



8-11-2024

Aanvullend onderzoek beschermde soorten

Baroniestraat 24, Boxtel



BNLadvies
Landschapsarchitectuur en ecologisch advies

*Aanvullend onderzoek naar de aanwezigheid van vaste rust- en
verblijfplaatsen van beschermde flora en fauna*

Colofon:

Opgesteld door:	BNL advies Telefoonstraat 2 5428 GJ Venhorst T: 06 18 90 46 06 E: info@bnladvies.nl W: www.bnladvies.nl
Projectlocatie:	Baroniestraat 24 5281 JD Boxtel
Status:	definitief
Versie:	QFF.24069
Periode Veldbezoek:	24-6-2024 t/m 23-9-2024
Datum Rapportage:	8-11-2024
Auteur:	D.M. Linskens, Msc
Veldwerk:	R.F. Versteegden
Collegiale toets:	Ing. R.J.L. Bijvelds



© copyright BNL advies 2024

Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd en/of openbaar worden gemaakt door middel van druk, fotokopie, microfilm of welke wijze dan ook, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de auteursrechthebbende. BNL advies kan door opdrachtgever niet aansprakelijk worden gesteld voor schade die voortvloeit uit gebruik van data of gegevens of door toepassing van aanbevelingen en conclusies, die zijn opgenomen in deze rapportage.

Inhoud

Colofon:	1
1. Inleiding	3
2. Wettelijk kader	4
2.1 Omgevingswet	4
2.1.1 Gebiedsbescherming	4
2.1.2 Soortenbescherming	5
2.2 Ontheffing	7
2.3 Natuurnetwerk Nederland	8
3. Omschrijving plangebied en Voorgenomen ontwikkeling	9
3.1 Algemeen	9
3.2 Voorgenomen ontwikkeling	9
3.2.1 Bestaande te ontwikkelen plangebied	10
4. Methode	12
4.1 Marterachtigen en de waterspitsmuis	12
4.1.1 Veldonderzoek	12
4.1.2 eDNA onderzoek	13
5. Resultaten Veldonderzoek	15
5.1 Cameravallen	15
6. Gebiedsfunctie, effectanalyse en maatregelen	16
6.1 Steenmarter en marterachtigen	16
6.2 Waterspitsmuis	16
6.3 Zorgplicht	16
7. Conclusie	17
7.1 Conclusie en vervolgstappen	17
Bijlage 1: rapportage eDNA	19

1. Inleiding

Aanleiding

Op verzoek van de initiatiefnemer is een aanvullend onderzoek flora en fauna uitgevoerd in het kader van de Omgevingswet (aanvullingswet natuur). Dit onderzoek is uitgevoerd naar aanleiding van de QuickScan flora en fauna welke is uitgevoerd door BNL advies. Het ecologische onderzoek bestaat uit veldonderzoek(en) op locatie en bijbehorende verslaglegging.

Geplande werkzaamheden

Vrijborg B.V. is voornemens om nieuwbouw te realiseren in de voormalige pastorietaan aan de Baroniestraat 24 in Boxtel. Voor dit woningbouwplan zullen twee aan elkaar geschakelde woonzorghuizen worden ontwikkeld met in totaal 48 niet-zelfstandige zorgappartementen en gemeenschappelijke ruimtes voor mensen met dementie. Naast een wandeltuin wordt ook een ecologische verbindingszone aangelegd langs een aangrenzende beek.

Resultaat QuickScan

Op 16-11-2023 is door Ekoza BV reeds een QuickScan flora en fauna uitgevoerd (22.275). Uit dit onderzoek blijkt dat het plangebied mogelijk onderdeel is van de functionele leefomgeving van diverse soorten in de te verwijderen plantstroken. De te onderzoeken soorten betreffen:

- Wezel, hermelijn, bunzing en steenmarter (Beschermingsregime 'andere soorten'). Nader onderzoek naar deze soorten moet uitwijzen of deze soorten ook daadwerkelijk van het plangebied gebruik maken en of een ontheffing in het kader van de Omgevingswet nodig is
- Waterspitsmuis (Beschermingsregime 'andere soorten'). Nader onderzoek naar deze soort moet uitwijzen of deze soort ook daadwerkelijk van het plangebied gebruik maken en of een ontheffing in het kader van de Omgevingswet nodig is.

Doel

De doelstelling voor het aanvullend onderzoek is geformuleerd in onderstaande onderzoeksvragen:

1. Maken soorten gebruik van het plangebied?
2. Welke functie heeft het plangebied voor de aangetroffen soort(en)?
3. Wat zijn de effecten van de voorgenomen werkzaamheden op de beschermde soort(en) die gebruikmaken van het plangebied?
4. Welke mitigerende en compenserende maatregelen dienen te worden uitgevoerd?
5. Is het noodzakelijk een ontheffing op de Omgevingswet aan te vragen?

Indien compenserende maatregelen noodzakelijk zijn om de schade aan beschermde soorten te compenseren, dient (ter onderbouwing van de ontheffingsaanvraag) een activiteitenplan te worden opgesteld. In dit activiteitenplan worden de compenserende maatregelen nauwkeurig beschreven.

2. Wettelijk kader

2.1 Omgevingswet

Sinds 1 januari 2024 is in de Omgevingswet de bescherming van dier- en plantensoorten en van habitattypen in Nederland geregeld. Voorheen was dit geregeld in de Wet natuurbescherming. Hierbij moet een splitsing gemaakt worden tussen flora- fauna-activiteiten (soortenbescherming) en Natura 2000-activiteiten (gebiedsbescherming). Daarnaast kent de Omgevingswet regels voor het vellen van houtopstanden.

Om een ontheffingsaanvraag in behandeling te nemen, dient het onderzoek aan goedgekeurde voorwaarden (o.a. ten aanzien van methode, intensiteit, periode, tijd tussen onderzoekmomenten) te voldoen. Enkel als het onderzoek volgens deze voorwaarden uitgevoerd is, kan volgens de wetgever een goed onderbouwde uitspraak gedaan worden over;

- de aanwezigheid van beschermde soorten;
- de functie van een gebied of onderdelen binnen een gebied voor deze soorten;
- het belang van een gebied of onderdelen binnen een gebied voor aanwezige beschermde soorten;
- de effecten van plannen op deze soorten;
- de keuze voor te nemen (mitigerende- en/of compenserende) maatregelen.

De voorwaarden waaraan onderzoek moet voldoen, staan beschreven in de kennisdocumenten die in opdracht van de wetgever door BIJ12 opgesteld zijn en de inventarisatieprotocollen van het Netwerk Groene Bureaus. Onderzoeken die niet volgens deze voorwaarden uitgevoerd zijn, kunnen volgens het bevoegd gezag geen basis en onderbouwing vormen van ontheffingsaanvragen en aanvragen zullen om die reden afgewezen worden. BNL advies werkt volgens bovengenoemde kennisdocumenten en inventarisatieprotocollen.

2.1.1 Gebiedsbescherming

De Ow richt zich met de bescherming van natuurgebieden en hun bijzondere natuurwaarden uitsluitend op Natura 2000-gebieden. Natura 2000 is een Europees netwerk van beschermde natuurgebieden. In Natura 2000-gebieden worden bepaalde diersoorten en hun natuurlijke leefomgeving beschermd om de biodiversiteit te behouden.

Voor deze kwalificerende waarden zijn instandhoudingsdoelen opgesteld. Invloeden (ook van buitenaf) mogen deze instandhoudingsdoelstellingen niet in gevaar brengen. Projecten, plannen en andere handelingen die nadelige effecten hebben op één of meerdere instandhoudingsdoelstellingen van een Natura 2000-gebied, zijn vergunningplichtig of moeten de goedkeuring -een “bestuurlijk oordeel”- van het bevoegd gezag hebben (in veel gevallen zijn dit Gedeputeerde Staten en in andere gevallen is dit de minister van Economische Zaken). Zij oordelen dan of een vergunning nodig is. Of deze goedkeuring wordt gegeven, is afhankelijk van de uitkomst van de zogenaamde habitattoets.

Uit de habitattoets kunnen drie mogelijkheden volgen:

- Er is zeker geen nadelig effect. In dit geval is er geen vergunning nodig in het kader van de Wet natuurbescherming;
- Er is sprake van een nadelig effect in de vorm van verstoring, maar dit is niet significant en er is geen sprake van verslechtering van aangewezen habitats. Hieruit volgt dat een vergunningaanvraag niet aan de orde is. Wel is een bestuurlijk oordeel van het bevoegd gezag nodig;
- Er is sprake van een mogelijk significant nadelig effect in de vorm van verstoring en/of er is sprake van verslechtering van aangewezen habitats. In dit geval dient een passende beoordeling opgesteld te worden en is een vergunning nodig;

Een ‘passende beoordeling’ is een rapport waarin (de zo exact mogelijke omvang van) de effecten, afzonderlijk of in combinatie met andere activiteiten, van een plan, project of handeling op een Natura 2000-gebied beschreven staan. Deze nadelige effecten worden in relatie tot de instandhoudingsdoelen bepaald. Indien uit de passende beoordeling volgt dat er significant nadelige gevolgen op zullen treden, moeten de plannen getoetst worden aan de zogenaamde ADC-criteria;

1. Zijn er Alternatieven?
2. Is er sprake van een Dwingende reden van groot openbaar belang?
3. Zijn er Compenserende maatregelen voorzien?

Wanneer er een alternatief bestaat voor de voorgenomen plannen dat niet tot significant nadelige effecten op instandhoudingsdoelstellingen leidt, moet dit alternatief gekozen worden. De ecologische belangen hebben in dit geval voorrang op economische belangen. Wanneer er geen alternatieven voorhanden zijn, er sprake is van een dwingende reden van groot openbaar belang en/of er voldoende compenserende maatregelen getroffen worden, kan een vergunning voor de voorgenomen plannen verleend worden.

2.1.2 Soortenbescherming

De Ow onderscheidt drie verschillende beschermingsregimes voor dier- en plantensoorten, met elk hun eigen verbodsbepalingen (zie tabel 1). De eerste twee categorieën zijn gebaseerd op de door de Europese Unie opgestelde Vogelrichtlijn (uit 1979) en de Habitatrichtlijn (uit 1992). Het derde beschermingsregime betreft soorten die niet op Europees niveau beschermd zijn, maar wel op landelijk niveau: de Nationaal beschermde soorten (in de wet aangeduid als “andere soorten”). Vooral de artikelen 11.34 Bal Vogelrichtlijn, 11.46 Bal Habitatrichtlijnsoorten, en 11.34 Bal Andere soorten zijn belangrijk in het kader van flora- en faunaonderzoek bij onder andere ruimtelijke ontwikkelingen (zie tabel 1).

Als bevoegd gezag heeft iedere afzonderlijke provincie (een aantal) algemene soorten uit deze derde categorie vrijgesteld van ontheffingsplicht. Wel geldt altijd voor alle soorten de specifieke zorgplicht (artikel 11.27 bal). Deze zorgplicht houdt in dat men bij werkzaamheden met mogelijk negatief effect op planten en dieren, maatregelen dient te nemen (binnen wat redelijkerwijs van men verwacht kan worden) om onnodige schade aan planten of dieren te voorkomen.

Tabel 1. Soortenbescherming en verbodsbepalingen.

Beschermingsregime soorten Artikel 11.38 Bal Vogelrichtlijn	Beschermingsregime soorten Artikel 11.46 Bal Habitatrichtlijn	Beschermingsregime soorten Artikel 11.55 Bal Andere soorten
Lid 1a: 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 1a: 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 1: Onverminderd artikel 5.1 Ow, tweede lid, aanhef en onder g, is het verboden: in het wild levende zoogdieren, amfibieën, reptielen, vissen, dagvlinders, libellen en kevers van de soorten, genoemd in de bijlage, onderdeel A, bij deze wet: <u>a</u> : opzettelijk te doden of te vangen; <u>b</u> : de vaste voortplantingsplaatsen of rustplaatsen van dieren als bedoeld in onderdeel a opzettelijk te beschadigen of te vernielen, <u>c</u> : 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.
Lid 1b: 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 1b: Het is verboden dieren als bedoeld in het eerste lid opzettelijk te verstoren.	
Lid 1c: Het is verboden eieren van vogels als bedoeld in het eerste lid te rapen en deze onder zich te hebben.	Lid 1c: Het is verboden eieren van dieren als bedoeld in het eerste lid in de natuur opzettelijk te vernielen of te rapen.	Lid 2: De verboden, bedoeld in het eerste lid, onderdelen a, en b, zijn niet van toepassing op de bosmuis, de huisspitsmuis en de veldmuis voor zover deze dieren zich in of op gebouwen of daarbij behorende erven of roerende zaken bevinden.
Lid 1d: Het is verboden vogels als bedoeld in het eerste lid opzettelijk te storen.	Lid 1d: Het is verboden de voortplantingsplaatsen of rustplaatsen van dieren als bedoeld in het eerste lid te beschadigen of te vernielen.	
Lid 3: 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	Lid 3: 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.	

2.2 Ontheffing

Wanneer één of meerdere verbodsbepalingen van toepassing zijn voor de voorgenomen activiteit, dient een ontheffing aangevraagd te worden bij de provincie waarin de activiteit plaatsvindt.

Een ontheffing voor het overtreden van verbodsbepalingen wordt voor soorten uit de Vogelrichtlijn en Habitatrichtlijn alleen verleend wanneer voldaan wordt aan elk van de volgende voorwaarden:

- Er bestaat geen andere bevredigende oplossing;
- De ontheffing is nodig:
 - a) In het belang van de volksgezondheid of de openbare veiligheid;
 - of b) In het belang van een dwingende reden van groot openbaar belang;
 - of c) In het belang van de veiligheid van het luchtverkeer;
- 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.

Voor vogels kan echter geen beroep gedaan worden op belang b “dwingende reden van groot openbaar belang”. Wanneer overtreding van de verbodsbepalingen voorkomen kan worden door het treffen van mitigerende maatregelen, is het aanvragen van een ontheffing niet nodig. Bij de aanvraag van een ontheffing in het kader van de Ow zijn een activiteitenplan en -in sommige gevallen- een compensatieplan noodzakelijk. Hierin staan de bevindingen uit de flora- en faunatoets vermeld en worden maatregelen beschreven die uitgevoerd zullen worden om ervoor te zorgen dat de nadelige effecten op beschermde plant- en diersoorten in en binnen de invloedssfeer van de activiteit zoveel mogelijk te voorkomen, dan wel te beperken of, in het geval van een compensatieplan, te compenseren.

Overige soorten

Voor de soorten uit deze categorie geldt een vrijstelling van de verbodsbepalingen mits een door het ministerie van EZ goedgekeurde gedragscode van toepassing is op de activiteit. Indien aantoonbaar gewerkt kan worden volgens een dergelijke gedragscode, hoeft geen ontheffing aangevraagd te worden voor het overtreden van één of meerdere verbodsbepalingen van de Ow. Indien er geen goedgekeurde gedragscode van toepassing is op de activiteit of het niet mogelijk is om volgens een dergelijke gedragscode te werken, dient bij overtreding van verbodsbepalingen wel een ontheffing aangevraagd te worden. De ontheffing kan voor deze soorten echter op grond van meer belangen verleend worden dan het geval is voor de Vogel- en Habitatrichtlijnsoorten.

Zorgplicht

Tenslotte geldt voor alle plant- en diersoorten (ook de onbeschermde soorten) de zorgplicht uit de Omgevingswet. Deze houdt in dat mogelijke nadelige gevolgen voor planten en dieren, voor zover redelijk, zoveel mogelijk vermeden moeten worden.

2.3 Natuurnetwerk Nederland

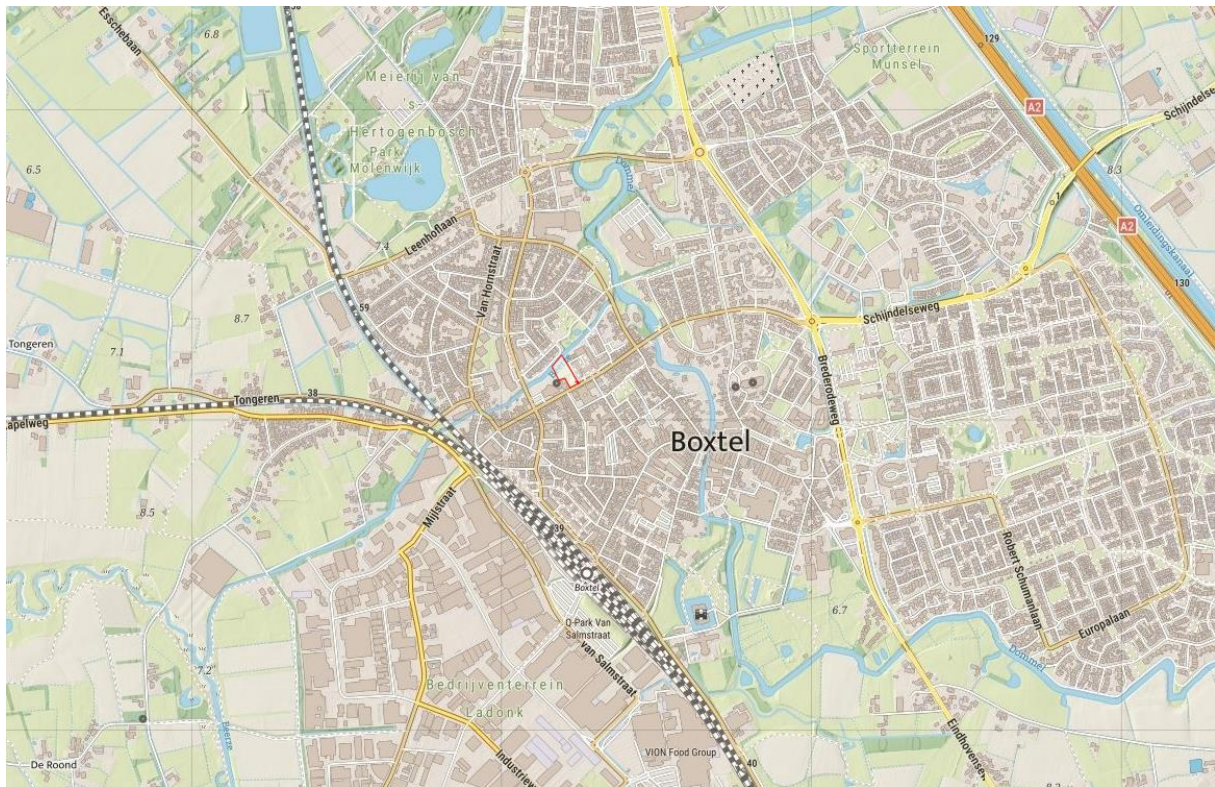
Binnen de Ow is het Natuurnetwerk Nederland (NNN) vastgelegd. Het Natuurnetwerk Nederland (NNN) is een netwerk van bestaande en nieuw aan te leggen groene gebieden, voorheen bekend als de Ecologische Hoofdstructuur (EHS). De provincies zijn verantwoordelijk voor de begrenzing en de ontwikkeling van dit natuurnetwerk. Daarnaast kan de provincie planologische bescherming aan gebieden toekennen door hen aan te wijzen als “bijzondere provinciale natuurgebieden” of “bijzondere provinciale landschappen”.

Natuurwaarden van het NNN worden afgemeten aan doelsoorten. Het is belangrijk dat verlies van en winst aan belangrijke natuurwaarden hieraan worden afgemeten. Ruimtelijke ingrepen moeten vooraf worden getoetst op hun effect op het areaal, de samenhang en de kwaliteit van het NNN. Ingrepen die geen significant negatief effect op wezenlijke kenmerken en waarden van het NNN hebben, kunnen in principe doorgang vinden. Als echter het tegenovergestelde geldt, hangt doorgang van de plannen onder meer af van het belang van de plannen en van de mogelijkheden voor mitigatie en compensatie. Hierbij geldt het 'Nee, tenzij-regime'. Per saldo dient de kwaliteit en/of kwantiteit van het NNN te verbeteren. Waar Natura 2000 -gebieden met het NNN overlappen, blijft ook het NNN-regime gelden.

3. Omschrijving plangebied en Voorgenomen ontwikkeling

3.1 Algemeen

Het plangebied is noordoostelijk gelegen van de kern Boxtel (zie afbeelding 1). Het plangebied ligt tussen een kerk en een wooncomplex. Het grenst aan de beek Smalwater (Beerze), deze is onderdeel van het Natuurnetwerk Nederland (NNN). De bestaande kavel ligt braak.



Afbeelding 1: Globale ligging van het plangebied. De locatie, Baroniestraat 24, Boxtel, wordt globaal aangeduid met de rode omlijning. Bron: Kadviewer.map5.nl.

3.2 Voorgenomen ontwikkeling

De werkzaamheden betreffen het ontwikkelen van een nieuw appartementen complex, waarvoor meerdere beplanting verwijderd gaan worden. In- en nabij de bebouwingen en beplantingen kunnen beschermde soorten flora en fauna voorkomen welke negatieve effecten kunnen ondervinden van de geplande ontwikkelingen.

Het plangebied en de onderzochte omliggende gronden, zijn in afbeelding 2 weergegeven.



Afbeelding 3 t/m 6: Braakliggend plangebied met begroeiingen en aangrenzende bebouwingen. Bron: BNL advies.

4. Methode

4.1 Marterachtigen en de waterspitsmuis

In het kader van de omgevingswet is er aanvullend onderzoek uitgevoerd naar de aan- of afwezigheid van marters en de waterspitsmuis in- en rondom het plangebied.

4.1.1 Veldonderzoek

Het veldonderzoek is uitgevoerd volgens de richtlijnen 'Kennisdocument kleine marterachtigen,' en expert judgement.

In totaal zijn er zes bezoeken uitgevoerd, waarbij tijdens de eerste vijf bezoeken wildcamera's zijn geplaatst op kansrijke plekken binnen het plangebied (aanwezige wissels, randen van begroeiingen, etc.), zie afbeelding 3, gedurende de periode 24-6-2024 tot 21-8-2024, om de aan- of aanwezigheid van doelsoorten aan te tonen (zie tabel 2).



Afbeelding 3: locaties geplaatste wildcamera's met identificatienummer (4 = Cameraval met lokstof, 22 = Struikrover, 24 = Cameraval met lokstof). Bron: BNL advies.

Tabel 2: Logboek activiteiten.

Datum	Activiteit	Werknemer(s)
24-6-2024	Plaatsen 2 x cameraval met lokstof en 1 x Struikrover	R.F. Versteegden
9-7-2024	Controle 1 wildcamera's	R.F. Versteegden
23-7-2024	Controle 2 wildcamera's	R.F. Versteegden
6-8-2024	Controle 3 wildcamera's	R.F. Versteegden
21-8-2024	Ophalen 2 x cameraval met lokstof en 1 x Struikrover	R.F. Versteegden
23-9-2024	eDNA bemonstering	R.F. Versteegden & D.M. Linskens

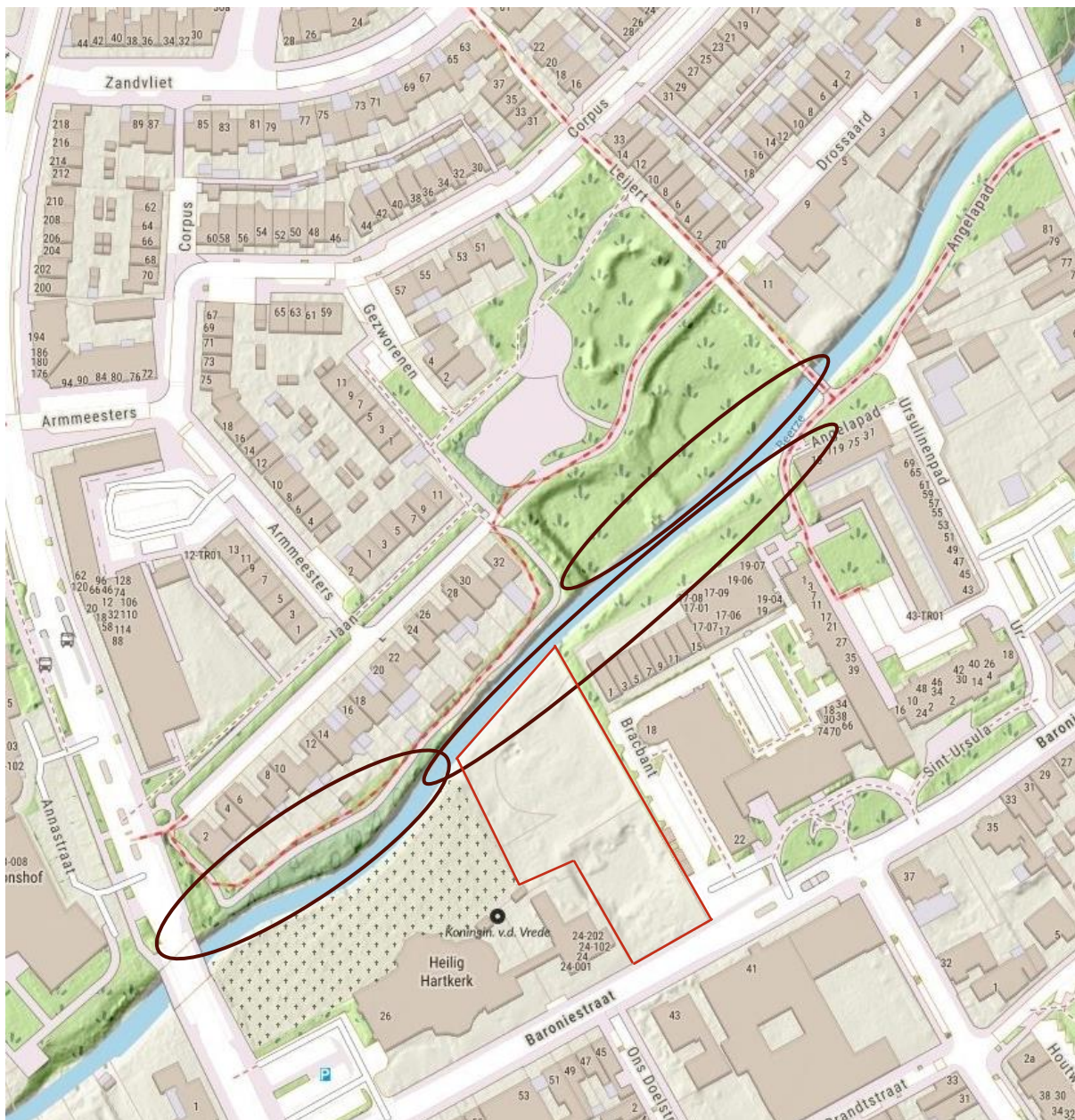
4.1.2 eDNA onderzoek

Het zesde bezoek werd gebruikt voor het verzamelen van bodemsamples aan de oever voor environmental DNA onderzoek (eDNA) voor het aantonen of uitsluiten van de aanwezigheid van de waterspitsmuis. Voor het verzamelen van bodem/strooiselmateriaal is ook buiten het plangebied getreden, namelijk beide oevers van een sectie van de beek Smalwater (zie afbeelding 4).

Er werd gewerkt volgens het eDNA bodembemonstering protocol waterspitsmuis van Datura B.V. (BVP-2023.02), met de bijbehorende sampling kit.

Een sample werd verzameld, wat bestond uit ongeveer 15-20 subsamples. Subsamples werden verzameld door met steriele handschoenen over de bovenste centimeter van de oever te schrapen en dit te verzamelen in een MiliQ-water pot (zie afbeeldingen 5 en 6). Na het verzamelen werd deze pot geschud en verdeeld over drie 50ml buizen met conserverend vloeistof. Deze buizen werden naar Datura B.V. verzonden voor onderzoek.

De bijbehorende rapportage eDNA onderzoek is toegevoegd als bijlage 1.



Afbeelding 4: Sectie van de beek Smalwater (Beerze) die bemonsterd is ten behoeve van het eDNA onderzoek (Monsterplaatsen binnen rode cirkels). Bron: Kadviewer.map5.nl.



Afbeelding 5 & 6: Monsternamen bodemsamples t.b.v. eDNA onderzoek. Bron: BNL advies

5. Resultaten Veldonderzoek

5.1 Cameravallen

Gedurende het onderzoek is één doelsoort waargenomen. De cameraval met lokstof geplaatst in de struiken (ID = 24) nam een steenmarter waar (zie afbeelding 7). De struikrover (ID = 22) nam één of meer spitsmuizen waar over verschillende dagen (zie afbeelding 8, het is mogelijk hetzelfde individu). Het eDNA onderzoek bevestigde dat het niet om een waterspitsmuis gaat.



Afbeelding 7 & 8: Waarnemingen. Bron: BNL advies

6. Gebiedsfunctie, effectanalyse en maatregelen

6.1 Steenmarter en marterachtigen

Binnen het plangebied zijn twee waarnemingen van de steenmarter geweest over een periode van 2 maanden met 3 cameravallen. De waarnemingen waren van dezelfde camera en waren verspreid over een maand.

Gezien het geringe bezoek van de steenmarter en de afwezigheid van een geobserveerde verblijfplaats binnen het plangebied, gaat het hier waarschijnlijk niet om een vaste rust-, voortplantings- en verblijfplaats of essentieel leefgebied van deze soort. Geplande werkzaamheden hebben daarmee naar verwachting geen negatief effect op deze soort. Een ontheffing Omgevingswet wordt niet nodig geacht.

6.2 Waterspitsmuis

Binnen het plangebied zijn geen waarnemingen van de waterspitsmuis geweest. Negatieve effecten op deze soorten m.b.t. de werkzaamheden zijn hiermee uitgesloten. Een ontheffing Omgevingswet wordt niet nodig geacht.

6.3 Zorgplicht

Tenslotte geldt voor alle plant- en diersoorten (ook de onbeschermden) de zorgplicht. Deze houdt in dat mogelijke nadelige gevolgen voor planten en dieren zoveel mogelijk vermeden moeten worden. Manieren om aan de zorgplicht te voldoen zijn onder andere:

- Er wordt gelegenheid gegeven aan amfibieën en grondgebonden zoogdieren, die tijdens de werkzaamheden worden gevonden, te vluchten of zich te verplaatsen naar een schuilplaats buiten het bereik van de werkzaamheden. Dit gebeurt door onder andere vegetatie of bodemmateriaal (takken, stronken, steenhopen) gefaseerd te verwijderen;
- in verband met verstoring van aanwezige dieren worden de werkzaamheden zoveel mogelijk overdag uitgevoerd en buiten de meest kwetsbare periode;
- De werkzaamheden zouden gefaseerd uitgevoerd moeten worden;
- Herplanting zou gedaan moeten worden met inheemse bomen en struiken (erfbeplantingsplan).

Tijdens de bouwfase moet daarnaast rekening gehouden worden met de kans op vestiging door (beschermden) pionierssoorten, zoals de Rugstreeppad (*Epidalea calamita*) en de Oeverzwaluw (*Riparia riparia*). De volgende maatregelen kunnen worden getroffen:

- Het ontstaan van poeltjes of plassen op het bouwterrein in het zomerhalfjaar (vanaf april) wordt voorkomen, zodat er geen geschikt voortplantingswater voor de Rugstreeppad aanwezig is;
- Steilranden voor nestlocaties van de oeverzwaluw worden voorkomen (wanneer oeverzwaluw toch aanwezig is dient men de werkzaamheden stop te zetten tot jonge vogels uitgevlogen zijn).

7. Conclusie

Tijdens de werkzaamheden blijft te allen tijde de specifieke zorgplicht van kracht en bij een veranderende situatie dient altijd een ecooloog ingeschakeld te worden.

7.1 Conclusie en vervolgstappen

Op basis van het nader onderzoek kan het volgende geconcludeerd worden;

- Er is een steenmarter waargenomen via een cameraval.
- Er zijn spitsmuizen waargenomen via cameravallen. Visuele identificatie was moeilijk.
- eDNA onderzoek heeft geen waterspitsmuis gedetecteerd.

Marterachtigen

Tijdens het nader onderzoek van twee maanden zijn er steenmarters waargenomen.

Omdat er geen verblijfplaatsen in het plangebied aanwezig zijn en het plangebied geen onderdeel uitmaakt van essentieel leefgebied, zijn er geen beschermde functies van steenmarter in het plangebied aanwezig.

De geplande sloopwerkzaamheden en potentiële herontwikkeling van de kavel, hebben daarmee geen negatieve effecten op de steenmarter en is een ontheffing op verbodsbepalingen uit de Omgevingswet beschermde soorten niet noodzakelijk.

Waterspitsmuis

Tijdens het nader onderzoek van twee maanden zijn er geen waterspitsmuizen waargenomen.

Omdat er geen verblijfplaatsen in het plangebied aanwezig zijn en het plangebied geen onderdeel uitmaakt van essentieel leefgebied, zijn er geen beschermde functies van de waterspitsmuis in het plangebied aanwezig.

De geplande sloopwerkzaamheden en potentiële herontwikkeling van de kavel, hebben daarmee geen negatieve effecten op de waterspitsmuis en is een ontheffing op verbodsbepalingen uit de Omgevingswet beschermde soorten niet noodzakelijk.

Tabel 3: Samenvatting conclusie

Soortgroep	Vervolgonderzoek	Negatieve invloed	Mogelijke mitigatie	Ontheffing
Vaatplanten	Nee	Geen	Geen	Nee
Vleermuizen	Nee	Geen	Geen	Nee
Vogels met jaarrond beschermde nesten	Nee	Geen	Zorgplicht; buiten broedseizoen een extra controle naar nesten uitvoeren	Nee
Overige grondgebonden zoogdieren	Nee	Geen	Zorgplicht; dieren de ruimte bieden zich naar veilige locaties te verplaatsen	Nee
Beschermde amfibieën	Nee	Geen	Geen	Nee
Reptielen	Nee	Geen	Geen	Nee

Hopende u hiermee voldoende geïnformeerd te hebben, verblijf ik.

Met vriendelijke groet,
Ing. R.J.L. Bijvelds
Ecoloog BNL advies



8-11-2024

Bijlage 1: rapportage eDNA

eDNA onderzoek waterspitsmuis



Colofon

Titel	eDNA onderzoek waterspitsmuis
Tekst, foto's en samenstelling	Lindy Kool, Suzan Wellens-Roemaat
In opdracht van	BNL Advies
Naam opdrachtgever	D. Linskens
Kenmerk opdrachtgever	24069
Rapportnummer	RA24220
Datum opstelling	14-11-2024
Aantal pagina's	7
Contactpersoon vanuit Datura	Lindy Kool
Wijze van citeren	Wellens-Roemaat, S. & Kool, L. 2024. eDNA onderzoek waterspitsmuis, Rapport RA24220, Datura Molecular Solutions BV, Wageningen



Datura Molecular Solutions BV

Gevestigd te:
Agro Business Park 10
6708 PW Wageningen
Nederland

+31(0)618441781
www.datura.nl
lindy.kool@datura.nl

Inhoud

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

2. Methode

2.1 Bemonstering

De bemonstering is uitgevoerd door een medewerker van BNL Advies, volgens gestandaardiseerde protocollen van Datura Molecular Solutions B.V. (opvraagbaar). Er is één bodemmonster verzameld en aangeleverd aan het laboratorium van Datura (Tabel 1).

Monsternummer	Datum	Type	Locatie
6002562	23-9-2024	Bodemmonster	51°35'26.0"N 5°19'03.3"E

2.2 Laboratoriumanalyse qPCR

Het bodemmonster is 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 bodemmonster is eerst gecentrifugeerd waardoor het DNA neerslaat in een pellet en het eDNA is vervolgens geëxtraheerd met behulp van een aangepaste variant 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 (e)DNA 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 van dit fragment artificieel DNA gemeten. 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 waar 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 (target DNA) zeer vaak vermenigvuldigd (geamplificeerd) wordt. Datura maakt gebruik van soort-specifieke primers die uitsluitend DNA van de doelsoort vermenigvuldigen. Datura gebruikt bovendien soort-specifieke probes (een soort primer) die uitsluitend binden aan DNA van de doelsoort. Binding van de probe aan het vermenigvuldigde DNA van de doelsoort (CFX96 Touch™ van Bio-Rad). De qPCR detectie van bodemonsters wordt uitgevoerd met 12 replica's gezien de concentraties DNA in deze monsters erg laag zijn. Door te werken met 12 replica's kan zeer gevoelig gedetecteerd worden. De qPCR detectie wordt uitgevoerd met de TaqMan® Environmental Mastermix 2.0 (Life Technologies®). Naast het DNA 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 qPCR

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 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 sample water is toegevoegd (zogenaamde extractie controles). In de qPCR worden naast de extractie controles ook negatieve PCR controles meegenomen. Zodoende kan heel nauwkeurig gemonitord worden of er inderdaad geen contaminatie optreedt.

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

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

2.3.2 Hoe fout negatieve waarnemingen worden voorkomen (qPCR)

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

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

3.1 Resultaten qPCR

Er is in het bodemonster geen eDNA van waterspitsmuis gedetecteerd middels een qPCR analyse (Tabel 2).

De analyse van het bodemonster is uitgevoerd met behulp van 12 replica's. 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 '1/2 of '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 '1/2' of '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.

Monsternummer	Type	Resultaat qPCR analyse waterspitsmuis
6002562	Bodem	0/12