Ecologisch onderzoek soortenbescherming voor dijkversterking Standhazensedijk in Drimmelen

Resultaten en toetsing aan de Wet natuurbescherming

2 februari 2022

Kenmerk R004-1282878VSX-V01-hme-NL

Verantwoording

Titel	Ecologisch onderzoek soortenbescherming voor dijkversterking Standhazensedijk in Drimmelen Resultaten en toetsing aan soortenbescherming onder de Wet natuurbescherming
Opdrachtgever	Waterschap Brabantse Delta
Projectleider	Sietse-Jelle Bijkerk
Auteur	Vincent Sanders
Kwaliteitscontrole	Berto van Dam
Projectnummer	1282878
Aantal pagina's	17
Voorblad	Luchtfoto van de Standhazensedijk (Cyclomedia)
Datum	2 februari 2022
Handtekening	Ontbreekt in verband met digitale verwerking. Dit rapport is aantoonbaar vrijgegeven.

Colofon

TAUW bv
Handelskade 37
Postbus 133
7400 AC Deventer
T +31 57 06 99 91 1
E info.deventer@tauw.com

Inhoud

1 Inleiding 4
1.1 Aanleiding 4
1.2 Leeswijzer 4
2 Plangebied en beoogde ontwikkeling 4
2.1 Plangebied 4
2.2 Beoogde ontwikkeling 5
3 Onderzoeksmethode 6
3.1 Verwachte soorten en functies van het plangebied 6
3.2 Protocollen 6
3.3 Bever 6
3.4 Noordse woelmuis en waterspitsmuis 6
3.5 Hermelijn 9
3.6 Grote modderkruiper 11
4 Resultaten en effecten 11
4.1 Bever 11
4.2 Noordse woelmuis en waterspitsmuis 13
4.3 Hermelijn 14
4.4 Grote modderkruiper 14
5 Vervolgstappen 15
6 Conclusies 16
6.1 Aanleiding 16
6.2 Resultaten en effecten 16
6.3 Vervolgstappen 17
7 Literatuur 17

Bijlage 1 eDNA onderzoek Standhazensedijk

1 Inleiding

1.1 Aanleiding

In opdracht van Waterschap Brabantse Delta heeft TAUW ecologisch onderzoek uitgevoerd langs de Standhazensedijk in Drimmelen. Waterschap Brabantse Delta is voornemens om een gedeelte van de Standhazensedijk te versterken. De dijk voldoet niet meer aan de eisen voor hoogwaterveiligheid. In een eerdere door TAUW uitgevoerde quickscan (TAUW, 2021) bleek dat negatieve effecten van de beoogde ontwikkeling op beschermde soorten (bever, noordse woelmuis, waterspitsmuis, hermelijn en grote modderkruiper) niet konden worden uitgesloten. Daarom is ecologisch soortonderzoek uitgevoerd. Deze rapportage doet verslag van het ecologisch onderzoek en geeft antwoord op de vraag of een ontheffing van de Wet natuurbescherming nodig is.

Er heeft geen onderzoek naar (vliegroutes van) vleermuizen plaatsgevonden. Negatieve effecten zijn uitgesloten als er zowel ten noorden als ten zuiden van de dijk niet meer dan vier populieren in de rij langs de Amertak worden gekapt. Als dit uitgangspunt wijzigt, kan nader onderzoek naar vliegroutes en verblijfplaatsen nodig zijn.

1.2 Leeswijzer

In hoofdstuk 2 volgt een overzicht van het plangebied en de beoogde ontwikkeling. In de navolgende hoofdstukken staan de details en de resultaten van het ecologisch onderzoek. In hoofdstuk 3 volgt eerst de onderzoeksmethode, waarna in hoofdstuk 4 de resultaten van de onderzoeken per soort(groep) is behandeld. Aan de hand van de resultaten is een effectbeoordeling uitgevoerd. In hoofdstuk 5 zijn de vervolgstappen besproken die nodig zijn om tot uitvoering te komen. Tot slot vat hoofdstuk 6 alles in een conclusie samen.

2 Plangebied en beoogde ontwikkeling

2.1 Plangebied

Figuur 2.1 toont de ligging van het plangebied. Het plangebied bestaat uit een dijk. Op de dijk ligt een fietspad. De dijk is begroeid met gras en laagblijvende kruiden zoals brandnetel, smeerwortel, ridderzuring en perzikkruid. Aan de noordkant gaat de teen van de dijk over in een natuurvriendelijke oever aan een recreatieplas. De oever is begroeid met riet en andere oevervegetatie. Aan de recreatieplas ligt ‘Beachclub Puur’. Hier worden feesten en bruiloften georganiseerd. Ten westen van ‘Beachclub Puur’ zijn recent een aantal landtongen aangelegd waarop (recreatie)woningen zijn beoogd. De recreatieplas is onderdeel va een (jacht)haventerrein. Het complete haventerrein ligt aan de zuidkant van de Amer. Ten noorden van de Amer ligt de Biesbosch.

Aan de zuidkant van de dijk (binnendijks) liggen akkers waar tijdens het veldbezoek voor de quickscan voornamelijk maïs op werd verbouwd. Tussen de akkers en de dijk ligt een sloot van ongeveer twee meter breed en een meter diep. De meest nabijgelegen bebouwing (boerderij) ligt op ongeveer 70 meter afstand van de dijk.

Ten oosten van het plangebied ligt de Amertak. Op de dijk langs de Amertak staat een dubbele rij volgroeide populieren. Het ontbreekt zowel ten noorden als ten zuiden van de dijk verder aan bomen en struiken. In 2016 is een doorsteek tussen de recreatieplas en de Amertak gemaakt.

Figuur 2.1 Ligging plangebied (globaal begrensd)

2.2 Beoogde ontwikkeling

Uit de WBI2017-beoordeling volgt dat de Standhazensedijk in Drimmelen een hoge kans heeft op falen door '*piping*'. Omdat de hoge faalkans ook blijkt uit de inspectieresultaten, is de opgave bij dit dijkvak urgent. Bij hoge waterstanden kan water door zandlagen die aanwezig zijn onder de basis van de dijk, onder de dijk doorstromen. Dit gebeurt veelal na het opbarsten van de deklaag (door waterdruk) op een binnendijkse plek/locatie. Wanneer daarbij zanddeeltjes meegevoerd worden, kan door erosie een holle ruimte (ook wel '*pipe*' genoemd) ontstaan. Hierdoor wordt de dijk ondermijnd en kan deze bezwijken. Dit bezwijkmechanisme noemen we '*piping*'. Het dijkvak voldoet hierdoor in ruime zin niet aan de norm.

3 Onderzoeksmethode

In dit hoofdstuk is de methode van het uitgevoerde onderzoek per verwachte soort beschreven.

3.1 Verwachte soorten en functies van het plangebied

Op basis van bekende verspreidingsgegevens en uitkomst van het veldbezoek voor de quickscan was op voorhand niet uit te sluiten dat beschermde soorten in het plangebied voorkomen. Daardoor zijn negatieve effecten op beschermde soorten niet uitgesloten (TAUW, 2021). De beschermde soorten werden verwacht vanwege de kenmerken van het plangebied en de omgeving daarvan. De onderzoeksinspanning is afgestemd op de te verwachten soorten en de ecologische functies die het plangebied kan bieden aan deze soorten.

3.2 Protocollen

Het veldwerk voor het ecologisch soortonderzoek is uitgevoerd volgens de meest recente versies van algemeen geaccepteerde onderzoeksprotocollen. In sommige gevallen betreft dit de kennisdocumenten van BIJ12 of de soortinventarisatieprotocollen van het Netwerk Groene Bureaus. Indien voor een soort geen onderzoeksprotocol aanwezig is, is het onderzoek afgestemd op basis van trefkans. In deze gevallen is een nadere toelichting gegeven over de gehanteerde onderzoeksopzet. In de volgende paragrafen is per soort(groep) de methode van het onderzoek beschreven.

3.3 Bever

Voor het onderzoek naar bever zijn de richtlijnen uit het Kennisdocument Bever (BIJ12, 2017) gebruikt. Omdat het waarnemen van bevers erg moeilijk is (ze zijn nachtactief), is het beveronderzoek uitgevoerd door het zoeken naar sporen. Hierbij is het plangebied afgelopen en is gezocht naar vraatsporen, beverdammen, beverkanalen, uittredeplaatsen en wissels. Ook is tijdens het onderzoek gezocht naar takkenburchten en oeverholen. Het onderzoek is uitgevoerd op 7 oktober 2021. Het plangebied was overzichtelijk, doordat de oevervegetatie aan de voet van de dijk (noordzijde) was gemaaid. De resultaten van het veldbezoek zijn aangevuld met gegevens van het waterschap.

3.4 Noordse woelmuis en waterspitsmuis

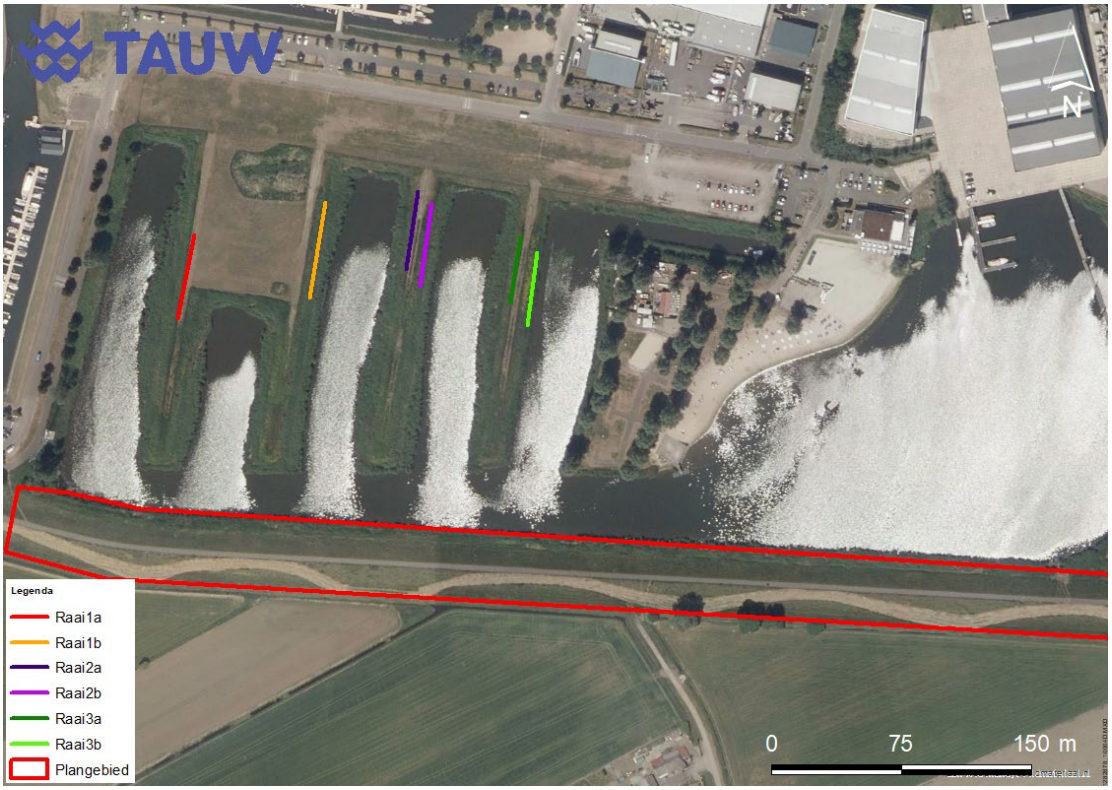
Voor het onderzoek naar noordse woelmuis en waterspitsmuis zijn de richtlijnen uit het Kennisdocument Noordse Woelmuis (BIJ12, 2017) gebruikt. Er is geen specifiek protocol voor waterspitsmuis beschikbaar. De methode om aan- of afwezigheid van noordse woelmuis vast te stellen, is ook geschikt voor waterspitsmuis. Beide soorten komen in vochtig habitat voor en vertonen gelijkenis doordat ze beide tot de groep muizen behoren.

Het onderzoek is uitgevoerd met inloopvallen (type: ‘*Longworth*’). Dit zijn vallen waar de muizen worden opgesloten in een kleine ruimte en de muizen in leven blijven. Op geschikte locaties zijn de vallen onder de vegetatie op plekken met voldoende dekking geplaatst. Per vangplek is een

raai geplaatst van twintig vallen, welke paarsgewijs op onderlinge afstand van tien meter uit elkaar geplaatst is. In totaal zijn drie raaien geplaatst.

Omdat de vegetatie aan de voet van de dijk volledig tot op het maaiveld was gemaaid, was door het ontbreken van voldoende dekking geen geschikt habitat meer aanwezig voor noordse woelmuis en waterspitsmuis. De raaien zijn daarom geplaatst in geschikte delen rondom het plangebied en wel op de oevers van de landtongen ten noorden van het plangebied. Om beide zijdes van de landtongen te onderzoeken zijn de raaien opgesplitst, waardoor aan elke zijde tien raaien zijn geplaatst. Figuur 3.1 geeft een impressie van de vangstlocaties. Figuur 3.2 geeft de locatie van de raaien op kaart weer.

Figuur 3.1 Locatie waar raai 1b is geplaatst. Op de achtergrond is het plangebied zichtbaar met de gemaaide oever aan de voet van de dijk



Figuur 3.2 Locaties van de raaien op kaart weergegeven

Het onderzoek is in oktober 2021 uitgevoerd. Oktober is voor het vangen van muizen het meest geschikt. De populatiedichtheden zijn in deze periode het grootst door aanwezigheid van jongen. Hierdoor wordt de vangkans vergroot.

Op vrijdagmiddag 1 oktober 2021 zijn de raaien rond het plangebied geplaatst. De vallen zijn op dat moment nog niet op scherp gezet. Wel is er hooi en voedsel in de val aangebracht. Het hooi dient als nestmateriaal. Het voedsel bestond uit vogelvoer en meelwormen en dient als lokmiddel, maar ook om muizen in leven te houden. Gedurende het weekend konden de mogelijk aanwezige muizen wennen aan de vallen.

Op maandagochtend is (indien nodig) nieuw hooi en voedsel aangebracht en zijn de vallen op scherp gezet om daadwerkelijk muizen te kunnen vangen. Hierna is om de twaalf uur een controle uitgevoerd. Bij elke controle is (indien nodig) nieuw hooi en voedsel aangebracht. Op donderdagochtend 7 oktober 2021 zijn de vallen voor de laatste keer gecontroleerd en zijn ze verwijderd uit het plangebied. Alle bezoekgegevens zijn weergegeven in tabel 3.1.

Tabel 3.1 Bezoekgegevens van het onderzoek naar noordse woelmuis en waterspitsmuis

Datum	Tijdstip	Activiteit
1 oktober 2021	Niet van toepassing	Plaatsing muizenvallen met stro en voedsel
4 oktober 2021	Ochtend	Scherpstellen muizenvallen, aanbrengen stro en voedsel
4 oktober 2021	Avond	Controlemoment, aanbrengen voedsel en stro
5 oktober 2021	Ochtend	Controlemoment, aanbrengen voedsel en stro
5 oktober 2021	Avond	Controlemoment, aanbrengen voedsel en stro
6 oktober 2021	Ochtend	Controlemoment, aanbrengen voedsel en stro
6 oktober 2021	Avond	Controlemoment, aanbrengen voedsel en stro
7 oktober 2021	Ochtend	Controlemoment en ophalen muizenvallen

Aanvullend heeft eDNA-onderzoek plaatsgevonden om te bepalen of noordse woelmuis en waterspitsmuis in het gebied aanwezig zijn of recent aanwezig zijn geweest. Wanneer noordse woelmuis en waterspitsmuis voorkomen in een gebied laten de soorten onbewust DNA achter in de omgeving. De ‘e’ voor DNA staat dan ook voor ‘*environmental*’. Dit eDNA blijft in de omgeving aanwezig zolang de soort daar (recentelijk) voorkomt. Door aseptische bemonstering zijn op twee locaties per soort in het plangebied watermonsters genomen. Deze monsters zijn genomen op de voor beide soorten meest kansrijke plekken.

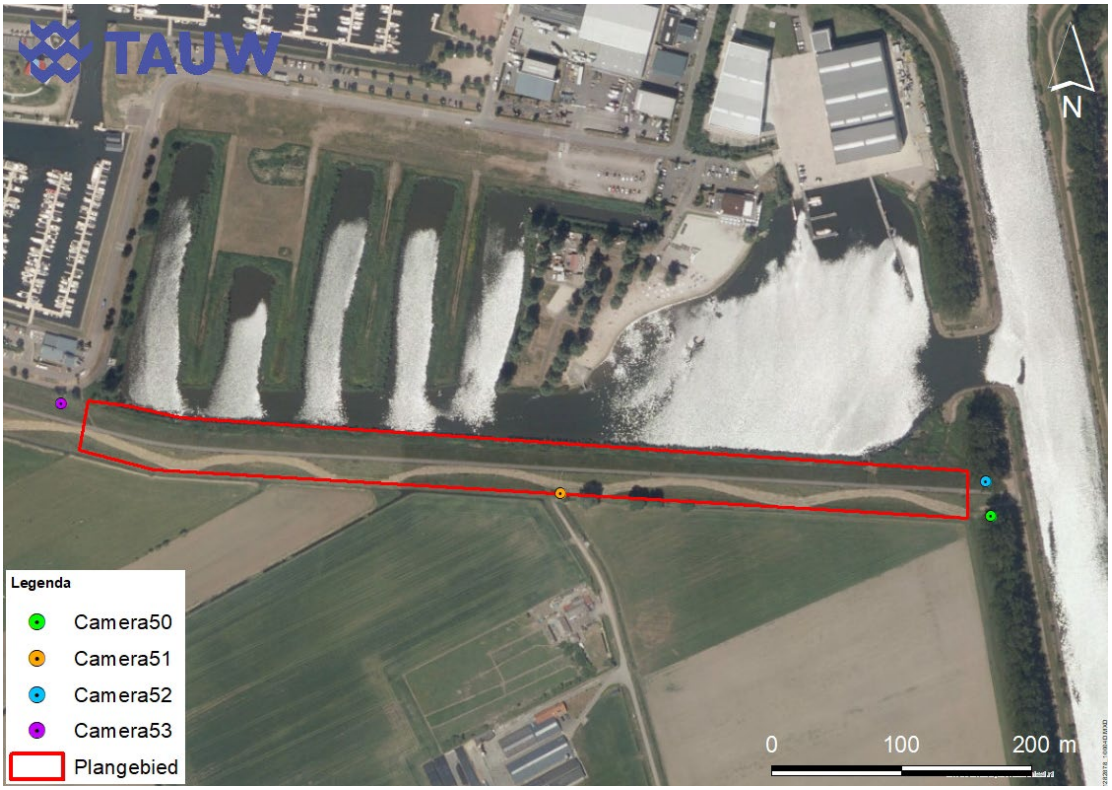
Het bemonsteren en analyseren is door een in eDNA gespecialiseerd laboratorium uitgevoerd. In het laboratorium is met PCR-technieken bepaald of er eDNA van noordse woelmuis en/of waterspitsmuis voorkomt in de monsters. Aan de hand van de uitslagen kan bepaald worden of deze soorten aan- of afwezig zijn in het plangebied. De werkwijze is dermate geoptimaliseerd dat een betrouwbaar resultaat verkregen wordt. De exacte beschrijving van deze methode en op welke locaties welke type monsters zijn bemonsterd staat beschreven in bijlage 1.

3.5 Hermelijn

Voor het onderzoek naar hermelijn zijn de richtlijnen gebruikt uit de Handreiking kleine marterachtigen (Provincie Noord-Brabant en Zoogdiervereniging, 2017). Om de aan- of afwezigheid aan te tonen zijn vier cameravallen ingezet. Wanneer er beweging voor de camera wordt gedetecteerd worden foto’s gemaakt die op een later moment zijn beoordeeld. Het aantal cameravallen is bepaald aan de hand van de omvang en geschiktheid van het plangebied en door ‘*expert judgement*’. Door de inzet van een overmatig aantal cameravallen ontstaat een goed beeld van de situatie in het plangebied en is bij technische storing geborgd dat er voldoende overige cameravallen functioneel zijn.

Er is gebruik gemaakt van twee standaard cameravallen die los in het veld zijn geplaatst. Voor de camera is lokmiddel aangebracht in de vorm van een doorboord blikje sardientjes, pindakaas en kattenbrokken. Daarnaast zijn twee struikrovers ingezet. Een struikrover is een grote buis die aan één kant open is. Via een verloopplank is een doorboord blikje sardientjes bevestigd voor de camera. De struikroverbuis heeft door de vormgeving een aantrekkende werking op hermelijn. Door het aanbrengen van het doorboord blik sardientjes wordt de kans om hermelijn vast te leggen vergroot.

De cameravallen zijn op 7 oktober 2021 in het plangebied geplaatst. De locaties zijn weergegeven in figuur 3.3. In tabel 3.2 zijn de data van de veldbezoeken weergegeven. Vervolgens is op 3 december 2021 een controleronde uitgevoerd. Hierbij zijn de beelden overgezet naar een harde schijf, zijn de batterijen verwisseld en is nieuw lokmiddel aangebracht. Op 7 januari 2021 zijn de cameravallen weer verwijderd uit het plangebied. De cameravallen hebben in totaliteit 3 maanden in het plangebied gestaan. Deze periode is (veel) langer dan staat aangegeven in de Handreiking Kleine Marterachtigen (Provincie Nood-Brabant en Zoogdiervereniging, 2017). Deze langdurige periode is aangehouden omdat er buiten het optimale inventarisatieseizoen onderzoek is gedaan. Door deze periode aan te houden is een volledig beeld ontstaan van de functie die het plangebied heeft voor hermelijn.



Figuur 3.3 Locaties van cameravallen in het plangebied

Tabel 3.2 Plaatsingsgegevens cameravallen

Camera	Type cameraval	Kijkrichting	Locatie
50	Struikrover	West	Aan boom gericht op hekwerk met vegetatie
51	Standaard	Oost	Aan hekwerk gericht op oever van sloot en voet van dijk
52	Standaard	Noord	Aan boom gericht op dijktalud
53	Struikrover	Noordwest	In droge greppel met ruige vegetatie

3.6 Grote modderkruiper

Om de aan- of afwezigheid van grote modderkruiper aan te tonen is gebruik gemaakt van eDNA-technieken. Wanneer een grote modderkruiper voorkomt in een watergang laat de soort onbewust DNA achter in de omgeving. De ‘e’ voor DNA staat dan ook voor ‘*environmental*’. Dit eDNA blijft in het water aanwezig zolang de soort daar (recentelijk) voorkomt. Door aseptische bemonstering zijn op twee locaties in het plangebied watermonsters genomen. Deze monsters zijn genomen op geschikte plekken, de watergang ten zuiden van de dijk.

Het bemonsteren en analyseren is door een in eDNA gespecialiseerd laboratorium uitgevoerd. In het laboratorium is met PCR-technieken bepaald of er eDNA van grote modderkruiper voorkomt in de watermonsters. Aan de hand van de uitslagen kan bepaald worden of grote modderkruiper aan- of afwezig is in het plangebied. De werkwijze is dermate geoptimaliseerd dat een betrouwbaar resultaat verkregen wordt. De exacte werkwijze van het laboratorium zijn in te zien in bijlage 1 van deze rapportage.

4 Resultaten en effecten

In dit hoofdstuk zijn resultaten van het uitgevoerde onderzoek uitgewerkt. Tevens is bepaald wat de effecten van de beoogde ontwikkeling zijn op de aangetroffen soorten en functies.

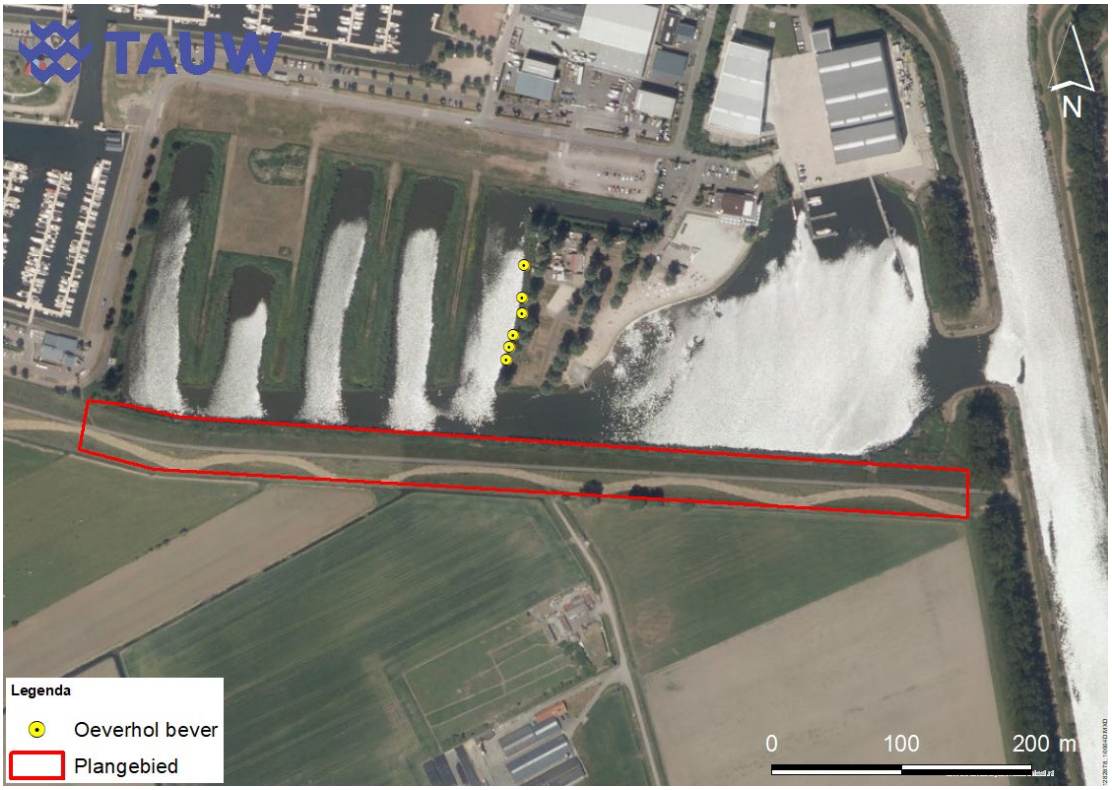
4.1 Bever

Tijdens de visuele inspectie zijn geen graafsporen, knaagsporen, markeerplekken of andere sporen aangetroffen die duiden op frequent gebruik van het plangebied. Aan de oostkant is wel een wissel aangetroffen die vanaf de oever van de recreatieplas naar de Amertak loopt (figuur 4.1).

Figuur 4.1 Beverwissel vanaf de recreatieplas naar de Amertak

De wissel is niet frequent in gebruik. Het gras is op de wissel nog volledig intact. Wanneer bever frequent gebruik maakt van een wissel ontstaat er een modderspoor zonder vegetatie. Gelet op het ontbreken van overige sporen en dat de wissel onregelmatig gebruikt wordt zijn verblijfplaatsen van bever in het plangebied uitgesloten.

Op de landtongen zijn meer sporen aangetroffen van bever, zoals een tweetal frequenter in gebruik zijnde wissels. Tijdens het controleren van de muizenvallen is geen takkenburcht aangetroffen. Uit gegevens van het waterschap blijkt dat op de meest oostelijke en verbrede landtong enkele oeverholen van bever aanwezig zijn (zie figuur 4.2). De oeverholen bevinden zich ver buiten de meest kritische verstoringsafstand van 20 meter rondom een burcht (BIJ12, 2017). De kortste afstand van het dichtstbijzijnde oeverhol tot het plangebied betreft meer dan 50 meter. De mogelijk aanwezige oeverholen liggen op voldoende afstand om de functie van het oeverhol te behouden. Een oeverhol biedt, doordat deze onder de grond aanwezig is, voldoende bescherming tegen geluidsoverlast en optische verstoring. Trillingen worden opgevangen in de eerste meters van het water naast het plangebied en zullen niet doordringen tot de landtongen.



Figuur 4.2 Resultaten van het beveronderzoek op kaart weergegeven

Er is geen ontheffing van de Wet natuurbescherming nodig voor het aantasten van verblijfplaatsen van bever. Wel dient verstoring tijdens de nacht voorkomen te worden. Door uitsluitend bij daglicht te werken is verstoring tijdens foerageermomenten van bever uit te sluiten.

In de quickscan (TAUW, 2021) is beschreven dat strikt genomen een ontheffing nodig is voor het (tijdelijk) aantasten van foerageergebied, indien er in de zomerperiode en/of najaar oevervegetatie wordt verwijderd. Ook als de akkers onbereikbaar raken voor bever is een ontheffing nodig.

Gelet op de resultaten uit het ecologisch onderzoek wordt het plangebied slechts incidenteel gebruikt door bever als foerageergebied. Hierdoor is het plangebied, net als de akkers ten zuiden daarvan, geen essentieel onderdeel van het leefgebied van bever. De aantasting van oevervegetatie heeft daarnaast al plaatsgevonden door regulier maaibeheer, waardoor het plangebied nauwelijks tot geen functie meer heeft voor bever. Daarnaast blijven de meest oostelijk gelegen akkers ten zuiden van het plangebied vanuit de Amertak ook tijdens de werkzaamheden bereikbaar voor bever en tijdens rustige uren in de nacht wanneer er geen werk plaatsvindt. Hierdoor is er geen ontheffing nodig voor aantasting van essentieel foerageergebied van bever.

4.2 Noordse woelmuis en waterspitsmuis

Tijdens het ecologisch onderzoek met inloopvallen is geen noordse woelmuis of waterspitsmuis aangetroffen. Wel is er zes keer een veldmuis en één keer een rosse woelmuis gevangen. Ook uit

het eDNA-onderzoek blijkt dat noordse woelmuis en waterspitsmuis afwezig is in het plangebied (zie bijlage 1). Een ontheffing van de Wet natuurbescherming voor noordse woelmuis en waterspitsmuis is niet nodig.

4.3 Hermelijn

Camera 52 heeft vanaf 2 december 2021 tot het einde van de onderzoeksperiode niet gefunctioneerd. Tijdens de laatste controlestap is één batterij losgeschoten uit de behuizing. Hierdoor had de cameraval geen stroomvoorziening en kon deze geen fauna registreren. Doordat er is gekozen voor een overmatige inzet van cameravallen is desondanks een goed beeld ontstaan van de functie die het plangebied heeft voor hermelijn. Zo kan het wegvallen van camera 52 worden opgevangen door camera 50 in de struikrover, die was geplaatst op korte afstand van camera 52.

Tijdens het onderzoek is er geen hermelijn geregistreerd. Ook andere marterachtigen zijn niet geregistreerd. Hieruit kan geconcludeerd worden dat het plangebied geen beschermde functie heeft voor hermelijn. Een ontheffing van de Wet natuurbescherming is niet nodig.

4.4 Grote modderkruiper

De volledige resultaten van het eDNA-onderzoek naar grote modderkruiper staan vermeldt in bijlage 1. De meest westelijke, bemonsterde watergang ten zuiden van de dijk is negatief bevonden op grote modderkruiper (0/12 replica’s). In het oostelijk deel van de watergang is een zeer lage concentratie eDNA van grote modderkruiper aangetroffen (1/12 replica’s). Dit betekent dat de watergang ten zuiden van de dijk behoord tot het leefgebied van grote modderkruiper en daardoor beschermd is.

Het advies is om deze watergang te ontzien tijdens uitvoering van de werkzaamheden. Op dat moment is geen ontheffing nodig van de Wet natuurbescherming. Wanneer dit niet mogelijk is wordt het leefgebied van grote modderkruiper aangetast en kunnen exemplaren worden gedood of verwond en is wel een ontheffing van de Wet natuurbescherming nodig.

5 Vervolgstappen

In dit hoofdstuk is per soort beschreven welke vervolgstappen nodig zijn om het voornemen binnen de kaders van de Wet natuurbescherming uit te voeren.

In de omgeving van het plangebied zijn beschermde functies van bever en grote modderkruiper aanwezig. Door het nemen van maatregelen is een overtreding van de Wet natuurbescherming te voorkomen en is geen ontheffing nodig. De maatregelen bestaan uit het volgende:

- Werk uitsluitend bij daglicht om verstoring van bever te voorkomen
- De watergang ten zuiden van de dijk dient intact te blijven om het leefgebied van grote modderkruiper niet aan te tasten

Wanneer het intact laten van de watergang ten zuiden van de dijk niet mogelijk is, is een ontheffing van de Wet natuurbescherming (artikel 3.10, lid 1a en 1b) nodig. De ontheffingsaanvraag moet ingediend worden bij het bevoegd gezag voor de te overtreden verbodsbepalingen.

Om een ontheffing aan te vragen moet een activiteitenplan opgesteld worden. In het activiteitenplan moet ingegaan worden op de volgende onderdelen:

- De beoogde ontwikkeling en de planning hiervan
- De aanwezige soorten, de beschermde ecologische functies en hoe die zijn onderzocht
- De te overtreden verbodsbepalingen
- De mitigerende en compenserende maatregelen
- Het wettelijk belang van de ontwikkeling
- De staat van instandhouding van de soort
- Een alternatievenafweging

Als het bevoegd gezag akkoord gaat met de alternatievenafweging, het wettelijk belang en de maatregelen die getroffen worden om negatieve effecten te verzachten of te voorkomen, verleent deze een ontheffing. In dat geval zijn er vaak in de verleende ontheffing voorwaarden beschreven. Meestal is één van die voorwaarden het opstellen van een werkprotocol waarin de mitigerende en compenserende maatregelen uitgewerkt worden en wordt de aanwezigheid van ecologische begeleiding vereist.

Bij formele ontheffingsaanvragen dient rekening gehouden te worden met een proceduretijd. De wettelijk vastgestelde proceduretermijn voor de behandeling van een ontheffingsaanvraag bedraagt 13 weken. Het bevoegd gezag kan deze eenmalig met 7 weken verlengen tot een maximale proceduretermijn van 20 weken.

6 Conclusies

In dit hoofdstuk zijn de conclusies en gevolgen voor de beoogde ontwikkeling samengevat.

6.1 Aanleiding

In opdracht van Waterschap Brabantse Delta heeft TAUW ecologisch onderzoek uitgevoerd langs de Standhazensedijk in Drimmelen. Waterschap Brabantse Delta is voornemens om een gedeelte van de Standhazensedijk te versterken. De dijk voldoet niet meer aan de eisen voor hoogwaterveiligheid. In een eerdere door TAUW uitgevoerde quickscan (TAUW, 2021) bleek dat negatieve effecten van de beoogde ontwikkeling op beschermde soorten (bever, noordse woelmuis, waterspitsmuis, hermelijn en grote modderkruiper) niet konden worden uitgesloten. Daarom is ecologisch soortonderzoek uitgevoerd. Deze rapportage doet verslag van het ecologisch onderzoek en geeft antwoord op de vraag of een ontheffing van de Wet natuurbescherming nodig is.

6.2 Resultaten en effecten

Alleen het voorkomen van bever en grote modderkruiper is tijdens het ecologisch soortonderzoek aangetoond. Het plangebied heeft voor bever geen essentiële functie en de akkers blijven tijdens de werkzaamheden bereikbaar. Hierdoor is voor bever geen ontheffing van de Wet natuurbescherming nodig. Wel zijn maatregelen nodig om verstoring op bever te voorkomen.

Grote modderkruiper komt voor in de sloot ten zuiden van de dijk. Tijdens het eDNA-onderzoek is een zeer lage concentratie van grote modderkruiper aangetroffen. Er moeten maatregelen getroffen worden om deze sloot met leefgebied van grote modderkruiper te behouden. Door het nemen van maatregelen is een overtreding van de Wet natuurbescherming te voorkomen en is geen ontheffing nodig. Wanneer het niet mogelijk is deze sloot te behouden is een ontheffing van de Wet natuurbescherming nodig.

De resultaten van het ecologisch soortonderzoek in het plangebied zijn samengevat in tabel 6.1.

Tabel 6.1 Samenvatting resultaten ecologisch soortonderzoek Standhazensedijk Drimmelen

Soort	Aanwezig of afwezig?	Ontheffing nodig?
Bever	Ja, buiten plangebied	Nee, geen essentieel leefgebied. Wel maatregelen nodig om verstoring te beperken.
Noordse woelmuis	Afwezig	Nee
Waterspitsmuis	Afwezig	Nee
Hermelijn	Afwezig	Nee
Grote modderkruiper	Aanwezig (sloot ten zuiden van dijk)	Nee, mits maatregelen worden genomen

6.3 Vervolgstappen

In de omgeving van het plangebied zijn beschermde functies van bever en grote modderkruiper aanwezig. Door het nemen van maatregelen is een overtreding van de Wet natuurbescherming te voorkomen en is geen ontheffing nodig. De maatregelen bestaan uit het volgende:

- Werk uitsluitend bij daglicht om verstoring van bever te voorkomen
- De watergang ten zuiden van de dijk dient intact te blijven om het leefgebied van grote modderkruiper niet aan te tasten

Wanneer het intact laten van de watergang ten zuiden van de dijk niet mogelijk is, is een ontheffing van de Wet natuurbescherming (artikel 3.10, lid 1a en 1b) nodig. De ontheffingsaanvraag moet ingediend worden bij het bevoegd gezag voor de te overtreden verbodsbepalingen.

7 Literatuur

TAUW 2021 (van Dam, B.), Quickscan dijkversterking Standhazensedijk te Drimmelen. Rapportage met kenmerk R001-1282878ERT-V02-sal-NL.

BIJ12, Kennisdocument Bever, juli 2017, versie 1.0.

BIJ12, Kennisdocument Noordse Woelmuis, juli 2017, versie 1.0.

Rook, J. & van Bochove, K. 2021. eDNA onderzoek waterspitsmuis, noordse woelmuis en grote modderkruiper. Rapport RA21199, Datura Molecular Solutions BV, Wageningen.

Provincie Noord-Brabant en Zoogdiervereniging, Handreiking kleine marterachtingen, 13 oktober 2017.

Geraadpleegde websites:
www.ndff.nl

Kenmerk R004-1282878VSX-V01-hme-NL

Bijlage 1 eDNA onderzoek Standhazensedijk

Datura
molecular solutions in ecology

eDNA onderzoek waterspitsmuis, noordse woelmuis en grote modderkruiper

In opdracht van Tauw B.V.

Colofon

Titel	eDNA onderzoek waterspitsmuis, noordse woelmuis en grote modderkruiper
Tekst, foto's en samenstelling	Kees van Bochove, Jitske Rook
In opdracht van	Tauw BV
Naam opdrachtgever	Jeroen Nagtegaal
Rapportnummer	RA21199
Datum opstelling	29-11-21
Aantal pagina's	8
Contactpersoon vanuit Datura	Suzan Roemaat
Wijze van citeren	Rook, J. & van Bochove, K. 2021. eDNA onderzoek waterspitsmuis, noordse woelmuis en grote modderkruiper. Rapport RA21199, Datura Molecular Solutions BV, Wageningen

Datura Molecular Solutions BV

Gevestigd te:
Agro Bussiness Park 10
6708 PW Wageningen
Nederland

+31(0)643288093
www.datura.nl
suzan.roemaat@datura.nl

Inhoudsopgave

1. Doelstelling 4
2. Methode 4
2.1 Bemonstering 4
2.2 Laboratoriumanalyse 5
2.3 Kwaliteitswaarborging 6
2.3.1 Hoe vals positieve waarnemingen worden voorkomen 6
2.3.2 Hoe vals negatieve waarnemingen worden voorkomen (qPCR) 7
3. Resultaten 8

1. Doelstelling

De doelstelling van onderhavig onderzoek was om de aan- of afwezigheid van waterspitsmuis (*Neomys fodiens),* noordse woelmuis (*Microtus oeconomus*) en grote modderkruiper (*Misgurnus fossilis*) aan te tonen aan de hand van eDNA onderzoek. Dit onderzoek is uitgevoerd in opdracht van Tauw BV.

2. Methode

2.1 Bemonstering

De bemonstering is uitgevoerd door Jitske Rook en Suzan Roemaat van Datura Molecular Solutions BV, volgens gestandaardiseerde protocollen van Datura (opvraagbaar). In totaal zijn er 2 watermonsters, 2 bodemmonsters en 2 keutelmonsters verzameld (Tabel 1).

Tabel 1: monsterinformatie

Monsternummer	Datum	Type	Testen op	Locatie
25773	7-10-21	Water	Grote modderkruiper	51.704626, 4.818692
25772	7-10-21	Water	Grote modderkruiper	51.704466, 4.823359
60679	7-10-21	Bodem	Waterspitsmuis	51.705045, 4.818211
60652	7-10-21	Bodem	Waterspitsmuis	51.704865, 4.822962
40953	7-10-21	Keutel	Noordse woelmuis	51.704878, 4.821793
40943	7-10-21	Keutel	Noordse woelmuis	51.704785, 4.825258

Figuur 1. Locatie van bemonsteren.

2.2 Laboratoriumanalyse

De watermonsters zijn getest op de aanwezigheid van eDNA van grote modderkruiper. De bodemmonsters zijn getest op de aanwezigheid van eDNA van waterspitsmuis en de keutelmonsters zijn middels soort-specifieke qPCR analyses getest op de aanwezigheid van eDNA van noordse woelmuis. Het analyseren van een eDNA monster vindt plaats in drie stappen. Eerst wordt het eDNA in het monster geconcentreerd en gezuiverd. Vervolgens wordt een controle analyse uitgevoerd om te testen of eDNA detectie in een monster eventueel 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. De bodemmonsters zijn 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. Het eDNA in de keutelmonsters is geëxtraheerd met behulp van de Qiagen PowerFecal DNA Kit. Storende stoffen als humuszuren kunnen detectie van het eDNA inhiberen wat kan leiden tot vals negatief resultaat. Gedurende de extracties zijn deze inhiberende stoffen zo veel mogelijk verwijderd.

2. Er wordt altijd een controle uitgevoerd om na te gaan of (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 resulteert in een fluorescent signaal. Dit signaal wordt gedetecteerd met behulp van een qPCR platform (CFX96 Touch™ van Bio-Rad). De qPCR detectie van water- en bodemmonsters 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 van keutelmonsters wordt uitgevoerd met 2 replica's. 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

2.3.1 Hoe vals positieve waarnemingen worden voorkomen

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

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

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

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

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

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

1. Verschillende onderdelen van de analyse workflow worden uitgevoerd in fysiek gescheiden laboratorium ruimtes. Het samenstellen van de eDNA monster kits en het voorbereiden van de qPCR reagentia vindt plaats in een **DNA clean room**. Dit is een ruimte waarin geen DNA monsters aanwezig zijn. Zodoende kunnen we garanderen dat er geen DNA aanwezig is in de eDNA monster kits en de reagentia (zoals de primers en probes) die later gebruikt worden in de eDNA analyses. Het extraheren van de eDNA monsters gebeurt in een **eDNA laboratorium**. Dit is een ruimte waarin uitsluitend lage concentraties DNA aanwezig zijn. Vervolgens worden hier de eDNA monsters samen met de qPCR reagentia in een 96-well plaat gepipetteerd. Deze plaat wordt luchtdicht afgesloten. Tenslotte wordt de qPCR uitgevoerd in een **post-PCR laboratorium**. In dit laboratorium wordt het eDNA vermeerderd en hier zijn dus hoge concentraties DNA aanwezig.
2. Er wordt een **unidirectionele workflow** gehanteerd om contaminatie van de DNA clean room en het eDNA laboratorium te voorkomen. Dit houdt in dat materialen die eenmaal in het post-PCR laboratorium geweest zijn niet meer terug mogen naar de DNA clean room en eDNA laboratorium.

Ook medewerkers van Datura mogen niet dezelfde dag van een post-PCR laboratorium terug naar een ruimte waarin weinig DNA aanwezig is.

3. In iedere analyse worden **controle analyses** uitgevoerd. Zo worden er monsters geëxtraheerd waaraan geen 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 vals negatieve waarnemingen worden voorkomen (qPCR)

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

1. Per monster worden meerdere **submonsters** verzameld. Hiermee wordt de kans vergroot dat eDNA in het monster terecht komt.
2. Een zeer gevoelige **qPCR detectie** in eDNA water- en 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 er inderdaad geen inhibitie meer optreedt (zie methode voor een uitgebreidere beschrijving);
5. Er wordt altijd een **positieve controle** van de doelsoort DNA meegenomen in de qPCR detectie. Deze controle moet altijd resulteren in positieve detectie. Ook als alle monsters negatief zijn, kan zodoende vastgesteld worden dat de detectie juist is uitgevoerd.

3. Resultaten

In een van de watermonsters is een lage concentratie eDNA van grote modderkruiper gedetecteerd. In de bodemmonsters is geen eDNA van waterspitsmuis gedetecteerd. In de van de keutelmonsters is geen eDNA van noordse woelmuis gedetecteerd. Een overzicht van de resultaten van dit onderzoek wordt weergegeven in Tabel 2.

De analyses van de water- en bodemmonsters is uitgevoerd met behulp van 12 qPCR replica's (zie 2.2 Laboratoriumanalyse). De analyses van de keutelmonsters zijn uitgevoerd met 2 qPCR replica's. De resultaten worden weergeven als het aantal replica's dat positief scoorde voor (e)DNA van de doelsoort(en) in de betreffende monsters. Indien er geen replica's positief zijn (i.e. "0/2" of "0/12"), betekent dit dat er geen DNA van doelsoort(en) in het betreffende monster is aangetroffen. Indien er minstens 1 positieve replica is in een monster (i.e. "1/2" of "1/12" of meer) betekent dit dat er DNA van doelsoort(en) is gedetecteerd. Het aantal positieve replica's is een grove maat voor de concentratie eDNA van de doelsoort: bij een laag aantal positieve replica's (e.g. '1/12') is de verwachting dat de eDNA concentratie van de doelsoort zeer laag is.

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

Tabel 2: Resultaten van de qPCR analyses van de water, keutel- en bodemmonsters met 12 en 2 replica's.

Monsternummer	**Type**	**Getest op**	**Resultaat**
25773	Water	Grote modderkruiper	0/12
25772	Water	Grote modderkruiper	1/12
60679	Bodem	Waterspitsmuis	0/12
60652	Bodem	Waterspitsmuis	0/12
40953	Keutel	Noordse woelmuis	0/2
40943	Keutel	Noordse woelmuis	0/2