Arnhem, Veluwestraat 120

Nader onderzoek Omgevingswet
Gemeente Arnhem



sab adviseurs in ruimtelijke ontwikkeling

info@sab.nl - www.sab.nl

In opdracht van:	
Contactpersoon:	
Opsteller:	
Collegiale toetser:	
Datum oplevering:	18 december 2024
Projectnummer:	190489.05
Foto voorblad:	Ingang Rijn IJssel, gemaakt door SAB

Kwaliteit van het ecologisch onderzoek en het geleverde product staan bij SAB hoog in het vaandel. Mede daarom zijn wij aangesloten bij het Netwerk Groene Bureaus (NGB); de brancheorganisatie voor groene adviesbureaus. Om aan onze standaard te voldoen, wordt ecologisch onderzoek enkel uitgevoerd door deskundigen zoals bedoeld door de Rijksdienst voor Ondernemend Nederland en zoals is beschreven in artikel 7.197j, lid 2, onder a van de Omgevingsregeling. Ecologen in opleiding tot deskundige werken altijd onder begeleiding van een deskundige. Dat neemt niet weg dat ecologisch onderzoek altijd een momentopname is.

SAB is niet aansprakelijk voor vervolgschade, alsmede schade die voortvloeit uit toepassing van de resultaten van de werkzaamheden, kaartmateriaal inclusief getoonde begrenzingen of andere gegevens verkregen van SAB. De opdrachtgever vrijwaart SAB voor aanspraken van derden in verband met deze toepassing.

Disclaimer tekst

Bij het samenstellen is de grootst mogelijke zorgvuldigheid nagestreefd. Toch kan de informatie in deze uitgave niet juist of onvolledig zijn.
De Opdrachtgever is hiervoor niet aansprakelijk. Als u van mening bent dat er beeldmateriaal is gebruikt waarover u het beeldrecht heeft, neem dan contact op met de opdrachtgever via onze website of bovengenoemde adres.

Copyright

Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen, in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt worden in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch door fotokopieën of enig andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de opdrachtgever.

Inhoudsopgave

1 Inleiding 3

1.1 Aanleiding 3
1.2 Besluitgebied 3
1.3 Kwaliteitsborging 3
1.4 Definitie product 3

2 Wettelijk kader 4

2.1 Beschermingsregimes 4
2.2 Opzetvereiste 5
2.3 Omgevingsvergunning flora- en fauna activiteit 5
2.4 Vrijstelling en gedragscodes 6

3 Ecologie van soorten 7

3.1 Vleermuizen 7
3.2 Alpenwatersalamander 9
3.3 Rugstreeppad 9
3.4 Roofvogels 9
3.5 Eekhoorn 11

4 Onderzoekmethodiek 12

4.1 Vleermuizen 12
4.2 Alpenwatersalamander 14
4.3 Rugstreeppad 14
4.4 Roofvogels en Eekhoorn 16

5 Resultaten en effectbeoordeling 18

5.1 Vleermuizen 18
5.2 Alpenwatersalamander 22
5.3 Rugstreeppad 22
5.4 Wintercheck 23

6 Conclusie en advies 26

6.1 Omgevingsvergunning flora- en fauna-activiteit nodig? 26
6.2 Omgevingsvergunning flora- en fauna-activiteit aanvragen 26
6.3 Mitigerende maatregelen 27
6.4 Broedperiode en specifieke zorgplicht 28

6.5 Vervolgstappen 29

Geraadpleegde literatuur

Bijlage 1 – eDNA onderzoek Alpenwatersalamander

1 Inleiding

1.1 Aanleiding

De opdrachtgever is voornemens de aanwezige bebouwing op de ROC Rijn IJssel-locatie op de Veluwestraat 120 te Arnhem te slopen en hier nieuwbouwwoningen te realiseren. In het voortraject met Rijn IJssel heeft SAB destijds meerdere natuur-onderzoeken uitgevoerd. Omdat de houdbaarheid van deze onderzoeken is verstreken, moeten deze onderzoeken herhaald worden.

Bij alle ruimtelijke ingrepen moet rekening gehouden worden met de aanwezige natuurwaarden in en om het besluitgebied. Er dient daarom vanuit de ecologie onderzocht te worden of met de ruimtelijke ontwikkelingen die het plan toestaat sprake is van overtreding van de geldende natuurwet- en regelgeving. In 2020 heeft SAB een quick scan natuur en nader onderzoek uitgevoerd. Ter actualisatie van deze onderzoeken heeft SAB in 2023 opnieuw een quick scan uitgevoerd (SAB, 2023) uitgevoerd. Uit de quick scan, uitgevoerd in 2023, blijkt dat op voorhand de aanwezigheid van nest- en verblijfplaatsen van verschillende soorten vleermuizen, roofvogels en eekhoorn niet kan worden uitgesloten. Verder kan er ook niet worden uitgesloten of het besluitgebied essentieel leefgebied is voor de hazelworm, rugstreeppad en alpenwatersalamander. Gezien het feit dat de parkachtige structuren langs de randen van het besluitgebied niet gekapt worden, is onderzoek naar essentieel foerageergebied en vliegroutes voor de vleermuis niet noodzakelijk. Ook is door het behoud van parkachtige structuren onderzoek naar de hazelworm niet noodzakelijk. Wel dient er voor deze soort gewerkt te worden volgens een ecologisch werkprotocol.

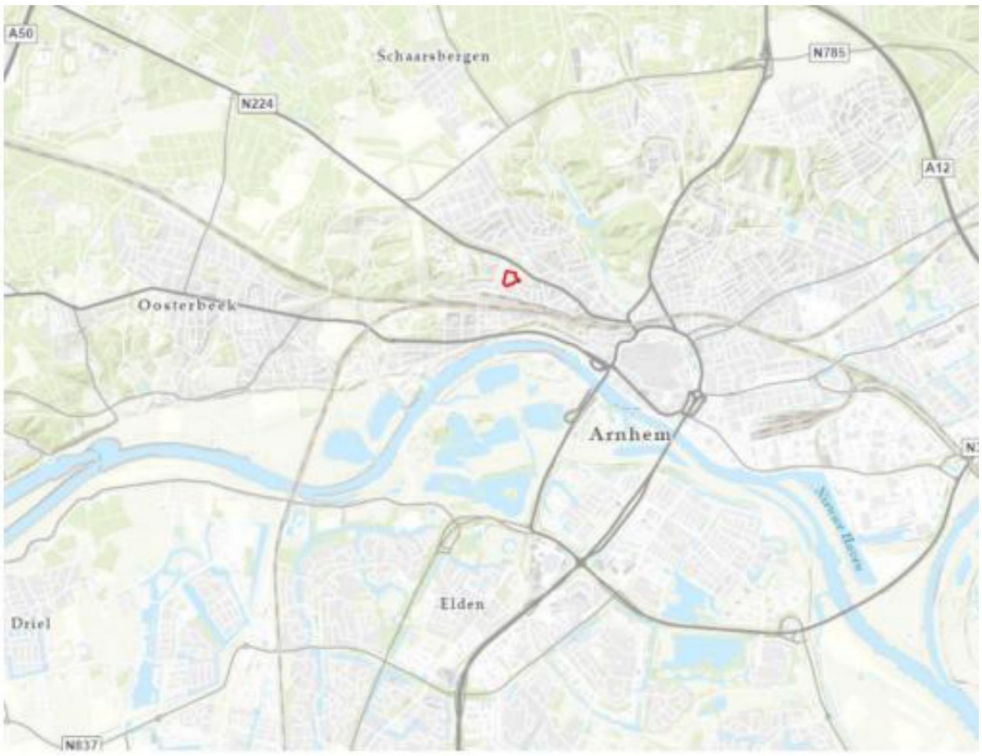
Voorliggende rapportage zet de bevindingen van het nader onderzoek naar verblijfplaatsen van vleermuissoorten, leefgebieden van de rugstreeppad en alpenwatersalamander en nestplaatsen van roofvogels en de eekhoorn uiteen.

Het doel van het hierna beschreven onderzoek is om de aan- of afwezigheid aan te tonen van voornoemde soorten en om vast te stellen wat de functies van het besluitgebied en het omliggende terrein voor deze soorten zijn. Uiteindelijk wordt op basis van deze bevindingen een advies uitgebracht over de wettelijke consequenties hiervan en eventuele vervolgstappen die noodzakelijk zijn.

1.2 Besluitgebied

1.2.1 Huidige situatie

Het besluitgebied bevindt zich aan de noordwestelijke rand van Arnhem (gemeente Arnhem, provincie Gelderland). Arnhem is een stad die voornamelijk is omringd door natuur. Aan de noordkant grenst het aan de Veluwe en aan de zuidkant van het centrum bevinden zich de uiterwaarden van de Nederrijn. De navolgende afbeeldingen geven de ligging van het besluitgebied weer.



Topografische kaart met de globale ligging van het projectgebied (rood omkaderd).Bron: PDOK

De directe omgeving van het besluitgebied kenmerkt zich voornamelijk door de aanwezigheid van woonhuizen en een woonzorgcomplex. Ten zuiden en zuidwesten van het besluitgebied staan woonhuizen. Ten noorden, noordoosten en noordwesten van het besluitgebied ligt een stadspark en ten zuidoosten ligt een woonzorgcomplex. Navolgende afbeeldingen geven de globale ligging van het besluitgebied weer.



Luchtfoto met de globale ligging van het projectgebied (rood omkaderd). Bron: PDOK. Bewerking: SAB

Op 16 november 2023 zijn tijdens het veldbezoek van de quick scan natuur (SAB, 2023) navolgende foto's gemaakt. Deze geven een impressie van het besluitgebied.



Noordzijde besluitgebied



Oostzijde besluitgebied



Westzijde besluitgebied



Noordoostzijde besluitgebied

1.2.2 Toekomstige situatie

In de toekomstige situatie zal nieuwbouw in het besluitgebied zijn gerealiseerd. Dit zal gaan om rijwoningen en appartementen. In totaal zullen er ongeveer 46 woningen worden gerealiseerd. De parkachtige omgeving wordt versterkt, waarbij het huidige parklandschap in de omgeving ten noorden van het plangebied verder wordt doorgetrokken naar de Veluwestraat. Het gebied waar woningen gerealiseerd mogen worden, wordt beperkt tot waar zich in de huidige situatie al bebouwing bevindt. Verder is er aandacht voor een natuurinclusief en klimaatadaptief ontwerp. Hemelwater wordt op eigen terrein verwerkt. Zie navolgende afbeelding voor een impressie van de toekomstige situatie. Ten behoeve van de ontwikkeling zal de bestaande bebouwing worden gesloopt en zal de aanwezige poel aan de zuidkant worden gedempt.

Zie navolgende afbeeldingen voor een weergave van het eerste concept stedenbouwkundig plan.



Concept stedenbouwkundigplan. Bron: Wilma Wonen 23-08-2023

1.3 Kwaliteitsborging

Kwaliteit van het ecologisch onderzoek en het geleverde product staat bij SAB hoog in het vaandel. Om te allen tijde aan onze standaard te voldoen, hanteren wij de volgende werkwijze:

- Het onderzoek wordt uitgevoerd conform geldige onderzoeksprotocollen, zoals het vleermuisprotocol (2021), de kennisdocumenten van BIJ12 (2017, 2024, 2024a) en de soortinventarisatieprotocollen van het NGB (2023).
- Het afwijken van de protocollen vindt enkel plaats indien dit ecologisch goed te onderbouwen en te rechtvaardigen is.
- Het onderzoek wordt enkel uitgevoerd door deskundigen op het gebied van de betreffende soorten. Ecologen in opleiding tot deskundige zijn tijdens veldonderzoek altijd onder begeleiding van een deskundige. Onder een ecologisch deskundige verstaan we de definitie zoals aangehouden wordt door de RVO (www.rvo.nl).
- Nadat het eerste conceptrapport gereed is, beoordeelt een collega het rapport op inhoud en vorm. De auteur verwerkt de geplaatste opmerkingen of bespreekt deze met de beoordelaar om zo tot een eensluidend advies te komen.

Een ecologisch deskundige is een persoon met aantoonbare specifieke ecologische kennis en ervaring. Hij of zij geeft ecologisch advies en/of begeleidt werkzaamheden op het gebied van habitats (natuurlijke leefgebieden) en soorten. En heeft voldoende kennis en jarenlange ervaring om ecologisch onderzoek te kunnen doen. Hiermee bedoelen we dat de ecologisch deskundige:

- *de functionaliteit van leefgebieden van beschermde soorten (her)kent;*
- *kennis heeft van algemeen erkende onderzoeksmethoden;*
- *ecologische werkprotocollen kan uitwerken;*
- *specifieke maatregelen kan begeleiden.*

1.4 Definitie product

Het product wat in deze rapportage geleverd wordt is een “nader onderzoek beschermde soorten” conform de begrippenlijst van het Netwerk Groene Bureaus (NGB, 2020) en omvat daarmee alle eisen die het NGB aan dit product stelt.

2 Wettelijk kader

De bescherming van dier- en plantensoorten is geregeld onder de Omgevingswet (wetten.overheid.nl). De artikelen waar in dit hoofdstuk naar wordt verwezen, komen uit dit stelsel aan besluiten, regelingen en wetten.

2.1 Beschermingsregimes

Voor alle activiteiten in de leefomgeving is de specifieke zorgplicht aan de orde. In de context van deze quick scan betreft de specifieke zorgplicht alle van nature in Nederland levende wilde planten en dieren en gaat het over negatieve gevolgen voor de biodiversiteit. Ingevolge de specifieke zorgplicht is degene die een activiteit verricht verplicht om:

- In de eerste plaats alle maatregelen te nemen die redelijkerwijs van diegene kunnen worden gevraagd om die gevolgen te voorkomen.
- Voor zover die gevolgen niet kunnen worden voorkomen: die gevolgen zoveel mogelijk te beperken of ongedaan te maken.
- Als die gevolgen onvoldoende kunnen worden beperkt: die activiteit achterwege te laten voor zover dat redelijkerwijs van diegene kan worden gevraagd.

De specifieke zorgplicht vraagt nadrukkelijk aandacht voor dieren en planten van bijlage II van de Habitatrichtlijn, van het beschermingsregime ‘andere soorten’ en soorten van rode lijsten .

Daarnaast is voor een aantal soorten door middel van verboden een beschermingsregime opgenomen. Er gelden aparte en strengere beschermingsregimes voor ‘vogel-richtlijnsoorten’ (artikel 11.37 t/m 11.40 Besluit activiteiten leefomgeving (Bal)), zie 2.1.1 en voor ‘habitatrichtlijnsoorten’ (artikel 11.46 t/m 11.48 Bal), zie 2.1.2.

Voor soorten die niet onder de specifieke zorgplicht vallen, zoals uitheemse soorten, geldt wel nog de algemene zorgplicht (artikel 1.6 en 1.7 Omgevingswet). Daarnaast moet hoe dan ook voor ieder dier voorkomen worden dat het onnodig lijdt (artikel 11.28 Bal). Kortom ten allen tijden moet bij de uitvoering van werkzaamheden rekening worden gehouden met alle aanwezige dieren, ook als dat niet is voorzien.

2.1.1 Vogelrichtlijnsoorten

Het is verboden om zonder omgevingsvergunning een flora- en fauna-activiteit te verrichten (Artikel 11.37 Bal), geldt voor:

a) Het opzettelijk doden of opzettelijk vangen van levende vogels;
b) Het opzettelijk vernielen of opzettelijk beschadigen van nesten, rustplaatsen en eieren van vogels of het opzettelijk wegnemen van nesten van die vogels;
c) Het rapen en onder zich hebben van eieren van vogels;
d) Het opzettelijk storen van vogels.

De verboden in de wet zorgen voor een goede bescherming van nesten van alle in het wild levende vogelsoorten tijdens het broedseizoen. Globaal loopt het broedseizoen van half maart tot half augustus, maar ook de nesten van broedende vogels buiten deze periode zijn beschermd. Daarnaast zijn van een aantal vogelsoorten de nesten jaarrond beschermd, dus ook als ze niet als broedlocatie worden gebruikt. Het betreft dan over het algemeen soorten die hun nest het gehele jaar als verblijfplaats gebruiken of soorten die niet of nauwelijks in staat zijn om een eigen nest te bouwen.

2.1.2 Habitatrichtlijnsoorten

Voor flora- en fauna-activiteit zijn de volgende verboden van belang voor dieren en planten genoemd op de Habitatrichtlijn en van het verdrag van Bern (Artikel 11.46 Bal):

a) Het in hun natuurlijk verspreidingsgebied opzettelijk doden of opzettelijk vangen van in het wild levende dieren;
b) Het opzettelijk verstoren van dieren;
c) Het in de natuur opzettelijk vernielen of rapen van eieren van dieren;
d) Het beschadigen of vernielen van de voortplantingsplaatsen of rustplaatsen van dieren;
e) Het opzettelijk plukken en verzamelen, afsnijden, ontwortelen of vernielen van planten in hun natuurlijke verspreidingsgebied.

2.2 Opzetvereiste

Bij veel van de hierboven genoemde verboden is er sprake van een opzetvereiste. Zo is het verboden om vogelnesten o*pzettelijk* te beschadigen. In de wet wordt bij deze opzet uitgegaan van 'voorwaardelijke opzet'. Bij voorwaardelijke opzet is men zich bij het handelen bewust van de mogelijke negatieve consequenties, terwijl men de handeling toch uitvoert (Europese Commissie, 2007). Een voorbeeld van voorwaardelijke opzet is iemand die in het voorjaar een boom omzaagt en daarbij 'per ongeluk' een vogelnest beschadigt. De persoon had niet de opzet dit nest te beschadigen. Maar in de broedtijd van vogels is er wel een aanzienlijke kans dat er in een boom een vogel nestelt. Er kan daarom toch sprake zijn van opzettelijke beschadiging van het nest: voorwaardelijke opzet.

2.3 Omgevingsvergunning flora- en fauna activiteit

Schadelijke handelingen die bij ruimtelijke ontwikkelingen aan de orde kunnen zijn, zijn het doden of verwonden van dieren, het verstoren of vernielen van nest- en verblijfplaatsen, of het verdwijnen van essentieel leefgebied wat lijdt tot aantasting van de functionaliteit van nest- en verblijfplaatsen. Indien uit het nader onderzoek blijkt dat een beschermde soort aanwezig is en een schadelijke handeling niet te voorkomen is, kan de provincie onder voorwaarden een omgevingsvergunning flora- en fauna-activiteit verlenen. In dat geval kan de voorziene ruimtelijke ontwikkeling uitgevoerd worden indien aan de voorschriften van de vergunning wordt voldaan en voldoende mitigerende maatregelen getroffen worden (artikel 8.74j t/m l, Bkl).

2.4 Vrijstelling en gedragscodes

Provinciale Staten kunnen in een verordening een vrijstelling verlenen van de bovenstaande verboden (artikel 11.41, 11.49, 11.55 Bal). De provincie Gelderland heeft besloten voor een aantal algemeen voorkomende zoogdiersoorten en amfibieën een vrijstelling te verlenen, voor handelingen die men verricht in het kader van ruimtelijke inrichting en ontwikkeling en voor handelingen in het kader van bestendig beheer en onderhoud. Het betreft de soorten aardmuis, bosmuis, dwergmuis, dwergspitsmuis, egel, gewone bosspitsmuis, haas, huisspitsmuis, konijn, ondergrondse woelmuis, ree, rosse woelmuis, tweekleurige bosspitsmuis, veldmuis, vos, woelrat, bruine kikker, gewone pad, kleine watersalamander, meerkikker en middelste groene kikker.

Daarnaast zijn de in paragraaf 2.1.1 beschreven verboden niet van toepassing op handelingen die men uitvoert in het kader van ruimtelijke inrichting of ontwikkeling of bestendig beheer en onderhoud, wanneer men die handelingen uitvoert conform een goedgekeurde gedragscode (Artikel 11.45, 11.53 en 11.59 Bal). Gedragscodes kunnen daarbij zowel gebruikt worden voor de omgang met de Vogelrichtlijnsoorten, de Habitatrichtlijnsoorten als de andere beschermde soorten.

3 Ecologie van soorten

3.1 Vleermuizen

Elke vleermuissoort heeft een eigen specifiek scala aan eisen waaraan een leefgebied moet voldoen, om zich succesvol te kunnen handhaven. De verblijfplaatsen, vliegroutes en foerageergebieden nemen hierin een centrale plaats in. Deze worden hieronder besproken.

3.1.1 Verblijfplaats

Net als alle zoogdieren zoeken ook vleermuizen een beschermde ruimte op om te slapen, hun jongen te baren en groot te brengen. Dit is de zogenaamde vaste rust- en verblijfplaats. Vleermuizen bezitten door het jaar heen een groot scala aan verschillende soorten verblijfplaatsen om in bovengenoemde behoefte te voorzien. Er wordt voor deze diergroep onderscheid gemaakt tussen kraamverblijfplaatsen, zomerverblijfplaatsen, paarverblijfplaatsen en winterverblijfplaatsen. In de kraamverblijfplaats worden de jongen (één per vrouwtje) gebaard en gezoogd. In dergelijke verblijfplaatsen scholen meerdere vrouwtjes (met jongen) bij elkaar. De omvang van een dergelijke kolonie verschilt per locatie en per soort. Van de gewone dwergvleermuis is bijvoorbeeld bekend dat zij groepen vormt van circa 50 tot 120 individuen (BIJ12, 2024). Bij de laatvlieger zijn deze groepen geregeld kleiner: 10 tot 60 vrouwtjes (Dietz et al., 2011).

In zomerverblijfplaatsen bevinden zich de volwassen mannetjes en vrouwtjes die zich niet voortplanten. Hier zijn geen grote groepen vleermuizen aanwezig. In de paarverblijfplaatsen vindt de paring plaats. Mannetjes bezetten dan een verblijfplaats met daaromheen zijn territorium en proberen vrouwtjes hiernaartoe te lokken om te paren. In de winterverblijfplaats overwinteren de vleermuizen (www.vleermuis.net). Gewone dwergvleermuizen kunnen zowel in kleine als in grote groepen overwinteren (BIJ12, 2024). Van de gewone dwergvleermuis is bekend dat deze gebruik maakt van massawinterverblijfplaatsen. Zodra het in de herfst en winter echt koud wordt, trekken de gewone dwergvleermuizen van hun solitaire winterverblijfplaatsen (vaak zijn dit ook zomer-, kraam-, of paarverblijfplaatsen (BIJ12, 2024)) naar massawinterverblijfplaatsen. Zover bekend zijn dit voornamelijk grote, massieve gebouwen, waar ze diep weg kunnen kruipen in diepe spleetvormige ruimten zoals een spouw, dilatatievoeg of hol vloerelement (Brekelmans & Korsten, 2014). De meervleermuis overwintert weer in grotten of bunkers en andere soorten trekken weg uit Nederland naar warmere oorden (www.vleermuis.net).

Vleermuizen zijn globaal op te delen in gebouwbewonende soorten zoals gewone dwergvleermuis en boombewonende soorten als rosse vleermuis en watervleermuis Daarnaast bestaan soorten die van beide elementen gebruikmaken. Daarbij is ook onderscheid te maken in zomer- en winterverblijfplaatsen van de verschillende soorten. Sommige soorten zoals de gewone dwergvleermuis verblijven het gehele jaar in gebouwen (spouwmuren, achter gevelbetimmeringen, etc.). Andere soorten

als de rosse vleermuis verblijven jaarrond in bomen (in holten, holen en achter loshangend schors). De watervleermuis overwintert echter weer in bunkers, grotten en kelders en verblijft in de zomerperiode in boomholten (Dietz et al., 2011; Zoogdiervereniging en Probos, 2012).

Vleermuizen leven door het jaar heen in een netwerk van verschillende verblijfplaatsen, maar ook in een netwerk van verschillende verblijfplaatsen tijdens hetzelfde seizoen. Afhankelijk van soort en situatie is er sprake van een hoofdverblijfplaats met satellietverblijfplaatsen of van meer gelijkwaardige verblijfplaatsen. Zelfs kraamverblijfplaatsen kunnen van de ene op de andere dag verlaten zijn, waarbij de vrouwtjes hun jongen hangend aan de buik met zich meedragen. Tussen winterverblijfplaatsen wordt minder gewisseld (www.vleermuis.net). Bij de gewone dwergvleermuis liggen alle verblijfplaatsen binnen een straal van 20 kilometer bijeen (BIJ12, 2024). Bij grotere vleermuissoorten als de rosse vleermuis is dit gebied vele malen groter (BIJ12, 2017d).

3.1.2 Vliegroutes

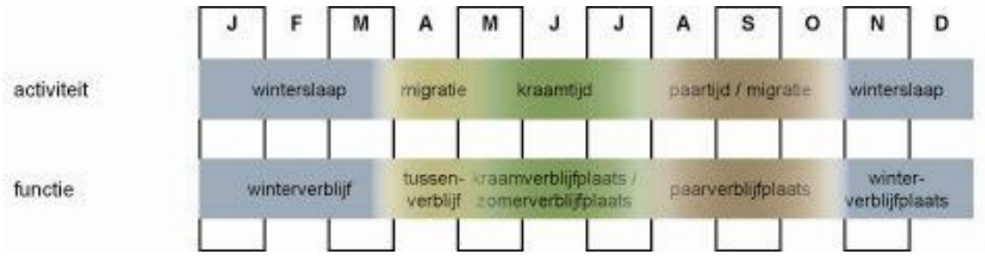
Vanuit hun verblijfplaatsen moeten de vleermuizen hun weg kunnen vinden op zoek naar voedsel. Met behulp van hun sonar moeten ze wegwijs worden in de omgeving tussen verblijfplaats en foerageergebied. Bepaalde vleermuissoorten, zoals de gewone dwergvleermuis, gebruiken hiervoor vaak een vaste route naar het foerageergebied. Lijnvormige elementen als een bomenrij of watergang met opgaande begroeiing zijn hierbij vaak belangrijk voor hun oriëntatie (www.vleermuizenindestad.nl, Limpens et al., 2004).

3.1.3 Foerageergebied

Vleermuizen gebruiken verschillende typen gebieden om voedsel te vinden. Hiertoe heeft elke vleermuissoort zich op enige wijze gespecialiseerd. Een overeenkomst is dat ze allen beschutting van wind zoeken. Enerzijds om energie te besparen, anderzijds vanwege de hoeveelheid insecten. De gewone dwergvleermuis foerageert bijvoorbeeld vooral in open ruimtes in bosachtig gebied of langs wind beschutte, lijnvormige elementen, zoals bomenrijen of watergangen (BIJ12, 2024). De laatvlieger foerageert ten opzichte van de gewone dwergvleermuis in dezelfde soort gebieden maar dan hoger in de lucht en zolang de wind het toe laat boven opener terrein. De watervleermuis foerageert meestal boven open water (www.vleermuizenindestad.nl).

3.1.4 Jaarcyclus vleermuizen

Vleermuizen gebruiken dus een netwerk van deelleefgebieden met verschillende functies. De in Nederland meest voorkomende soorten volgen daarbij een duidelijke seizoenscyclus: beginnend bij winterslaap, achtereenvolgens migratie, kraamperiode, balts- of paartijd, trek en tenslotte weer winterslaap (www.vleermuizenindestad.nl). zie onderstaand tijdschema.



Jaarcyclus van vleermuizen. Bron: Zoogdiervereniging

3.2 Alpenwatersalamander

De alpenwatersalamander heeft een voorkeur voor zandige leemgronden waar hij voorkomt in loof- of gemengde bossen, of kleinschalige landschappen met heggen of struwelen. Voortplanting vindt plaats in allerlei typen water, zolang het niet snelstromend en niet rijk is aan vis (Goverse et al., 2015). Wanneer de temperatuur 's avonds boven de vijf graden komt trekken de alpenwatersalamander naar het voortplantingshabitat, vanaf januari met een piek begin maart. De meeste volwassen dieren worden tot en met juni waargenomen met een piek in april en de eerste heft van mei. De juvenielen migreren vanaf medio juni tot eind september uit het voortplantingswater richting het land. De alpenwatersalamander overwintert op het land. Ze zijn dan te vinden onder houtwallen, houtstapels, stenen, bunkers, kelders of in niet bewoonde holen van knaagdieren (Creemers & van Delft, 2009).

3.3 Rugstreeppad

De rugstreeppad is een bewoner van zandige terreinen met een hoge dynamiek zoals duinen, uiterwaarden, opgespoten terreinen, heidevelden en akkers. Ook komt de soort op minder natuurlijke terreinen voor, zoals braakliggende terreinen of bouwlocaties. Deze soort is een echte pionier die zich ingraaft in kaal braakliggend terrein en haar eitjes legt in ondiepe kale poeltjes en plassen, maar ook slootjes en vennen kunnen geschikt leefgebied zijn. De dieren verlaten half maart de winterverblijfplaats. Voortplanting begint half april en kan doorgaan tot in augustus. Mannetjes verblijven de gehele voortplantingsperiode in het water. Vrouwtjes daarentegen verlaten na de eierafzet het water weer. De rugstreeppad overwintert op het land, de dieren hebben eind oktober allemaal het water weer verlaten (Creemers & van Delft, 2009).

3.4 Roofvogels

3.4.1 Boomvalk

De boomvalk is een schaarse broedvogel die leeft in open landschappen, meestal met water in de buurt. De boomvalk broedde oorspronkelijk veel op heiden, in bossen en langs bosranden op zandgrond. Tegenwoordig broedt zij echter meer in open agrarische landschappen en aan de rand van steden. Ook in gebieden die rijk zijn aan menselijke verstoring zoals sport-, bedrijfsterreinen of langs snelwegen wordt door de boomvalk gebroed. Dit heeft deels te maken met een toenemende

predatiedruk van havik in het oorspronkelijke broedgebied. De boomvalk gebruikt voornamelijk nesten van kraaien maar ook duiven of andere roofvogels om in te broeden en gedraagt zich in broedtijd onopvallend. Nesten kunnen in boomgroepen, vrijstaande bomen maar ook op hoogspanningsmasten aanwezig zijn. De broedperiode is in mei-juni (SOVON, 2002; www.vogelbescherming.nl).

3.4.2 Buizerd

De buizerd heeft de voorkeur voor een afwisselend landschap waar bossen worden afgewisseld door open terrein, weilanden en houtwallen. De combinatie van een bos of bosje met nabijgelegen open land is ideaal. De buizerd maakt in de meeste gevallen gebruik van een bestaand kraaien- of blauwe reigernest, en bouwt deze verder uit tot een omvangrijk nest. Het territorium en bijbehorende nesten wordt jaarrond verdedigd. Nesten bevinden zich in hoge bomen tussen de 6 en 27 meter, grofweg tussen de 1/3 en 2/3 van de boomhoogte. Het nest bevindt zich direct langs de stam of soms op een zijtak, enkel in grove dennen ook in de boomtop (SOVON, 2002).

3.4.3 Havik

De havik komt voornamelijk voor in naald- en loofbos en kan een territorium levenslang bezetten. Ook moerasbos en parken worden gebruikt. Door onderlinge concurrentie en voedselgebrek in bosgebieden worden ook steeds vaker dieren in groengebieden rond de stad aangetroffen. De havik maakt (meestal) zelf een nest hoog in de kroon van een boom welke vaak jarenlang achtereen wordt gebruikt. Soms wordt een nest van een andere roofvogel opgelapt. Meestal worden naaldbomen maar soms ook loofbomen gebruikt. De broedtijd loopt van eind maart tot begin juli (SOVON 2002, www.vogelbescherming.nl).

3.4.4 Ransuil

Ransuilen broeden in allerlei gebieden, waar open veld aanwezig is met voldoende muizen. Ze mijden grote bossen, boomloze gebieden en steden. Tegenwoordig wordt vooral in kleine bosjes en agrarisch cultuurland gebroed. De soort nestelt in een oud nest van een andere soort, bij voorkeur van ekster of zwarte kraai, maar soms ook van houtduif, buizerd of havik. Ze broeden bij voorkeur in naaldbomen, die het beste dekking geven, maar ook in loofbomen, houtwallen, boomgroepen en solitaire bomen. De broedperiode is van half februari tot eind juli, waarbij eileg plaatsvindt van half maart tot half april. (SOVON 2002, www.sovon.nl, www.vogelbescherming.nl).

3.4.5 Sperwer

De sperwer komt voor in allerlei typen bos en kleinschalig landschap met boomgroepen. De soort broedde traditioneel in dichte, niet te oude naaldbossen of gemengde bossen. Onder andere door toename van de havik, die in vergelijkbaar gebied leeft en ook op de sperwer jaagt, broedt de sperwer tegenwoordig echter op allerlei plekken in dichte loofbosjes, wegbeplanting en stadstuinen. De sperwer maakt elk jaar een nieuw nest binnen het bezette territorium, vaak dicht bij het oude. Het nest wordt direct aan de stam op dikke takken gebouwd. Soms wordt het

oude nest van een houtduif verder uitgebouwd. De soort broedt van eind april tot eind juni (SOVON, 2002).

3.4.6 Wespendief

De wespendief nestelt in de kruin van hoge loof- en naaldbomen. Deze wordt echter snel over het hoofd gezien omdat ouders met jongen tot meer dan vijf kilometer van het nest foerageren en de balts boven dit gehele territorium kan plaatsvinden. De soort bouwt jaarlijks een nest of knapt een oud nest op. Als voedsel worden vooral sociale wespen en hun larven en poppen gegeten, maar de wespendief eet ook ander dierlijk voedsel zoals kleine zoogdieren, reptielen of amfibieën. De wespendief start pas in de laatste decade van mei met de ei-leg. De jongen zijn vanaf half augustus vliegvlug en worden dan nog twee weken verzorgt (SOVON, 2002).

3.4.7 Zwarte wouw

De zwarte wouw is een is een soort die in veel verschillende soorten landschap voorkomt, van laagland, bos- en waterrijke gebieden zoals rivierdalen met ooibossen en moerasgebieden. De soort nestelt in halfopen landschappen, doorgaans in de buurt van visrijke wateren, maar vooral in moerasbos. In Nederland is het een uitermate zeldzame broedvogel en zijn maar enkele broedgevallen bekend. Verreweg de meeste zwarte wouwen vertonen zich tijdens de voorjaarstrek, vooral in april en mei. Volwassen vogels trekken gemiddeld enkele weken eerder door dan onvolwassen vogels en blijven veel minder vaak enige tijd hangen. De broedtijd is van april tot en met juni (SOVON, 2002; www.vogelbescherming.nl).

3.5 Eekhoorn

De eekhoorn leeft in allerlei typen bos en is ook in tuinen of parken in de omgeving van bos aan te treffen mits daar voldoende voedsel beschikbaar is. Eekhoorns leven van zaden en noten, schimmels, bessen en jonge scheuten. Ook is bekend dat eekhoorns soms eieren of nestvogels eten. Eekhoorns maken van takken en bladeren, een bolvormig nest van circa 30 tot 50 centimeter doorsnede, op een hoogte van minimaal 5-6 meter in een boom, meestal in een tak- of stamvork. De buitenste zijde van het nest wordt gemaakt van twijgen en de binnenzijde wordt bekleed met mos en gras. Ook natuurlijke boomholtes, oude kraaien- of eksternesten, nestkasten of spechtenholen worden soms als nestlocatie gebruikt. Eekhoorns gebruiken in hun territorium naast hun hoofdnest vaak nog 4 tot 6 reservenesten, bijvoorbeeld als extra vluchtmogelijkheid. Het hoofdnest wordt ook in de winter gebruikt om in warm te blijven, want een winterslaap kennen eekhoorns niet. Eekhoorns kunnen tot tweemaal in het jaar jongen werpen. Meestal worden drie tot vier jongen geboren en ook deze jongen worden grootgebracht in een nest (Kaper et al. 2012, www.zoogdiervereniging.nl, www.rsst.org.uk, www.IVN.nl).

4 Onderzoekmethodiek

4.1 Vleermuizen

4.1.1 Onderzochte soorten, functies en onderzoeksomstandigheden

Het vleermuisonderzoek heeft plaatsgevonden volgens de richtlijnen zoals deze zijn verwoord in het Vleermuisprotocol 2021 (Vleermuisvakberaad Netwerk Groene Bureaus et al., 2021). Om aan deze richtlijnen te kunnen voldoen is allereerst beoordeeld welke vleermuissoorten mogelijk in het besluitgebied voor kunnen komen en welke functies het voor deze soorten kan vervullen. Deze beoordeling is gebaseerd op de bekende verspreiding van in Nederland voorkomende vleermuizen, de ecologie van de soorten en de aangetroffen situatie. In navolgend overzicht is deze beoordeling uiteengezet.

Voor de meervleermuis voldoet het paarverblijfonderzoek niet aan het vleermuisprotocol. Voor de meervleermuis geldt dat deze soort zeer honkvast is voor wat betreft hun verblijfplaatsen (Haarsma, 2011). Alle paarverblijfplaatsen worden daarbij ook in de kraamperiode gebruikt. In dit geval zijn tijdens de kraamperiode geen meervleermuizen in het besluitgebied waargenomen. Daarom is paarverblijfonderzoek naar deze soort niet noodzakelijk.

Beoordeling van mogelijk aanwezige soorten en de functies die de situatie in het onderzoeksgebied zou kunnen vervullen (x = functie is niet uit te sluiten, - = functie is uit te sluiten)

Vleermuissoort	Kraamverblijf	Zomerverblijf	Paarverblijf	Winterverblijf	Massawinterverblijf
Gewone dwergvleermuis	x	x	x	x	x
Ruige dwergvleermuis	-	x	x	x	x
Laatvlieger	x	x	x	x	-
Meervleermuis	x	x	x	-	-
Gewone grootoorvleermuis	x	x	x	-	-
Franjestaart	-	x	-	-	-
Rosse vleermuis	-	-	-	-	-
Watervleermuis	-	-	-	-	-
Bosvleermuis	-	-	-	-	-

De mogelijk aanwezige vleermuissoorten en functies, zoals weergegeven in voorgaand overzicht, zijn in dit onderzoek onderzocht. Om voor deze soorten te voldoen aan de onderzoekseisen van het vleermuisprotocol zijn de veldbezoeken

uitgevoerd zoals is weergegeven in navolgende tabel. In deze tabel zijn ook de weersomstandigheden en het aantal onderzoekers weergegeven. Tevens is weergegeven wanneer welke functies zijn onderzocht.

Data, tijden, onderzoeksomstandigheden en onderzochte functies tijdens de uitgevoerde onderzoeken

Veldonderzoeksdata	07-06-2024	25-06-2024	15-07-2024	15-08-2024	06-09-2024
Zon op	05:22	05:22	05:39	06:25	07:01
Zon onder	21:57	22:04	21:53	21:03	20:15
Tijd (start)	02:15	22:00	22:00	23:15	00:00
Tijd (eind)	05:15	00:30	00:00	01:15	02:00
Temperatuur (°C)	9-7	24-20	18	19	23-21
Windkracht (Bft)	0	2	2	2	2
Neerslag	Geen	Geen	Geen	Geen	Geen
Weersomstandigheden	Goed	Goed	Goed	Goed	Goed
Aantal onderzoekers	3	5	5 vanaf 23:00 3	2	2
Onderzochte soorten	Gd, rd, lv, gg	Gd, rd, lv, gg, mv, fs	Gd, rd, lv, gg, mv, fs	Gd, rd, lv, gg	Gd, rd, lv, gg
Onderzochte Functies					
Kraamverblijfplaatsen	x	x	x		
Zomerverblijfplaatsen	x	x	x		
Paarverblijfplaatsen				x	x
(Massa)winterverblijf				x	x

4.1.2 Methode

De onderzoekers hebben zich gedurende het veldonderzoek over het onderzoeksgebied verspreid en gezocht naar vleermuizen door middel van zichtwaarnemingen en het gebruik van batdetectors. Navolgende waarnemingen zijn belangrijk en zijn in ieder geval genoteerd:

- Vleermuizen die in of uit een gebouw, boom, etc. vliegen. Dit wijst op de aanwezigheid van een verblijfplaats;
- Zwermgedrag; vleermuizen die een tijdje en op een typische manier op een bepaalde plek rondvliegen. Vaak met meerdere vleermuizen, maar kan ook alleen. Dit kan duiden op een verblijfplaats.
- Paargedrag, zoals baltsactiviteit van mannelijke vleermuizen. Dit kan bijvoorbeeld wijzen op de aanwezigheid van een paarterritorium en paarverblijfplaatsen.

4.1.3 Batdetectors

Het onderzoek naar de aanwezigheid van vleermuizen is uitgevoerd door middel van zichtwaarnemingen en onderzoek met batdetectors. In dit onderzoek zijn de typen Petterson D240X, Petterson M500 en/of Batlogger M gebruikt. Een batdetector is een apparaat dat de onhoorbare, ultrasone geluiden van vleermuizen opvangt en vertaalt in voor mensen hoorbare geluiden. Door interpretaties van ritme, klank en hoogte van het door het apparaat uitgezonden geluid kunnen de meeste soorten vleermuizen worden onderscheiden en op naam worden gebracht. Met behulp van deze detectoren kunnen opnames worden gemaakt die eventueel achteraf geanalyseerd kunnen worden met behulp van computerprogramma's. Met name voor de soorten van het geslacht *Myotis* is dit noodzakelijk om tot een zekere determinatie te komen.

4.1.4 Weersomstandigheden

De vleermuisveldbezoeken mogen alleen bij goede weersomstandigheden uitgevoerd worden. Deze eisen zijn ook in het vleermuisprotocol opgenomen. Als de weersomstandigheden onvoldoende zijn, is de vleermuisactiviteit lager dan bij goede weersomstandigheden en geven de waarnemingen geen goed beeld van het vleermuisgebruik van het onderzoeksgebied. In dit geval zijn alle veldbezoeken bij goede weersomstandigheden uitgevoerd. Weergegevens zijn geraadpleegd via de websites van het KNMI, Weer.nl en Buienradar.nl.

4.2 Alpenwatersalamander

Om de aan- of afwezigheid van deze amfibiesoort te bepalen is gebruikgemaakt van eDNA-onderzoek. De monstername heeft plaatsgevonden conform het eDNA filter samplingprotocol van Datura (www.datura.nl). Hierbij worden per monster 28 submonsters van het water genomen waarna het water gefilterd wordt en het filter in pipetjes met conserverende vloeistof wordt gestopt. Datura onderzoekt vervolgens de monsters middels soortspecifieke DNA-analyse of DNA aanwezig is van de alpenwatersalamander. De monstername heeft plaatsgevonden op 8 mei 2024. De gehele poel in het zuiden van het besluitgebied is bemonsterd.

4.3 Rugstreeppad

Het onderzoek naar aan- of afwezigheid van de rugstreeppad is uitgevoerd conform het soortinventarisatieprotocol van het Netwerk Groene Bureaus (NGB, 2023) en moet bestaan uit onderzoek naar voortplantingsbiotoop en landbiotoop (zowel voor de zomer als de winter).

4.3.1 Voortplantingsbiotoop

Voor het voortplantingsbiotoop moet geluisterd worden naar kooractiviteit en gezocht worden naar eisnoeren, larven en juvenielen. Dit is uitgevoerd in en in de omgeving van het besluitgebied. Bij het luisteren naar kooractiviteit worden ook koorgeluiden van rugstreeppadden afgespeeld. Voor het zoeken naar eisnoeren, larven en juvenielen is met een zaklamp potentieel geschikte voortplantingswateren beschenen voor aanwezigheid van eisnoeren en larven en zijn de oevers afgezocht

naar juvenielen. Er dienen minimaal drie veldbezoeken uitgevoerd te worden in de periode van half april tot en met mei en van half juni tot en met begin augustus. Minimaal één van deze veldbezoeken moet in de periode half april – mei en minimaal één veldbezoek moet uitgevoerd worden tussen half juni en half juli. Tussen ieder veldbezoek moet een minimale periode van één week zitten. De onderzoeken moeten plaatsvinden tussen zonsondergang en middernacht en minimaal 1,5 uur duren. Er moet op die avonden sprake zijn van relatief warme avonden, bij voorkeur na regen of een weersomslag.

4.3.2 Landbiotoop

Voor het onderzoek naar zomerlandbiotoop moeten amfibieplaten geplaatst worden in potentieel geschikt landbiotoop. Deze zijn geplaatst op 15 mei 2024. Zie navolgende afbeelding voor de locaties hiervan en een voorbeeld van een amfibieplaten. Hiervoor zijn tapijttegels gebruikt. Er konden maximaal vijf tegels geplaatst worden, aangezien de mogelijkheden voor geschikte locaties beperkt was. Deze platen moeten vervolgens gecontroleerd worden op aanwezigheid van rugstreeppadden onder deze platen. Tegelijkertijd moet gezocht worden naar volwassen individuen die op het land aanwezig zijn. Hiervoor moeten minimaal vier veldbezoeken uitgevoerd worden in de periode half april – september. Tussen ieder veldbezoek moet een minimale periode van één week zitten. De platencontrole moet tussen zonsopkomst en zonsondergang plaatsvinden, terwijl de zichtwaarnemingen van individuen tussen zonsondergang en middernacht moet plaatsvinden. Vanuit efficiëntie zijn de platen steeds kort voor zonsondergang gecontroleerd, waarna aansluitend vanaf zonsondergang is gezocht naar individuen. Er moet op die avonden sprake zijn van relatief warme avonden, bij voorkeur na regen of een weersomslag. Voor de amfibieplaat zijn tapijttegels gebruikt. De aanwezigheid van winterlandbiotoop moet bepaald worden op basis van expert judgement.



Locaties reptiel/amfibieplaten: 3 amfibieplaten in het noorden en 2 rondom de poel in het zuiden

4.3.3 Onderzoeksdata en -omstandigheden

Het onderzoek naar aanwezigheid van volwassen individuen voor landbiotoop en aanwezigheid van kooractiviteit en eisnoeren, larven en juvenielen voor voortplantingsbiotoop moet gecombineerd worden. Omdat het amfibieplaten controleren aansluit op het zoeken naar individuen, wordt dit ook gecombineerd. Derhalve is onderzoek naar voortplantingsbiotoop ook in vier veldbezoeken gedaan. Zie navolgende tabel voor de onderzoeksdata en -omstandigheden.

Onderzocht biotoop	22-05-24	29-05-2024	25-06-2024	16-07-2024
Temperatuur (°C)	16	15-13	25	18
Windkracht (Bft)	2	1	3	2
Neerslag	Geen	Geen	Geen	Geen
Weersomstandigheden	Goed	Goed	Goed	Goed
Voorplantingsbiotoop		x	x	x
Landbiotoop	x	x	x	x

4.4 Roofvogels en Eekhoorn

Voor het onderzoek naar de roofvogels en de eekhoorn wordt in eerste instantie alleen een wintercheck gedaan. Dit onderzoek wordt uitgevoerd om te bepalen of in bomen in en rond het plangebied (grote) nesten en geschikte holtes of spleten aanwezig kunnen zijn, die potentieel dienst kunnen doen als nest- en verblijfplaats. Het betreft de volgende elementen:

- (Grote) takkennesten van kraaien en eksters waarvan boomvalk, buizerd, havik, ransuil, sperwer, wespendief en zwarte wouw gebruik kunnen maken;
- Grote bolvormige nesten met bladen waar eekhoorn nest in maakt.

In de winter is dit goed te zien omdat er dan geen blad aan de bomen zit, dit in tegenstelling tot de andere jaargetijden. De check is uitgevoerd middels een visuele inspectie met verrekijker en zaklamp. Alle grote bomen in en binnen een straal van 75 meter rond het plangebied zijn onderzocht. Dit is in één veldbezoek door één veldwerker uitgevoerd. Het onderzoeken van bomen in de omgeving van het plangebied is van belang om ook duidelijk te krijgen of met de ruimtelijke ontwikkeling mogelijk ook verstoring van dergelijke beschermde elementen in de omgeving plaatsvindt. Zie navolgende afbeelding voor het onderzoeksgebied.

Dit veldbezoek is uitgevoerd op 3 december 2024 van 10:00 tot 11:00 uur. De weersomstandigheden waren 7 graden Celsius, windkracht 2 Bft, bewolkt maar droog.



75 meter (zwart kader) rondom besluitgebied (rood kader)

5 Resultaten en effectbeoordeling

5.1 Vleermuizen

5.1.1 Kraam- en zomerverblijfonderzoek

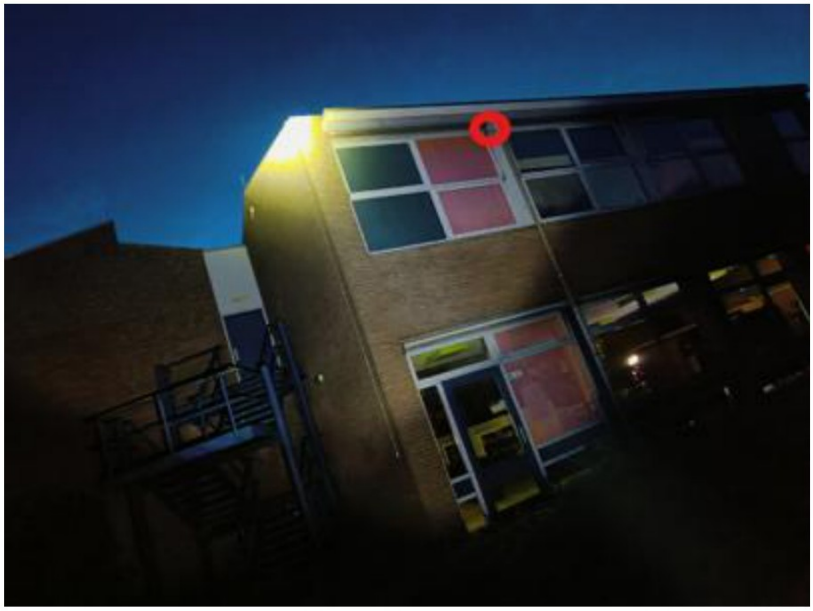
7 juni 2024

Voorafgaand aan het veldbezoek geconstateerd dat de temperatuur onder het protocollaire minimum zat. Bij de start van het veldbezoek was het 10 graden Celcius. Dit is protocollair voldoende.

Vanwege de lage temperatuur, is de aanname gedaan dat de vleermuizen eerder zouden invliegen. Daarmee is de gehele ronde gefocust op het gebouw in plaats van dat er aan het einde meer op de omgeving gefocust werd. Verder zijn drie ervaren veldmedewerkers, een warmtecamera en batdetectors ingezet tijdens het veldbezoek.

Op de zuidwesthoek van het gebouw is een invliegende gewone dwergvleermuis geconstateerd, zonder sonar en niet zwermend, zie navolgende afbeelding. Verder is een langsvliegende *myotis* spec. waargenomen.

Tijdens dit veldbezoek is een zomerverblijfplaats van de gewone dwergvleermuis vastgesteld in het besluitgebied. Andere soorten of gedragingen zijn niet vastgesteld tijdens dit veldbezoek.



Locatie invlieger zuidwesthoek gebouw

25 juni 2024

Tijdens het veldbezoek op 25 juni 2024 een uitvlieger geconstateerd uit de zuidoosthoek van het gebouw. Het betrof een gewone dwergvleermuis. Ook is aan

noordgevel is een uitvlieger van de gewone dwergvleermuis geconstateerd bij de regenpijp, zie navolgende afbeeldingen. Het betreft beide zomerverblijfplaatsen. Verder zijn er geen verblijfplaatsen geconstateerd. Wel werd er sporadisch door gewone dwergvleermuis gefoerageerd en werd er veel gefoerageerd door (maximaal 10) laatvliegers boven het veld in het noorden van het besluitgebied. Het lijkt erop dat op deze locatie belangrijk of essentieel foerageergebied aanwezig is. Het is van belang om deze locatie niet te verstoren en preventieve maatregelen te treffen.

Tijdens dit veldbezoek zijn twee zomerverblijfplaatsen van de gewone dwergvleermuis vastgesteld in het besluitgebied. Dit betreft andere locaties dan het aangetroffen zomerverblijf tijdens het eerste onderzoek. Verder is tijdens dit veldbezoek een egel waargenomen.



Locatie zomerverblijf aan de noordkant van de gewone dwergvleermuis



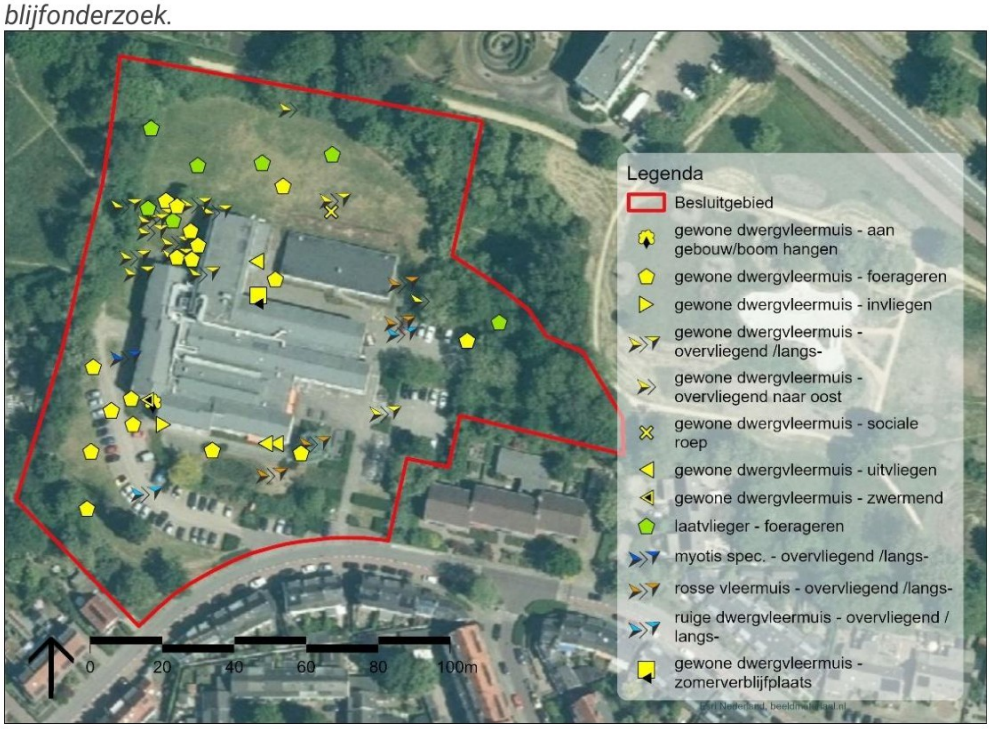
Locatie uitvlieger vanuit raamkozijn of zonwering op zuidoosthoek

16 juli 2024
Tijdens dit onderzoek zijn vanaf 21:45 uur foeragerende dwergvleermuizen waargenomen. Deze waren verspreid over het besluitgebied en foerageerde, met een grove schatting, 10 individuen tegelijk rond de bebouwing in het besluitgebied en aan de bosrand. Vervolgens heeft het tien minuten geregend vanaf 22:25 uur, waarbij geen invliegers zijn waargenomen. Wel was het aantal gewone dwergvleermuizen aanzienlijk minder. Het is niet duidelijk in welke richting deze vlogen.

Verder zijn er wederom gewone dwergvleermuizen uitgevlogen op de reeds bekende locaties. Het betrof de zuidoosthoek van het gebouw en de noordgevel van het gebouw. Na de regen zijn ook laatvliegers waargenomen. Het aantal laatvliegers was lager dan vorige veldbezoeken. Het waren er nu enkele tegelijkertijd. Het tweede uur is er gezocht naar de verblijfplaatsen van de laatvlieger maar deze zijn niet vastgesteld.

Tijdens dit veldbezoek zijn dezelfde verblijfplaatsen als 25 juni 2024 vastgesteld in het besluitgebied. Andere soorten of gedragingen zijn niet vastgesteld tijdens dit veldbezoek.

Navolgende afbeelding visualiseert de waarnemingen van het zomer- en kraamverblijfonderzoek.



5.1.2 Effectbeoordeling kraam- en zomerverblijfonderzoek

Op het terrein zijn drie verblijfplaatsen van de gewone dwergvleermuis vastgesteld. Allen zijn zomerverblijfplaatsen. Eén aan de zuidwestgevel, één aan de zuidoostgevel en één aan de noordgevel.

Daarnaast is het niet uit te sluiten dat de het veld en bosrand ten noorden van het gebouw als belangrijk foerageergebied dienen. Het foerageergebied bevindt zich binnen de invloedssfeer van de voorgenomen maatregelen. Daarom wordt er geadviseerd preventieve maatregelen te treffen om de verstoring te voorkomen en beperken. De werkzaamheden dienen tussen zonsopkomst en zonsondergang worden uitgevoerd in de actieve periode van de vleermuis. Ook dient verlichting naar de bomen en het grasveld niet meer te zijn dan de huidige situatie.

5.1.3 Paar- en winterverblijfonderzoek

15 augustus 2024

Aan het begin van het veldbezoek was er nauwelijks baltsactiviteit. Na een half uur zijn de eerste baltsende gewone dwergvleermuizen waargenomen in het besluitgebied. Verder is de wijdere omgeving verkend. In de wijk ten westen van het besluitgebied werd gebaltst door een gewone dwergvleermuis. Terug in het besluitgebied, werd inmiddels ook gebaltst langs de noordzijde van het gebouw. Hier is één gewone dwergvleermuis waargenomen die baltsend heen en weer vloog. Ook is er een uitvlieger vastgesteld vanuit de bekende verblijfplaats bij de regenpijp. Dit verblijf fungeert nu dus als paarverblijf. Aan de westzijde van het gebouw werd ook gebaltst door een gewone dwergvleermuis. Het vermoeden is dat het om hetzelfde individu gaat, maar het is nog niet volledig uitsluiten dat er aan deze kant van het gebouw ook een paarverblijfplaats bevindt. Het is niet zeker of deze locatie dezelfde is als de zomerverblijfplaats die op 7 juni 2024 is vastgesteld. In dat geval gaan we uit van de worstcase scenario dat het paarverblijfplaats zich op een andere locatie aan de westgevel bevindt.

Tijdens dit veldbezoek is één paarverblijfplaats met zekerheid vastgesteld en aannemelijk dat er nog een tweede paarverblijfplaats in het besluitgebied aanwezig is (worstcase situatie). Andere soorten of gedragingen zijn niet vastgesteld tijdens dit veldbezoek.

6 september 2024

Het veldbezoek van 6 september was rustig. Er is sporadisch een gewone dwergvleermuis waargenomen buiten het besluitgebied. Er zijn geen sociale- of paargeluiden waargenomen. Wel is er in de wijk rondom het besluitgebied af en toe een gewone dwergvleermuis of ruige dwergvleermuis overgevlogen.

Tijdens dit veldbezoek is geen verblijfplaats vastgesteld in het besluitgebied. Andere soorten of gedragingen zijn niet vastgesteld tijdens dit veldbezoek.



Bovenstaande afbeelding visualiseert de waarnemingen van het paarverblijfonderzoek.

5.1.4 Effectbeoordeling paar-en winterverblijfonderzoek

Er zijn twee paarverblijfplaatsen van de gewone dwergvleermuis geconstateerd in het gebouw. De noordelijke locatie betreft dezelfde locatie als een eerder gevonden zomerverblijf. Bij de westelijke locatie wordt uitgegaan van het worstcase scenario, waarbij niet met zekerheid kan worden gezegd of deze overeenkomt met een eerder gevonden zomerverblijfplaats. Verder zijn er geen grote getalen zwermende en invliegende vleermuizen geconstateerd waardoor een massawinterverblijf kan worden uitgesloten.

5.2 Alpenwatersalamander

Uit de eDNA-analyse blijkt dat de alpenwatersalamander niet in de bemonsterde poel aanwezig is. Zie bijlage 1 voor de rapportage. Derhalve kan is vastgesteld dat de alpenwatersalamander niet in het besluitgebied aanwezig is. Met de geplande ruimtelijke ontwikkeling is geen sprake van een negatief effect op de alpenwatersalamander.

5.3 Rugstreeppad

In geen van de veldbezoeken is kooractiviteit waargenomen. Ook zijn er geen eisnoeren, larven of juvenielen aangetroffen. Het voortplantingsbiotoop van de rugstreeppad in het besluitgebied kan daarmee worden uitgesloten.

Tijdens het landbiotoop onderzoek is op verschillende dagen de verdwijning van amfibieplaten geconstateerd. Dit werd geconstateerd op 29 mei en 15 juli 2024. Verder is op 29 mei 2024 een plaat onder water aangetroffen, zie navolgende

afbeelding. Er waren nog genoeg amfibieplaten aanwezig om het onderzoek te kunnen voltooien. Er geen aanwijzingen gevonden voor de aanwezigheid van rugstreeppadden onder de amfibieplaten. Daarmee wordt ook het landbiotoop van de rugstreeppad uitgesloten.



Door extreme regenval is amfibieplaat onder water komen te staan

5.4 Wintercheck

5.4.1 Resultaten

Tijdens het veldbezoek van 3 december 2024 zijn meerdere ekster- en kraaiennesten waargenomen, zie navolgende afbeeldingen. Deze zijn in en rondom het besluitgebied waargenomen. Aangezien niet kan worden uitgesloten het nest wordt gebruikt door een soort met jaarrond beschermd nest (boomvalk, buizerd, havik, ransuil, sperwer, wespendief en zwarte wouw of eekhoorn) dient er rekening te worden gehouden met de soort bij zware werkzaamheden, zoals heien en slopen. De zware werkzaamheden dienen buiten het broedseizoen worden uitgevoerd. De periode van half februari tot oktober valt binnen het broedseizoenen van deze verschillende roofvogelsoorten. Ook dient de verlichting in de richting van deze bomen niet meer te zijn dan de huidige situatie.

De aangetroffen nesten zijn niet bolvormig én met bladeren bedekt. Daarmee is uitgesloten dat een van de nesten door de eekhoorn gebruikt wordt.



Kraaiennest in besluitgebied



Waarnemingen van vogelnesten in en rondom besluitgebied

5.4.2 Effectbeoordeling

Rondom het besluitgebied zijn grote nesten waargenomen. Aangezien niet kan worden uitgesloten het nest wordt gebruikt door een soort met jaarrond beschermd nest (boomvalk, buizerd, havik, ransuil, sperwer, wespendief en zwarte wouw) dient er rekening te worden gehouden met de soorten bij zware werkzaamheden, zoals heien en slopen. Ook dient er niet meer verlichting richting de bomen te zijn dan de huidige situatie. Mits de opdrachtgever deze maatregelen kan waarborgen, is nader onderzoek naar roofvogels en een eventuele omgevingsvergunning flora- en fauna-activiteit niet noodzakelijk. Voor de roofvogels geldt dat de periode van half februari tot oktober binnen het broedseizoenen van de verschillende vogelsoorten valt.

Het is uitgesloten dat de nesten gebruikt worden door de eekhoorn. Nader onderzoek naar de soort of het aanvragen van een omgevingsvergunning flora- en fauna-activiteit voor deze soort is niet noodzakelijk.

6 Conclusie en advies

6.1 Omgevingsvergunning flora- en fauna-activiteit nodig?

In het besluitgebied is onderzoek verricht naar de aanwezigheid van essentiële elementen van vleermuizen, alpenwatersalamander, rugstreeppad en nestplaatsen van roofvogels en de eekhoorn.

De rugstreeppad en alpenwatersalamander zijn niet aanwezig in het besluitgebied. Voor deze soorten hoeft geen omgevingsvergunning flora- en fauna-activiteit te worden aangevraagd.

Wel zijn grote nesten zijn aanwezig in het besluitgebied. Het is uitgesloten dat deze gebruikt worden door de eekhoorn. Het is niet uit te sluiten dat deze nesten worden gebruikt door roofvogels. Mits de opdrachtgever de maatregelen, beschreven in 5.4 kan waarborgen, is nader onderzoek naar deze nesten en een eventuele omgevingsvergunning flora- en fauna-activiteit voor deze soorten niet noodzakelijk.

Ook zijn verblijfplaatsen van de gewone dwergvleermuis aangetroffen in gebouwen binnen het besluitgebied. Er zijn 3 zomerverblijfplaatsen aangetroffen en 2 paarverblijfplaatsen. Één zomerverblijf dient ook als paarverblijf. Het tweede paarverblijf is mogelijk hetzelfde als het aangetroffen zomerverblijf maar niet met zekerheid vast te stellen. Met de geplande werkzaamheden gaan de verblijfplaatsen van de vleermuis verloren. Ook is kans aanwezig op het verwonden of doden van vleermuizen bij de werkzaamheden. In dat geval is sprake van een schadelijke handeling die leidt tot een vergunningsplicht. Om de werkzaamheden toch door te laten gaan is een omgevingsvergunning flora- en fauna-activiteit nodig in combinatie met het treffen van mitigerende maatregelen.

Verder is er mogelijk een essentieel foerageergebied van de vleermuis aanwezig in het besluitgebied, zie paragraaf 5.1.2. Om een negatief effect op het foerageergebied te voorkomen, dienen de werkzaamheden in de actieve periode van vleermuizen tussen zonsopgang en zonsondergang te worden uitgevoerd. Ook dient verlichting richting de bomen niet meer te zijn dan de huidige situatie. Als de opdrachtgever deze maatregelen kan waarborgen, is nader onderzoek naar het foerageergebied en eventuele omgevingsvergunning flora- en fauna-activiteit niet noodzakelijk.

Daarnaast dient te allen tijde rekening gehouden te worden met broedende vogels en de specifieke zorgplicht. Dit geldt onder andere ook voor de egel die tijdens een van de veldbezoeken is waargenomen.

6.2 Omgevingsvergunning flora- en fauna-activiteit aanvragen

Het uitvoeren van ruimtelijke ingrepen waarbij beschermde soorten (gewone dwergvleermuis) worden verstoord is wettelijk gezien mogelijk als men in het bezit

is van een omgevingsvergunning flora- en fauna-activiteit. Een dergelijke omgevingsvergunning dient voor dit project aangevraagd te worden bij het Omgevingsloket.

Bij het indienen van een aanvraag omgevingsvergunning flora- en fauna-activiteit dient een projectplan te worden opgesteld. In dit plan wordt onder andere de verspreiding van de betreffende beschermde soort in het besluitgebied verwoord alsmede het (wettelijk) belang van de ingreep onderbouwd. Daarnaast dient een uitgebreide alternatievenafweging plaats te vinden over waarom de verstoring van vaste rust- en verblijfplaatsen niet is te voorkomen.

Een omgevingsvergunning wordt enkel verleend als voldoende mitigerende maatregelen worden getroffen om zoveel mogelijk schade aan de gewone dwergvleermuis en huismus te voorkomen. Daarnaast dient te allen tijde rekening gehouden te worden met alle broedende vogels en de zorgplicht.

6.3 Mitigerende maatregelen

6.3.1 Vleermuis

6.3.1.1 Kwetsbare periode

Kwetsbare periodes voor de vleermuis zijn periodes waarin de vleermuis in winterslaap of diepe torpor is en wanneer het vrouwtje zwanger is of er afhankelijke jongen aanwezig zijn. Werkzaamheden dienen buiten kwetsbare periode uitgevoerd te worden. Dit geldt ook voor het uitvoeren van maatregelen om verblijfplaatsen ongeschikt te maken. Zodra het pand ongeschikt is verklaard, geldt dat de sloop in elke periode kan plaatsvinden (BIJ12, 2024).
Het ongeschikt maken van de verschillende verblijfplaatsen dient in de volgende periodes uitgevoerd te worden:

- Paar-, en zomerverblijfplaats gewone dwergvleermuis: half april tot half oktober

6.3.1.2 Alternatieve verblijfplaatsen

Vóór de sloop van het gebouw dienen alternatieve verblijfplaatsen te worden gecreeerd. Hiervoor is de regel dat per verblijfplaats ter compensatie 4 alternatieve verblijfplaatsen dienen terug te komen. De afstand van alternatieve verblijfplaatsen dient voor een zomer- en paarverblijfplaats wenselijk binnen 50 meter te zijn met een uiterste afstand van 200 meter.

Tijdelijke verblijfplaatsen dienen als overbrugging gedurende de uitvoering van de verstorende activiteiten. Permanente alternatieve verblijfplaatsen moeten voor lange tijd geschikt blijven. De tijdelijke alternatieven bieden niet dezelfde functionaliteit en continuïteit als permanente alternatieve verblijfplaatsen. Dat is de reden dat toegewerkt dient te worden naar permanent verblijfplaatsen.

Tijdelijke verblijfplaatsen

Tijdelijke voorzieningen mogen pas verwijderd worden nadat er permanent verblijfplaatsen beschikbaar zijn en als ze niet in gebruik zijn. Verder hoeven de tijdelijke verblijfplaatsen niet verwijderd te worden. De voorzieningen kunnen de vorm hebben van een platte vleermuiskast of andere platte voorzieningen. Het is van belang om zo min mogelijk uit te wijken naar vleermuiskasten op palen vanwege de acceptatiekans.

Permanent verblijfplaatsen
Voor het lang beschikbaar maken van verblijfplaatsen dienen permanente verblijfplaatsen worden aangeboden voor de vleermuis. Hierbij de acceptatiekans het hoogst als er inpandige voorzieningen worden aangeboden. Opening naar nieuwe spouwmuren is een goede mogelijkheid voor nieuwe permanente verblijfplaatsen.

Voor zowel tijdelijke of nieuwe permanent verblijfplaatsen dienen aan specifieke factoren te voldoen om de effectiviteit van de aangeboden verblijfplaatsen te bevorderen. Deze zijn te lezen in het Kennisdocument gewone dwergvleermuis (BIJ12, 2024). Voor het inpassen van de juiste alternatieve verblijfplaatsen dient deskundig ecoloog advies te geven.

6.3.1.3 Gewenningsperiode en planning

Wanneer er een alternatief verblijfplaats wordt gecreëerd, heeft de vleermuis een gewenningsperiode nodig om de nieuwe verblijfplaats te vinden. De gewenningsperiode voor de verschillende verblijfplaatsen is als volgt:

- Paar- en zomerverblijf gewone dwergvleermuis: drie maanden in actieve seizoen (begin april t/m eind oktober)

Na de gewenningsperiode, mogen de panden ongeschikt gemaakt worden. Zodra aanwezigheid van vleermuizen uitgesloten is, mag de sloop van de panden gestart worden. Dit proces dient begeleid te worden door een deskundig ecoloog.

6.3.1.4 Beperken verstoring foerageergebied

Ten noorden van het besluitgebied ligt potentieel belangrijk foerageergebied van de vleermuis. Om verstoring te voorkomen wordt aangeraden. De lichtverstoring op deze zijde te beperken en voornamelijk gedurende de dag te werken in de actieve periode van de vleermuizen. Ook dient hier rekening mee te worden gehouden bij de mogelijke plannen m.b.t. tot verlichting bij de nieuwbouwwoningen.

6.4 Broedperiode en specifieke zorgplicht

De specifieke zorgplicht van de Omgevingswet is altijd van toepassing. Iedereen moet voldoende zorg in acht nemen voor alle in het wild levende dieren, planten en hun leefomgeving (o.a. egel). Dit kan bijvoorbeeld door de werkzaamheden te verrichten buiten kwetsbare periodes (het voortplantings- en winterslaapseizoen). Ook kan er gefaseerd worden gewerkt om dieren de kans te geven om te vluchten.

Broedende vogels, vanaf het bouwen van het nest tot het uitvliegen van de jongen, zijn strikt beschermd. De broedende vogels en hun jongen mogen niet verstoord, verwond en gedood worden. Daarnaast mogen in gebruik zijnde nesten ook niet beschadigd en vernield worden. Zonder maatregelen kan dit bij ruimtelijke ingrepen wel gebeuren. Er is echter voor ruimtelijke ontwikkelingen geen vrijstelling hiervoor te verkrijgen in het kader van de Omgevingswet. Wij adviseren daarom om de werkzaamheden buiten de broedperiode te starten, zodat er vanwege de dan aanwezige verstoring geen vogels in de buurt gaan broeden. De werkzaamheden kunnen dan vervolgens wel in de broedperiode doorlopen.

6.5 Vervolgstappen

- Aanvragen omgevingsvergunning flora- en fauna-activiteit Omgevingswet voor de gewone dwergvleermuis;
- Tref tijdig voldoende mitigerende maatregelen voor de gewone dwergvleermuis;
- Tref preventieve maatregelen t.b.v. het foerageergebied van de vleermuis;
- Tref preventieve maatregelen t.b.v. roofvogels met jaarrond beschermd nest, zie paragraaf 5.4;
- Houd rekening met broedende vogels;
- Houd rekening met de zorgplicht (voor o.a. egel).

Geraadpleegde literatuur

BIJ12, 2024. Kennisdocument Gewone dwergvleermuis *Pipistrellus pipistrellus*, versie 2.0, april 2024. BIJ12, Utrecht.

BIJ12. 2017. Kennisdocument Rosse vleermuis. *Nyctalus noctula,* versie 2.0, juli 2017. BIJ12, Utrecht.

BIJ12, 2024a. Kennisdocument Ruige dwergvleermuis *Pipistrellus nathusii*, versie 2.0, september 2024. BIJ12, Utrecht.

Creemers, R.C.M. & J.J.C.W. van Delft, 2009. De amfibieën en reptielen van Nederland. Nederlandse Fauna 9 Nationaal Natuurhistorisch Museum Naturalis, KNNV Uitgeverij & European Invertebrate Survey-Nederland, Leiden.

Dietz, Ch. von Helversen, O. Nill, D. 2011. Vleermuizen. Alle soorten van Europa en Noordwest-Afrika.

Goverse, E., Herder, A.J.E. & de Zeeuw, M.P. 2015. Handleiding voor het Monitoren van Amfibieën in Nederland. Vierde herziene druk. RAVON werkgroep Monitoring, Amsterdam & Centraal Bureau voor de Statistiek, Den Haag.

Haarsma, 2011. De Meervleermuis in Nederland. De Zoogdiervereniging, Nijmegen

Kaper, A. de Wijs, W. J. R. Verbeylen, G. 2012. Handleiding 2012. Monitoring van Rode eekhoorns aan de hand van nesttellingen en haarvallen. Zoogdierwerkgroep natuurpunt.

Limpens, H. J. G. A. Twisk, P. Veenbaas, G. 2004. Met vleermuizen overweg. Brochure Rijkswaterstaat en Vereniging voor Zoogdierkunde en Zoogdierbescherming.

Netwerk Groene Bureaus, 2023. Soortinventarisatieprotocollen in het kader van de Wet natuurbescherming (versie juli 2017). Netwerk Groene Bureaus, Odijk.

Netwerk Groene Bureaus, Definitielijst Netwerk Groene Bureaus 2020, 16 januari 2020.

SAB, 2023. Quick scan natuur. Arnhem, Veluwestraat 120. SAB, Arnhem.

SOVON Vogelonderzoek Nederland, 2002. Atlas van de Nederlandse broedvogels 1998-2000. Nederlandse Fauna 5: 1-584. Nationaal Natuurhistorisch Museum Naturalis, KNNV Uitgeverij & European Invertebrate Survey-Nederland, Leiden

Vleermuisvakberaad Netwerk Groene Bureaus, Zoogdiervereniging (2021) Vleermuisprotocol 2021, januari 2021

Zoogdiervereniging & Probos. 2012. Laanbeheer en vleermuizen; met oog voor veiligheid en cultuurhistorie; met bijdragen van E. A. Jansen, M. H. A. van Benthem, C. de Groot, P. Twisk & H. J. G. A. Limpens.

Websites:
www.bij12.nl
www.IVN.nl
www.ndff.nl
www.rijksoverheid.nl
www.rsst.org.uk
www.sovon.nl
www.vleermuizenindestad.nl
www.vogelbescherming.nl
www.wetten.nl
www.zoogdiervereniging.nl

Bijlage 1 – eDNA onderzoek Alpenwatersalamander

Datura
Environmental Solutions

eDNA onderzoek

alpenwatersalamander



In opdracht van SAB

Colofon

Titel	eDNA onderzoek alpenwatersalamander
Tekst, foto's en samenstelling	[redacted]
In opdracht van	SAB
Naam opdrachtgever	[redacted]
Kenmerk opdrachtgever	190489.05 Arnhem
Rapportnummer	RA24093
Datum opstelling	30-5-2024
Aantal pagina's	7
Contactpersoon vanuit Datura	[redacted]
Wijze van citeren	de Vaan, J. & Wellens-Roemaat, S. 2024 eDNA. Rapport eDNA onderzoek alpenwatersalamander RA24093 Datura Molecular Solutions BV, Wageningen

Datura Molecular Solutions BV

Gevestigd te:
Agro Business Park 10
6708 PW Wageningen
Nederland

+31(0)638229591
www.datura.nl
jarno.devaan@datura.nl

Inhoudsopgave

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

1. Doelstelling

De doelstelling van dit onderzoek is het aantonen van de aan- of afwezigheid van alpenwatersalamander (*Ichthyosaura alpestris*) aan de hand van (e)DNA onderzoek. Hiervoor is gebruik gemaakt van eDNA watermonsters. Dit onderzoek is uitgevoerd in opdracht van SAB.

2. Methode

2.1 Bemonstering

De bemonstering is uitgevoerd door een medewerker van SAB volgens gestandaardiseerde protocollen van Datura (opvraagbaar). Er is 1 watermonster verzameld en aangeleverd aan het laboratorium van Datura (Tabel 1).

Tabel 1: monsterinformatie

Monsternummer	Datum	Type	Locatie
2009670	8-5-2024	Watermonster	Arnhem, 190489.05 poel

2.2 Laboratoriumanalyse

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

1. Het eDNA in de watermonsters is geëxtraheerd middels een chloroform-phenol extractie. 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 geïnhibeerd wordt. Dit wordt gedaan door een bekende hoeveelheid van een fragment artificieel DNA toe te voegen. Vervolgens wordt de concentratie gemeten van dit fragment artificieel DNA. Dit wordt zowel gedaan in een reactie waar een hoeveelheid monster aan toegevoegd wordt, als in een reactie waar geen monster aan toegevoegd wordt. Als DNA detectie in een monster geïnhibeerd wordt, dan is de gemeten concentratie artificieel DNA in de reactie waarin monster toegevoegd wordt lager ten opzichte van de reactie waaraan geen monster aan toegevoegd is. Met name in zuur water, waarin veel organische deeltjes aanwezig zijn kan inhibitie optreden. In een dergelijk geval wordt een extra zuivering stap uitgevoerd of wordt het monster verdund. Vervolgens wordt opnieuw gekeken of de inhiberende stoffen voldoende verwijderd zijn.
3. Detectie van eDNA vindt plaats door middel van een real-time quantitative PCR. Het principe achter deze techniek is dat een specifiek deel van het DNA zeer vaak vermenigvuldigd (geamplificeerd) wordt. Datura maakt gebruik van soort-specifieke primers die uitsluitend hechten aan DNA van de doelsoort en dit vervolgens vermenigvuldigen. Datura werkt bovendien met soort-specifieke probes (een soort primer) die uitsluitend binden aan eDNA van de doelsoort. Binding van de probe aan het vermenigvuldigde eDNA van de doelsoort resulteert in een fluorescent signaal. Dit signaal wordt

gedetecteerd met behulp van een qPCR platform (CFX96 Touch™ van Bio-Rad). De qPCR detectie wordt uitgevoerd met 12 replica's. Daardoor kan zeer gevoelig gedetecteerd worden. De qPCR detectie wordt uitgevoerd met behulp van 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 diverse andere (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 DNase free 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 bodemmonsters 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 gevoeligere 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 nog invloed hebben en er inderdaad geen inhibitie meer optreedt (zie methode voor een uitgebreidere beschrijving);
5. Er wordt altijd een **positieve DNA controle** van de doelsoort 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 het watermonster geen eDNA van alpenwatersalamander gedetecteerd. 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 weergeven 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: Resultaat van de qPCR analyses van het watermonster met 12 replica's.

Monsternummer	Type	Resultaat qPCR analyse
2009670	Watermonster	0/12

sab adviseurs in ruimtelijke ontwikkeling
info@sab.nl - www.sab.nl

sab Arnhem
Frombergdwarsstraat 54
6814 DZ Arnhem

sab Amsterdam
Jacob Bontiusplaats 9
1018 LL Amsterdam