



Rapport ecologisch onderzoek vleermuizen,
boerenzwaluwen, kerkuil, Alpenwatersalamander

Rapport: 2023-NO001

Colofon

In opdracht van:	Kragten
Contactpersoon opdrachtgever	[REDACTED]
Datum	23-10-2023
Rapportnummer	NO0001
Aantal pagina's	31
Status rapport	Opgeleverd
Uitgevoerd door	[REDACTED] en [REDACTED] Veldwerk: 10 Teia veldmedewerkers
Contactpersoon uitvoering	[REDACTED]
Telefoonnummer	+31 (0) 6 30686043
E-mail	[REDACTED]@teia.nl
Collegiale Toets	[REDACTED]
Wijze van citeren	[REDACTED], [REDACTED] (2023). Rapport ecologisch onderzoek vleermuizen, boerenwaluw, kerkuil, Alpenwatersalamander NO0001. Amsterdam.

Teia B.V. is niet aansprakelijk voor gevolgschade, en ook schade welke voortvloeit uit toepassingen van de resultaten van werkzaamheden of andere gegevens verkregen van Teia B.V.; Kragten vrijwaart Teia B.V. voor aanspraken van derden in verband met deze toepassing.

© copyright Teia B.V./ Kragten

Dit rapport is vervaardigd op verzoek van de opdrachtgever welke hierboven in het colofon is vermeld. Deze rapportage is eigendom van de opdrachtgever. Niets uit deze rapportage mag worden vermenigvuldigd of openbaar gemaakt worden zonder toestemming van de opdrachtgever en Teia B.V.

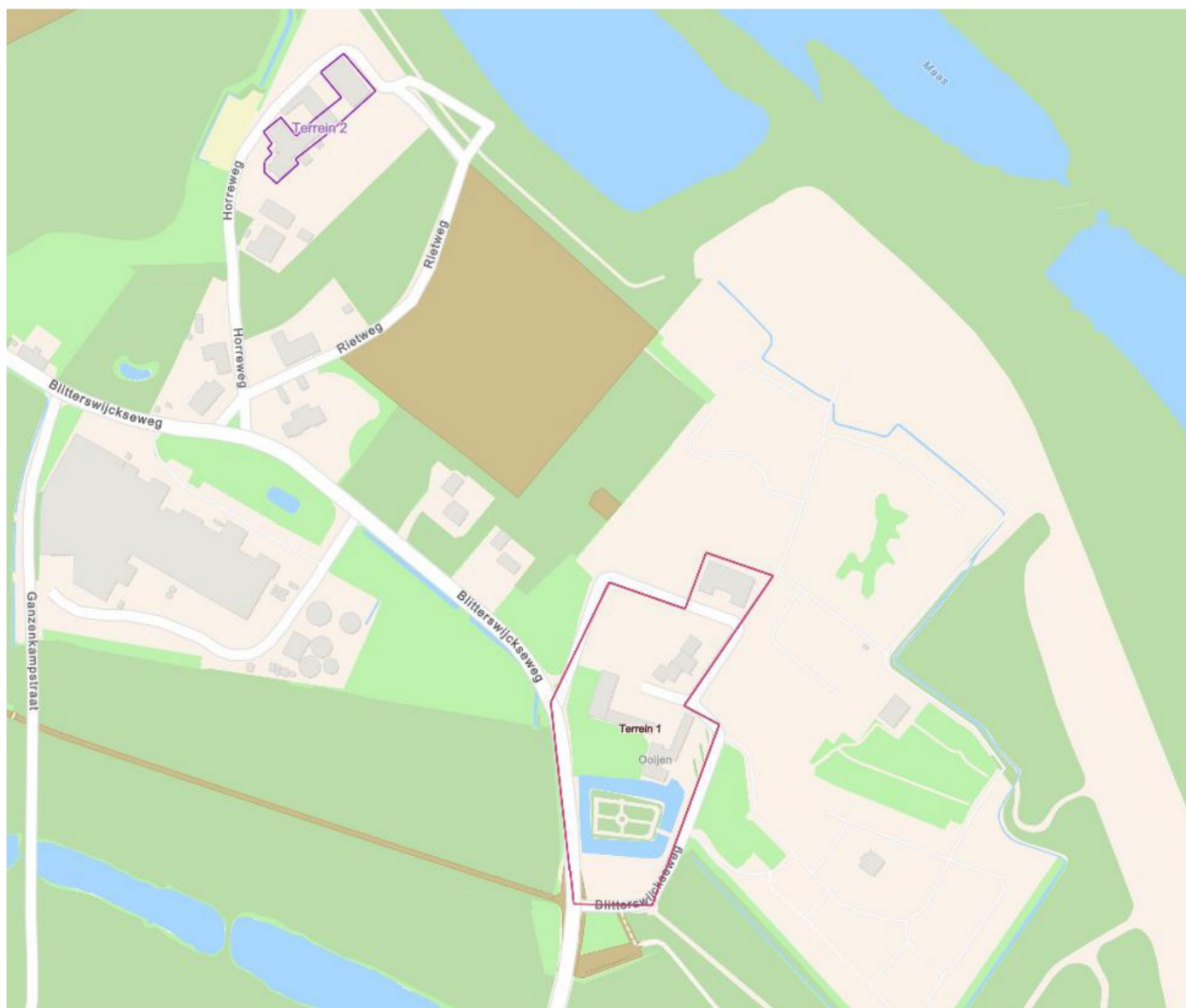
Inhoudsopgave

1.	Inleiding.....	1
1.1	Aanleiding	3
1.2	Doelstelling.....	3
2.	Wettelijk kader.....	4
2.1.	Grondslag wettelijk kader	4
2.2.	Vleermuizen	4
2.3.	Boerenwaluw.....	4
2.4.	Kerkuil.....	5
2.5.	Alpenwatersalamander.....	5
3.	Onderzoeksmethodiek	6
3.1.	Vleermuizen	6
3.2.	Boerenwaluw.....	6
3.3.	Kerkuil.....	7
3.4.	Alpenwatersalamander.....	7
4.	Resultaten	9
4.1.	Vleermuizen	9
4.1.1.	Voorjaaronderzoek	9
4.1.2.	Najaaronderzoek	11
4.2.	Boerenwaluw.....	11
4.3.	Kerkuil.....	12
4.4.	Alpenwatersalamander.....	12
4.5.	Overige soorten.....	13
5.	Betekenis plangebied en effectbepaling.....	14
5.1.	Vleermuizen (terrein 2).....	14
5.2.	Boerenwaluw (terrein 2)	14
5.3.	Kerkuil (terrein 2)	14
5.4.	Alpenwatersalamander (terrein 1).....	14
6.	Conclusie en aanbevelingen.....	15
6.1.	Werkwijzen	16
6.1.1.	Vleermuizen.....	16
6.1.2.	Kerkuil.....	16

6.1.3. Boerenwaluw	16
6.1.4. Alpenwatersalamander	16
6.2 Algemene zorgplicht Wet natuurbescherming	17
7 Verantwoording en geldigheidsduur	18
7.1 Verantwoording	18
7.2 Geldigheidsduur	18
8 Literatuurlijst	19
9. Bijlagen	20

1. Inleiding

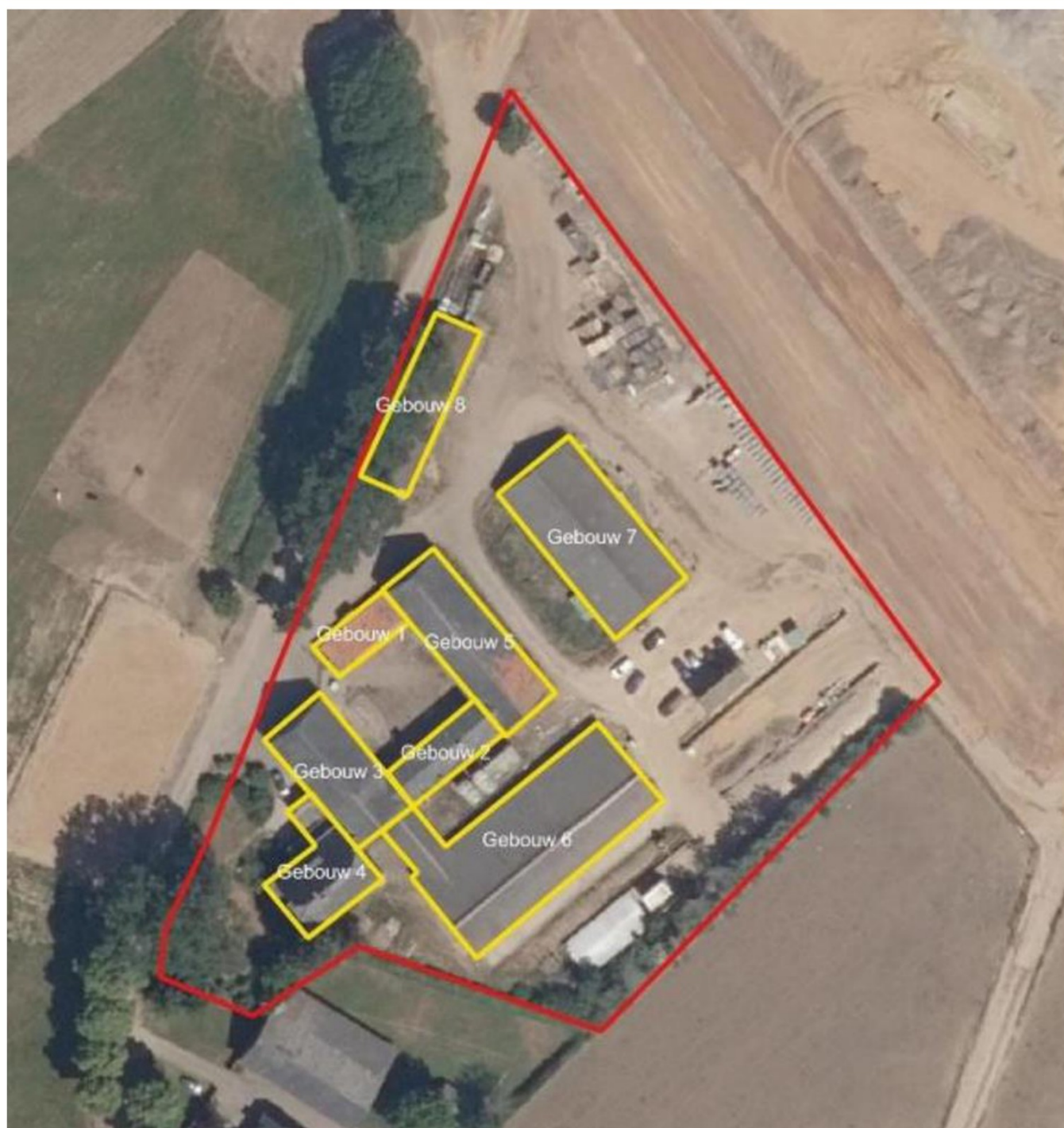
In opdracht van Kragten hebben een tiental Teia veldmedewerkers onder toezicht van [REDACTED] en [REDACTED] namens Teia B.V. nader ecologisch onderzoek uitgevoerd naar vleermuizen, boerenzwaluw, kerkuil en Alpenwatersalamander op Recreatiepark Ooijen, te Broekhuizenenvorst. De te onderzoeken bebouwing bestaat onder andere uit oude, grote boerenschuren (gesitueerd op terrein 2 (figuur 1), zoals omschreven in QS 'HOT467' van Kragten), die momenteel dienen ter opslag, met bakstenen muren en een puntdak met dakpannen. Respectievelijk worden er een aantal schuren gesloopt en de slotgracht (terrein 1, blauwe vlak) hersteld. De bebouwing die op terrein 2 verloren gaat is weergegeven in figuur 2; gebouwen 2, 7 en 8 worden gesloopt. Daarnaast wordt gebouw 6 verbouwd in hoogte en breedte, gebouw 1 verbonden met het westelijke deel van gebouw 5, gebouw 3 en 4 krijgen een nieuwe vleugel en er wordt een zwembad aangelegd ten westen van gebouw 4 (tabel 1). De nabije omgeving wordt gekenmerkt door (voormalig) agrarische grond en ten oosten stroomt de Maas.



Figuur 1. Overzichtskartaal terreinen 1 en 2, Recreatiepark Ooijen.

Tabel 1. Voorgenomen plannen bebouwing terrein 2.

Gebouw nummering	Voorgenomen plannen
2, 7, 8	Complete sloop
6	Verbouwing in hoogte en breedte
1, 5	Verbonden aan westkant gebouw 5
3, 4	Realisatie nieuwe vleugel
4	Aanleg zwembad ten westen



Figuur 2. Overzichtskaat bouwplannen terrein 2.

1.1 Aanleiding

De aanleiding voor het uitvoeren van nader ecologisch onderzoek naar vleermuizen, boerenwaluw, kerkuil en Alpenwatersalamander komt voort uit de vraag van Recreatiepark Kasteel Ooijen te Broekhuizenenvorst, die voornemens is om een aantal bestaande schuren op terrein 2 te slopen en op de vrijgekomen ruimte een nieuwe schuur te realiseren, alsook gebouwen met elkaar te verbinden, vleugels aan te bouwen en een zwembad aan te leggen. Op terrein 1 worden twee extra kasteeltorens aan de voorzijde (t.h.v. het 'Kasteel') gebouwd. Daarnaast wordt de gedempte slotgracht rondom het kasteel weer hersteld d.m.v. uitgraven en wordt het plangebied door een toegangsweg ontsloten.

1.2 Doelstelling

Het ecologisch onderzoek naar vleermuizen, boerenwaluw, kerkuil en Alpenwatersalamander is uitgevoerd om vast te stellen of/hoe deze het plangebied gebruiken. Met het uitvoeren van soortgerichte onderzoeken naar bovengenoemde soorten wordt verder in kaart gebracht of en waar binnen het projectgebied beschermde soorten en beschermde functies van deze soorten aanwezig zijn, waar tijdens de uitvoering rekening mee dient te worden gehouden. Tevens wordt met dit onderzoek beoordeeld of er vervolgstappen in het kader van de Wet natuurbescherming noodzakelijk zijn.

2. Wettelijk kader

2.1. Grondslag wettelijk kader

Als grondslag voor de bescherming van de soorten genoemd in deze rapportage worden de verbodsbepalingen zoals genoemd in paragraaf 3.1, 3.2 en 3.3 van de Wet natuurbescherming aangehaald. Het juiste beschermingsregime en omgang met de soorten worden gebaseerd op de bijlagen van artikel 3.10 van de Wet natuurbescherming; onderdeel A en B, bijlage I, II, III van de Bern-conventie (MinInv.nederlandsesoorten.nl, 2021), bijlage II, IV en V van de Habitatrichtlijn (MinInv.nederlandsesoorten.nl, 2021), bijlage I en II van de Bonn-conventie, artikel 1, 4.1, 4.2, 6.2, 6.3, 7.2 en 7.3 van de Vogelrichtlijn.

2.2. Vleermuizen

Vleermuizen zijn Europees beschermd onder de Habitatrichtlijn bijlage IV, Bonn-conventie bijlage II en de Bern-conventie bijlage-II. Deze Europese wet- en regelgeving is opgenomen in de Wet natuurbescherming paragraaf 3.2. Voor deze soorten geldt het volgende:

- Het is verboden om soorten van de habitatrichtlijn in hun natuurlijk verspreidingsgebied opzettelijk te doden, te vangen of opzettelijk te verstoren.
- Het is verboden om voortplantingsplaatsen of rustplaatsen van soorten van de habitatrichtlijn te beschadigen of te vernietigen.
- Het is verboden om dieren van de habitatrichtlijn onder zicht te hebben voor verkoop, te vervoeren voor verkoop, te verhandelen, te ruilen of te koop of te ruil aan te bieden.
- Het is verboden om essentieel foerageergebied en/of belangrijke vliegroutes van vleermuizen te verwijderen.

2.3. Boerenzwaluw

De Boerenzwaluw (*Hirundo rustica ssp. rustica*) valt onder de Wet natuurbescherming paragraaf 3.2 beschermingsregime soorten van de Habitatrichtlijn, in bijlage II Verdrag van Bern met het beschermingsregime van artikel 3.5 en 3.6. Voor deze soort geldt het volgende:

- Het is verboden om de bedoelde dieren in hun natuurlijk verspreidingsgebied opzettelijk te doden, te vangen of opzettelijk te verstoren.
- Het is verboden om eieren van de bedoelde dieren in de natuur te vernielen of te rapen
- Het is verboden om voortplantingsplaatsen of rustplaatsen van bedoelde dieren te beschadigen of te vernielen.
- Het is verboden om dieren van de bedoelde soorten onder zich te hebben voor verkoop, te vervoeren voor verkoop, te verhandelen, te ruilen of te koop of te ruil aan te bieden.
- Het is verboden om dieren anders dan voor verkoop onder zich te hebben of te vervoeren.

2.4. Kerkuil

De Kerkuil (*Tyto alba*) valt onder de Wet natuurbescherming paragraaf 3.2 beschermingsregime soorten van de Habitatrictlijn, in bijlage II Verdrag van Bern met het beschermingsregime van artikel 3.5 en 3.6. Voor deze soort geldt het volgende:

- Het is verboden om de bedoelde dieren in hun natuurlijk verspreidingsgebied opzettelijk te doden, te vangen of opzettelijk te verstoren.
- Het is verboden om eieren van de bedoelde dieren in de natuur te vernielen of te rapen.
- Het is verboden om voortplantingsplaatsen of rustplaatsen van bedoelde dieren te beschadigen of te vernielen.
- Het is verboden om dieren van de bedoelde soorten onder zich te hebben voor verkoop, te vervoeren voor verkoop, te verhandelen, te ruilen of te koop of te ruil aan te bieden.
- Het is verboden om dieren anders dan voor verkoop onder zich te hebben of te vervoeren.

2.5. Alpenwatersalamander

De Alpenwatersalamander (*Ichthyosaura alpestris*) valt onder de Wet natuurbescherming paragraaf 3.3. Voor deze soort geldt het volgende:

- Het is verboden om deze amfibieën opzettelijk te doden of te vangen.
- Het is verboden de vaste voortplantingsplaatsen of rustplaatsen opzettelijk te beschadigen of te vernielen.

3. Onderzoeksmethodiek

3.1. Vleermuizen

Vleermuizen maken jaarrond gebruik van verschillende typen verblijfplaatsen. Zo worden in het voorjaar zomer- en kraamverblijfplaatsen gevormd en in het najaar paar- en winterverblijfplaatsen. Vleermuizen maken gebruik van een netwerk aan verblijfplaatsen waartussen ze geregeld verhuizen. Jaarlijks zullen de vleermuizen terugkomen naar hetzelfde netwerk en deze ook uitbreiden. Het onderzoek is er op gericht inzicht te krijgen in dit netwerk met betrekking tot het plangebied. Vleermuizen maken daarnaast gebruik van vliegroutes en foerageergebieden. Beide zijn essentieel voor de staat van instandhouding van de soort(en).

Om inzicht te krijgen welke relatie vleermuizen hebben met recreatiepark Ooijen zijn deze geïnventariseerd op vooraf bepaalde kansrijke locaties (heel terrein 2) volgens het meest recent beschikbare vleermuisprotocol, van 2021. Hierbij is in het voorjaar het plangebied onderzocht van 15 mei t/m 15 juli 2023 met een onderzoeksinspanning van 2 avondbezoeken en 1 ochtendbezoek met een periode van 20 dagen tussen de bezoeken. Tijdens deze periode is actief gezocht naar kraamverblijfplaatsen van gewone dwergvleermuis, laatvlieger, gewone grootoorvleermuis en franjestaart. Het avondbezoek is gestart vanaf zonsondergang en is tot 2,5 uur na zonsondergang uitgevoerd, waarna het ochtendbezoek 3 uur voor zonsopkomst tot zonsopkomst is uitgevoerd onder juiste weersomstandigheden (tabel 2).

Het onderzoek naar baltsverblijfplaatsen van gewone dwergvleermuis, laatvlieger, gewone grootoorvleermuis en franjestaart is uitgevoerd in de periode van 15 augustus t/m 15 oktober 2023. Dit betreft 2 rondes van 2 uur, beginnend 1 uur na zonsondergang in de periode van 15 augustus t/m 1 oktober 2023 en 2 rondes van 2 uur tussen 22:00-01:00 in de periode van 15 september t/m 15 oktober 2023. Tussen de rondes zit een periode van 20 dagen, en uitvoering vond plaats onder de juiste weersomstandigheden (tabel 2).

3.2. Boerenwaluw

Gezien het feit dat er geen officiële onderzoeksmethodiek is voor de boerenwaluw, is er een opgesteld aan de hand van de nest- en telrichtlijnen van SOVON; 2 bezoeken tussen eind mei en juli langs balken en richels in stallen en schuren op de terreinen (m.b.v. zaklamp), waarbij het hoogst aantal gelijktijdig bezette nesten aan wordt gehouden. Deze onderzoeken zijn uitgevoerd op één dag onder warme zonnige weersomstandigheden op 26-05-2023, en de andere dag gecombineerd met het kerkuil onderzoek op 28-07-2023 met een gelijksoortige temperatuur. Tijdens deze veldbezoeken is er bepaald of er individuen in het plangebied aanwezig waren en of deze indicaties van broeden vertoonden, zoals zingende mannetjes (in vlucht of vanuit broedplaats), en vogels met nestmateriaal of uitwerpselen. Verder werd er geïnventariseerd of er nesten aanwezig waren in de aanwezige schuren en stallen.

3.3. Kerkuil

De onderzoeksmethodiek voor kerkuilen is gebaseerd op het Bij12 kennisdocument kerkuil en spitst zich voornamelijk toe op het aantonen van de aan-of afwezigheid van nesten, rustplaatsen en essentieel functioneel leefgebied van de kerkuil in de omgeving. De aanwezigheid van een kerkuil kan worden vastgelegd door het aantonen van een bezet nest of een waarneming in de periode van februari t/m augustus 2023 van een paar in broedbiotoop, territoriaal gedrag of bedelende jongen. Het onderzoek bestaat uit 3 veldbezoeken: 2 hiervan worden s 'avonds uitgevoerd en zijn voor het waarnemen van de eerder benoemde gedragingen onder de juiste weersomstandigheden. Het onderzoek naar de aanwezigheid van braakballen of krijtstrepen mag het gehele jaar worden uitgevoerd.

3.4. Alpenwatersalamander

Voor de Alpenwatersalamander is een eDNA bemonsteringsmethodiek toegepast. Bij deze techniek worden 28 samples van het water (slotgracht terrein 1) genomen en door een filter gehaald. Het overgebleven residu zal dan worden geanalyseerd op de aanwezigheid van sporen van Alpenwatersalamander DNA. Het bemonsteringsprotocol is te vinden in bijlage 2.

Datum	Type onderzoek	Type bezoek	Uitvoerders	Begintijd	Eindtijd	Temperatuur	Bewolking	Windkracht	Windrichting	Neerslag
01-06-2023	Kraam- en zomerverblijfplaatsen	Avondbezoek 1	5 Teia veldmedewerkers	22:03	00:13	12	4/8	4	N	Geen
05-07-2023	Kraam- en zomerverblijfplaatsen	Avondbezoek 2	4 Teia veldmedewerkers	21:56	00:26	14	8/8	1	W	Geen
06-07-2023	Kraam- en zomerverblijfplaatsen	Ochtendbezoek	4 Teia veldmedewerkers	02:20	05:20	13	7/8	1	ZW	Geen
15-08-2023	Paarverblijfplaatsen	Avondbezoek 1	4 Teia veldmedewerkers	22:05	00:05	17	7/8	1	NW	Korte bui 23:40-23:50
08-09-2023	Paarverblijfplaatsen	Avondbezoek 2	2 Teia veldmedewerkers	22:00	00:00	21	0/8	1	O	Geen
19-09-2023	Paarverblijfplaatsen	Avondbezoek 3	2 Teia veldmedewerkers	22:00	00:00	18	8/8	3	ZW	Geen
12-10-2023	Paarverblijfplaatsen	Avondbezoek 4	2 Teia veldmedewerkers	22:00	00:00	15	7/8	2	ZW	Geen
26-05-2023	Boerenzwaluw & Kerkuil	Zwaluw & Sporenonderzoek & eDNA	2 Teia ecologisch adviseurs	10:30	14:30	18	2/8	3	ZW	Geen
28-07-2023	Boerenzwaluw & Kerkuil	Zwaluw & Luisteronderzoek	Teia ecologisch adviseur	20:30	22:30	20	3/8	0	ZO	Geen
03-08-2023	Kerkuil	Luisteronderzoek	Teia ecologisch adviseur	22:00	00:00	15	7/8	2	W	Geen

Tabel 2. Bezoekinformatie veldonderzoek vleermuizen, kerkuil, eDNA en boerenzwaluw.

4. Resultaten

4.1. Vleermuizen

4.1.1. Voorjaarsonderzoek

Op 06-07-2023 is er tijdens de ochtendronde door veldmedewerkers van Teia een zomerverblijfplaats voor gewone dwergvleermuizen geconstateerd. Een totaal van 2 dieren vloog in- en uit door een kapelraam in de hooizolder (figuur 3 en 4).



Figuur 3. In- en uitvliegopening gewone dwergvleermuizen, terrein 2.



Figuur 4. Vleermuis waarnemingen (zomerverblijfplaats = driehoek), (paarverblijf = ruit), foerageergebieden gewone dwergvleermuis (rode vlakken), foerageergebied gewone grootoorvleermuis (groene vlak) met gebiedsgrenzen (paars).

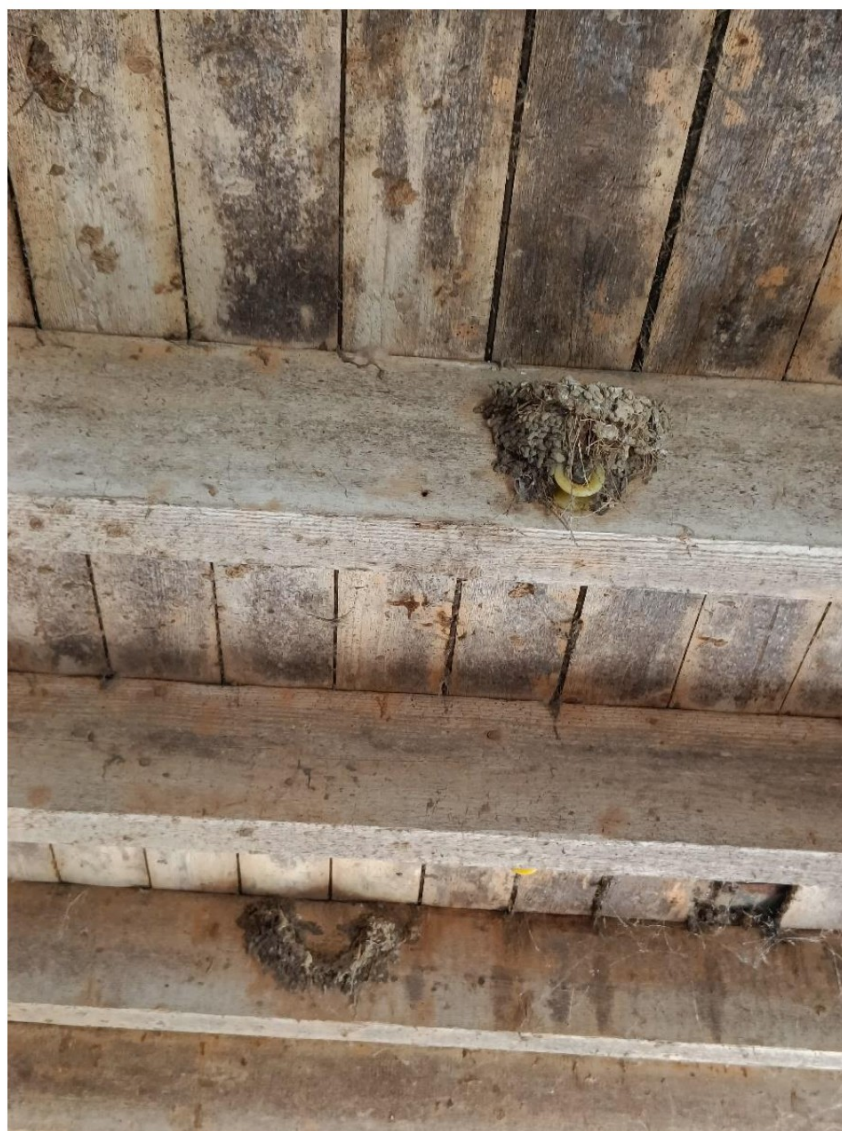
Tijdens de voorjaarsonderzoeken zijn er ook 3 foerageergebieden vastgesteld (figuur 4): In het noorden, op 05-07-2023, zijn er 6 foeragerende gewone dwergvleermuizen waargenomen. Midden, 01-06-2023, een gewone grootoorvleermuis foeragerend rond een boom (geen verdere sporen gevonden op het terrein). In het zuiden van het plangebied zijn op 01-06-2023 3 foeragerende gewone dwergvleermuizen waargenomen.

4.1.2. Najaarsonderzoek

Tijdens het najaarsonderzoek is er op 12-10-2023 een paarverblijf vastgesteld door 2 veldmedewerkers van Teia. Deze bevond zich rond dezelfde locatie als waar het zomerverblijf in het voorjaar werd gevonden (figuur 4). Het gaat om het grote openstaande kapelraam (figuur 3). Hier maakte een gewone dwergvleermuis baltsgeluiden terwijl deze in- en uit de zolder vloog. De precieze locatie van het verblijf op die zolder kon niet bepaald worden, maar aannemelijk is dat het om hetzelfde verblijf gaat als welke in het voorjaar geconstateerd is: een gecombineerd paar-zomerverblijf. Ten slotte is er op deze avond ook een gewone grootoorvleermuis waargenomen met de detector, deze bleef niet lang foerageren rond een boom op het terrein en is de rest van de avond niet meer waargenomen. Op de zolder ontbrak het ook aan enige (poep)sporen van deze soort.

4.2 Boerenzwaluw

Bij het boerenzwaluw onderzoek zijn op terrein 2 een aantal oude nesten gevonden in gebouw 2 (figuur 6 en 7). Het gaat hier exclusief om nesten die al geruime tijd niet meer in gebruik zijn. Het grotendeel van de nesten waren al bijna compleet uit elkaar gevallen en er zijn geen zwaluwen in- of uitvliegend waargenomen. Ook zijn er tijdens inventarisatierondes (ook vleermuisrondes op 01-06, 05-07 en 06-07, 2023) geen individuen of (poep)sporen aangetroffen.



Figuur 6. Oude zwaluwnesten terrein 2, gebouw 2.



Figuur 7. Oud zwaluwnest terrein 2, gebouw 2.

4.3 Kerkuil

Tijdens het eerste, verkennende bezoek aan recreatiepark Ooijen op 26-05-2023 is er gezocht naar sporen in de vorm van uilenballen of krijtsproen op terrein 2. Uit een gesprek met de plaatselijke opzichter bleek dat er in gebouw 5 een nestkast voor kerkuilen aanwezig is. Deze was ten tijde van het bezoek ook bezet. In de hierop volgende luisteronderzoeken is de kerkuil (met jongen) niet gehoord. Tijdens het vleermuisonderzoek van 05-07-2023 zijn er door een veldmedewerker schreeuwende jongen waargenomen. Ook de volwassen dieren zijn op deze avond vliegend waargenomen. Tenslotte is een volwassen individu jagend waargenomen tijdens het vleermuisonderzoek op 15-08-2023, waaruit geconcludeerd kan worden dat de directe omgeving ook als foerageergebied voor de kerkuilen fungeert. Warmtebeeldcamera-beelden van de kerkuil, vliegend door de zolder van gebouw 5, zijn beschikbaar op de Sharepoint van Teia.

4.4 Alpenwatersalamander

Op 26-05-2023 zijn volgens het bemonsteringsprotocol (bijlage 2) sub samples verzamelt op verschillende plaatsen in de gedempte slotgracht op terrein 1. Er zijn in totaal 2 grotere samples gemaakt, die opgestuurd zijn naar het lab van Datura. De resultaten (ter inzage beschikbaar in bijlage 1) concluderen dat er geen eDNA sporen zijn gevonden van Alpenwatersalamander.

4.5 Overige soorten

Tijdens het onderzoek naar boerenzwaluwen zijn naar schatting 18 in gebruik zijnde nesten van huiszwaluwen gevonden op terrein 1. Deze nesten bevonden zich onder de dakgoot aan de voorzijde van het hoofdgebouw (het zgh. "kasteel") van recreatiepark Ooijen (figuur 8).



Figuur 8. Locaties huiszwaluwnesten kasteel Ooijen.

5. Betekenis plangebied en effectbepaling

5.1. Vleermuizen (terrein 2)

Vleermuizen zullen redelijkerwijs een negatief effect ondervinden van de werkzaamheden. Tijdens het onderzoek zijn twee vaste verblijfplaatsen (mogelijk gecombineerd paar-zomerverblijf) gevonden van de gewone dwergvleermuis in gebouw 2 op terrein 2. Door de voorgenomen ruimtelijke ingreep, het slopen van gebouw 2, zullen deze verblijfplaatsen, en dus verblijfsfunctie, verloren gaan. De foerageergebieden rondom de bebouwing (met name gebouwen 4, 7 en 8) op terrein 2 blijven intact en/of er zijn voldoende uitwijkmogelijkheden waardoor deze functie niet benadeeld wordt door de ruimtelijke ingrepen.

5.2. Boerenwaluw (terrein 2)

De boerenwaluw zal redelijkerwijs geen negatief effect ondervinden van de werkzaamheden. Zoals eerder gesteld zijn de gevonden nesten op terrein 2 niet meer in gebruik. Echter, dit is nooit met volledige zekerheid te zeggen; daarom, om mogelijke verstoringen te voorkomen, dient er buiten de broedperiode (mei-augustus) van zwaluwen gewerkt te worden. De bezette huiswaluw nesten op terrein 1 (waar 2 kasteeltorens gebouwd worden) bevinden zich op een locatie waar geen werkzaamheden plaats zullen vinden.

5.3 Kerkuil (terrein 2)

Kerkuilen zullen redelijkerwijs een negatief effect ondervinden van de werkzaamheden. Met het voornemen om op terrein 2 gebouw 1 te verbinden met het westelijke deel van gebouw 5 (huidige nestkast bevindt zich in het oostelijke deel van dit gebouw) zal de verblijfplaats in de vorm van de aanwezige nestkast mogelijk verstoord raken door licht, geluid of aanwezigheid van mensen. Het verder geconstateerde foerageergebied rondom het plangebied zal intact blijven. Kerkuilen hebben grote foerageergebieden van minstens 500-1500 meter rondom de broedplaats (Bij12 kennisdocument kerkuil). Omdat er in de directe omgeving voldoende uitwijkmogelijkheden zijn wordt deze functie niet negatief beïnvloed.

5.4 Alpenwatersalamander (terrein 1)

De Alpenwatersalamander en/of (e)DNA sporen van deze zijn tijdens het onderzoek niet waargenomen of vastgesteld. Daarom kan er redelijkerwijs aangenomen worden dat er geen negatieve effecten op de betreffende soort op zullen treden tijdens de werkzaamheden.

6 Conclusie en aanbevelingen

Aan de hand van het nader onderzoek wat is uitgevoerd ten behoeve van de ruimtelijke ingre(e)p(en) binnen het plangebied kunnen de volgende conclusies worden getrokken:

- Binnen het plangebied (terrein 2) is één zomerverblijfplaats gevonden van gewone dwergvleermuis in gebouw 2 (mogelijk gecombineerd paar-zomerverblijf).
- Binnen het plangebied (terrein 2) is één paarverblijf gevonden van gewone dwergvleermuis in gebouw 2 (mogelijk gecombineerd paar-zomerverblijf).
- Binnen het plangebied (terrein 2) zijn geen zwaluwen aangetroffen. Wel zijn er oude, vervallen boerenwaluw nesten gevonden die reeds niet meer in gebruik zijn in gebouw 2.
- Binnen het plangebied (terrein 1) zijn naar schatting 18 bezette huiswaluw nesten gevonden aan het kasteel, buiten de omgeving van de beoogde werkzaamheden.
- Binnen het plangebied (terrein 2) is een nest(kast) van kerkuilen aanwezig in gebouw 5.

Aan de hand van bovenstaande uitspraken kan worden geconcludeerd dat een ontheffing op de Wet natuurbescherming wel noodzakelijk is (tabel 3).

Ook dient de algemene zorgplicht, beschreven in hoofdstuk 6.2 ten alle tijden te worden gevolgd.

Tabel 3. Mogelijke effecten en verbodsbepalingen uit de Wet natuurbescherming.

Soortgroep	Effect	Vervolgstappen	Artikel in Wnb
Vogelsoorten met een jaarrond beschermd nest			
Boerenwaluw	Geen	Geen	Vogelrichtlijn, art 3.1, lid 4.
Huiswaluw	Mogelijk	Rekening houden met verstoring in broedseizoen (half mei tot begin augustus) voor de werkzaamheden op terrein 1.	Vogelrichtlijn, art 3.1, lid 4.
Kerkuil	Mogelijk	Rekening houden met verstoring in broedseizoen (februari tot augustus) op terrein 2. Indien dit niet mogelijk is dient er ontheffing te worden aangevraagd.	Vogelrichtlijn, art 3.1, lid 4.
Vleermuizen			
Gewone dwergvleermuis	Ja, bij de sloop van gebouw 2 verdwijnen twee verblijfplaatsen.	Bij de sloop van gebouw 2 (terrein 2) dient een ontheffing te worden aangevraagd voor het verdwijnen van twee verblijfplaatsen (zomer- en paarverblijfplaats).	Habitatrichtlijn, art 3.5, lid 1, 2, 4.

6.1 Werkwijzen

6.1.1. Vleermuizen

Werkzaamheden worden zoveel mogelijk buiten de gevoelige periode van vleermuizen uitgevoerd en tussen zonsopkomst en zonsondergang. Indien wel gewerkt wordt in de hiervoor beschreven periode kan dit alleen met het gebruik van gerichte lichtbronnen. Deze zijn afgeschermd aan de boven- en achterkant om verstoring te minimaliseren.

6.1.2. Kerkuil

Aangaande de kerkuil dient er buiten de meest kwetsbare periode, dat wil zeggen de broedperiode (februari tot augustus, maar kan tot ver in het najaar doorlopen), gewerkt te worden. De minst kwetsbare periode loopt van september tot januari. Indien het een muizenrijk jaar betreft kan er sprake zijn van vervolglegels, welke de kwetsbare periode verlengen tot in december. Dit dient overlegd te worden met de lokale uilenwerkgroep of een uilendeskundige. Omdat de vaste verblijfplaats van de kerkuil mogelijk verstoord wordt tijdens de voorgenomen werkzaamheden, dient er vervangende nestgelegenheid gerealiseerd te worden. Hoe meer locaties hiervoor worden geboden, hoe meer kans op succes (minimaal 2). Aangezien niet alle bebouwing gesloopt zal worden op terrein 2, is het aanbevolen om zowel de bestaande nestkast als soortgelijke nieuwe op andere plekken in de bespaarde gebouwen te plaatsen. Hierbij is het belangrijk dat er toegang is tot de zolder van dit gebouw in de vorm van een gat in de muur op hoogte. Bij de transitie van oud naar nieuw verblijf, dienen beide geruime tijd aanwezig te zijn. Op die manier wordt de uilen te tijd gegeven om zich te verplaatsen en te gaan wennen aan de nieuwe situatie (als de nieuwe nestkast in hetzelfde gebouw wordt opgehangen is er geen gewenningsperiode nodig).

6.1.3. Boerenwaluw

Zoals eerder beschreven worden er geen negatieve effecten op boerenwaluw populaties verwacht. Echter, tijdens de werkzaamheden (met name de realisatie van twee kasteeltoren op terrein 1) kunnen de aanwezige huiszwaluwen verstoord worden door licht of geluid. Hierom dient er buiten het broedseizoen (mei-augustus) gewerkt te worden. Ook dienen er geen aanrijroutes, opslagplaatsen of lichten aanwezig te zijn bij de nesten (figuur 6).

6.1.4. Alpenwatersalamander

Het uitgevoerde eDNA onderzoek heeft geen sporen van de Alpenwatersalamander geconstateerd. De beoogde werkzaamheden zullen derhalve geen negatieve invloed hebben en er hoeft, anders dan de algemeen geldende zorgplicht, geen rekening gehouden te worden met de Alpenwatersalamander.

6.2 Algemene zorgplicht Wet natuurbescherming

Tijdens ruimtelijke ingrepen willen wij u altijd adviseren om rekening te houden met aanwezige flora en fauna. In de Wet natuurbescherming is immers een algehele zorgplicht opgenomen deze stelt dat 'iedereen, indien redelijkerwijs mogelijk, voldoende zorg in acht moet nemen voor alle planten en dieren en hun leefomgeving'. Onderdeel hiervan is het zo veel mogelijk vermijden en beperken van schade aan de natuur, waardoor de noodzaak tot compenserende maatregelen zoveel mogelijk wordt verkleind.

Wij raden daarom de volgende handelingswijze en maatregelen aangaande de zorgplicht aan:

- Werkzaamheden vanaf één kant aanvangen.
- Bij het kappen of rooien van bomen, heggen en struiken moet dit gebeuren buiten het vogelbroedseizoen (indicatie: half maart tot half juli) en voorafgaand aan andere werkzaamheden.
 - Indien dit toch in het broedseizoen gebeurt dient er een ecooloog aanwezig te zijn om de aanwezige bomen, heggen en struiken te controleren op broedende vogels.
- De werkzaamheden uitsluitend tussen zonsopgang en zonsondergang plaats laten vinden.
- Het gebruik van verlichting op het plangebied na zonsondergang zoveel mogelijk beperken.
 - Indien dit wel noodzakelijk lijkt adviseren wij om met rood licht te werken en/of
 - Gebruik te maken van gerichte lichtbronnen dus met afscherming aan de boven- en achterzijde.
- In de maanden april - augustus plassen zoveel mogelijk direct weghalen in het plangebied om te voorkomen dat amfibieën en reptielen zich hier gaan vestigen.
- Geef de dieren die aanwezig zijn op het terrein de ruimte en tijd om te vluchten. Jaag ze indien nodig voorzichtig weg van het terrein.

Neem bij twijfel over wat u moet doen met aangetroffen flora en/of fauna tijdens uw project vrijblijvend contact met ons op!

7 Verantwoording en geldigheidsduur

7.1 Verantwoording

Teia B.V. is een onafhankelijk adviesbureau en verklaart hierbij geen financiële of juridische belangen te hebben bij de uitkomst van het uitgevoerde onderzoek.

Deze rapportage is gebaseerd op een grote mate van kennis en ervaring binnen Teia B.V. Ondanks de grote zorgvuldigheid waarmee het veldwerk is uitgevoerd is Teia B.V. niet verantwoordelijk voor eventuele afwijkingen noch voor de mogelijke gevolgen daarvan.

Het is niet toegestaan dit rapport zonder schriftelijke toestemming van Teia B.V. anders dan in zijn geheel (met inbegrip van bijlagen) te reproduceren.

7.2 Geldigheidsduur

In het kader van de Wet natuurbescherming mogen onderzoeksgegevens van beschermde soorten maximaal drie jaar oud zijn. Hierbij is een voorwaarde dat weinig of geen ruimtelijke of kwalitatieve veranderingen zijn opgetreden in de afgelopen drie jaar. In gebieden waar dergelijke veranderingen wel plaats hebben gevonden, moeten de gegevens recenter zijn.

8 Literatuurlijst

Boerenwaluw | Sovon Vogelonderzoek (2023); <https://stats.sovon.nl/stats/soort/9920>

Bij12. (2017). Kennisdocument Gewone dwergvleermuis, *Pipistrellus pipistrellus*. Versie 1.0 Utrecht

Bij12. (2017). Kennisdocument Gewone grootoorvleermuis, *Plecotus auritus*. Versie 1.0 Utrecht

Bij12. (2017). Kennisdocument Kerkuil, *Tyto alba*. Versie 1.0 Utrecht

Ministerie van landbouw natuur en voedselkwaliteit (2021). Bonn-conventie;
www.minlnv.nederlandsesoorten.nl

Ministerie van landbouw natuur en voedselkwaliteit (2021). Vogelrichtlijn;
www.minlnv.nederlandsesoorten.nl

Ministerie van landbouw natuur en voedselkwaliteit (2022). Habitatrichtlijn;
www.minlnv.nederlandsesoorten.nl

Soortinventarisatieprotocollen_Netwerk_Groene_Bureaus_versie_1.1_dd_juli_2017 (2017).

Vleermuisvakberaad Netwerk Groene Bureaus, Zoogdiervereniging (2021) Vleermuisprotocol 2021.
www.netwerkgroenebureaus.nl; www.zoogdiervereniging.nl

9. Bijlagen

1. Resultaten eDNA Onderzoek Alpenwatersalamander.



eDNA onderzoek alpenwatersalamander



In opdracht van Teia B.V.

Colofon



Titel	eDNA onderzoek alpenwatersalamander
Tekst, foto's en samenstelling	
In opdracht van	Teja B.V.
Naam opdrachtgever	
Kenmerk opdrachtgever	HOT467-0002
Rapportnummer	RA23100
Datum opstelling	15 juni 2023
Aantal pagina's	7
Contactpersoon vanuit Datura	
Wijze van citeren	S. (2023). Rapport eDNA onderzoek alpenwatersalamander RA23100, Datura Molecular Solutions BV, Wageningen



Datura Molecular Solutions BV

Gevestigd te:
Agro Business Park 10
6708 PW Wageningen
Nederland

+31(0)643288093
www.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 (*Uchthya alpestris*) aan de hand van (e)DNA onderzoek. Hiervoor is gebruik gemaakt van eDNA watermonsters. Dit onderzoek is uitgevoerd in opdracht van Teia B.V..

2. Methode

2.1 Bemonstering

De bemonstering is uitgevoerd door medewerkers van Teia B.V. volgens gestandaardiseerde protocollen van Datura Molecular Solutions B.V. (opvraagbaar). Er zijn twee watermonsters (met beide twee sub locaties) verzameld en aangeleverd aan het laboratorium van Datura. Elk monster heeft een eigen nummer gekregen, dit nummer is tezamen met de coördinaten van waar het monster is genomen en de datum van bemonstering te vinden in de onderstaande tabel (Tabel 1).

Tabel 1: monsterinformatie eDNA onderzoek alpenwatersalamander

Monsternummer	Coördinaten	Datum
2008307	51.505829, 6.155937 51.505825, 6.155623	26-05-2023
2008291	51.505551, 6.155036 51.505531, 6.155826	26-05-2023

2.2 Laboratoriumanalyse

De watermonsters zijn getest op de aanwezigheid van eDNA afkomstig van de 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 gehinderd 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 gehinderd 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 gehinderd 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 (zogenoemde extractie controles). In de qPCR worden naast de extractie controles ook negatieve PCR controles meegenomen. Zodoende kan heel nauwkeurig gemonitord worden of er inderdaad geen contaminatie optreedt.

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

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

2.3.2 Hoe fout negatieve waarnemingen worden voorkomen (qPCR)

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

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

eDNA onderzoek alpenwatersalamander | 6

3. Resultaten

Er is in de watermonsters geen gDNA 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 weergegeven als het aantal replica's (van de 12 replica's) dat positief scoorde voor gDNA van de doelsoorten in de betreffende monsters. Als er een score van "0/12" is verkregen, betekent dit dat er geen gDNA 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 gDNA van de doelsoort is gedetecteerd. Het aantal positieve replica's is een grove maat voor de concentratie gDNA van de doelsoort: bij een laag aantal positieve replica's (bijvoorbeeld '1/12') is de verwachting dat de gDNA concentratie van de doelsoort zeer laag is.

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

Tabel 2: Resultaten van de gPCR analyses voor alpenwatersalamander van de watermonsters met 12 replica's.

Monsternummer	Resultaat <u>gPCR</u> analyse alpenwatersalamander
2008307	0/12
2008291	0/12

2. eDNA-filterprotocol.

Datura Molecular Solutions BV



eDNA filter samplingprotocol

Let op: sampling kit pas in het veld open maken i.v.m. contaminatierisico!

De sample kit bevat:

- 2 paar handschoenen
- 1 blauwe bemonsteringsschep
- 1 steriele Whirl-Pak bag
- 2 2mL buisjes met conserverende buffer
- 1 wegwerppincet

Overige benodigdheden:

- Filterhouder (per sample)
- Fles
- Vacuümpomp

Locatie van bemonstering

- Submonsters worden genomen langs een traject van 50 - 200 meter;

Verzamelen van subsamples

1. Trek een set handschoenen aan (denk aan contaminatie!).
2. Open de Whirl-Pak bag.
3. Verzamel 28 subsamples met behulp van de blauwe bemonsteringsschep. Mix het water voorzichtig door de schep heen en weer te bewegen. Zorg ervoor dat de bodem niet verstoord wordt. De bodem bevat mogelijk historisch DNA. Vul de schep tot de rand en leeg deze in de Whirl-Pak bag.
4. Sluit de Whirl-Pak bag en schudt om de subsamples te vermengen.
5. Haal de filterhouder uit de verpakking en draai deze op de opvangfles.
6. Sluit de filterhouder aan op de pomp.
7. Giet het water uit de Whirl-pak bag voorzichtig op het filter.
8. Zet de pomp aan. Bij plassen, sloten en boezemwateren kan tot maximaal 1 liter water gefiltreerd worden. Dit duurt ongeveer 2 minuten. Bij troebel water kan filter echter al eerder verstopt raken. Het is dus niet erg als het niet lukt om 1 liter water te filteren. Giet het water daarom stukje bij beetje op het filter en filtreer altijd het gehele toegevoegde volume. Noteer ook de hoeveelheid water die gefiltreerd kon worden.
9. Zet de pomp uit.

Conserveer de samples

10. Trek het tweede paar schone handschoenen aan om contaminatie te voorkomen.
11. Als het water gefiltreerd is, gebruik dan de plastic pincet om het filter voorzichtig in de buisjes met conserverende vloeistof te duwen. (Bij lage temperaturen zal er precipitatie (neerslag) te vinden zijn in de buffer. Door deze even in de hand op te warmen wordt de buffer weer vloeibaar.) Het is belangrijk om te voorkomen dat er vloeistof gemorst wordt! Verdeel het filter over de twee buisjes. Het filter moet daarbij doorgescheurd worden. Het is dus niet erg als het filter in meerdere stukjes in de buisjes overgebracht wordt. Zorg dat het filter geheel onder de buffer staat zodat het eDNA niet kan afbreken. Door slechts één pootje van de pincet te gebruiken kan het filter eenvoudig naar beneden gedrukt worden.
12. Sla de buisjes op in het opslagdoosje. Probeer het doosje zoveel mogelijk horizontaal te bewaren zodat er altijd een laagje buffer boven het filter blijft staan.
13. Bewaar de samples bij kamertemperatuur.
14. Stuur de samples zo spoedig mogelijk op naar Datura met een volledig ingevuld sample formulier (uitgeprint of digitaal). Langdurig bewaren van het sample kan leiden tot degradatie van het DNA.

De opvangfles, pomp en het opslagbakje ontvangen wij graag terug. De overige materialen mogen weggegooid worden.

NB: plastic scheiden is beter voor het milieu