Eén van deze bezoeken moet in het bladerloze seizoen, bij voorkeur maart-april, plaatsvinden en de andere bij voorkeur in het begin van de zomer. Voor dit onderzoek zijn drie veldbezoeken uitgevoerd waarvan één in de geschikte periode en twee in de optimale periode. De geschiktheid van inventarisatieperioden zijn weergegeven in Figuur 3-2. In Tabel 3-1 is een overzicht van de bezoekmomenten en weersomstandigheden weergegeven.



Figuur 3-2: Geschiktheid van inventarisatieperioden voor verschillende onderzoeken naar bever (BIJ12, 2017a).

3.3 Noordse woelmuis

Onderzoek naar de aanwezigheid van de noordse woelmuis is uitgevoerd doormiddel van eDNA onderzoek. Deze wijze van onderzoek is één van de methoden genoemd voor het vaststellen van de aan- of afwezigheid in het Kennisdocument noordse woelmuis (BIJ12, 2017b). Het eDNA onderzoek kan het gehele jaar uitgevoerd worden. Voor eDNA onderzoek is gebruik gemaakt van twee methoden namelijk keutelonderzoek en bodemsampling. Het verzamelen van de monsters is uitgevoerd op 14 april 2023 door Sweco (Robin van Buijtenen en Barry van der Veeke), de qPCR analyse is uitgevoerd door Datura. Het onderzoek van Datura is bijgevoegd in Bijlage 3.

4 Resultaten en effectbeoordeling

4.1 Nestenonderzoek

4.1.1 Resultaten

Bezoek 10 februari 2023

Tijdens dit bezoek is vastgesteld dat alle eerder waargenomen nesten (Spijker, 2023) nog aanwezig zijn. Tijdens het bezoek zijn echter geen vogels waargenomen in relatie tot de nesten. Wel zijn enkele kleine vogelnesten waargenomen in de omgeving, de werkzaamheden hebben geen invloed op deze nesten.

Bezoek 16 maart 2023

Tijdens dit bezoek is vastgesteld dat alle eerder waargenomen nesten (Spijker, 2023) nog aanwezig zijn. Tijdens het bezoek zijn echter geen vogels waargenomen in relatie tot de nesten. Wel zijn op het hoogspanningsstation ekster, zwarte kraai en houtduif waargenomen. Nabij nest 5 in de bomenrij is een buizerd in vlucht waargenomen.

Daarnaast is in de bosschage ten zuiden van het hoogspanningsstation een nest waargenomen in de dichtere begroeiing (Figuur 4-1). Door de locatie en de begroeiing was het moeilijk in te schatten van welke soort dit nest kon zijn. Aangezien sperwer wel eens nesten bouwt in jonge dichte begroeiing is dit nest meegenomen in het onderzoek. Daarnaast is een nest waargenomen tussen de spijlen van het bijgebouw op het hoogspanningsstation (Figuur 4-2). Het is van vogels met jaarrond beschermde nesten (cat. 1-4, zie bijlage 2) niet bekend dat dergelijke nesten gebruikt worden.



Figuur 4-1: Nest in bosschage ten zuiden station.

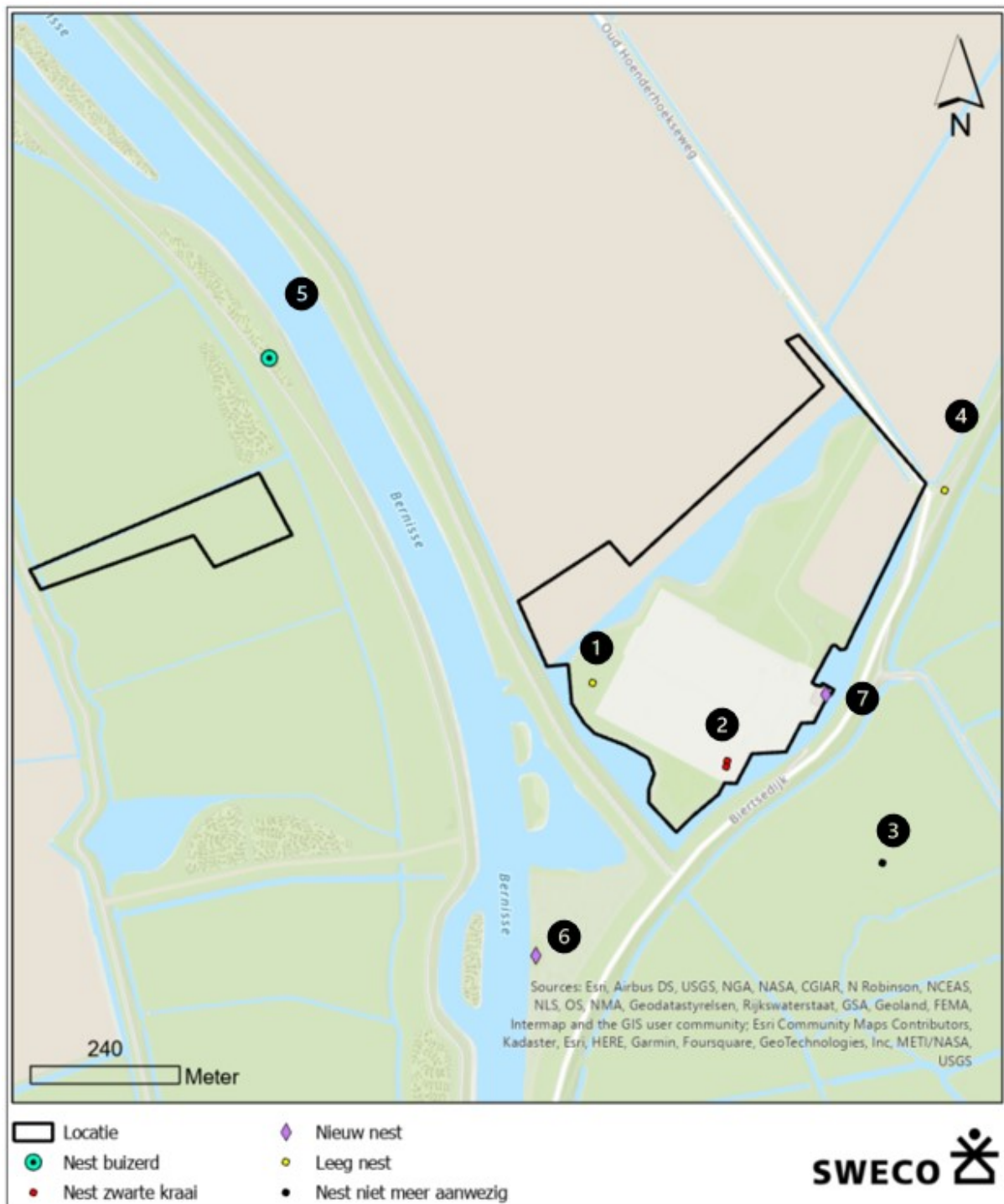


Figuur 4-2: Nest tussen spijlen gebouw station.

Bezoek 14 april 2023

Tijdens dit veldbezoek zijn verschillende waarnemingen gedaan op en nabij de nesten, deze worden in de navolgende opsomming benoemd. Daarnaast is in Figuur 4-3 een overzichtskaart opgenomen met alle nesten en nummers.

- Nest 1 (mast 068)
 - Het nest is nog steeds aanwezig, echter zijn hier geen vogels waargenomen.
- Nest 2 (mast 069A)
 - Nest in onderste traverse wit is nog steeds aanwezig. Direct naast dit nest is zwarte kraai waargenomen.
 - Nieuw nest waargenomen in bovenste traverse wit. Direct naast dit nest is zwarte kraai waargenomen.
- Nest 3 (mast 069)
 - Dit nest is niet meer aanwezig. Dit betrof waarschijnlijk een oud nest dat nu uit de mast is gewaaid. Tijdens het vorige bezoek (16 maart) is dit nest nog wel waargenomen.
- Nest 4 (boom noordoosten)
 - Het nest is gedeeltelijk nog aanwezig, hier zijn echter geen vogels waargenomen. Het betreft waarschijnlijk een oud nest.
- Nest 5 (bomenrij noordwesten)
 - Op dit nest is een buizerd waargenomen.
- Nest 6 (nieuw nest bosschage)
 - Door de dichte begroeiing is dit nest tijdens de tweede ronde niet goed waargenomen. Het gehele veldbezoek is in ieder geval één onderzoeker in de buurt van het nest gebleven en zijn geen af- of aanvliegende vogels bij het nest waargenomen.
- Nest 7 (nieuw nest gebouw)
 - Dit betreft een zeer open nest, hier zijn geen vogels of eieren op waargenomen.



Figuur 4-3: Overzichtskartaal van de waargenomen nesten. De blauw stip is het buizerd nest. De twee rode stippen zijn de nesten van zwarte kraai. De twee gele stippen zijn de nesten waar geen vogels zijn waargenomen. De zwarte stip is het nest dat niet meer aanwezig is. De twee paarse ruiten zijn de nieuwe nesten.

4.1.2 Effectbeoordeling

Nest 1 (mast 068)

Tijdens beide bezoeken zijn op en nabij nest 1 geen vogels waargenomen. Daarnaast zijn ook geen gebruikssporen waargenomen zoals nieuwe takken of verse uitwerpselen. Nest 1 betreft een verlaten nest. Dit nest kan verwijderd worden.

Nest 2 (mast 069A)

Tijdens het tweede bezoek zijn in mast 069A twee nesten waargenomen, een op de onderste traverse wit en een op de bovenste traverse wit. Direct naast beide nesten is zwarte kraai waargenomen. Zwarte kraai is een categorie 5 soort wat betekent dat deze nesten jaarrond beschermd zijn indien er sprake is van zwaarwegende ecologische feiten. In de omgeving zijn echter voldoende geschikte alternatieve nestlocaties aanwezig zoals bomen en andere masten. Hierdoor zijn deze nesten niet aangemerkt als jaarrond beschermd. Wel zijn deze tijdens het broeden beschermd. Na het broeden kunnen de nesten verwijderd worden. Zwarte kraaien broeden gewoonlijk tot juni en hebben één legsel (Vogelbescherming). Hierdoor kunnen de nesten na het broedseizoen verwijderd worden, in dit geval in ieder geval na 15 juli.

Nest 3 (mast 069)

Het nest in mast 069 is niet meer aanwezig, vervolgstappen zijn niet aan de orde.

Nest 4 (boom noordoosten)

Tijdens beide bezoeken zijn op en nabij nest 4 geen vogels waargenomen. Daarnaast zijn ook geen gebruikssporen waargenomen zoals nieuwe takken of verse uitwerpselen. Nest 4 betreft een verlaten nest.

Nest 5 (bomenrij noordwesten)

Tijdens het tweede bezoek is op nest 5 een buizerd waargenomen. De buizerd is een categorie 4 soort, deze soorten keren ieder jaar terug naar een specifiek nest. Buizerds doen dit ook en renoveren nesten van vorige jaren. Nest 5 is aangemerkt als een jaarrond beschermd nest.

De ingreep resulteert niet in directe aantasting van het nest, het nest kan dus behouden blijven. De verstoringafstand van een broedende buizerd is minimaal 75 meter bij de meeste activiteiten. Op het moment dat er jongen aanwezig zijn in het nest mogen nesten dus niet binnen 75 meter benaderd worden door mensen of materieel (BIJ12, 2017c). Het dichtstbijzijnde werkgebied rond mast 067 bevindt zich op minimaal 138 meter van het nest. Daarnaast is tussen het nest en het werkgebied nog een bosschage gelegen waardoor versturende effecten zoals visuele verstoring gedempt worden. Daarnaast is gekeken naar het leefgebied, zoals effect op foerageergebied. In de omgeving is veel geschikt foerageergebied aanwezig zoals de agrarische percelen, kruiden- en faunarijk grasland, vochtig weidevogelgrasland en bosschage randen.

Nest 6 (nieuw nest bosschage)

Door de ligging in het natte gedeelte in de dichte bosschage kon niet duidelijk opgemaakt worden om wat voor nest het ging. Tijdens de bezoeken zijn geen aan- of afvliegende vogels bij het nest waargenomen. In de wat dichtere begroeiing is het mogelijk dat dit een nest van een sperwer betreft. Het nest blijft echter behouden en de werkgebieden liggen op minimaal 175 meter afstand.

De sperwer jaagt vooral op kleine zangvogels en vaak in dicht bos, dit soort gebied is niet aanwezig binnen de werkgebieden.

De voorgenomen werkzaamheden hebben geen negatief effect op het nest of op leefgebied van eventueel sperwer.

Nest 7 (nieuw nest station)

Dit was een zeer open nest. Tijdens de veldbezoeken zijn geen vogels, jongen of eieren op of bij het nest waargenomen. Daarnaast is dit geen nest dat door een cat. 1-4 soort in gebruik wordt genomen.

Vogelnesten

Alle in Nederland broedende vogels zijn tijdens het broeden beschermd. Voorafgaand aan de versturende werkzaamheden binnen het broedseizoen (circa half maart tot half juli), is het uitvoeren van een broedvogelcontrole noodzakelijk. De Wnb erkent officieel geen broedseizoen. Er zijn soorten die al (ver) voor half maart kunnen en/of beginnen met broeden of vogels die later kunnen broeden. In de Wnb is aangegeven dat van belang is of een broedende vogel aanwezig is, voor (kleine) gebieden kan dit uitgesloten worden middels een broedvogelcontrole.

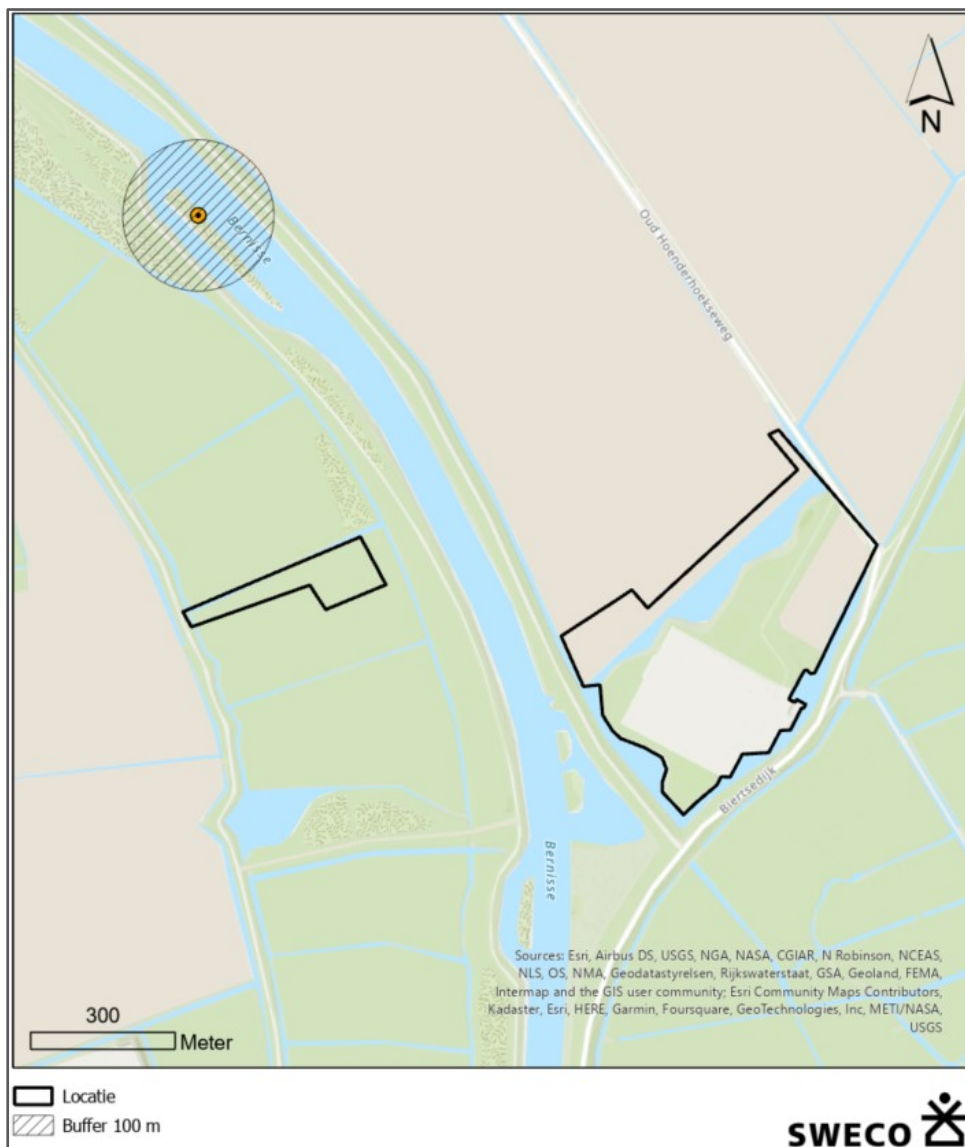
Buiten het broedseizoen kunnen de werkzaamheden plaatsvinden, binnen het broedseizoen enkel (kleinere) gebieden die van tevoren zijn vrijgegeven middels een broedvogelcontrole. Raadpleeg hiervoor een ecologisch deskundige. De bomen en struiken binnen het werkgebied kunnen eventueel voorafgaand aan het broedseizoen (voor februari) onaantrekkelijk worden gemaakt door deze te snoeien.

4.2 Bever

4.2.1 Resultaten

Bezoek 16 maart 2023

Tijdens dit veldbezoek is op het eiland ten noordwesten van het hoogspanningsstation een beverburcht waargenomen (Figuur 4-4). Daarnaast zijn langs verschillende delen van de Bernisse knaagsporen waargenomen.



Figuur 4-4: Locatie van de beverburcht (oranje stip) inclusief 100 m bufferzone (grijze cirkel) ten opzichte van de werkgebieden (zwart omkaderd).

Bezoek 14 april 2023

Tijdens dit veldbezoek is wederom de beverburcht waargenomen (Figuur 4-5) ditmaal ook met verse knaagsporen nabij de burcht (Figuur 4-6). Naast de burcht ligt een duidelijke uittreedplaats.



Figuur 4-5: Burcht en uittreedplaats op eiland in Bernisse.



Figuur 4-6: Verse knaagsporen nabij burcht.

4.2.2 Effectbeoordeling

De beverburcht is waargenomen ten noordwesten van het hoogspanningsstation. Tijdens het tweede bezoek waren bij deze burcht verse knaagsporen en een duidelijke uittreedplaats te zien. Daarnaast zijn tijdens beide bezoeken (oude) knaagsporen waargenomen langs de Bernisse in de omgeving van het hoogspanningsstation. De bever gebruikt zijn burcht het gehele jaar waardoor de burcht jaarrond kwetsbaar is voor verstoring. Hierbinnen is echter de voortplantingsperiode de meest kwetsbare periode, deze loopt globaal van mei tot en met augustus. Verder zijn momenten met ijs op het water ook kwetsbare perioden. De bever is beschermd conform artikel 3.5 van de Wet natuurbescherming. Dit betekent dat naast het doden van deze dieren of het beschadigen of vernielen van voortplantings- of rustplaatsen het ook verboden is om deze dieren opzettelijk te verstoren.

De beverburcht bevindt zich respectievelijk op 460 meter en 720 meter van de werklocaties. Daarnaast ligt de burcht geïsoleerd op het eiland. In het Kennisdocument Bever worden enkele richtlijnen gegeven hoe om te gaan bij werkzaamheden in zones rond verblijfplaatsen (BIJ12, 2017a). Deze richtlijnen richten zich tot een afstand van 100 meter oeverlengte van een burcht en tot 20 meter oeverbreedte (overgang water - land) van een burcht. Gezien de afstand van de burcht tot de werklocaties zijn effecten op de burcht uitgesloten (Figuur 4-4).

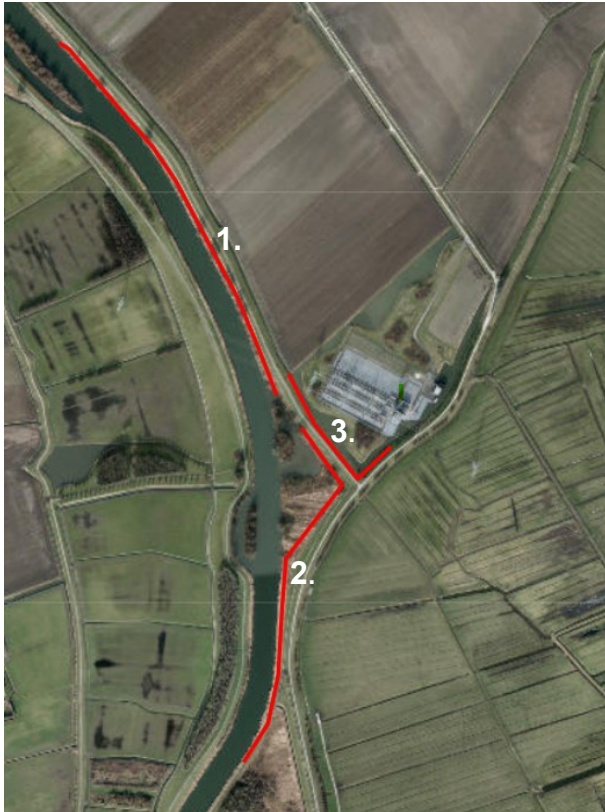
De omvang van het leefgebied wordt bepaald door de hoeveelheid en kwaliteit van de voedselbronnen langs de oever. In het algemeen bedraagt de meest benutte oeverzone voor de bever zo'n 10 à 20 meter het land op (BIJ12, 2017a). Langs de Bernisse zijn veel geschikte voedselbronnen aanwezig waardoor een grotere afstand niet noodzakelijk is. De werkgebieden bevinden zich ruim buiten deze afstand van de watergang. Hierdoor zijn effecten op essentieel leefgebied uitgesloten.

4.3 Noordse woelmuis

4.3.1 Resultaten

Tijdens het veldbezoek op 14 april 2023 zijn oeversamples verzameld langs de meest geschikte gedeeltes voor noordse woelmuis rondom het station. In Figuur 4-7 is een kaartje opgenomen met de tracés waarlangs de samples genomen zijn.

Er zijn geen keutels waargenomen die van noordse woelmuis afkomstig konden zijn. De oevers waren sterk begroeid met riet en op veel plaatsen erg drassig.



Figuur 4-7: Locaties oeversamples noordse woelmuis.

In één van de drie oeversamples is eDNA van de noordse woelmuis gedetecteerd (Goes et al., 2023). Dit betreft het meest zuidelijke traject (2), in de andere samples is geen eDNA van noordse woelmuis waargenomen. Iedere analyse is uitgevoerd met behulp van twaalf replica's. De resultaten worden weergegeven als het aantal replica's (van de twaalf) dat positief scoorde voor eDNA van noordse woelmuis. Voor traject 2 heeft één van de twaalf replica's positief gescoord op noordse woelmuis. Bij minstens één positieve replica kan gesteld worden dat de noordse woelmuis aanwezig is in het onderzochte gebied. Het aantal positieve replica's kan dienen als een grove maat voor de concentratie eDNA, dit betekent dat bij een laag aantal positieve replica's verwacht wordt dat de concentratie eDNA zeer laag is (Datura).

4.3.2 Effectbeoordeling

Voor de noordse woelmuis moet variatie in de vegetatie aanwezig zijn zoals diverse kruiden, overgangszones tussen land en water met riet, aanwezigheid van bepaalde soorten zeggen en in natte gebieden moeten drogere delen aanwezig zijn. Ze mijden door struiken en bomen gedomineerde begroeiingen. Een ruim aanwezige vegetatie van meer dan 25 cm hoogte maar zonder houtige opslag is optimaal leefgebied. De werkgebieden, bestaande uit het hoogspanningsstation en meer agrarisch gebied met korte vegetatie, vormen geen optimaal leefgebied.

De noordse woelmuis is echter beschermd conform artikel 3.5 van de Wet natuurbescherming. Dit betekent dat naast het doden van deze dieren of het beschadigen of vernielen van voortplantingsplaatsen of rustplaatsen het ook verboden is om deze dieren opzettelijk te verstoren. Het eDNA onderzoek heeft aangetoond dat het gedeelte direct rondom het hoogspanningsstation niet in gebruik is door noordse woelmuis. In het gedeelte meer ten zuiden is een zeer lage hoeveelheid eDNA waargenomen.

De noordse woelmuis is aangetroffen ten zuiden van het hoogspanningsstation. Dit gedeelte valt buiten het werkgebied waardoor het leefgebied behouden blijft. Daarnaast wordt het hoogspanningsstation bereikt via de Oud Hoenderhoekseweg aan de noordkant van het station, wat op enige afstand ligt tot het tracé met de waarnemingen van DNA van de Noordse woelmuis. Hierdoor is geen sprake van effecten van werkverkeer door verstoring of aantasting van leefgebied.

Tussen het tracé waar DNA is aangetroffen en het noordelijk gelegen plangebied zijn twee gemaaide grasbermen aanwezig aan weerszijden van een weg, waarna een smalle steile rietoever aanwezig is met een watergang. Het lijkt niet waarschijnlijk dat de Noordse woelmuis het plangebied zal betreden omdat deze verstoringgevoelig is en omdat er geen optimaal habitat aanwezig is. Het westelijk plangebied ligt op dusdanig grote afstand tot waar de soort voorkomt dat deze niet wordt verwacht binnen het plangebied. Wel dient zowel voor beschermde als vrijgestelde soorten de zorgplicht in acht genomen te worden, wat voornamelijk inhoudt dat aanwezige dieren de gelegenheid krijgen het plangebied ongestoord te kunnen verlaten. Als tijdens de werkzaamheden Noordse woelmuizen worden aangetroffen dient het werk te worden stilgelegd en moet een ter zake deskundig ecoloog ingeschakeld worden om te bepalen of maatregelen nodig zijn.

5 Conclusie

5.1 Algehele conclusie

Uit dit onderzoek is gebleken dat de werkzaamheden geen effect hebben op de instandhouding van de bever, noordse woelmuis en vogels met jaarrond beschermde nesten. Het aanvragen van een ontheffing op grond van de Wet natuurbescherming met betrekking tot deze soorten is niet nodig. Wel is het van belang dat de overige aanbevelingen uit het verkennend natuuronderzoek opgevolgd worden (Spijker, 2023). Een samenvatting van deze aanbevelingen zijn opgenomen in bijlage 1.

In Figuur 5-1 is een overzicht opgenomen met alle nesten, waargenomen beverburcht en het tracé waar de noordse woelmuis is waargenomen.



Figuur 5-1: Overzichtskartaal van de nesten, beverburcht en tracé waar noordse woelmuis is waargenomen.

5.2 Nestenonderzoek

Het onderzoek heeft aangetoond dat het nest in mast 068 niet in gebruik is. Daarnaast zijn in mast 069A twee nesten waargenomen die hoogstwaarschijnlijk beide in gebruik zijn door zwarte kraai. Het nest in mast 069 is niet meer aanwezig. De nesten in de masten kunnen buiten het broedseizoen verwijderd worden (circa vanaf 15 juli).

Bij het nest in de boom ten noordoosten van het hoogspanningsstation (nest 4), is geen activiteit waargenomen. Dit nest wordt niet direct beïnvloedt. Eventueel kan dit nest verwijderd worden en de boom voorafgaand aan volgende broedseizoen onaantrekkelijk worden gemaakt door deze te snoeien.

Het nest in de bomenrij ten noordwesten van het hoogspanningsstation (nest 5), betreft een nest dat in gebruik is door buizerd. Hierdoor is dit nest aangemerkt als jaarrond beschermd nest. De plannen hebben echter geen directe invloed op het nest waardoor deze behouden kan blijven. Daarnaast bevinden de werkgebieden zich op minimaal 138 meter van het nest en worden verstorende effecten gedempt door de tussenliggende bosschage. De werkzaamheden hebben geen negatief effect op de instandhouding van de buizerd.

Een ontheffing op grond van de Wet natuurbescherming met betrekking tot jaarrond beschermde nesten is niet nodig.

5.3 Bever

De beverburcht ligt geïsoleerd op een eiland en op ruim voldoende afstand van de werkgebieden. Daarnaast zijn er in de omgeving veel geschikte foerageermogelijkheden. De werkzaamheden hebben geen invloed op het leefgebied en het functioneren van de bever.

Een ontheffing op grond van de Wet natuurbescherming met betrekking tot bever is niet nodig.

5.4 Noordse woelmuis

Het veldonderzoek heeft aangetoond dat de noordse woelmuis ten zuiden van het hoogspanningsstation is aangetroffen, buiten de werkgebieden. Het leefgebied zal behouden blijven en er zijn geen negatieve effecten van werkverkeer te verwachten, aangezien het hoogspanningsstation via een weg aan de noordkant wordt bereikt.

Een ontheffing op grond van de Wet natuurbescherming met betrekking tot noordse woelmuis is niet nodig.

5.5 Vervolgstappen

In de navolgende opsomming worden nogmaals de benodigde vervolgstappen uit dit onderzoek opgesomd.

- Het lege nest in mast 068 kan worden verwijderd.
- De twee nesten van zwarte kraai in mast 069A kunnen na 15 juli verwijderd worden.
- Werkzaamheden die binnen het broedseizoen plaatsvinden kunnen enkel uitgevoerd worden in (kleinere) gebieden die van tevoren zijn vrijgegeven middels een broedvogelcontrole. Raadpleeg hiervoor een ecologisch deskundige. De bomen en struiken binnen het werkgebied kunnen eventueel voorafgaand aan het broedseizoen (voor februari) onaantrekkelijk worden gemaakt door deze te snoeien.

5.6 Samenvattende tabel

Wet natuurbescherming: soortbescherming	Locatie	Waarneming	Conclusie
Bever	Noordwesten van hoogspanningsstation	Verse knaagsporen aanwezig en een duidelijke uittreedplaats.	Door de grote afstand tot de burcht en leefgebieden is geen negatief effect te verwachten.
Noordse woelmuis	Tracé 1	Geen DNA sporen aangetroffen.	Vervolgstappen niet aan de orde. Bij onverhoopt aantreffen van de soort een deskundig ecooloog inschakelen.
	Tracé 2	Lage hoeveelheid, maar wel DNA aanwezig.	Geen effecten wegens afstand tot plangebied.
	Tracé 3	Geen DNA sporen aangetroffen.	Vervolgstappen niet aan de orde.
Jaarrond beschermd	Nest 1 (mast 068)	Aanwezig, maar geen vogels waargenomen.	Nest kan worden verwijderd (buiten broedseizoen).
	Nest 2 (mast 069A)	Naast bestaande nest een nieuw nest aangetroffen. Bij beide een zwarte kraai waargenomen.	Nest kan worden verwijderd (buiten broedseizoen, na 15 juli).
	Nest 3 (mast 069)	Niet meer aanwezig.	Vervolgstappen niet aan de orde.
	Nest 4 (boom noordoost)	Gedeeltelijk nog aanwezig. Geen vogels waargenomen.	Nest kan worden verwijderd (buiten broedseizoen).
	Nest 5 (bomenrij noordwest)	In gebruik door een buizerd.	Nest blijft behouden. Tijdens broedseizoen afstand van minimaal 75 meter bewaren. Het nest bevindt zich op ca. 138 meter tot plangebied dus geen negatieve effecten te verwachten.
	Nest 6 (nieuw nest bosschage)	Geen vogels waargenomen.	Mogelijk sperwer nest. Door de grote afstand tot de werkzaamheden en aanwezig habitat geen negatieve effecten op het nest.
	Nest 7 (nieuw nest gebouw)	Geen vogels of eieren waargenomen.	Niet in gebruik door categorie 1-4 soort. Wel mogelijke broedplaats voor algemene broedvogels.

Referenties

BIJ12 (2017a). Bever, Castor fiber. Kennisdocument, Versie 1.0 juli 2017.

BIJ12 (2017b). Noordse woelmuis, *Microtus oeconomus arenicola*. Kennisdocument, Versie 1.0 juli 2017.

BIJ12 (2017c). Buizerd, *Buteo buteo*. Kennisdocument, Versie 1.0 juli 2017.

Goes, M. J., Rook, J., Wellens-Roemaat, S. (2023). eDNA onderzoek noordse woelmuis Rapport RA22250, Datura, Wageningen.

Sovon (z.d.). Buizerd; *Buteo* – Common Buzzard. Geraadpleegd via:
<https://stats.sovon.nl/stats/soort/2870>

Spijker, R. (2023). Verkennend Natuuronderzoek station Simonshaven 380kV; Oriënterend onderzoek in het kader van de wet- en regelgeving voor natuur. Sweco Nederland B.V., NL23-648800269-42824.

Geraadpleegde websites

Atlas Zuid-Holland	www.zuid-holland.nl/politiek-bestuur/feiten-cijfers/atlassen-kaarten/
Datura	datura.nl/1556-2/protocollen-en-sampleformulieren/
NDFF	www.ndff.nl/
SOVON	www.sovon.nl
Vogelbescherming	www.vogelbescherming.nl
Zoogdiervereniging	www.zoogdiervereniging.nl

Bijlage 1: Samenvatting Verkennend natuuronderzoek station Simonshaven 380kV

In onderstaande tabel is een samenvatting gegeven van de conclusies voor het gedeelte soortbescherming voortkomend uit het verkennend natuuronderzoek (Spijker, 2023).

Wet natuurbescherming: soortbescherming	Effecten	Nader veld- en/of effectenonderzoek	Nadere procedure/ mitigerende maatregelen
Planten.	Geen.	n.v.t.	n.v.t.
Vleermuizen.	Vliegroute, foerageergebied en verblijfplaatsen (verstoring door verlichting (omgeving)).	Indien de verstoring niet voldoende kan worden gemitigeerd, is aanvullend onderzoek nodig in de periode mei t/m september.	(Bouw)verlichting niet richten op omliggende groenstructuren tussen één uur voor zonsondergang en één uur na zonsopkomst in de periode maart tot en met oktober.
Grondgebonden zoogdieren.	Bever (verstoring beverburchten).	Indien de verstoring niet voldoende kan worden gemitigeerd, is aanvullend onderzoek nodig in de periode februari t/m juni. Het aanvragen van een ontheffing is op basis van de uitkomsten mogelijk nodig.	Om verstoring te voorkomen is van belang dat er in een straal van 100 meter rond geschikt habitat voor burchten geen werkzaamheden plaatsvinden tussen een half uur voor zonsondergang en een half uur na zonsopgang in de periode mei t/m augustus. Buiten deze periode geldt een afstand van 20 meter. De mitigerende maatregelen dienen te worden opgenomen in een ecologisch werkprotocol.
	Noordse woelmuis (verstoring en vernietiging zomerhabitat en verblijfplaatsen bij terrein station Simonshaven en mast 068).	Nader onderzoek in april t/m september is noodzakelijk om aan- of afwezigheid van de soort op het terrein vast te stellen.	Het aanvragen van een ontheffing Wnb is op basis van de uitkomsten mogelijk nodig.

Wet natuurbescherming: soortbescherming	Effecten	Nader veld- en/of effectenonderzoek	Nadere procedure/ mitigerende maatregelen
	Algemene soorten.	Geen.	Zorgplicht; werkzaamheden die nadelig kunnen zijn voor dieren en planten, in redelijkheid zo veel als mogelijk worden nagelaten of maatregelen worden genomen om onnodige schade aan dieren en planten te voorkomen. Maatregelen dienen te worden uitgewerkt in een ecologisch werkprotocol.
Vogels.	Algemene broedvogels.	n.v.t.	Kap-/rooiwerkzaamheden buiten het broedseizoen (15 maart – 15 juli) uitvoeren. Versturende werkzaamheden voor het broedseizoen starten, anders is eerst een broedvogelcontrole nodig.
	Bosje naast mast 067.	Extra veldbezoek in januari/ februari om met zekerheid vast te kunnen stellen of zich hier jaarrond beschermde nesten bevinden.	Bij de aanwezigheid van jaarrond beschermde nesten dienen om verstoring te voorkomen dienen de werkzaamheden in september t/m januari te worden uitgevoerd. Indien dit niet mogelijk is, is nader onderzoek naar de bezetting van de nesten noodzakelijk in de periode februari t/m juni.
	Nest in mast 069A en 069 en nest in boom.	Om verstoring te voorkomen dienen de werkzaamheden in september t/m januari te worden uitgevoerd. Indien dit niet mogelijk is, is nader onderzoek naar de bezetting van de nesten noodzakelijk in de periode februari t/m juni.	Indien de nesten door een jaarrond beschermde soort bezet zijn is mogelijk is er een ontheffing Wet natuurbescherming nodig.
	Nest in mast 068.	Nader onderzoek drie bezoeken in de periode half februari t/m eind juli.	Indien het nest door een jaarrond beschermde soort bezet zijn is er een ontheffing Wet natuurbescherming nodig.
Amfibieën.	Algemene soorten.	n.v.t.	Werkzaamheden die in het water plaatsvinden dienen (vissen en amfibieën) rustig te worden opgestart zodat eventueel aanwezige dieren kunnen vluchten. De mitigerende maatregelen dienen te worden opgenomen in een ecologisch werkprotocol.

Wet natuurbescherming: soortbescherming	Effecten	Nader veld- en/of effectenonderzoek	Nadere procedure/ mitigerende maatregelen
Reptielen.	Geen.	n.v.t.	n.v.t.
Vissen.	Algemene soorten.	n.v.t.	Werkzaamheden die in het water plaatsvinden dienen (vissen en amfibieën) rustig te worden opgestart zodat eventueel aanwezige dieren kunnen vluchten. De mitigerende maatregelen dienen te worden opgenomen in een ecologisch werkprotocol.
Ongewervelden.	Geen.	n.v.t.	n.v.t.

Bijlage 2: Toetsingskader Wnb: soortenbescherming

In de Wet natuurbescherming (Wnb) is soortbescherming opgedeeld in drie categorieën. Voor iedere categorie gelden verschillende verbodsbepalingen welke zijn vermeld in artikel 3.1, 3.5 en 3.10 van de Wnb. Het betreft de volgende categorieën:

Soorten van de Vogelrichtlijn (artikel 3.1 e.v.)

- lid 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;
- lid 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;
- lid 3) het is verboden eieren van vogels als bedoeld in het eerste lid te rapen en deze onder zich te hebben;
- lid 4) het is verboden vogels als bedoeld in het eerste lid opzettelijk te storen;
- lid 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.

Soorten van de Habitatrichtlijn (artikel 3.5 e.v.)

- lid 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;
- lid 2) het is verboden dieren als bedoeld in het eerste lid opzettelijk te verstoren;
- lid 3) het is verboden eieren van dieren als bedoeld in het eerste lid in de natuur opzettelijk te vernielen of te rapen;
- lid 4) het is verboden de voortplantingsplaatsen of rustplaatsen van dieren als bedoeld in het eerste lid te beschadigen of te vernielen;
- lid 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 ontwortelen of te vernielen.

Andere soorten (artikel 3.10 e.v.)

- lid 1) onverminderd artikel 3.5, eerste, vierde en vijfde lid, is het verboden:
 - onderdeel 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;
 - onderdeel B. de voortplantingsplaatsen of rustplaatsen van dieren als bedoeld in onderdeel a opzettelijk te beschadigen of te vernielen, of
 - onderdeel 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 ontwortelen of te vernielen.

Voor *Vogelrichtlijn- en Habitatrichtlijnsoorten* geldt dat voortplantings- en rustplaatsen (inclusief functionele leefomgeving) van beschermde soorten niet opzettelijk verstoord of vernietigd mogen worden en dat exemplaren van beschermde soorten niet opzettelijk mogen worden gedood of verwond. In gebruik zijnde nesten van vogels zijn altijd beschermd gedurende het broedseizoen.

Van een aantal vogelsoorten geniet de vaste rust- en verblijfplaats een aanvullende jaarronde bescherming. Deze soorten worden genoemd in een beleidsdocument dat onder de Flora- en faunawet is opgesteld. Ook onder de Wnb is deze lijst van kracht, maar provincies hebben de mogelijkheid deze aan te passen. Voor provincie Zuid-Holland geldt de reguliere landelijke lijst. Soorten waarvan de nesten altijd jaarrond beschermd zijn, zijn de volgende: boomvalk, buizerd, gierzwaluw, grote gele kwikstaart, havik, huismus, kerkuil, oehoe, ooievaar, ransuil, roek, slechtvalk, sperwer, steenuil, wespendif en zwarte wouw (categorie 1 - 4). Van een aantal andere soorten zijn de nesten enkel jaarrond beschermd als er onvoldoende alternatieven zijn. Dit zijn soorten, zoals de pimpelmees, boerenzwaluw en blauwe reiger (categorie 5).

Voor *Andere soorten* geldt dat voortplantingsplaatsen en rustplaatsen (inclusief functionele leefomgeving) van beschermde soorten niet (opzettelijk) vernietigd mogen worden en dat exemplaren van beschermde soorten niet (opzettelijk) mogen worden gedood of verwond. Verbodsbepalingen ten aanzien van de verstoring zijn niet van toepassing op deze soorten. Ten aanzien van de andere beschermde soorten geldt dat het bevoegd gezag (provincies c.q. ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit) de vrijheid hebben om soorten binnen deze categorie vrij te stellen van de verbodsbepalingen uit artikel 3.10 Wnb.

Met artikel 3.10 van deze wet wordt het mogelijk gemaakt om die bescherming op te heffen om redenen die onder meer verband houden met ruimtelijke inrichting of ontwikkeling van gebieden of verband houden met onder meer het bestendig beheer of onderhoud aan vaarwegen, watergangen, waterkeringen, waterstaatswerken, drinkwaterleidingen en infiltratiekanalen voor drinkwaterproductie, oevers, vliegvelden, wegen, spoorwegen of bermen, of in het kader van natuurbeheer. Met artikel 3.189 van de Zuid-Hollandse Omgevingsverordening wordt een dergelijke vrijstelling gegeven (Provincie Zuid-Holland, 2021). De diersoorten waarop de vrijstelling voor ruimtelijke ingrepen toeziet, worden genoemd in Tabel 1.

Voor beschermde soorten die niet zijn vrijgesteld en de voorgenomen activiteiten strijdig zijn met de bepalingen in de wet, geldt een ontheffingsplicht. Deze kan alleen worden verleend, indien de gunstige staat van instandhouding niet in het geding is. De indicatoren hiervoor zijn de ontwikkeling van de populatie, de verspreiding en het leefgebied. Deze indicatoren kunnen in het projectgebied mogelijk ingeschat worden door de onderzoeker, op grotere schaal kan gekeken worden naar trends van het Netwerk Ecologische Monitoring (NEM). Voor vogels geldt in afwijking hierop dat voor verstoring geen ontheffing nodig is, indien de gunstige staat van instandhouding niet in het geding is. Het is ook mogelijk om voor beide categorie soorten te werken volgens een goedgekeurde gedragscode die is afgestemd op de Wnb. Er is dan geen ontheffing op grond van de Wnb nodig.

Tabel 1: Vrijgestelde soorten in provincie Zuid-Holland.

Zoogdieren		Amfibieën
Aardmuis	Huisspitsmuis	Bastaardkikker
Bosmuis	Konijn	Bruine kikker
Bunzing	Ree	Gewone pad
Dwergmuis	Rosse woelmuis	Kleine watersalamander
Dwergspitsmuis	Veldmuis	Meerkikker
Egel	Vos	
Gewone bosspitsmuis	Wezel	
Haas	Woelrat	
Hermelijn		

Naast bovengenoemde verbodsartikelen bevat de Wnb een algemeen geldende zorgplicht. Deze zorgplicht is altijd van toepassing en geldt ook voor niet beschermde flora en fauna:

Zorgplicht (artikel 1.11)

- lid 1) Eenieder 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.
- lid 2) De zorg, bedoeld in het eerste lid, houdt in elk geval in dat eenieder 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:
- onderdeel A. dergelijke handelingen achterwege laat, dan wel,
 - onderdeel B. indien dat achterwege laten redelijkerwijs niet kan worden gevegd, de noodzakelijke maatregelen treft om die gevolgen te voorkomen, of
 - onderdeel C. voor zover die gevolgen niet kunnen worden voorkomen, deze zoveel mogelijk beperkt of ongedaan maakt.

Bijlage 3: Onderzoek Datura eDNA Bodemsampling

1. Doelstelling

De doelstelling van dit onderzoek is het aantonen van de aan- of afwezigheid van de noordse woelmuis (*Alexandromys oeconomus arenicola*) aan de hand van (e)DNA onderzoek. Hiervoor is gebruik gemaakt van bodemmonsters. Dit onderzoek is uitgevoerd in opdracht van Sweco Nederland B.V.

2. Methode

2.1 Bemonstering

De bemonstering is uitgevoerd door een medewerker van Sweco Nederland B.V. volgens gestandaardiseerde protocollen van Datura (opvraagbaar). In totaal zijn er op 26 april 2023 drie bodemmonsters geleverd aan het laboratorium van Datura Molecular Solutions B.V. (Tabel 1).

Tabel 1. monsterinformatie

Monster nummer	Ontvangen
61916	26 april 2023
61919	26 april 2023
61917	26 april 2023

2.2 Laboratoriumanalyse

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

1. Het eDNA in 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 fout negatief resultaat. Gedurende de extracties zijn deze inhiberende stoffen zo veel mogelijk verwijderd.

2. Er wordt altijd een controle uitgevoerd om na te gaan of eDNA detectie in een monster geïnhibeed wordt. Dit wordt gedaan door een bekende hoeveelheid van een fragment artificieel DNA toe te voegen. Vervolgens wordt de concentratie gemeten van dit fragment artificieel DNA. Dit wordt zowel gedaan in een reactie waar een hoeveelheid monster aan toegevoegd wordt, als in een reactie waar geen monster aan toegevoegd wordt. Als DNA detectie in een monster geïnhibeed wordt, dan is de gemeten concentratie artificieel DNA in de reactie waarin monster toegevoegd wordt lager ten opzichte van de reactie waaraan geen monster aan toegevoegd is. Met name in zuur water, waarin veel organische deeltjes aanwezig zijn kan inhibitie optreden. In een dergelijk geval wordt een extra zuivering stap uitgevoerd of wordt het monster verdund. Vervolgens wordt opnieuw gekeken of de inhiberende stoffen voldoende verwijderd zijn.
3. Detectie van eDNA vindt plaats door middel van een real-time quantitative PCR. Het principe achter deze techniek is dat een specifiek deel van het DNA zeer vaak vermenigvuldigd (geamplificeerd) wordt.

Datura maakt gebruik van soortspecifieke primers die uitsluitend DNA van de doelsoort vermenigvuldigen. Datura werkt gebruikt bovendien een soortspecifieke 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 fout positieve waarnemingen worden voorkomen

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

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

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

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

1. Er wordt gebruik gemaakt van een **2-staps** qPCR protocol, hetgeen de kans op aspecifieke detectie verkleint.
2. Gebruik van zeer **specifieke primers** waarmee uitsluitend eDNA van de doelsoort gedetecteerd kan worden. De primers zijn ontwikkeld met behulp van specialistische software.
3. Een qPCR detectie wordt uitgevoerd met behulp van een zeer specifieke **probe**. Deze probe hecht uitsluitend aan DNA van de doelsoort, hetgeen resulteert in een fluorescent signaal.
4. De primers en probe zijn in het laboratorium getest. Eerst is getest of de qPCR detectie inderdaad negatief resultaat geeft na het toevoegen van DNA van (verwante) soorten.
5. Vervolgens is de methode **gevalideerd** door het testen van veldmonsters. Er zijn eDNA monsters verzameld op locaties waar de doelsoort niet voorkomt. Er werd geen eDNA gedetecteerd in deze monsters. Zodoende kon aangetoond worden dat de methode niet resulteert in positieve detectie als de doelsoort niet aanwezig is.

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

1. Verschillende onderdelen van de analyse workflow worden uitgevoerd in fysiek gescheiden laboratorium ruimtes. Het samenstellen van de eDNA monster kits en het voorbereiden van de qPCR reagentia vindt plaats in een **DNA clean room**. Dit is een ruimte waarin geen DNA monsters aanwezig zijn. Zodoende kunnen we garanderen dat er geen DNA aanwezig is in de eDNA monster kits en de reagentia (zoals de primers en probes) die later gebruikt worden in de eDNA analyses. Het extraheren van de eDNA monsters gebeurt in een **eDNA laboratorium**. Dit is een ruimte waarin uitsluitend lage concentraties DNA aanwezig zijn. Vervolgens worden hier de eDNA monsters samen met de qPCR reagentia in een 96-well plaat gepipetteerd. Deze plaat wordt luchtdicht afgesloten. Tenslotte wordt de qPCR uitgevoerd in een **post- PCR laboratorium**. In dit laboratorium wordt het eDNA vermeerderd en hier zijn dus hoge concentraties DNA aanwezig.
2. Er wordt een **unidirectionele workflow** gehanteerd om contaminatie van de DNA clean room en het eDNA laboratorium te voorkomen. Dit houdt in dat materialen die eenmaal in het post-PCR laboratorium geweest zijn niet meer terug mogen naar de DNA clean room en eDNA laboratorium. Ook medewerkers van Datura mogen niet dezelfde dag van een post-PCR laboratorium terug naar een ruimte waarin weinig DNA aanwezig is.
3. In iedere analyse worden **controle analyses** uitgevoerd. Zo worden er monsters geëxtraheerd waaraan geen slootwater is toegevoegd (zogenaamde extractie controles). In de qPCR worden naast de extractie controles ook negatieve PCR controles meegenomen. Zodoende kan heel nauwkeurig gemonitord worden of er inderdaad geen contaminatie optreedt.

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

Het **bemonsteringsprotocol** van Datura wordt gevolgd. Dit protocol schrijft een specifieke werkwijze voor. In de praktijk is gebleken dat er geen contaminatie plaats vindt als dit protocol gevolgd wordt.

2.3.2 Hoe fout negatieve waarnemingen worden voorkomen (qPCR)

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

1. Per monster worden meerdere submonsters verzameld. Hiermee wordt de kans vergroot dat eDNA in het monster terecht komt.
2. Een zeer gevoelige **qPCR detectie** in eDNA water- en bodemonsters wordt uitgevoerd met behulp van **12 replica's**. Wanneer minder replica's uitgevoerd worden kan er minder gevoelig gedetecteerd worden. Meer dan 12 qPCR replica's leidt echter niet tot gevoeliger detectie.
3. Gebruik van een **zeer korte merker** van maximaal 100 basepaar.
4. In ieder monster wordt **vastgesteld of de qPCR detectie 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

Er is in 1 van de 3 bodemonsters eDNA van noordse woelmuis gedetecteerd. Dit gaat om monster nummer 61919. Een overzicht van de resultaten van dit onderzoek wordt weergegeven in Tabel 2.

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

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

Tabel 2: Resultaten q-PCR analyses voor noordse woelmuis met 12 replica's.

Monsternummer	Resultaat qPCR analyse noordse woelmuis
61916	0/12
61919	1 / 12
61917	0/12