

**BESLUIT van GS van Utrecht**

DATUM	10 september 2021	TEAM	Vergunningverlening Natuur en Landschap
ZAAKKENMERK	Z-WNB-SB-OV-2020-1135	REFERENTIE	Servicebureau
NUMMER	822391AD	DOORKIESNUMMER	030-2583311
UW BRIEF VAN	25 augustus 2020	FAX	030-2583139
UW NUMMER	-	E-MAILADRES	Servicebureau@provincie-utrecht.nl
BIJLAGE(N)	- 1: Voorschriften - 2: Kaart werkgebied Waternet - 3: Soorten en verbodsbepalingen - 4: Werkwijze - 5: Quickscan Soorten - 6: Bemonstering eDNA - 7: Bemonstering Macrofauna oppervlaktewater - 8: Uitzoekmethode (levend materiaal) en microscopie	ONDERWERP	Ontheffing Wnb onderzoek stichting Waterproef - Heel provincie Utrecht

Op 25 augustus 2020 hebben wij uw aanvraag om ontheffing in het kader van de Wet natuurbescherming (hierna: wet), onderdeel soortenbescherming, ontvangen. De aanvraag is ingediend door Stichting Waterproef, voor de gehele provincie Utrecht en is bij ons geregistreerd onder zaakkenmerk Z-WNB-SB-OV-2020-1135.

I. Besluit

Wij besluiten, op grond van het bepaalde in de wet en het Beleidskader Wet natuurbescherming provincie Utrecht 2017¹ ontheffing te verlenen van de verbodsbepaling(en) in:

- artikel 3.5, eerste lid van de wet, voor zover dit betreft het opzettelijk vangen van amfibieën (Amphibia), grondgebonden zoogdieren (Mammalia), kevers (Coleoptera), libellen (Odonata), nachtvlinders (Heterocera), reptielen (Reptilia), vissen (Pisces) en weekdieren (Mollusca) zoals genoemd in bijlage 3.
- artikel 3.5, eerste lid van de wet, voor zover dit betreft het doden van de gestreepte waterroofkever (*Graphoderus bilineatus*), de platte schijfhoren (*Anisus vorticulus*) en de larven van libellen (Odonata) zoals genoemd in bijlage 3.
- artikel 3.5, tweede lid van de wet, voor zover dit betreft het verstoren van amfibieën (Amphibia), grondgebonden zoogdieren (Mammalia), kevers (Coleoptera), libellen (Odonata), nachtvlinders (Heterocera), reptielen (Reptilia), vissen (Pisces), vleermuizen (Chiroptera) en weekdieren (Mollusca) zoals genoemd in bijlage 3.
- de verbodsbepalingen in artikel 3.5, vijfde lid van de wet, voor zover dit betreft het plukken, verzamelen, afsnijden, onwortelen of vernielen van de mossen (Bryophyta) en vaatplanten (Tracheophyta) zoals genoemd in bijlage 3.
- artikel 3.6, tweede lid van de wet, voor zover dit betreft het vervoeren en onder zich hebben van de gestreepte waterroofkever (*Graphoderus bilineatus*), de platte schijfhoren (*Anisus vorticulus*), de libellenlarven (Odonata), de verzamelde mossen (Bryophyta) en vaatplanten (Tracheophyta) zoals genoemd in bijlage 3.

¹ https://www.provincie-utrecht.nl/sites/default/files/2020-03/beleidsnota_wet_natuurbescherming.pdf

- artikel 3.9, eerste lid en 3.24, tweede lid, voor zover dit betreft het gebruik respectievelijk het bij zich hebben van de hieronder tevens genoemde niet-selectieve vangmiddelen:
 - Inloopvallen (life-traps) voor het vangen van beschermde inheemse kleine grondgebonden zoogdieren (Mammalia) zoals genoemd in bijlage 3.
 - Schepnetten voor het vangen van vissen (Pisces) en amfibieën (Amphibia) zoals genoemd in bijlage 3.
 - Amfibieënfuiken voor het vangen van amfibieën (Amphibia)
 - Vangpotten, emmers en platen voor het vangen van amfibieën (Amphibia) en reptielen (Reptilia) zoals genoemd in bijlage 3.
 - Insectennetten, insectenvallen, vangpotten, vlindernetten, insecten sleepnetten en (nachtvlinder)lampen voor het vangen van beschermde inheemse kevers (Coleoptera), libellen (Odonata) en nachtvlinders (Heterocera zoals genoemd in bijlage 3..
- artikel 3.10, eerste lid, aanhef en onder a van de wet, voor zover dit betreft het opzettelijk vangen van de in bijlage 2 genoemde amfibieën (Amphibia), grondgebonden zoogdieren (Mammalia), kevers (Coleoptera), libellen (Odonata), reptielen (Reptilia) en vissen (Pisces) zoals genoemd in bijlage 3.
- artikel 3.10, eerste lid, aanhef en onder b van de wet, voor zover dit betreft het plukken, verzamelen, afsnijden, ontwortelen of vernielen van de vaatplanten (Tracheophyta) zoals genoemd in bijlage 3.

voor de periode van de verzenddatum van het besluit tot en met 8 september 2026.

Omschrijving van de aanvraag

Uw aanvraag heeft betrekking op het uitvoeren van onderzoek naar aquatische levensgemeenschappen, waaronder macrofauna en macrofyten. Dit onderzoek wordt uitgevoerd om te voldoen aan de verplichting vanuit de Kaderrichtlijn Water (KRW) die stelt dat waterschappen de ecologische waterkwaliteit in hun beheersgebied moeten monitoren.

Ook wordt ontheffing aangevraagd om onderzoek te kunnen uitvoeren in het kader van projectbegeleiding. Het gaat dan om maatschappelijke projecten als bestendig beheer en onderhoud (maaien/baggeren) of ruimtelijke ontwikkelingen zoals o.a. dijkverbetering. Om deze projecten uit te voeren binnen een bestaande gedragscode of om een ontheffing van de Wet natuurbescherming voor deze projecten aan te vragen is ecologisch onderzoek in de vorm van een quickscan of aanvullend onderzoek noodzakelijk.

De aanvraag is een vervolg op de ontheffing met kenmerk FF/75A/2013/046, verleend door het ministerie van Economische Zaken op 7 maart 2014 (en geldt van 7 maart 2014 tot en met 6 maart 2019).

U vraagt een ontheffing voor het verstoren, doden en/of vangen, onder zich hebben en vervoeren, van beschermde fauna. Tevens vraagt u in verband met voorgaande ontheffing aan voor het onder zich hebben en gebruik van de niet-selectieve vangmiddelen:

- Inloopvallen (life-traps) voor het vangen van beschermde inheemse kleine grondgebonden zoogdieren zoals genoemd in bijlage 3.
- Schepnetten voor het vangen van vissen en amfibieën zoals genoemd in bijlage 3.
- Amfibieënfuiken voor het vangen van amfibieën.
- Vangpotten, emmers en platen voor het vangen van amfibieën en reptielen zoals genoemd in bijlage 3.
- Insectennetten, insectenvallen, vangpotten, vlindernetten, insecten sleepnetten en (nachtvlinder)lampen voor het vangen van beschermde inheemse kevers, libellen en nachtvlinders zoals genoemd in bijlage 3.

Ook vraagt u ontheffing aan voor het verzamelen van beschermde flora en het onder zich hebben en vervoeren van deze verzamelde flora. De aangevraagde soorten zijn beschreven in bijlage 2.

U vraagt ontheffing aan voor de gehele provincie Utrecht. De werkzaamheden zijn voornamelijk geconcentreerd in het werkgebied van Waternet, maar incidenteel vinden ook projecten daarbuiten (in het overige deel van de provincie Utrecht) plaats. Een kaart van het werkgebied van Waternet is opgenomen in bijlage 2. Ontheffing is aangevraagd voor de periode van 9 september 2021 tot en met 8 september 2026.

II. Procedure

Wij hebben de aanvraag afgehandeld volgens het bepaalde in afdeling 4.1.2 van de Algemene wet bestuursrecht (hierna: Awb). Op 2 maart, 20 april, 18 augustus, 6 september en 7 september 2021 heeft u deze aanvraag aangevuld.

III. Toetsingskader

De amfibieën, zoogdieren, kevers, libellen, nachtvlinders, reptielen, vissen, vleermuizen, weekdieren, mossen en vaatplanten zoals genoemd in bijlage 3 zijn beschermd op grond van de artikelen 3.5 en 3.10 van de wet.

IV. Motivering

De aangevraagde ontheffing kan alleen worden verleend als is voldaan aan elk van de volgende voorwaarden:

- a) er bestaat geen andere bevredigende oplossing;
- b) er is een geldig wettelijk belang;
- c) er wordt geen afbreuk gedaan aan het streven de populaties van de amfibieën, zoogdieren, kevers, libellen, nachtvlinders, reptielen, vissen, vleermuizen, weekdieren, mossen en vaatplanten, zoals genoemd in bijlage 3, in hun natuurlijke verspreidingsgebied in een gunstige staat van instandhouding te laten voortbestaan.

a) Afweging van andere bevredigende oplossingen

Omschrijving van alternatieven

U maakt gebruik van de Kennisdocumenten van Bij12, het Vleermuisprotocol, inventarisatieprotocollen van de Zoogdiervereeniging, SOVON, RAVON en FLORON en specifieke protocollen van Waterproef die u ook bij de aanvraag hebt toegevoegd. De meeste van deze protocollen zijn in het ecologisch werkveld gangbaar. Wij hebben de werkwijze zoals omschreven in het Activiteitenplan en de door u bijgevoegde protocollen van Waterproef (zie bijlagen 4 tot en met 8) beoordeeld en ons oordeel is dat deze onderzoeksmethoden functioneel en beproefd zijn en voldoende om de werkzaamheden zorgvuldig uit te kunnen voeren.

In het Activiteitenplan geeft u zelf de volgende onderbouwing voor de alternatieven:

"De onderzoeken worden op een zo zorgvuldig mogelijke wijze uitgevoerd, waarbij het verwonden en doden van dieren en schade aan vegetaties zoveel mogelijk wordt voorkomen. Dit geldt voor zowel wettelijk beschermde soorten als overige soorten.

Bij macrofytenonderzoek worden wettelijk beschermde planten uitsluitend geplukt wanneer determinatie in het veld en op basis van herkenbare foto's niet mogelijk is en wanneer determinatie noodzakelijk is voor een opname. Bij macrofaunabemonsteringen worden wettelijk beschermde dieren verzameld als bijvangst van overige macrofauna. Het immers niet mogelijk om het materiaal levend te determineren. Om populaties van soorten in stand te houden worden leefgebieden slechts beperkt bemonsterd: monsternamen vindt plaats in een deel van een monsternamelocatie, in een zeer beperkt deel van een polder of gebied en met tussenpozen van één tot meerdere jaren. Er zijn geen alternatieve methoden beschikbaar met bevredigende resultaten en minder effect op flora en fauna.

Ecologische onderzoeken voor de Wet natuurbescherming worden uitgevoerd volgens daartoe geldende richtlijnen in o.a. Kennisdocumenten en inventarisatievoorschriften. Waar mogelijk worden methoden toegepast met minder effect op dieren, zoals eDNA, sporenonderzoek en cameravallen. Het vangen, verstoren of doden van dieren wordt uitsluitend toegepast wanneer andere inventarisatiemethoden niet toereikend zijn."

Verdere definiëringen van de werkwijze en welke onderzoeksmiddelen wanneer worden ingezet zijn te lezen in het activiteitenplan en de onderzoeksprotocollen.

Door de zorgvuldige werkwijze en het gebruik maken van alternatieven als foto's en eDNA waar dit mogelijk is, wordt het vangen, verstoren en doden alleen toegepast indien nodig. Ook wisselen de onderzoekslocaties dusdanig, dat herstel mogelijk is waardoor negatieve effecten op populaties minimaal zullen zijn.

Conclusie

Gezien het bovenstaande zijn er geen redelijke alternatieven mogelijk die zouden leiden tot een kwalitatief gelijkwaardig resultaat. De alternatievenafweging is hiermee dan ook voldoende onderbouwd.

b) Belangenafweging

Omschrijving van het belang

Wij toetsen of het belang van de ingreep zwaarder mag wegen dan het beschermingsbelang van de soorten zoals is vastgelegd in de wet. Voor de amfibieën, zoogdieren, kevers, libellen, nachtvlinders, reptielen, vissen, vleermuizen, weekdieren, mossen en vaatplanten zoals genoemd in bijlage 3 heeft u de ontheffing aangevraagd op grond van de belangen genoemd in artikel 3.8, vijfde lid, onder b:

- 1. In het belang van de bescherming van de wilde flora of fauna, of in het belang van de instandhouding van de natuurlijke habitats;
- 4. Voor onderzoek en onderwijs, repopulatie of herintroductie van deze soorten, of voor de daartoe benodigde kweek, met inbegrip van de kunstmatige vermeerdering van planten.

In uw aanvraag heeft u het belang van de aanvraag onderbouwd. U geeft hierover het volgende aan:

"Het onderzoek naar aquatische levensgemeenschappen wordt uitgevoerd als verplichting van de waterschappen vanuit de Kaderrichtlijn Water (KRW) om de ecologische waterkwaliteit in hun beheersgebied te monitoren. De monitoring van macrofyten en macrofauna valt onder deze monitoringsplicht. De samenstelling van de macrofyten en macrofauna is een indicator van de waterkwaliteit. Indien de diversiteit van macrofyten en/of macrofauna laag is, zal dit ook gevolgen hebben voor hogere diersoorten, zoals vissen en zoogdieren. De Kaderrichtlijn Water is een belangrijke Europese richtlijn die landen ertoe verplicht de waterkwaliteit op orde te hebben.

Ecologische onderzoeken naar soorten van de Wet natuurbescherming worden uitgevoerd met het doel om deze soorten en hun leefgebied te beschermen, maar tevens om maatschappelijk belangrijke projecten mogelijk te maken. Het onderzoek naar beschermde soorten komt voort uit de Wet natuurbescherming en wordt uitgevoerd voorafgaand aan ruimtelijke ingrepen of het uitvoeren van beheer. Werkzaamheden kunnen bestaan uit bestendig beheer en onderhoud, zoals maaien en baggeren, of kunnen voortkomen uit ruimtelijke ontwikkelingen, zoals bomenkap en dijkverbetering. Ecologische onderzoeken worden uitgevoerd om te bepalen of werkzaamheden negatieve effecten hebben op beschermde soorten. Onderzoeken leiden uiteindelijk tot een advies om eventuele negatieve effecten op beschermde soorten te voorkomen, mitigeren of compenseren. Daarmee dragen deze onderzoeken bij aan de bescherming van flora en fauna en tegelijkertijd aan de voortgang van projecten die van belang zijn vanwege het grote openbare belang en/of veiligheid."

Conclusie

Hiermee is sprake van een wettelijk belang van de ingreep. Het ecologische effect op de soorten is, door het zorgvuldig uitvoeren van onderzoek, minimaal en tijdelijk. De staat van instandhouding van de soorten komt door het onderzoek niet in gevaar. In dit geval weegt het belang van het onderzoek daarom zwaarder dan het beschermingsbelang van de beschermde inheemse soorten.

c) Ecologische beoordeling

Door het volgen van de werkwijze zoals beschreven in het Activiteitenplan en de bijgevoegde protocollen (zie bijlagen 4 tot en met 8) blijven de negatieve effecten op inheemse beschermde amfibieën, zoogdieren, kevers, libellen, nachtvlinders, reptielen, vissen, vleermuizen, weekdieren, mossen en vaatplanten, zoals genoemd in bijlage 3, beperkt. Zo wordt er maar een deel van het onderzoeksgebied bemonsterd, wordt er periodiek steeds een ander gebied bemonsterd en wordt waar mogelijk gebruik gemaakt van alternatieven (eDNA en het nemen van foto's). Waar nodig voor het verkrijgen van voldoende en kwalitatief voldoende onderzoeksgegevens wordt er verstoord, gevangen en/of gedood.

Indien soorten gevangen worden, worden deze – indien het bijvangst betreft – direct teruggezet. Indien nodig worden soorten gevangen, direct gedetermineerd en op dezelfde locatie teruggeplaatst. Alleen lastig te identificeren soorten, zoals platte schijfhoren, gestreepte waterroofkever en larven van beschermde libellensoorten genoemd in bijlage 3 worden gedood en in het laboratorium onderzocht. Mossen en vaatplanten worden in het veld op naam gebracht. Indien determinatie niet lukt worden eerst foto's genomen. Indien in te schatten is dat deze foto's niet behulpzaam zijn wordt plantenmateriaal verzameld en meegenomen.

Ook van mossen en vaatplanten wordt alleen een monster meegenomen naar het laboratorium indien determinatie in het veld niet lukt en foto's onvoldoende zijn voor een succesvolle determinatie.

U geeft in het Activiteitenplan aan dat door de inventarisaties de gunstige staat van instandhouding niet in gevaar komt, door het toepassen van volgende werkwijze:

"De onderzoeksmethoden hebben als doel om aanwezigheid van soorten vast te stellen middels een representatieve steekproef van een lokale populatie. Hierdoor wordt een beperkt deel van de lokale populatie onderzocht. De onderzoeksmethoden zijn zodanig gekozen dat een wezenlijke invloed van onderzoeksmethoden en eventuele (tijdelijke) onttrekkingen op populaties van de soorten uitgesloten kunnen worden."

Wij stellen dat uw onderzoek bijdraagt aan informatievoorziening over en het behoud van de staat van instandhouding van de soorten genoemd in bijlage 3. Het onderzoek dat u uitvoert in verband met de Kaderrichtlijn water verschaft inzicht in de aanwezigheid (en daarmee ook afwezigheid van verwachte) diersoorten en plantensoorten. Ook geeft dit inzicht in de aquatische leefgemeenschap als geheel. Deze informatie kan gebruikt worden om beheerplannen door te zetten of aan te scherpen. Ook verricht u onderzoek dat benodigd is voor het aanvragen van ontheffingen in het kader van de Wet (Wet natuurbescherming). Het gaat hierbij om projecten zoals dijkverbetering en bestendig beheer. De door u geleverde informatie zorgt ervoor dat, vergunde of wettelijke toegestane, werkzaamheden uitgevoerd kunnen worden met de minste ecologische impact.

Samenvattend wordt er door het uitvoeren van het onderzoek op de door u beschreven wijze geen afbreuk gedaan aan het streven de populaties van de in bijlage 3 genoemde amfibieën, zoogdieren, kevers, libellen, nachtvlinders,

reptielen, vissen, vleermuizen, weekdieren en planten in hun natuurlijke verspreidingsgebied in een gunstige staat van instandhouding te laten voortbestaan.

V. Conclusie

Aangezien aan de voorwaarden voor een ontheffing wordt voldaan, verlenen wij u ontheffing als bedoeld in de artikelen 3.8 eerste lid, 3.9 tweede lid en 3.25 vierde lid, aanhef en onder a, van de wet. Aan deze ontheffing zijn voorschriften verbonden. Deze zijn opgenomen in bijlage 1 van dit besluit.

VI. Bezwaar

U kunt binnen zes weken na de dag waarop deze beschikking op de voorgeschreven wijze is bekendgemaakt een bezwaarschrift bij Gedeputeerde Staten van Utrecht indienen:

- Digitaal: gebruikt u hiervoor het formulier "Bezwaar tegen beslissing provinciaal bestuur met DigiD". Uw DigiD geldt als ondertekening. U vindt het formulier via: www.provincie-utrecht.nl onder loket / klacht, bezwaar of melding doorgeven / bezwaar tegen beslissing provincie;
- Schriftelijk: t.a.v. de secretaris van de Awb-adviescommissie van PS en GS, postbus 80300, 3508 TH Utrecht.

Het bezwaarschrift moet in ieder geval bevatten:

- uw naam en adres;
- de datum;
- een omschrijving van het besluit waartegen het bezwaar is gericht (indien mogelijk, onder vermelding van het besluitnummer);
- de reden van bezwaar;
- ondertekening.

Aan de behandeling van een bezwaarschrift zijn voor de indiener geen kosten verbonden.

Overigens schort het indienen van een bezwaarschrift de werking van het besluit niet op. Als u niet kunt wachten op de normale behandeling van uw bezwaarschrift, hebt u de mogelijkheid om een voorlopige voorziening aan te vragen bij de rechtbank. U moet op dat moment ook al een bezwaarschrift hebben ingediend. Het verzoek om een voorlopige voorziening richt u aan de voorzieningenrechter van de Rechtbank Midden-Nederland, Sector bestuursrecht, postbus 16005, 3500 DA Utrecht.

VII. Inwerkingtreding

Dit besluit treedt in werking vanaf de verzenddatum en wordt gepubliceerd op de website www.officielebekendmakingen.nl.

VIII. Overige informatie

Er kan ook vergunning of ontheffing nodig zijn op grond van andere wetten of verordeningen. Wij adviseren u zo nodig contact op te nemen met uw gemeente en/of milieudienst, als u dit nog niet heeft gedaan. Als u vragen heeft over de procedure en de inhoud van dit besluit, kunt u contact opnemen met ons Servicebureau via servicebureau@provincie-utrecht.nl, of op telefoonnummer 030-2583311.

IX. Verzending

Wij verzenden dit besluit aan de aanvrager. Een afschrift van dit besluit verzenden wij aan:

- Regionale Uitvoeringsdienst (hierna: RUD) Utrecht.

Hoogachtend,
Gedeputeerde Staten van Utrecht,
namens hen

Mevr. drs. ing. S. Heijlom
Teamleider Vergunningverlening Natuur en Landschap
Domein Landelijke Leefomgeving

Bijlage 1: Voorschriften

Aan deze ontheffing zijn de volgende voorschriften verbonden:

Algemeen

1. De ontheffing wordt alleen verleend voor de in dit besluit genoemde soorten en beschreven verboden handelingen.
2. Deze ontheffing geldt alleen voor onderzoek dat conform de aanvraag wordt uitgevoerd, voor zover in deze ontheffing zelf niet anders is aangegeven.
3. De ontheffinghouder dient direct contact op te nemen met het Servicebureau van de provincie Utrecht (Archimedeslaan 6, postbus 80300, 3508 TH te Utrecht of servicebureau@provincie-utrecht.nl) indien bij het uitvoeren van het onderzoek andere beschermde soorten dan de genoemde worden aangetroffen of andere handelingen als bedoeld in voorschrift 1 noodzakelijk zijn.
4. Deze ontheffing kan uitsluitend gebruikt worden door (medewerkers van) de ontheffinghouder of haar rechtsopvolgers of in opdracht van de ontheffinghouder handelende (rechts-)personen. De ontheffinghouder of haar rechtsopvolgers blijven daarbij verantwoordelijk voor de juiste naleving van deze ontheffing.
5. Deze ontheffing kan, conform artikel 5.4 van de wet, worden ingetrokken, indien blijkt dat de ontheffinghouder zich niet houdt aan de voorschriften.

Tijdens het onderzoek

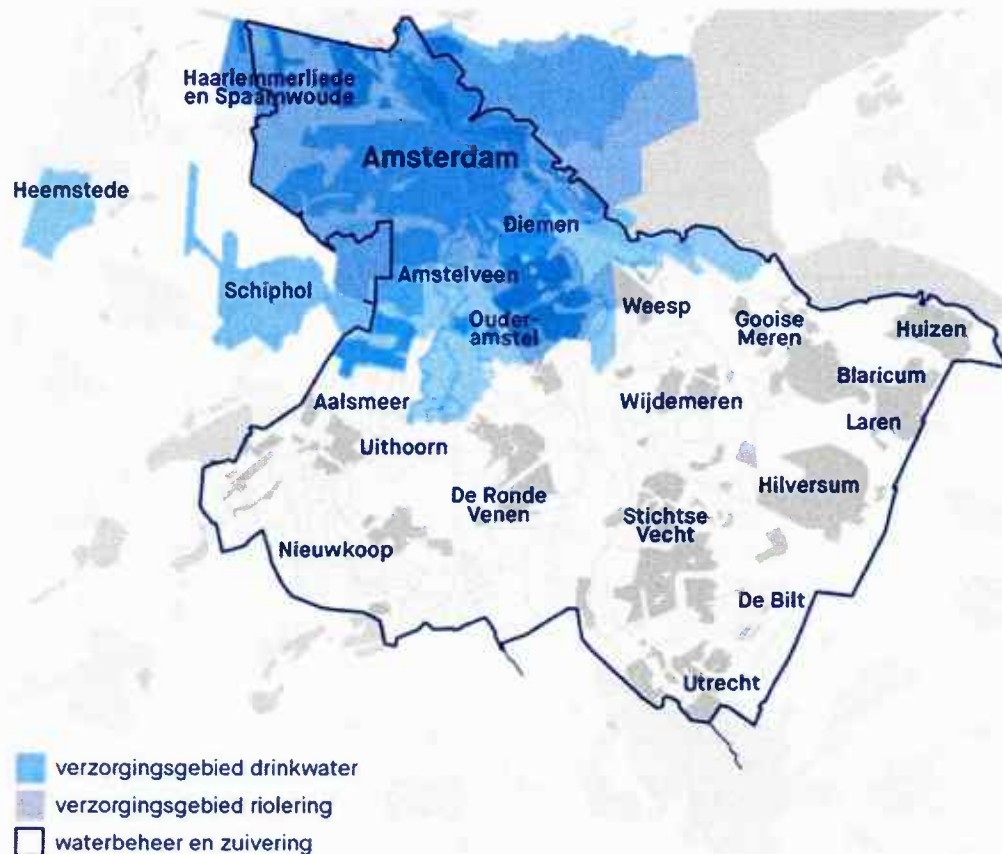
6. De onderzoekswerkzaamheden en bovengenoemde voorschriften moeten worden uitgevoerd door een deskundige of onder begeleiding van een deskundige op het gebied van de soorten waarvoor ontheffing is verleend en op dat moment onderzoek wordt uitgevoerd.
7. Tijdens de uitvoering van het onderzoek moet een afschrift van deze ontheffing op de locatie aanwezig zijn en op verzoek worden getoond aan de daartoe bevoegde toezichthouders of opsporingsambtenaren.
8. De werkwijze, genoemd in hoofdstuk 4 van het Activiteitenplan van 2 maart 2021 (zie bijlage 4) met daarin ook de genoemde standaardprotocollen van de diverse kennisorganisaties, alsmede de bijgevoegde protocollen van Waterproef (bijlage 5 tot en met 8) moet worden opgevolgd.
9. Om verspreiding van ziekten bij amfibieën - zoals chytridiomycose, ranavirus, saprolegnia, kikker- en paddenherpes - te voorkomen dient het meest recente hygiëneprotocol voor veldwerk van RAVON opgevolgd te worden.²
10. De vallen voor de grondgebonden kleine zoogdieren dienen met intervallen van maximaal 8 uur gecontroleerd te worden. Na de controle van de vallen dient in ieder geval weer droog hooi, fruit of groente (voor vocht) en voedsel voor insecteneters aanwezig te zijn.
11. Amfibieënfuiken dienen circa 10 cm boven de waterspiegel uit te steken zodat gevangen dieren kunnen ademen, ook als bijvoorbeeld door regenval het waterpeil ineens sterk zou stijgen.

Na het onderzoek

12. U dient jaarlijks een rapportage van de verrichte onderzoeken aan te leveren vóór 15 februari van het jaar (vanaf het jaar 2022). Uw rapportage dient te gaan over het voorgaande kalenderjaar.
 - o In deze rapportage dient u in ieder geval aan te geven welke diersoorten zijn gedood en hoeveel exemplaren van deze soorten zijn gedood. Ook moet vermeld worden in welke aantallen en op welke veldlocaties zij zijn aangetroffen.
 - o Ook dient het aangegeven te worden, indien er diersoorten zijn verstoord, gevangen en/of gedood of mos- en plantensoorten zijn geoogst die niet in de ontheffing waren opgenomen. Ook hiervoor moeten aantallen en locaties worden vermeld.
 - o Een aantal van de soorten die is opgenomen in deze ontheffing is al gedurende langere tijd (laatste tien jaar, bron NDFF) niet in de provincie waargenomen. Het is aannemelijk dat zij in de looptijd van de ontheffing toch worden aangetroffen. Ook deze soorten, hun aantallen en vindplaatsen dienen in de rapportage te worden opgenomen.Deze rapportage dient gestuurd te worden aan servicebureau@provincie-utrecht.nl met daarbij vermeld briefnummer 822391AD.
13. Indien er in het voorgaande kalenderjaar geen onderzoeken hebben plaatsgevonden in de provincie Utrecht, er geen soorten (afkomstig uit de provincie Utrecht) zijn gedood en er geen onverwachte soorten zijn aangetroffen dan volstaat een e-mail met deze strekking. Ook deze dient dan vóór 15 februari gestuurd te worden aan servicebureau@provincie-utrecht.nl.
14. Op basis van de informatie verschaft onder punt 12 kunnen wij de ontheffing periodiek herzien (wijzigingen doorvoeren).

² Ten tijde van de afgifte van deze ontheffing is de meest recente versie van april 2020:
https://ravon.nl/Portals/2/Bestanden/Publicaties/Hygiene_protocol.pdf

Bijlage 2: Kaart werkgebied Waternet



Afbeelding 1 Het werkgebied van Waternet

Kaart afkomstig uit Activiteitenplan Wet natuurbescherming Onderzoek Stichting Waterproef, 2 maart 2021. De ontheffing geldt voor de gehele provincie Utrecht, de activiteiten van Stichting Waterproef zullen voornamelijk plaatsvinden in het werkgebied van Waternet.

Bijlage 3: Verbodsbepalingen en soorten

Artikel 3.5, lid 1 - opzettelijk vangen		
Amfibieën	Boomkikker	<i>Hyla arborea ssp. arborea</i>
	Heikikker	<i>Rana arvalis ssp. arvalis</i>
	Kamsalamander	<i>Triturus cristatus</i>
	Knoflookpad	<i>Pelobates fuscus ssp. fuscus</i>
	Poelkikker	<i>Rana lessonae</i>
	Rugstreeppad	<i>Bufo calamita</i>
	Vroedmeesterpad	<i>Alytes obstetricans ssp. obstetricans</i>
Grondgebonden zoogdieren	Noordse woelmuis	<i>Microtus oeconomus ssp. arenicola</i>
Kevers	Gestreepte waterroofkever	<i>Graphoderus bilineatus</i>
Libellen	Gevlekte witsnuitlibel	<i>Leucorrhinia pectoralis</i>
	Groene glazenmaker	<i>Aeshna viridis</i>
	Noordse winterjuffer	<i>Sympecma annulata ssp. braueri</i>
	Oostelijke witsnuitlibel	<i>Leucorrhinia albifrons</i>
	Rivierrombout	<i>Gomphus flavipes ssp. flavipes</i>
	Sierlijke witsnuitlibel	<i>Leucorrhinia caudalis</i>
Nachtvlinders	Teunisbloempijlstaart	<i>Proserpinus proserpina</i>
Reptielen	Gladde slang	<i>Coronella austriaca ssp. austriaca</i>
	Muurhagedis	<i>Podarcis muralis ssp. brongniardii</i>
	Zandhagedis	<i>Lacerta agilis ssp. agilis</i>
Vissen	Houting	<i>Coregonus oxyrinchus</i>
	Steur	<i>Acipenser sturio</i>
Weekdieren	Platte schijfhoren	<i>Anisus vorticulus</i>

Artikel 3.5 lid 1 – opzettelijk doden		
Kevers	Gestreepte waterroofkever	<i>Graphoderus bilineatus</i>
Weekdieren	Platte schijfhoren	<i>Anisus vorticulus</i>
Libellen (specifiek: larven)	Gevlekte witsnuitlibel	<i>Leucorrhinia pectoralis</i>
	Groene glazenmaker	<i>Aeshna viridis</i>
	Noordse winterjuffer	<i>Sympecma annulata ssp. braueri</i> Synoniem: <i>Sympecma paedisca</i>
	Oostelijke witsnuitlibel	<i>Leucorrhinia albifrons</i>
	Rivierrombout	<i>Gomphus flavipes ssp. flavipes</i> Synoniem: <i>Stylurus flavipes</i>
	Sierlijke witsnuitlibel	<i>Leucorrhinia caudalis</i>

Artikel 3.5, lid 2 – verstoren

Amfibieën	Boomkikker	<i>Hyla arborea ssp. arborea</i>
	Heikikker	<i>Rana arvalis ssp. arvalis</i>
	Kamsalamander	<i>Triturus cristatus</i>
	Knoflookpad	<i>Pelobates fuscus ssp. fuscus</i>
	Poelkikker	<i>Rana lessonae</i>
	Rugstreeppad	<i>Bufo calamita</i>
	Vroedmeesterpad	<i>Alytes obstetricans ssp. obstetricans</i>
Grondgebonden Zoogdieren	Bever	<i>Castor fiber ssp. albicus</i>
	Hamster	<i>Cricetus cricetus ssp. canescens</i>
	Noordse woelmuis	<i>Microtus oeconomus ssp. arenicola</i>
	Otter	<i>Lutra lutra ssp. lutra</i>
	Wolf	<i>Canis lupus</i>
Kevers	Gestreepte waterroofkever	<i>Graphoderus bilineatus</i>
Libellen	Gevlekte witsnuitlibel	<i>Leucorrhinia pectoralis</i>
	Groene glazenmaker	<i>Aeshna viridis</i>
	Noordse winterjuffer	<i>Sympecma annulata ssp. braueri</i>
	Oostelijke witsnuitlibel	<i>Leucorrhinia albifrons</i>
	Rivierrombout	<i>Gomphus flavipes ssp. flavipes</i>
	Sierlijke witsnuitlibel	<i>Leucorrhinia caudalis</i>
Nachtvinders	Teunisbloempijlstaart	<i>Proserpinus proserpina</i>
Reptielen	Gladde slang	<i>Coronella austriaca ssp. austriaca</i>
	Muurhagedis	<i>Podarcis muralis ssp. brongniardii</i>
	Zandhagedis	<i>Lacerta agilis ssp. agilis</i>
Vissen	Houting	<i>Coregonus oxyrinchus</i>
	Steur	<i>Acipenser sturio</i>
Vleermuizen	Baardvleermuis	<i>Myotis mystacinus ssp. mystacinus</i>
	Bechsteins vleermuis	<i>Myotis bechsteini</i>
	Bosvleermuis	<i>Nyctalus leisleri ssp. leisleri</i>
	Brandts vleermuis	<i>Myotis brandti ssp. brandti</i>
	Franjestaart	<i>Myotis nattereri</i>
	Gewone dwergvleermuis	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>
	Gewone grootoorvleermuis	<i>Plecotus auritus ssp. auritus</i>
	Kleine dwergvleermuis	<i>Pipistrellus pygmaeus</i>
	Laatvlieger	<i>Eptesicus serotinus ssp. serotinus</i>
	Meervleermuis	<i>Myotis dasycneme</i>
	Rosse vleermuis	<i>Nyctalus noctula ssp. noctula</i>
	Ruige dwergvleermuis	<i>Pipistrellus nathusii</i>
	Tweekleurige vleermuis	<i>Vespertilio murinus ssp. murinus</i>
	Watervleermuis	<i>Myotis daubentoni ssp. daubentoni</i>
Weekdieren	Platte schijfhoren	<i>Anisus vorticulus</i>

Artikel 3.5, lid 5 – Planten in hun natuurlijke verspreidingsgebied opzettelijk plukken, verzamelen, afsnijden, onwortelen of vernielen		
Mossen	Geel schorpioenmos	<i>Drepanocladus vernicosus</i>
	Tonghaarmuts	<i>Orthotrichum rogeri</i>
Vaatplanten	Drijvende waterweegbree	<i>Luronium natans</i>
	Kruipend moerasscherm	<i>Helosciadium repens</i> Synoniem: <i>Apium repens</i>
	Kleine vlotvaren	<i>Salvinia natans</i>

Artikel 3.10, lid 1a – opzettelijk vangen		
Amfibieën	Alpenwatersalamander	<i>Mesotriton alpestris ssp. alpestris</i>
	Bruine kikker	<i>Rana temporaria ssp. temporaria</i>
	Gewone pad	<i>Bufo bufo ssp. bufo</i>
	Kleine watersalamander	<i>Lissotriton vulgaris ssp. vulgaris</i>
	Meerkikker	<i>Rana ridibunda</i>
	Middelste groene kikker	<i>Rana esculenta</i>
	Vinpootsalamander	<i>Lissotriton helveticus</i>
	Vuursalamander	<i>Salamandra salamandra ssp. terrestris</i>
Grondgebonden zoogdieren	Aardmuis	<i>Microtus agrestis</i>
	Bosmuis	<i>Apodemus sylvaticus</i>
	Dwergmuis	<i>Micromys minutus</i>
	Dwergspitsmuis	<i>Sorex minutus</i>
	Gewone bosspitsmuis	<i>Sorex araneus</i>
	Grote bosmuis	<i>Apodemus flavicollis</i>
	Hermelijn	<i>Mustela erminea ssp. aestiva</i>
	Huisspitsmuis	<i>Crocidura russula ssp. russula</i>
	Rosse woelmuis	<i>Myodes glareolus</i>
	Tweekleurige bosspitsmuis	<i>Sorex coronatus</i>
	Veldmuis	<i>Microtus arvalis</i>
	Waterspitsmuis	<i>Neomys fodiens ssp. fodiens</i>
	Wezel	<i>Mustela nivalis ssp. vulgaris</i>
	Woelrat	<i>Arvicola amphibius</i>
Kevers	Vliegend hert	<i>Lucanus cervus</i>
Libellen	Beekrombout	<i>Gomphus vulgatissimus</i>
	Bosbeekjuffer	<i>Calopteryx virgo ssp. virgo</i>
	Gevlekte glanslibel	<i>Somatochlora flavomaculata</i>
	Kempense heidelibel	<i>Sympetrum depressiusculum</i>
Reptielen	Hazelworm	<i>Anguis fragilis ssp. fragilis</i>
	Levendbarende hagedis	<i>Zootoca vivipara ssp. vivipara</i>
	Ringslang	<i>Natrix natrix ssp. helvetica</i>
Vissen	Beekprik	<i>Lampetra planeri</i>
	Grote modderkruiper	<i>Misgurnus fossilis</i>
	Kwabaal	<i>Lota lota</i>

Artikel 3.10, lid 1a – opzettelijk doden		
Libellen (specifiek: larven)	Beekrombout	<i>Gomphus vulgatissimus</i>
	Bosbeekjuffer	<i>Calopteryx virgo ssp. virgo</i>
	Gevlekte glanslibel	<i>Somatochlora flavomaculata</i>
	Kempense heidelibel	<i>Sympetrum depressiusculum</i>

Artikel 3.10, lid 1b - Vaatplanten in hun natuurlijke verspreidingsgebied opzettelijk plukken, verzamelen, afsnijden, onwortelen of vernielen

Vaatplanten	Blaasvaren	<i>Cystopteris fragilis</i>
	Dreps	<i>Bromus secalinus</i>
	Glad biggenkruid	<i>Hypochaeris glabra</i>
	Grote leeuwenklauw	<i>Aphanes arvensis</i>
	Zandwolfsmelk	<i>Euphorbia seguieriana</i>

Bijlage 4: Werkwijze

Bron: hoofdstuk 4 van het Activiteitenplan van 2 maart 2021

4. Omschrijving Werkwijzen

4.1 Werkwijzen

4.1.1 Algemeen

Om de kans op het aantreffen van soorten zo groot mogelijk te maken, worden de inventarisaties afgestemd op de omstandigheden. Deze omstandigheden verschillen over het jaar en zijn bijvoorbeeld afhankelijk van de ecologie van de doelsoort, terreinomstandigheden, weersomstandigheden etc, etc. Het bepalen van de meest geschikte onderzoeksmethode gebeurt daarom op basis van expert judgement. Verschillende onderzoeksprotocollen (zoals het Vleermuisprotocol, Kennisdocumenten Bij12, inventarisatiehandleidingen van de PGO's zoals SOVON, RAVON en FLORON) worden daarbij als leidraad gebruikt.

Monitoring vindt meestal plaats volgens een vast protocol en een vaste periode en wordt meestal met tijdsintervallen herhaald.

Onderzoeksaanvragen voor de Wet natuurbescherming komen grotendeels ad hoc binnen. De uitvoering hiervan volgt veelal een bepaalde werkwijze, waarbij eerst een bureau- en literatuurstudie wordt gedaan, waarbij op basis van terreingegevens en verspreidingsgegevens wordt bepaald welke soorten in het plangebied kunnen worden verwacht. Vervolgens vindt meestal een veldbezoek plaats, waarin beoordeeld wordt of er leefgebied voor deze soorten in het plangebied aanwezig is, of er eventueel andere soorten zijn te verwachten die niet uit het vooronderzoek naar voren kwamen en wordt globaal gekeken naar aanwezigheid van soorten tijdens het veldbezoek. Op basis van het bronnenonderzoek en het veldbezoek wordt vervolgens bepaald of er voldoende informatie is om de aanwezigheid van soorten te bepalen en om effecten van de voorgenomen werkzaamheden in te kunnen schatten. Indien dit niet het geval is, dan is nader onderzoek noodzakelijk. Bij het nader onderzoek wordt op geschikte momenten, gericht in het veld gezocht naar de aanwezigheid van de doelsoorten waarover nog te weinig informatie beschikbaar is.

4.1.2 Macrofyten

Onderzoek naar macrofyten wordt hoofdzakelijk uitgevoerd als onderdeel van de monitoringsverplichting van opdrachtgevers aan de Kaderrichtlijn Water. Bij het onderzoek worden opnames gemaakt van de vegetatie. Betrokken medewerkers hebben een gedegen kennis van inheemse flora. Determinatie vindt plaats in het veld of naderhand op basis van fotomateriaal. Vegetaties blijven in de regel onaangetast. Incidenteel is determinatie in het veld en het maken van determineerbare foto's niet mogelijk. Hierbij kan een (deel van een) plant geplukt worden, waarna determinatie in het laboratorium plaatsvindt. Het plukken betreft uitsluitend wettelijk beschermde soorten van artikel 3.10 'andere soorten'. Soorten van artikel 3.5 'Habitatrichtlijnsoorten' worden alleen (delen van) mossen verzameld.

4.1.3 Macrofauna

Onderzoek naar macrofauna wordt eveneens hoofdzakelijk uitgevoerd als onderdeel van de monitoringsverplichting van opdrachtgevers aan de Kaderrichtlijn Water. Voor het onderzoek naar macrofauna worden in wateren monsters genomen met behulp van een macrofaunaschepnet. Het schepnet wordt over een lengte van 5 tot 10 meter langs de oever en door het water getrokken. Het materiaal, dat bestaat uit bodemsubstraat, delen van watervegetatie en macrofauna wordt ter plaatse oppervlakkig onderzocht op amfibieën en vissen. Bij aantreffen worden deze direct teruggezet in het water. Daarnaast worden eenvoudig te determineren soorten zoveel mogelijk ter plaatse op naam gebracht en levend teruggezet. Het restant wordt meegenomen naar het laboratorium en uitgezocht. Uitgezocht macrofauna wordt op alcohol geconserveerd en binnen enkele maanden gedetermineerd met behulp van een professionele microscoop. De bemonstering kan plaatsvinden in leefgebied van wettelijk beschermde soorten macrofauna, zoals Platte schijfhoren, Gestreepte waterroofkever en voortplantingswateren van wettelijke beschermde libellen. Er wordt hiervoor gebruik gemaakt van de meest recente versies van de macrofauna protocollen van Waterproef (V7030 en A7030).

4.1.4 Onderzoek Wet natuurbescherming

Bij ecologisch onderzoek in het kader van de Wet natuurbescherming wordt een plan-, project- of werkgebied onderzocht op (functionaliteit voor) wettelijk beschermde plant- en diersoorten.

Bij verkennende onderzoeken (quickscans) wordt zoveel mogelijk informatie verzameld over de mogelijke aanwezigheid van beschermde functies voor wettelijk beschermde soorten. Hierbij wordt gericht gezocht naar sporen, verblijfplaatsen en exemplaren en individuen van beschermde soorten.

Bij het inventariseren van vissen, amfibieën en macrofauna worden met behulp van een (RAVON-)schepnet steekproefsgewijs monsters genomen. Het net wordt op enige afstand [vanaf de oever in het water gestoken en met kracht over en door de bodem naar de oever toe gehaald](#). Daarbij wordt o.a. door de oevervegetatie en onder kraggen geschept. Het schepnet kan zowel vanaf de oever als wadend door het water gebruikt worden. Aange troffen vissen en amfibieën worden direct gedetermineerd en teruggezet in het water. Aange troffen individuen worden met grote zorg behandeld. De inventarisatie van vissen en amfibieën wordt uitgevoerd in lijn met de Kennisdocumenten van Bij12 en overige inventarisatieprotocollen, zoals:

- Het waarnemen van amfibieën en reptielen (Diepenbeek, 2006);
- Handleiding voor het monitoren van amfibieën in Nederland (Goverse et al., 2015);
- Het waarnemen van zoetwatervissen (Spikmans, 2006);

Macrofaunasoorten die uitsluitend met behulp van een microscoop te determineren zijn, zoals Platte schijfhoren en (larven van) wettelijk beschermde kevers en libellen, worden bij vangst geconserveerd en op het laboratorium van Waterproef gedetermineerd. De onderzoeksmethoden voor macrofauna zijn in lijn met de voorschriften uit het Handboek hydrobiologie (Bijkerk 2014) en overige inventarisatieprotocollen, zoals:

- Handleiding Slakken van de Habitatrichtlijn waarnemen (Boesveld, 2009).

Beschermde amfibieën en reptielen kunnen vangpotten of platen ingezet worden. Hierdoor kunnen individuen gevangen worden om geteld te worden. De vangpotten worden minimaal dagelijks gecontroleerd, vaker bij ongunstige weersomstandigheden. Direct na controle en determinatie worden dieren vrijgelaten. De onderzoeksmethoden is in lijn met de Kennisdocumenten van Bij12 en overige inventarisatieprotocollen, zoals:

- Het waarnemen van amfibieën en reptielen (Diepenbeek, 2006);
- Handleiding voor het monitoren van amfibieën in Nederland (Goverse et al., 2015);

Waterproef voert onderzoek uit naar beschermde muizensoorten. Het vangen van muizen kan met life-traps uitgevoerd worden. In toenemende mate wordt echter onderzoek toegepast m.b.v. eDNA. Life-traps zijn vallen waarbij gevangen individuen niet gedood worden. In de life-traps wordt voldoende hooi en voer gestopt, zodat gevangen dieren in leven blijven. Afhankelijk van weersomstandigheden worden de vallen iedere 12 uur (tot 8 uur bij ongunstig nat en koud weer) gecontroleerd, zodat sterfte wordt voorkomen. Onderzoek met life-traps wordt uitgevoerd met hiertoe geschikte inloopvallen volgens de Kennisdocumenten van Bij12 en overige inventarisatieprotocollen, zoals:

- Handleiding inventarisatie Noordse woelmuis m.b.v. inloopvallen (Koelman, 2007).

Vleermuisonderzoek wordt gepland en uitgevoerd conform de meest recente versie van het vleermuisprotocol (Vleermuisvakberaad). In eerste instantie wordt onderzoek naar vleermuizen uitgevoerd met behulp van een batdetector. Boomholtes, vleermuiskasten en potentiële verblijven worden af en toe visueel onderzocht met o.a. een endoscoop en zaklamp. Hierbij wordt zo min mogelijk geluid en licht gemaakt om verstoring van vleermuizen tot een minimum te beperken. Ondanks de nodige voorzorg is verstoring van vaste rust- en verblijfplaatsen mogelijk.

Waarnemingen van wettelijk beschermde soorten worden ingevoerd in de Nationale Databank Flora en Fauna. Om praktische redenen worden vogels en vrijgestelde soorten uitsluitend ingevoerd wanneer dit relevante waarnemingen betreft. Datasets van macrofauna en macrofyten worden veelal door de gegevenseigenaren c.q. de moederorganisaties ingevoerd.

De volgende activiteiten vallen buiten de scope van deze aanvraag:

- onderzoek met sporenbuizen en cameravallen (geen dreigende overtreding);
- bemonstering en analyse van (e)DNA van wettelijk beschermde soorten (geen dreigende overtreding);
- verplaatsen van beschermde planten en dieren. Dit wordt uitgevoerd conform een goedgekeurde gedragscode of een projectspecifieke ontheffing.

4.2 Planning uitvoering

Onderzoek naar aquatische gemeenschappen gebeurt in de regel in het groeiseizoen: in de periode maart t/m september.

Verkenkend onderzoek in het kader van de Wet natuurbescherming (quickscans) vindt in principe jaar rond plaats.

Soortgerichte inventarisaties worden uitgevoerd in hiertoe geschikte perioden met voldoende trefkans op het waarnemen van (beschermde functies van) beschermde soorten. Indien beschikbaar zijn geschikte inventarisatieperioden opgenomen in inventarisatievoor-schriften.

4.3 Verslaglegging

Verslaglegging van de uitgevoerde veldwerkzaamheden vindt plaats in rapporten, notities en ruwe databestanden die aan de opdrachtgever worden aangeleverd

4.4 Betrokken deskundigen

Verantwoordelijk voor de activiteiten is de directeur van Stichting Waterproef, dhr. E. van Oorsouw. De activiteiten worden uitgevoerd door ecologisch deskundigen van Stichting Waterproef, conform de definitie van het Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselveiligheid:

"Onder een ecologisch deskundige verstaan we een persoon die in een bepaalde situatie en voor specifieke soorten gevraagd wordt te adviseren en/of begeleiden, aantoonbare ervaring en kennis heeft op het gebied van soortspecifieke ecologie. Hij of zij voldoet aan een of meer van deze punten:

- *bezit een afgeronde hbo- of universitaire opleiding, met als zwaartepunt (Nederlandse) ecologie;*
- *bezit een afgeronde mbo-opleiding, met als zwaartepunt de Wet natuurbescherming, soortenherkenning en zorgvuldig handelen ten opzichte van die soorten;*
- *is werkzaam voor een ecologisch adviesbureau, zoals een bureau dat is aangesloten bij het Netwerk Groene Bureaus;*
- *zet zich aantoonbaar actief in op het gebied van de soortenbescherming en is werkzaam of aangesloten bij de volgende Nederlandse organisaties: Zoogdierverseniging, RAVON, Stichting Das en Boom, Vogelbescherming Nederland, Vlinderstichting, Natuurhistorisch Genootschap, KNNV, NJN, IVN, EIS Nederland, FLORON, SOVON, STONE, Staatsbosbeheer, Natuurmonumenten, De Landschappen en Stichting Beheer Natuur en Landelijk gebied;*
- *zet zich aantoonbaar actief in op het gebied van de monitoring en/of bescherming."*

4.5 Verantwoording onderzoeksmethoden

De onderzoeksmethoden naar levensgemeenschappen zijn gebaseerd op de geldende richtlijnen in het Handboek Hydrobiologie (Bijkerk, 2014) en andere actuele inventarisatie-richtlijnen. Onderzoeksmethoden worden vastgelegd in voorschriften of een plan van aanpak. Een veelgebruikte voorschrift is bijgevoegd en betreft:

- Voorschrift V7030 Bemonstering van macrofauna;

Voor de onderzoeksmethoden in het kader van de Wet natuurbescherming wordt gebruik gemaakt van geldende inventarisatierichtlijnen en –protocollen en actuele kennis van onderzoeksmethoden. Het uitgangspunt bij de keuze van onderzoeksmethoden is dat voldoende inspanning geleverd wordt om de aanwezigheid van beschermde soorten en functies uit te kunnen sluiten. De Kennisdocumenten van BIJ12 vormen een eerste uitgangspunt bij het opzetten van onderzoeken. Voor het uitvoeren van een verkennend onderzoek heeft Waterproef een voorschrift opgesteld:

- Voorschrift V7090 Quicksan Soorten.

Voor de bemonstering van eDNA heeft Waterproef eveneens een protocol opgesteld:

- Voorschrift V7500 Bemonstering eDNA.

De voorschriften zijn als bijlage van dit activiteitenplan opgenomen.

5. Effecten op de staat van instandhouding van aanwezig soorten

De onderzoeksmethoden hebben als doel om aanwezigheid van soorten vast te stellen middels een representatieve steekproef van een lokale populatie. Hierdoor wordt een beperkt deel van de lokale populatie onderzocht. De onderzoeksmethoden zijn zodanig gekozen dat een wezenlijke invloed van onderzoeksmethoden en eventuele (tijdelijke) onttrekkingen op populaties van de soorten uitgesloten kunnen worden.

Bijlage 5: Quickscan Soorten

Titel: V7090.Quickscan Soorten Versie: 2

Geprint document uitgegeven door KAM

Titel:	V7090.Quickscan Soorten
Versie:	2

Referentie:

*Groenewegen, M.H.M & W.P.J. Teunissen. 2018. V7090 – Quickscan Soorten. Versie 2.
Stichting Waterproef.*

Quickscan Soorten

1 Onderwerp

Dit voorschrift beschrijft de werkwijze voor het uitvoeren en opstellen van een Quickscan Soorten.

2 Toepassingsgebied

Dit voorschrift is voor de verkennende toetsing van projecten van de opdrachtgever die kunnen leiden tot overtreding van verbodsbepalingen van de Wet natuurbescherming hoofdstuk Soortenbescherming.

3 Definities

Beschermde soorten	Soorten als bedoeld in de Wet natuurbescherming artikel 3.1, lid 1, artikel 3.5, lid 1 en artikel 3.10, lid 1.
Vrijgestelde soorten	Soorten als bedoeld in de Wet natuurbescherming artikel 3.10, lid 1, waarvoor overtreding van verbodsbepalingen zijn vrijgesteld middels een landelijke of provinciale verordening.
Verbodsbepalingen	De verboden zoals genoemd in de Wet natuurbescherming ten aanzien van beschermde soorten (tabel 1)

Tabel 1. Verbodsbepalingen Wet natuurbescherming.

Verbodsbepaling	Van toepassing op		
	VR ¹	HR ²	NL ³
Verbod op opzettelijk verstoren van individuen	X ⁴	X	
Verbod op opzettelijk eieren te rapen/onder zich te hebben	X	X	
Verbod op opzettelijk verwonden/doden van individuen	X	X	X
Verbod op opzettelijk beschadigen/verwijderen van verblijven/nesten	X	X	X
Verbod op verwijderen van planten		X	X

Ad 1. Vogelrichtlijnsoorten van artikel 3.1 lid 1

Ad 2. Habitatrichtlijnsoorten van artikel 3.5 lid 1

Ad 3. 'Nationale' Andere soorten van artikel 3.10 lid 1

Ad 4. Tenzij de verstoring niet van wezenlijke invloed is op de staat van instandhouding van de soort.

Verblijfplaats	Een voortplantingslocatie of vaste rust- of verblijfplaats van een dier. Verblijfplaatsen kunnen verschillende functies hebben, zoals overwintering, zomerverblijf, eiafzettingslocatie, kraamverblijf, voortplantingslocatie etc. Onder verblijven wordt tevens verstaan: de functionele leefomgeving die nodig is om verblijven als zodanig te laten functioneren.
Plangebied	Een begrensd gebied waarbinnen activiteiten kunnen plaatsvinden.
Standplaats	Een groeilocatie van een plant.
Gedragscodes	Een goedgekeurde werkwijze waarmee overtreding van verbodsbepalingen kan worden voorkomen.

4 *Beginsel*

Waterproef toetst projecten van opdrachtgevers aan de Soortenbescherming in de Wet natuurbescherming. De Quickscan Soorten is de eerste stap van de toetsingsprocedure en bestaat uit de volgende onderdelen:

1. Een verkennende beoordeling van de mogelijke aanwezigheid van beschermde soorten en hun verblijven.
2. Een beoordeling van de mogelijke effecten van een project op beschermde soorten.
3. Aanbevelingen voor maatregelen om overtreding van verbodsbepalingen te voorkomen.
4. Een toetsing of er sprake is of kan zijn van een overtreding van verbodsbepalingen met inachtneming van aanbevolen maatregelen.
5. Aanbevelingen voor vervolgpcedures: o.a. nader onderzoek, ontheffingaanvraag, voorlegging aan het bevoegd gezag.

De Quickscan Soorten bestaat uit een schriftelijke rapportage. De werkwijze wordt per opdracht vastgelegd in een prijsopgave.

5 *Veiligheid en milieu*

De uitvoerder dient de gevaren te kennen die een specifiek terrein met zich mee brengt en gaat voorafgaand aan de werkzaamheden na of het verantwoord is om deze uit te voeren.

Werkzaamheden met een boot of op hoogte worden uitgevoerd door minimaal twee personen.

Terreinen buiten het eigendom van de opdrachtgever worden pas betreden na toestemming van de grondgebruiker. Werkzaamheden die kunnen leiden tot hinder bij bewoners/gebruikers worden vooraf gemeld.

In het beheersgebied van Waternet is tijdens werkzaamheden op of aan het water het dragen van een zwemvest verplicht.

6 *Omgevingscondities*

De Quickscan Soorten kan het gehele jaar uitgevoerd worden. Een uitvoering in specifieke perioden kan gunstig zijn voor de combinatie met soortgerichte inventarisaties.

7 *Hulpmiddelen en Apparatuur*

Basishulpmiddelen worden altijd aanwezig geacht tijdens een inventarisatie. Overige hulpmiddelen worden indien van toepassing aanwezig geacht.

7.1 *Basishulpmiddelen*

- 7.1.1 *Veiligheidsvest*
- 7.1.2 *Verrekijker*
- 7.1.3 *Fotocamera*
- 7.1.4 *Tablet of telefoon met waarnemingsapplicatie*
- 7.1.5 *Loupe*

7.2 Bij de inventarisatie van het water

7.2.1 *RAVON-schepnet*

7.2.2 *Cuvet*

7.2.3 *Reagentia*

7.2.4 *Opslagpotjes*

7.2.5 *Zwemvest*

7.3 Bij het werken op bouwterreinen

7.3.1 *Veiligheidsschoenen*

7.3.2 *Veiligheidshelm*

7.3.3 *Gehoorbescherming*

7.3.4 *Veiligheidsbril*

7.4 Boomcontroles

7.4.1 *Trap*

7.4.2 *Zaklamp*

7.4.3 *Endoscoop*

8 Reagentia, standaarden en controlemonster

8.1 reagentia en hulpstoffen

8.1.1 Ethanol, 80% (v/v).

Opmerking: Het gebruik van ethanol 96% (v/v), waaraan t.b.v. denaturatie 5% (v/v) methanol is toegevoegd, is toegestaan.

Houdbaarheid: Onbeperkt (is 3 jaar bij Stichting Waterproef) in een afgesloten dampdichte fles.

9 Analysemonster

Niet van toepassing.

9.1 Monsterconservering

Kleine ongewervelden die niet in het veld gedetermineerd of voldoende gefotografeerd kunnen worden, worden verzameld in ethanol.

Mest / braakballen etc. worden droog verzameld.

Monsters met beschermde soorten worden gelabeld en minimaal drie jaar bewaard in het archief van macrofauna bij Waterproef (kamer 0.13).

10 Inventarisatie

10.1 Voorbereiding veldwerk

Voorafgaand aan veldwerk wordt de Nationale Databank Flora en Fauna geraadpleegd om de verspreiding van beschermde soorten nabij het plangebied in kaart te brengen. Zodoende kan in het veld gericht gezocht worden naar individuen, exemplaren, verblijven en overige functies.

10.2 Locatiekeuze

De begrenzing van het plangebied wordt door de opdrachtgever aangegeven. In principe bestaat het plangebied uit de locaties waar werkzaamheden plaatsvinden ten behoeve van de uitvoering van een project van de opdrachtgever. Tijdens het veldbezoek worden de meest geschikte biotopen voor mogelijk in het plangebied aanwezige beschermde soorten in het plangebied onderzocht (expert judgment).

Op voorhand te verwachten beschermde soorten of verblijven worden zo gericht mogelijk onderzocht tijdens het veldbezoek, rekening houdend met de geschikte inventarisatieperioden van soorten en functies en combinatie tijdens een verkennend veldbezoek.

10.3 itgangspunten

Een Quickscan is nodig zodra er op voorhand een vermoeden is dat een project kan leiden tot overtreding van verbodsbepalingen.

De Quickscan is een signalerende verkenning die mogelijke overtreding van verbodsbepalingen inzichtelijk maakt en aanbevelingen doet voor eventuele vervolgstappen, zoals nader soortenonderzoek of een ontheffingaanvraag.

De Quickscan heeft niet als doel om de volledige vereiste onderzoeksinspanning te leveren om de aan- of afwezigheid van beschermde functies van beschermde soorten vast te kunnen stellen.

Waarnemingen van beschermde soorten worden ingevoerd met een waarnemingsapp, en zo nodig gefotografeerd en ingemeten met GPS. Het betreft waarnemingen van individuen, exemplaren, potentiële verblijven of nesten, sporen en overige relevante waarnemingen.

Het verstoren, verwonden en doden van dieren en het plukken van planten wordt zoveel mogelijk voorkomen. Voortplantingslocaties en overige (functionele onderdelen van) verblijfplaatsen worden zo min mogelijk aangetast.

10.4 Veldbezoek

Tijdens het veldbezoek worden in ieder geval de volgende inventarisaties uitgevoerd, tenzij anders aangegeven in de prijsopgave:

- (Mogelijk) aan te tasten bomen worden onderzocht op geschikte holten voor vleermuisverblijven en geschikte en potentiële roofvogelnesten. De inventarisatie kan optimaal uitgevoerd worden in de winterperiode, wanneer bomen niet in blad staan.
- (Mogelijk) aan te tasten wateren worden steekproefsgewijs onderzocht op mogelijke beschermde soorten en functies: amfibieën(larven), vissen, Platte schijfhoren, Krabbenscheer. Amfibieënlarven kunnen het beste in het voorjaar (mei/juni) onderzocht worden. Overige watergebonden soorten kunnen het beste in de nazomer (juli/augustus) onderzocht worden;
- (Mogelijke) eiafzettingslocaties, verblijfslocaties en overwinteringslocaties van Ringslang worden in kaart gebracht.
- Mogelijke verblijfslocaties van beschermde grondgebonden zoogdieren en amfibieën worden in kaart gebracht.
- Mogelijke functionele leefgebieden van verblijven van beschermde dieren worden in kaart gebracht, zoals migratie/vliegroutes en foerageergebieden.
- Geschikte standplaatsen worden onderzocht op exemplaren van beschermde soorten. De inventarisatie is optimaal tijdens de groei- en bloeiperiode van de mogelijk aanwezige soorten: grofweg de periode mei t/m augustus.

10.5 Verzamelen van taxa

- Exemplaren van niet of moeilijk in het veld te determineren taxa worden verzameld in een kunststof potje of een plastic zak en worden meegenomen naar het laboratorium en gedetermineerd.
- Indien nodig worden lastig of niet te determineren soorten door een externe specialist gedetermineerd.

11 Kwaliteitsborging

De in dit voorschrift beschreven werkwijze mag alleen worden uitgevoerd door daartoe bevoegde personen zoals opgenomen in de bevoegdhedenmatrix.

11.1 Eerste lijnscontrole

De veldwerker controleert zichzelf, o.a. door na te gaan:

1. Kloppen de waarnemingen: soort, locatie, datum etc.;
2. Is gewerkt volgens de geldende voorschriften;
3. Kan de aanwezigheid van beschermde functies voldoende uitgesloten of vastgesteld worden.

11.2 Tweede lijnscontrole

Rapporten worden door een collega met voldoende ecologische deskundigheid beoordeeld voordat deze in concept worden uitgegeven. Van de opdrachtgever wordt verwacht dat deze de rapporten ook beoordeeld. Na akkoord van de opdrachtgever en na verwerking van eventuele opmerkingen wordt de conceptrapportage als definitief rapport uitgegeven.

11.3 Derde lijnscontrole

Niet van toepassing.

12 Rapportage en archivering

12.1 Rapportage

Aanwezigheidsbeoordeling

De veldwaarnemingen worden vastgelegd op veldkaarten of in een email. De veldwaarnemingen worden aangevuld met bekende verspreidingsgegevens uit verspreidingsatlassen en online databases. Van beschermde soorten wordt zo volledig mogelijk beoordeeld of de aanwezigheid van exemplaren en verblijven in het plangebied vastgesteld, verwacht of uitgesloten kan worden. Hierbij wordt de vuistregel gevolgd: beschermde functies van beschermde soorten die nabij het plangebied aanwezig zijn en waarvoor geschikt habitat aanwezig is in het plangebied kunnen niet uitgesloten worden, tenzij er voldoende aanwijzingen zijn dat mogelijke beschermde functies niet als zodanig worden gebruikt door de soort.

Effectbeoordeling en aanbevelingen

Op basis van de voorziene werkzaamheden en met inachtneming van een uitvoering van de werkzaamheden in lijn met een gedragscode wordt beoordeeld of een project leidt of kan leiden tot negatieve effecten op beschermde functies van beschermde soorten. Voor mogelijke negatieve effecten worden aanbevelingen gedaan om maatregelen te treffen, zodat negatieve effecten kunnen worden voorkomen of verzacht. Maatregelen betreffen o.a. de uitvoering buiten de kwetsbare perioden van voortplanting en overwintering of de het aanpassen van de uitvoeringswijze en inrichting.

Toetsing

Getoetst wordt of een overtreding van verbodsbepalingen uitgesloten kan worden door een uitvoering van het project met inachtneming van de gedragscode en aanvullende maatregelen.

Aanbevelingen

Tot slot worden de aanbevelingen voor maatregelen om overtreding van verbodsbepalingen te voorkomen opgesomd. In het geval van onvermijdelijke (mogelijke) overtreding van verbodsbepalingen wordt aangegeven of gerichte inventarisaties nodig zijn om de omvang van negatieve effecten en maatregelen nader inzichtelijk te krijgen of wordt aanbevolen om een ontheffing van de Wet natuurbescherming aan te vragen.

12.2 Archivering

Rapportages, foto's en correspondentie worden bewaard binnen de projectmappen van F:\CBV\Team biologie\Team 7 - Flora & Fauna\.

13 Wijzigingen

Dit is de tweede versie, volledig gereviseerd op 26 maart 2018 door Thijs Groenewegen.

Ten opzichte van de vorige versie zijn de volgende wijzigingen doorgevoerd:

- Het versienummer is aangepast. Ten onrechte was het voorgaande document als 2^e uitgave uitgegeven. Voorliggend stuk betreft de 2^e uitgave.
- Hoofdstuk 7 hulpmiddelen en apparatuur is inhoudelijk gewijzigd.
- De literatuurlijst is verwijderd.
- De bijlage 'stroomschema toetsprocedure' is verwijderd.
- Tekstuele wijzigingen.

Bijlage 6: Bemonstering eDNA

Titel: V7500.Bemonstering eDNA Versie: 2

Geprint document uitgegeven door KAM

Titel:	V7500.Bemonstering eDNA
Versie:	2

Referentie:

*Teunissen, W.P.J., M. Wesseling, T. Groenewegen. 2020b. V7500 – Bemonstering eDNA.
Versie 2. SPV Stichting Waterproef, Edam*

Bemonstering eDNA

1 **Onderwerp**

Dit voorschrift beschrijft de bemonstering van eDNA in stilstaande zoete tot brakke wateren, uit bodem en uit uitwerpselen. De methodiek betreft een eigen methode.

1	Onderwerp	1
2	Toepassingsgebied	1
3	Definities	2
4	Beginsel	2
5	Veiligheid en milieu	2
6	Omgevingscondities	3
7	Hulpmiddelen en Apparatuur	3
7.1	Hulpmiddelen algemeen	3
7.2	Hulpmiddelen watermonsters	3
7.3	Hulpmiddelen uitwerpselen monsters	3
7.4	Reinigen glaswerk	3
7.5	Apparatuur Algemeen	4
7.6	Apparatuur Watermonsters	4
8	Reagentia, standaarden en controlemonster	5
8.1	Reagentia en hulpstoffen	5
8.2	Controlemonster en controlestandaard	5
8.3	Kalibratiestandaarden	5
9	Analysemonster	5
9.1	Monsterconservering	5
9.2	Zekerheidsstelling van het monster	5
9.3	Vorbewerking	5
9.4	Blanco	5
9.5	Controlemonster	5
10	Bemonstering	6
10.1	Watermonsters	7
10.2	Uitwerpselen	14
11	Berekeningen	15
12	Evaluatie en controles	15
13	Rapportage en archivering	15
13.1	Rapportage	15
13.2	Archivering	15
14	Literatuur	16
15	Bijlages:	16

2 **Toepassingsgebied**

Dit voorschrift is van toepassing op het nemen van eDNA monsters uit oppervlakte water of uitwerpselen t.b.v. het aantonen van de aan- of afwezigheid van specifieke doelsoorten. De trefkans van de bemonstering wordt o.a. beïnvloedt door de ecologische kennis van de uitvoerder, de bemonsteringslocatie en het aantal deelmonsters. Op deze wijze genomen monsters zijn geschikt voor verdere eDNA analyse, bijvoorbeeld met qPCR technieken of next generation sequencing.

3 **Definities**

eDNA	Environmetal DNA. DNA van een organisme dat is vrijgekomen in het milieu. Het betreft intracellulair DNA (in levende cellen) en extracellulair DNA of celrestanten. Het is afkomstig van bijvoorbeeld celafbraak en afscheiding van lichaamsvocht. Voorbeelden zijn urine, slijm, huid, haren, losse cellen, etc.
latrine	Sommige doelsoorten hebben de neiging om de uitwerpselen bij elkaar te leggen. Het cluster van uitwerpselen wordt in zo'n geval een latrine genoemd.
doelsoort	Soort waarvan het DNA met de bemonstering wordt gezocht.
trefkans	De trefkans is de kans waarmee een taxon in een water/ bodem/ uitwerpselen monster met de geselecteerde methode kan worden gedetecteerd.

4 **Beginsel**

In het veld worden water-, en/of uitwerpselenmonsters genomen en zo nodig geconserveerd. De aan- of afwezigheid van DNA van de doelsoorten in het monster kan afhangen van: de periode van monsternamen, recente betreding, recente neerslag, de afstand tot een lozingspunt, stroomsnelheid van het water. De methode is zeer gevoelig: één DNA molecuul is in principe voldoende om een soort te kunnen aantonen. Dat maakt dat de methode zeer gevoelig is voor contaminatie. Bij de bemonstering wordt hiermee rekening gehouden.

5 **Veiligheid en milieu**

De uitvoerder dient op de hoogte te zijn van algemene en specifieke veiligheid bij uitvoeren van veldwerk, raadpleeg hiervoor indien nodig SPV V1100. Het werken met uitwerpselen en resten van dieren, brengt gevaren met zich mee met betrekking tot het overbrengen van ziekten. Wees hiervan bewust, werk schoon en neem de nodige maatregelen.

Indien metingen moeten worden gedaan met behulp van een boot, dan moeten er in ieder geval twee personen op deze boot aanwezig zijn. In het beheergebied van Waternet is tijdens werkzaamheden op of aan het water het dragen van een zwemvest verplicht. Werk volgens de geldende Arbo voorschriften. De uitvoerder van de bemonstering dient op de hoogte zijn van de gevaaraspecten van de gebruikte chemicaliën. Raadpleeg hiervoor, indien nodig, het veiligheidsboek en/of de chemiekaarten. Voorkom dat chemicaliën in het milieu terecht komen.

6 Omgevingscondities

De analyse kan onder normale omstandigheden in het veld worden uitgevoerd.

Er wordt niet bemonsterd als:

- Er sprake is van veel recente betreding van de bodem door mensen of voertuigen. Zoek plekken zonder betreding, zijn deze niet of met moeite te vinden, dan wordt niet bemonsterd. Er bestaat dan een te groot risico dat eDNA van een andere locatie is aangevoerd.
- De monsterlocatie direct naast een lozingspunt of gemaal ligt. Het aangevoerde water kan van een andere plek komen, waardoor de herkomst van het eDNA niet goed meer is te bepalen.
- Vlak na hevige regenval. DNA kan van elders zijn aangevoerd door een grotere stroomsnelheid van het oppervlaktewater. Uitwerpselen en bodem met eDNA kan zijn uit-/weggespoeld.
- Het water net is verstoord/ geroerd waardoor veel bodem/slibdeeltjes in het water terecht zijn gekomen en het water troebel is. Deze deeltjes kunnen het filter verstoppert, waardoor filtratie van het DNA materiaal niet goed kan verlopen.

7 Hulpmiddelen en Apparatuur

Gebruik toestellen en hulpmiddelen die zoveel mogelijk bestaan uit materialen, die inert zijn ten aanzien van de te analyseren component(en).

7.1 Hulpmiddelen algemeen

7.1.1 *Formulieren: voor veldwaarnemingen, met monsterpuntomschrijving (bijlage 1);*

7.1.2 *Afvalzak*

7.2 Hulpmiddelen watermonsters

7.2.1 *Bemonsteringskit watermonsters van Sylphium*

7.2.2 *Handschoenen (paar in afgesloten zak)*

7.3 Hulpmiddelen uitwerpselen monsters

7.3.1 *Bemonsteringskit uitwerpselenmonsters van Sylphium*

7.3.2 *Handschoenen (paar in afgesloten zak)*

7.4 Reinigen glaswerk

n.v.t.

7.5 Apparatuur Algemeen

7.5.1 GPS

7.5.2 Voldoende opgeladen, digitale tablet met toegang tot mappen met SPV's, chemiekaarten en topografische kaart;

7.6 Apparatuur Watermonsters

7.6.1 Monsterhengel Sylphium



Afbeelding 1. Monsterhengel Sylphium. Aan het eind van de hengel wordt een DNA schone spuit geplaatst waarmee watermonsters worden genomen. (bron: Sylphium, 2018').

8 Reagentia, standaarden en controlemonster

8.1 Reagentia en hulpstoffen

8.1.1 Conserveringsvloeistof CTAB

Voeg toe of los op: 20 g CTAB (Hexadecyltrimethylammoniumbromide), 80 g NaCl, 2 ml 2-mercaptoethanol, 5 mM EDTA, 0,1 M Tris-HCl en IPC (DNA van een niet inheemse plant als Interne Positieve Controle) en vul aan tot 1 liter.

8.1.2 Reinigingsvloeistof voor monsterhengel: Dunne bleek.

8.2 Controlemonster en controlestandaard

n.v.t.

8.3 Kalibratiestandaarden

n.v.t.

9 Analysemonster

n.v.t.

9.1 Monsterconservering

De monsters kunnen na toevoeging van de conserveringsvloeistof zeker maximaal 6 maanden ongekoeld worden bewaard. Een langere periode is wellicht mogelijk echter in deze situatie dient er een disclaimer t.a.v. de houdbaarheid te worden geplaatst in de rapportage.

9.2 Zekerheidsstelling van het monster

Moment dat de conserveringsvloeistof in contact is gekomen met het monster.

9.3 Voorbewerking

n.v.t.

9.4 Blanco

n.v.t.

9.5 Controlemonster

n.v.t.

10 **Bemonstering**

Voorafgaand aan de bemonstering wordt vastgesteld waar (gebied) en op welke wijze bemonsterd moet worden. Er zijn 2 verschillende typen van bemonstering: watermonsters en monsters uit uitwerpselen. Elk met hun eigen bemonsteringswijze.

De uitvoerder van de bemonstering is ecologisch deskundig en bepaalt op basis van expert judgement de locatie van de specifieke (deel)monsterlocaties in het veld. Hierbij wordt rekening gehouden met habitatvoorkeuren van de doelsoort. Over het algemeen geldt, hoe dichter bij de doelsoort wordt bemonsterd hoe hoger de trefkans.

Locatie:

- Voorbereiding: Zorg voor de juiste hulpmiddelen en apparatuur (paragraaf 7), wees op de hoogte van de veiligheidsaspecten (paragraaf 5) en bepaal of er sprake is van de juiste omgevingscondities (paragraaf 6) om de bemonstering uit te voeren. Zorg voor (indien van toepassing) toestemming van de terreineigenaar.
- Leg de locatie van het monstertraject vast, door de x, y- coördinaten van het middelpunt van het traject te noteren: (EPSG) 28992: Geprojecteerd coördinatensysteem Amersfoort / RD New in meters. Teken bij voorkeur ook het gehele bemonsterde traject in op kaart.
- De directe omgeving van stuwen, inlaten en gemalen wordt zoveel mogelijk gemeden, omdat dit bronnen kunnen zijn van water van elders, waardoor het risico bestaat dat DNA van een andere locatie dan de monsterlocatie wordt aangetoond.
- Kruisbesmetting van DNA van andere locaties vormt een reëel risico. Werk daarom altijd voor je uit en blijf met je eigen lichaam uit het water. Zorg ervoor dat apparatuur, kleding, schoeisel en monsters van andere locaties niet in aanraking komen met het te bemonsteren water/bodem/uitwerpselen.
- Werk voor je uit, vanaf de boeg, bij bemonstering vanaf een boot.
- Voer eventuele overige bemonsteringen/ metingen op de locatie pas uit, nadat de eDNA bemonstering is afgerond.

10.1 Watermonsters

Verpakking:

De bemonsteringsset (Afbeelding 2) kan ongekoeld en bij kamertemperatuur bewaard worden en bestaat uit:

- Een 60 ml spuit;
- Sterivex filter 0,22 μm ;
- Conserveringsvloeistof (3ml) in injectiespuit (inhoud 5 ml);
- afsluitdopjes;
- Koppelslangetje;
- Zakje met uniek monsternummer waarmee het monster op het lab geïdentificeerd wordt (niet afgebeeld op Afbeelding 2).

Daarnaast zijn de volgende zaken noodzakelijk:

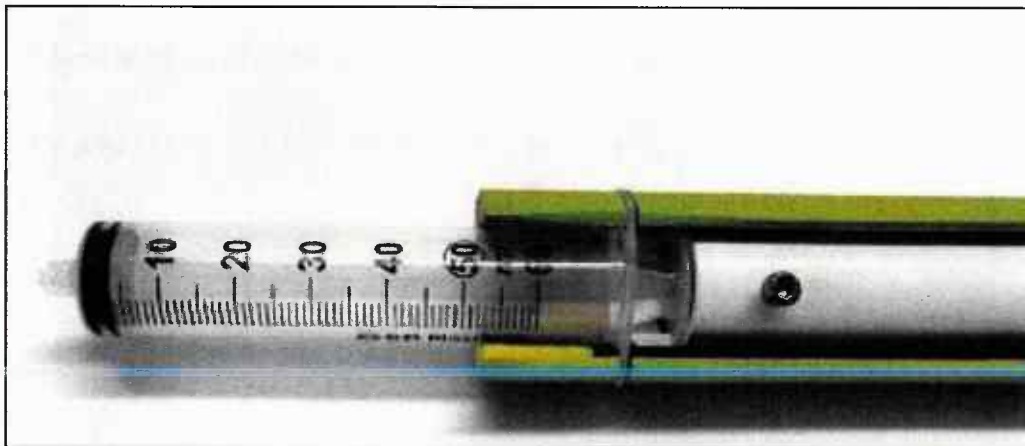
- Paar handschoenen in afgesloten zak.



Afbeelding 2. Inhoud bemonsteringskit; 60 ml steriele spuit voor bemonstering, steriel Sterivex filter, injectiespuit met conserveringsvloeistof, koppelslangetje en een afsluitdopje. (bron: Sylphium, 2018¹).

Monstername:

- Bepaal de monsterstrategie: het aantal deelmonsters is afhankelijk van de stroomsnelheid van het water, de heterogeniteit van de omgeving en de helderheid van het water.
 - o Helderheid water: Het filter slaat in water met weinig deeltjes minder snel dicht dan bij troebel water. Er kunnen daarom bij helder water meer deelmonsters worden genomen. Bij troebel water raakt het filter eerder verstopt, dit is te merken doordat de spuit weerstand ondervindt bij het filteren van het water, waardoor verdere filtering niet meer mogelijk is.
 - o Stroming water: Neem meer deelmonsters (bij voorkeur circa 3-10) bij sterk stromend water dan bij stilstaand water (1-5). Bemonster hierbij tot het filter dichtslaat of anders tot maximaal 5 deelmonsters in stilstaand of tot maximaal 10 deelmonsters in stromend water.
 - o Stromend water: Werk bij het nemen van deelmonsters in langzaam tot sterk stromend water bij voorkeur stroomopwaarts. Dit vergroot de trefkans.
 - o Heterogeniteit van de omgeving: Neem meer monsters bij sterk wisselende oevers dan bij monotone oeverkanten.
- Handschoenen aan;
- Gebruik een schone monsterhengel;
- Plaats de 60 ml injectiespuit in het mondstuk van de monsterhengel, zoals getoond in Afbeelding 3 en Afbeelding 4. Zorg ervoor dat het handvat van de zuiger in de gleuf van de binnenbuis schuift.



Afbeelding 3. Plaatsing van de 60 ml steriele injectiespuit voor bemonstering in de monsterhengel. (bron: Sylphium, 2018²).



Afbeelding 4. Plaatsing van de 60 ml steriele injectiespuit voor bemonstering in de monsterhengel. De monsterhengel raakt het water niet. (bron: Sylphium, 2018').

- Plaats de spuit in het water zonder dat de monsterhengel het water raakt (Afbeelding 4). Dit voorkomt DNA contaminatie tussen waterpartijen. Zuig het water op in de spuit door de binnenbuis aan het andere eind van de monsterhengel aan te trekken. Zie Afbeelding 1, Afbeelding 3 en Afbeelding 4). Bemonster zoveel mogelijk aan het wateroppervlak omdat deze zone minder op de analyse storende deeltjes bevat;
- Verwijder de volgezogen 60 ml spuit uit het mondstuk van de monsterhengel;
- Sluit het Sterivex filter op de spuit aan door deze erop te draaien. Let op: Deze kan worden doorgedraaid, waarna een lekkage kan optreden. Gebruik in dat geval een nieuwe bemonsteringskit en gooi deze weg;



Afbeelding 5. Bevestiging Sterivex filter aan 60 ml injectiespuit. (bron: Sylphium, 2018¹).

- Spuit het watermonster met handkracht over het Sterivex filter. Een minimum van 30 ml is voldoende om de doelsoort te kunnen aantonen, echter de trefkans wordt groter wanneer er meer water gefiltreerd wordt;

Let op: Zolang het Sterivex filter aan de spuit gekoppeld is, mag de zuiger van de spuit nooit terug worden getrokken. Hierdoor ontstaat er een vacuüm boven het filter, waardoor deze kan scheuren en is het filter niet meer bruikbaar. Gebruik in dat geval een nieuwe bemonsteringskit en gooi deze weg.

- Meer water filteren: Ontkoppel de 60 ml spuit van het Sterivex-filter, zuig de spuit opnieuw vol met water en spuit het watermonster met handkracht over het Sterivex filter (dit is optioneel, zolang het filter niet is dichtgeslagen kan er doorgefilterd worden);
- Ontkoppel het Sterivex filter van de spuit, verwijder het eventueel aanwezige water uit de 60 ml spuit spuit en zuig de spuit vol met lucht;
- Monteer het Sterivex filter weer op de spuit en druk het water met de in de spuit aanwezige lucht uit het Sterivex filter. Deze stap herhalen als er nog water achterblijft in het sterivex filter;

Let op: Ook in deze stap moet voorkomen worden dat de zuiger teruggetrokken wordt, zolang het Sterivex filter nog op de spuit zit, om scheuring van het filter te voorkomen.

- Verwijder de 60 ml spuit en doe deze in de afvalzak;
- Sluit de 5 ml spuit met de conserveringsvloeistof aan op (de andere, **dunnere kant**) van het Sterivex filter m.b.v. het koppelslangetje. Bewaar het dopje dat op de spuit met conserveringsvloeistof zat. Houd het Sterivex filter naar boven en spuit de conserveringsvloeistof in het Sterivex filter (zie Afbeelding 6);

Let op: voorkom dat de spuit met conserveringsvloeistof op de bredere kant van het Sterivex filter wordt aangesloten, de vloeistof loopt dan weer uit het filter. Gebruik in dat geval een nieuwe bemonsteringskit en gooi deze weg.



- Afbeelding 6. Toevoegen conserveringsvloeistof. De 5 ml injectiespuit met conserveringsvloeistof wordt met het koppelslangetje aan het Sterivex filter gekoppeld. Dit is aan de andere zijde van het filter waar de 60 ml injectiespuit verbonden is geweest (bron: Sylphium, 2018').
- Plaats het rode dopje dat op de kleine spuit zat op het Sterivex filter, wanneer het gehele Sterivex filter gevuld is (Afbeelding 7);

Let op: Draai het dopje niet te vast. Hierdoor kan het afbreken, waarna verdere analyse niet meer mogelijk is.



Afbeelding 7. Sluit met rubber schroefdop, ene zijde van het filter af (bron: Sylphium, 2018').

- Verwijder de kleine (5 ml) spuit met koppelslangetje (rood rubber) en plaats het doorzichtige punttopje op het vrijgekomen uiteinde van het Sterivex filter (zie Afbeelding 8). Plaats deze met het scherpe puntje in het gaatje van het Sterivex filter. Zorg ervoor dat deze goed vast zit door hard te duwen en hierbij het puntje licht te draaien. Controleer of deze goed vast zit;



- Afbeelding 8. Het aan beide zijden afgesloten filter, na bemonstering. (bron: Sylphium, 2018').
- Doe het Sterivex filter, de 5ml spuit en het koppelslangetje terug in het monsterzakje (zie Afbeelding 9). De 5 ml spuit en het slangetje zijn nodig bij de isolatie van het DNA uit het monster. Het monster is nu klaar voor transport naar het laboratorium;



- Afbeelding 9. Het afgesloten Sterviex filter en de 5 ml injectiespuit met koppelslangetje gaan in een afgesloten zak met codering. (bron: Sylphium, 2018!).
- Verzamel al het afval in de afvalzak en laat de locatie schoon achter;
- Noteer op veldkaarten waar de bemonstering heeft plaatsgevonden en het monsternummer, controleer de tabel met basisgegevens en vul zo nodig aan (bijlage 1).
- Reinig het uiteinde van de monsterhengel met dunne bleek.

10.2 Uitwerpselen

Verpakking:

De bemonsteringsset kan ongekoeld en bij kamertemperatuur bewaard worden en bestaat uit:

- Een afsluitbare plastic zak gevuld met;
- Een vloeistofdicht, DNA steriel monsterpotje (faecespotje met ingebouwd schepje in de deksel);
- dat voorzien is van een eenduidige identificatie;
- en gevuld is met 5 ml conserveringsvloeistof.



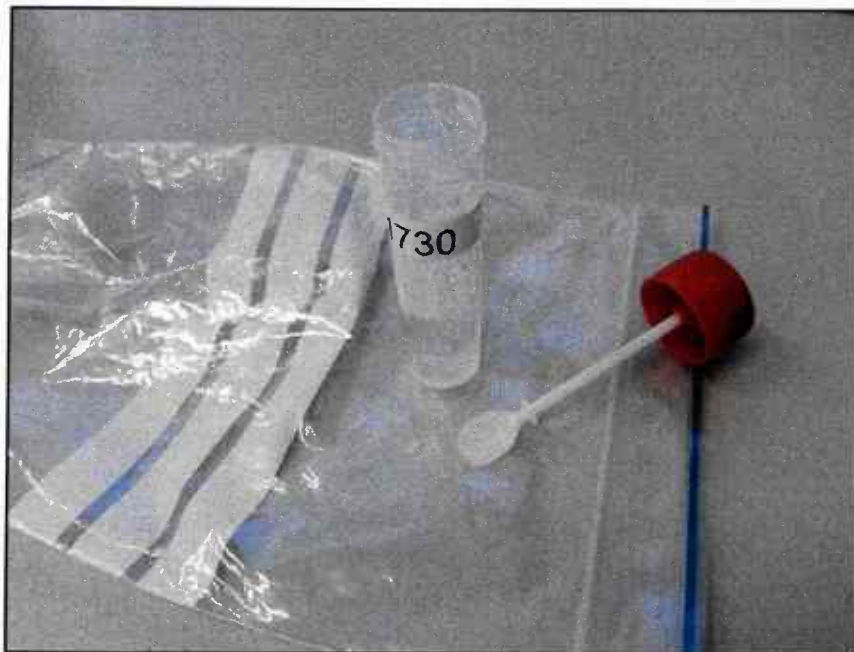
Afbeelding 10. Monsterpotje met identificatienummer in een afgesloten zak.

Daarnaast zijn de volgende zaken noodzakelijk:

- Een set rubberhandschoenen in afsluitbare plastic zak.

Monstername:

- Draag handschoenen;
- Houd het monsterpotje zoveel mogelijk gesloten. Vermijd aanraking van de handen of andere objecten met de binnenzijde van het buisje, de dop en de uitwerpselen en voorkom dat conserveringsvloeistof verloren gaat;
- Zoek (op handen en knieën) naar uitwerpselen/ latrines van de doelsoort binnen een traject van 50 meter;
- Werk hierbij voor jezelf uit en bemonster niet op plekken waar al is gelopen (dit om contaminatie van uitwerpselenmonsters te voorkomen);
- Steek om de 2-3 meter haaks in op de oever, in de vegetatie en herhaal bovenstaande stap;
- Bemonster per keutelhoopje 1-2 keutels en stop deze met het schepje (Afbeelding 11) in het buisje. Verzamel maximaal 20 keutels;



Afbeelding 11. Schepje in de deksel van het monsterpotje.

- Sluit na het toevoegen van een keutel tussentijds telkens het buisje af;
- Stop na 30 minuten;
- Doe het goed afgesloten buisje in de plastic zak;
- Handschoenen uit;
- Noteer op veldkaarten waar de bemonstering heeft plaatsgevonden en het monsternummer, controleer de tabel met basisgegevens en vul zo nodig aan (bijlage 1).

11 *Berekeningen*

n.v.t.

12 *Evaluatie en controles*

n.v.t.

13 *Rapportage en archivering*

13.1 *Rapportage*

Vastlegging van relevante gegevens met betrekking tot de omstandigheden rond het monsterpunt maken deel uit van de monstername.

13.2 *Archivering*

n.v.t.

14 *Literatuur*

- Sylphium, 2018¹. Monstername protocol t.b.v. eDNA analyses. Versie: 20180326. Sylphium molecular ecology.
- Sylphium, 2018². Environmental sampling kit - #SYL002. Version: 20181010. Sylphium molecular ecology.
- Herder, J.E., A. Valentini, E. Bellemain, T. Dejean, J.J.C.W. van Delft, P.F. Thomsen en P. Taberlet., 2014. *Environmental DNA - toepassingsmogelijkheden voor het opsporen van (invasieve) soorten*. Stichting RAVON, Nijmegen. Rapport 2013-104.

15 *Bijlages:*

Bijlage 1: Veldwaarnemingen eDNA

Bijlage 1: Veldwaarnemingen eDNA

Etiket (optioneel)	
-----------------------	--

Bemonstering door:	
--------------------	--

Ingenomen op het lab door:	
----------------------------	--

Monsternummer:	
----------------	--

Datum (dd-maand-jjjj):	
------------------------	--

Type bemonstering (kies uit: water/ uitwerpselen/ bodem):	
--	--

Doelsoorten (noteer de soorten, waarvoor bemonsterd is):	
--	--

Veldwaarnemingen		waarde	eenheid
X-coördinaat			Graad (Amersfoort RD nieuw)
Y- coördinaat			Graad (Amersfoort RD nieuw)

Bemonsteringstraject			m
----------------------	--	--	---

Aantal deelmonsters	# latrines		
	# grondhappen		
	# water*		

* Aantal deelmonsters dat gebruikt is voor het mengmonster.

Opmerkingen	(noteer hier omgevingsfactoren of andere zaken die van invloed zouden kunnen zijn op de trefkans of de analyse. Denk hierbij aan stroming van het water, weersomstandigheden, betreding, detritus in het water, maaierwerkzaamheden, etc.)
-------------	---

Bijlage 7: Bemonstering van Macrofauna in oppervlaktewater

Titel: V7030.Macrofauna Versie: 8

Geprint document uitgegeven door KAM

Titel:	V7030.Macrofauna
Versie:	8

Referentie:

Langbroek W., C. van der Sande & D Tempelman. 2019. V7030 - Bemonstering Macrofauna in oppervlaktewater. Versie 8. Stichting Waterproef.

Bemonstering van macrofauna in oppervlaktewater

1 **Onderwerp**

Dit voorschrift beschrijft de werkwijze voor het bemonsteren van macrofauna in oppervlaktewater met behulp van een macrofaunanet en een Van Veenhapper/Ekman-Birge-happer.

2 **Toepassingsgebied**

De beschreven bemonsteringsmethode is bedoeld voor de beoordeling van de ecologische kwaliteit volgens de KRW-maatlat. Dit voorschrift is van toepassing op oppervlaktewateren zoals sloten, vaarten, petgaten, wielen, vennen, meren en plassen, ten behoeve van de analyse van macrofauna in oppervlaktewater en waterbodem, zoals beschreven in voorschrift A7030.

3 **Definities**

Aquatische macrofauna: verzamelnaam voor alle aan water gebonden levensstadia van ongewervelde dieren groter dan circa 0,5 mm. Grotere watervlooien, mosselkreeftjes en ander zoöplankton worden niet tot de macrofauna gerekend. De afbakening bij afspraak geschiedt aan de hand van een vastgestelde lijst van taxonomische groepen (bijlage 1).

4 **Beginsel**

Het doel is om de soortensamenstelling zo goed mogelijk vast te stellen, door de aanwezige habitats, met de juiste inspanning zo efficiënt mogelijk te bemonsteren. De methode is gelijkwaardig aan het handboek hydrobiologie (Bijkerk R, 2014).

5 **Veiligheid en milieu**

De uitvoerder dient de gevaren te kennen die een specifiek terrein met zich mee brengt en moet nagaan of het verantwoord is het veldwerk alleen uit te voeren. In twijfelgevallen dient hierover te worden overlegd met collega's. De uitvoerder moet nagaan of is voldaan aan alle wettelijke veiligheidseisen voor het gebruik van rij- en vaartuigen.

Vraag tijdig vóór het uitvoeren van het veldwerk toestemming aan de eigenaren en gebruikers van de terreinen.

Vraag een ontheffing aan voor het verbod op verzamelen van waterorganismen in de Flora- en faunawet en neem de ontheffing mee tijdens het veldwerk.

6 **Omgevingscondities**

De analyse kan onder normale omstandigheden in het veld worden uitgevoerd.

7 Hulpmiddelen en apparatuur

7.1 Hulpmiddelen

- 7.1.1 Een plastic emmer met afsluitbare deksel met inhoud van 5 liter (één per bemonsteringslocatie)
- 7.1.2 Schepnet; opening 30 cm × 20 cm, maaswijdte 0,5 mm × 0,5 mm, diepte van het net ca. 45 cm. (standaard-macrofaunahandnet (zie de praktijknorm ISO 7828:1958 (CEN, 1994)))
- 7.1.3 Keukenzeef: fijnmazige zeef (maaswijdte kleiner dan 1 millimeter) voor het bemonsteren van verlandingszones en plas-draszones.
- 7.1.4 (Lies)laarzen en/of waadbroek

7.2 Apparatuur

- 7.2.1 Van Veenhapper/Ekman-Birge-happer
Indien het macrofaunahandnet niet toereikend is om de bodem te bemonsteren (diepte >1,5 meter), wordt er gebruik gemaakt van een Van Veenhapper (14,5 * 14 * 9 cm) /Ekman-Birge happer (20*15*15 cm).
- 7.2.2 GPS.
- 7.2.3 iPad.



Figuur 1 Van Veenhapper

8 Reagentia, standaarden en controlemonster

n.v.t.

9 Analysemonster

n.v.t.

10 Meting

10.1 Monstername uitgangspunt

Over een oevertraject van 100 m worden van de verschillende habitats (Tabel 1a) deelmonsters genomen van oever en bodem. Standaard wordt minimaal 5 meter bemonsterd, waarvan minimaal 1 meter in de bodem en 1 meter verdeeld over de waterkolom en het wateroppervlak. De resterende monsterlengte wordt verdeeld over de andere compartimenten (zie tabel 1).

De minimale bemonsteringsinspanning blijft hierbij 5 meter en bij zeer diverse wateren wordt deze uitgebreid tot maximaal 10 meter. In wateren met een steil oeververloop, waar de diepte ter plaatse groter is dan het dieptebereik van het handnet, wordt aanvullend

bemonsterd met een Van Veenhapper/Ekman-Birge happer. Hierbij worden minimaal 5 volle bodemhappen genomen, tot een maximum van 10 happen indien er bij de eerste 5 bodemhappen geen of beperkt bodemmateriaal naar boven is gekomen.

Tabel 1a (bewerkt uit Bijkerk, 2014)

Compartiment	Habitat	Bemonsteringstechniek
Water	Wateroppervlak	Visuele bemonstering vooraf
	Waterkolom	Nettechniek waterkolom
Bodem	Zachte bodem	Nettechniek bodem
	Zandbodem	Nettechniek bodem
	Bodem-Diep water	Van Veenhapper/Eckman-Birge happer.
	Stenen en hout	Verzamelen
Vegetatie	Ondergedoken	Nettechniek vegetatie
	Drijvend	Nettechniek vegetatie, verzamelen
	Oeverplanten	Nettechniek vegetatie
	Verlandingsvegetatie, drijfijl	Traptechniek verlanding
Oever	Beschoeide oever	Nettechniek beschoeide oever
	Plas-dras oever	Traptechniek plas-dras

Tabel 1b habitattypen

Code	Omschrijving	Eenheid
WO	Water-Oppervlak	meter
WK	Water-Kolom	meter
BB	Bodem-Bagger	meter
BZ	Bodem-Zand	meter
BH	Bodem-Hard substraat	meter/cm ²
BD	Bodem-Diep water	liter
VS	Vegetatie-Submers	meter
VD	Vegetatie-Drijvend	meter
VO	Vegetatie-Oeverplanten	meter
VV	Vegetatie-Verlanding	meter
OB	Oever-Beschoeid	meter
OD	Oever-Dras	meter

Monsternametechniek

In tabel 2 staan de gebruikte technieken zoals die per habitat wordt uitgevoerd.

Tabel 2 (bewerkt uit Bijkerk, 2014)

Bemonsteringstechniek	Werkwijze
Visuele bemonstering vooraf	Zoek naar fauna op het wateroppervlak en vang deze met een snelle beweging met het net.
Nettechniek waterkolom	Beweeg het handnet snel door de waterkolom van onder naar boven.
Nettechniek bodem	Bemonster de bodem oppervlakkig met handnet. Beweeg het net met korte oppervlakkige stootjes door de bovenste paar cm van de waterbodem. Zorg dat er niet teveel bodemmateriaal in het net belandt

Nettechniek vegetatie	Beweeg het handnet schoksgewijs door de vegetatie van binnen naar buiten en van onder naar boven. Ga daarbij heen en terug door hetzelfde stuk.
Nettechniek beschoeide oever	Schraap het handnet stevig van onder naar boven langs de beschoeiing.
Verzamelen	Verzamel wat materiaal (planten, stenen, hout in het verzamelmonster.
Traptechniek verlanding	Trap de vegetatie onder water zodat er een poeltje ontstaat. Schep dit poeltje leeg met het macrofaunanet of een keukenzeef. Standaard wordt 1 poeltje genoteerd als 0,3 meter treklengte.
Traptechniek plas dras	Trap de vegetatie op de grens van water-land onder water. Beweeg het net of keukenzeef er schoksgewijs doorheen, voorwaarts, zijwaarts en omhoog. Haal het net herhaaldelijk door het opgewervelde materiaal, met name door de eventueel ontstane drijfslagen van grove detritus.
Van Veenhapper	Zet de bodemhapper open en laat deze naar de bodem zakken. Haal de happer met een snelle ruk naar boven en controleer of de happer vol zit. Herhaal dit vijf keer. Wanneer er met deze vijf happen geen of niet voldoende bodemmateriaal naar boven is gekomen, wordt het aantal bodemhappen uitgebreid tot maximaal 10. Noteer tenslotte het verzamelde bodemmateriaal in liters
Eckman-Birge happer	Zet de bodemhapper open en laat deze naar de bodem zakken. Laat vervolgens het schietlood via het koord dat aan de happer vastzit naar beneden zakken, totdat er een "tik" te horen is. Haal de happer naar boven en leeg de inhoud in een emmer met inhoudsmaten. Herhaal dit vijf keer. Wanneer er met deze vijf happen geen of niet voldoende bodemmateriaal naar boven is gekomen, wordt het aantal bodemhappen uitgebreid tot maximaal 10.

10.2 Uitvoering algemeen

- Meet de Amersfoortcoördinaten op het middelpunt van het oevertraject. Wanneer coördinaten reeds bekend zijn, worden ter controle de coördinaten ter plaatse van dit punt opnieuw ingemeten en genoteerd.
- Maak een foto van het oevertraject met behulp van de Ipad.
- Onderscheid de voor macrofauna relevante habitats binnen het gekozen meetvlak (oevertraject van 100 meter). Ga voor het onderscheid van deze habitats uit van de hoofdindeling in tabel 1b.
- Bedenk van te voren welke bemonsteringstechnieken men kan toepassen (zie tabel 1 & 2).
- Er wordt gestreefd om een vergelijkbare inspanning te doen en een gelijke verdeling over de verschillende deelhabitats te bemonsteren, indien de locatie eerder is bemonsterd.

- Begin de bemonstering met het vangen van op het wateroppervlak aanwezige dieren, zoals schaatsenrijders en schrijvertjes en leeg deze in de plastic emmer. Blijf ook tijdens de verdere bemonstering alert op de aanwezigheid van deze organismen en snelzwemmende dieren en probeer deze ook te verzamelen.
- Bemonster hierna de waterkolom (minimaal 1 meter).
- Bemonster vervolgens de bodem (minimaal 1 meter) en leeg de inhoud daarna in de emmer.
- Bemonster hierna de overige habitats (zie tabel 1a) en doe de inhoud in de emmer
- Voorzie de emmer van de locatiecode.
- Determineer en tel makkelijk te determineren grote macrofauna-organismen (zoals sommige kevers, zoetwaterkreeften) in het veld en zet de dieren terug in het water. Noteer de soorten en hun aantallen.
- Spoel het net goed uit met het ter plaatse aanwezige oppervlaktewater alvorens een volgende locatie te bemonsteren. Spoel het net bij deze volgende locatie nogmaals uit met het daar ter plaatse aanwezige oppervlaktewater.
- Gebruik koelelementen om de monsters te koelen (bij weer boven de 15 graden).
- Zet bij aankomst in het laboratorium alle emmers in een koele ruimte (2 – 10 °C) weg, behalve die welke direct worden uitgezocht. Zoek de emmers binnen 48 uur uit.

10.3 Diepwatermethode

In diepe plassen kan een aanvullende diepwaterbemonstering wenselijk zijn. Een dergelijk monster bestaat uitsluitend uit bodemsediment uit diepere delen. Hierbij wordt een vast punt genomen als middelpunt. De coördinaten van dit middelpunt worden ingemeten. In een straal van 50 meter rond het middelpunt worden 5 bodemhappen genomen. In zachte bodems kan het beste gebruik gemaakt worden van een Van Veenhapper, in hardere bodems is een Ekman-Birge happer meer geschikt. De 5 bodemhappen worden vervolgens tot één mengmonster teruggebracht. Het bemonsterde volume is gelijk aan 5 volle bodemhappen. Eventueel kunnen dus meerdere niet volle happen worden gebruikt bij bodems waar het lastig is om genoeg materiaal te verzamelen (hierbij wordt vooral gedacht aan harde zandbodems), totdat het volume van 5 volle bodemhappen is bereikt. Om de bemonsteringsinspanning redelijk te houden wordt hier echter een bovengrens gesteld van 10 niet volle happen. Wanneer er eventueel vegetatie in de happer mee naar bovenkomt, dan wordt dit beschouwd als onderdeel van het monster.

11 Berekeningen

n.v.t.

12 Evaluatie en controles

Om afwijkingen te constateren dient de projectleider gedurende het veldseizoen via een Excel-uitdraai te controleren of:

- de juiste locatie is bemonsterd (bij afwijkingen van > 50m in de coördinaten van het opgegeven punt dient er een opmerking in het opmerkingenveld te staan waarom niet op het opgegeven punt is bemonsterd).
- gegevens volledig zijn ingevuld.
- geen onwaarschijnlijke getallen zijn ingevuld.
- de juiste monsterdatum is ingevuld.

Door dit regelmatig te controleren is het nog mogelijk om binnen de monsterperiode afwijkingen te constateren en die binnen deze monsterperiode op te lossen. Per project is er een map met daarin de controlebestanden. De bovenstaande gegevens zijn terug te vinden in de controlebestanden.

Voorbeeld; voor HHNK 2017 zijn de controlebestanden te vinden op de volgende locatie;

F:\CBV\Team biologie\Team 1 -

Macrofauna\Meetnetten\Noorderkwartier\2017\2017\controle

13 *Rapportage en archivering*

13.1 Rapportage

De volgende gegevens worden in het veld opgenomen:

- Monstercode & monsternaam
- Bemonsteringsdatum
- Gemeten Amersfoortcoördinaten
- Waarnemer
- Trajectlengte (in meters)
- Bemonsteringsaandeel habitattypen (in meters), zodat de bemonstering reproduceerbaar is.
- Bij dieptebemonstering de monsterdiepten en het volume bodemmateriaal dat verzameld is, uitgedrukt in liters. Wanneer er vegetatie in de bodemhap naar boven wordt gehaald dan wordt dit ook beschouwd als deel van dit bodemvolume. In de opmerkingen wordt wel genoteerd dat er ook plantenmateriaal mee naar boven is gekomen.
- Bijzonderheden worden vermeld onder de opmerkingen

Tabel 3 overzicht gebruikte testen in lims

Testcodering Waterproef	Omschrijving	Eenheid
xcoor0xv	X coördinaat	meter
ycoor0xv	Y coördinaat	meter
bemtraj0xv	Bemonsteringstraject	meter
bemdiepte0xv	Bemonsteringsdiepte	centimeter
treklen0xv	Treklengte (totaal)	meter
trltebsbg0z	Treklengte door bodem bagger	meter
bemopbshs0z	bodem hardsubstraat	vierkante centimeter (Waternet)
trltebshs0z	bodem hardsubstraat	meter (HHNK)
trltebszd0z	Treklengte door bodem zand	meter
trlteovbs0z	Treklengte door oever-beschoeid	meter
trlteovdr0z	Treklengte door oever-dras	meter
trltevedr0z	Treklengte door vegetatie-drijvend	meter
trlteveop0z	Treklengte door vegetatie- oeverplanten	meter
trltevesm0z	Treklengte door vegetatie-submers	meter
trltevevl0z	Treklengte door vegetatie- verlanding	meter
trlteowkm0z	Treklengte door water-kolom	meter
trlteowov0z	Treklengte door water-oppervlak	meter
bemvlbsdp0z	Bemonsterd volume bodem diep	liter
bmafasb0d	Macrofauna standaard taxontest	aantal

14

Literatuur

- Bijkerk R. (red) (2014) Handboek Hydrobiologie. Biologisch onderzoek voor de ecologische beoordeling van Nederlandse zoete en brakke oppervlaktewateren. Rapport 2014 - 2, Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer

1: Taxa die tot de macrofauna worden gerekend.

Bijlage 1: Taxa die tot de macrofauna worden gerekend

De afgrenzing van macrofauna is enerzijds bepaald door de overwegende grootte van de vertegenwoordigers per taxonomische hoofdgroep (gewoonlijk groter dan 0,5 mm).

De aquatische stadia van de volgende groepen ongewervelde dieren behoren tot de macrofauna:

Porifera (sponzen), Coelenterata (holtedieren), Bryozoa (mosdierpjes), Plathelminthes (platwormen), Nemertea (snoer-), Nematomorpha (paardehaarwormen), Annelida (gelede wormen waaronder borstelwormen en bloedzuigers), Mollusca (weekdieren waaronder slakken en tweekleppigen), Arachnida (geleedpotigen waaronder spinnen en mijten), Insecta (insecten) en Crustacea (kreeftachtigen) (exclusief Cladocera, Ostracoda en Copepoda).

Bijlage 8: Het bepalen van de soortensamenstelling van de macrofauna; uitzoekmethode (levend materiaal) en microscopie

Titel: A7030.Macrofauna Versie: 12

Geprint document uitgegeven door KAM

Titel:	A7030.Macrofauna
Versie:	12

Referentie:

Langbroek W., C. van der Sande & D Tempelman. 2020. A7030 - Het bepalen van de soortensamenstelling van macrofauna; uitzoekmethode (levend materiaal) en microscopie. Versie 12. Stichting Waterproef

Het bepalen van de soortensamenstelling van de macrofauna; uitzoekmethode (levend materiaal) en microscopie

1 Onderwerp

Dit voorschrift beschrijft de methode voor een semi-kwantitatieve bepaling (uitzoeken en analyse) van macrofaunamonsters uit zoete en brakke, stilstaande en stromende wateren, het verwerken en rapportage van de verzamelde gegevens, teneinde de soortensamenstelling zo compleet en representatief mogelijk vast te stellen, door de aanwezige habitats, met de juiste inspanning zo efficiënt mogelijk te bemonsteren (voorschrift V7030). De methode is conform de methode zoals beschreven in het handboek hydrobiologie (Bijkerk R, 2014), hoofdstuk 12 en betreft het uitzoeken van levend materiaal en determinatie van de aangetroffen macrofauna-organismen. Het betreft levend materiaal omdat deze methode van uitzoeken aansluit op de 'multi-habitatmethode' bij de monsterneming (voorschrift V7030).

Dit voorschrift betreft twee aspecten:

- I) De voorbehandeling en het macroscopisch uitzoeken van levende macrofaunamonsters
- II) Determinatie van macrofaunamonsters en verwerking van bij de determinatie verkregen gegevens

2 Toepassingsgebied

Dit voorschrift is van toepassing op macrofauna-onderzoek van oppervlaktewater, waterbodem en substraat in zoete en brakke, stilstaande en stromende wateren, welke zijn bemonsterd volgens het interne voorschrift V7030.

3 Definities

- Macrofauna: verzamelnaam voor met het blote oog zichtbare, aan watergebonden levensstadia van ongewervelde dieren (> 0,5mm): 'macroscopische dieren'. De grotere watervlooien, mosselkreeftjes en ander zoöplankton worden niet tot de macrofauna gerekend. De afbakening bij afspraak geschiedt aan de hand van een vastgestelde lijst van taxonomische groepen (bijlage 1).
- Multi-habitatbemonstering: De verschillende biotopen die in een meer, plas of lijnvormige water aanwezig zijn. Bij de bemonstering wordt uit elk biotoop een deelmonster genomen.
- Invertebraten, macrobenthos, macrozoöbenthos: alternatieve termen voor macrofauna.
- Determinatie: het bepalen van de soortnaam van een organisme met behulp van daarvoor geschikte determinatieliteratuur en opgedane expertise.
- Taxonomisch niveau: bijv. soort, genus, familie. Genus is een hoger niveau dan soort; familie is een hoger niveau dan genus.
- Abundantie: De abundantie is een maat voor de hoeveelheid van het voorkomen van afzonderlijke taxa.
- Decanteren: methode die gebruik maakt van het verschil in bezinksnelheid; als er in het monster veel zand aanwezig is kan dit verwijderd worden door te decanteren waarbij het zand grondig gespoeld wordt.

- Spoelen: het grondig wassen en spoelen van grof plantenmateriaal teneinde de macrofauna hieruit te verwijderen.
- Levend uitzoeken: een macrofaunamonster wordt niet geconserveerd; de in het monster aanwezige organismen worden met een witte uitzoekbak, zonder verdere optische middelen, levend uitgezocht.

4 Beginsel

Het onderzoek betreft een macrofaunamonster, geconserveerd volgens NEN-EN-ISO 5667-3 (2012). Hierin wordt de macrofauna in diergroepen gesorteerd en geconserveerd opgeslagen. Vervolgens wordt met behulp van binoculair, microscoop en determinatieliteratuur de soortensamenstelling van deze groepen en de abundantie van elk onderscheiden taxon in het monster bepaald.

5 Veiligheid en milieu

De uitvoerder dient op de hoogte te zijn van de veiligheidsvoorschriften die gelden voor de te gebruiken chemicaliën. Raadpleeg hiervoor, indien nodig, het veiligheidshandboek (<F:\Algemeen\KAM-documenten\Algemeen\ARBO\Veiligheidshandboek.03.docx>) en/of de chemiekaarten. I:/chemiekaarten.

Voor het uitzoeken en determineren van macrofauna gelden de volgende instructies:

- In de determinatieruimten: werk met de aanwezige puntafzuiging om inademing van verdampende ethanol tot een minimum te beperken.
- Bewaar grote verzamelingen uitzoekflesjes met ethanol in een afgesloten ruimte, bijv. een ladenkast. Dit om de aanwezigheid van eventuele verdampende ethanol tot een minimum te beperken.
- Werkvoorraden van chemicalia worden in een daartoe geschikte, geëtiketteerde of anderszins gemarkeerde fles bewaard. De flessen worden tijdens het uitzoeken en/of determineren van macrofauna in een lekbak geplaatst.
- Werkvoorraden van ethanol worden aan het eind van een werkdag in de zuurkast geplaatst. Werkvoorraden mogen alleen in daartoe geëigende spuitflessen worden bewaard.
- Gebruikte ethanol dient te worden verzameld en als chemisch afval te worden afgevoerd. Gebruikte ethanol dient in geëtiketterde flessen te worden verzameld (opschrift: "afval ethanol").
- Koenike-vloeistof dient te worden verzameld en als chemisch afval te worden afgevoerd.
- Gooi na het uitzoeken van iedere bak de restanten door een zeef, de inhoud van de zeven gaan in de groene bak. Het water mag afgevoerd worden via de gootsteen.
- De genoemd chemicalia (ethanol, Koenike etc) zijn schadelijk bij inademing en/of bij huidcontact. Het voorbereiden van verbruikschemicalia en/of het bijvullen van werkvoorraden gebruikschemicalia wordt daarom verplicht in een zuurkast uitgevoerd.

6 Omgevingscondities

Uitzoeken en determineren wordt uitgevoerd onder kamertemperatuur.

Wanneer gekoelde, levend verzamelde macrofaunamonsters tijdens het uitzoeken langzaam op temperatuur komen, kan een toename in activiteit waargenomen worden. Houd hiermee rekening door zeer koele monsters eerst even op kamertemperatuur te laten komen.

7 Hulpmiddelen en apparatuur

7.1 Hulpmiddelen

- Douchekop
- Monsteremmers met deksel (5l)
- Glazen potjes met plastic deksel
- Uitzoekbakken (witte kunststof foto-ontwikkeldbakken)
- Pincet met harde en slappe punt
- Prepareernaald
- Plastic pipetten (met brede opening)
- Petrischalen van glas (geen eisen aan de diameter)
- Dampdichte glazen potjes van 15 ml met deksels
- Objectglaasjes (76x26 mm) en dekglasjes (meerdere maten)
- Voorbedrukte etiketten (papier) bestendig tegen ethanol (beschreven met 'oostindische' inkt)
- Etikettenstickers om preparaten te etiketteren
- Potjesblok waarin de potjes voor het verzamelen van diergroepen ingezet worden, gelabeld met de diergroepen die verzameld worden

7.2 Apparatuur

- Zeven met een maaswijdte van 4,75 mm, 1,18 mm en 0,50 mm.
- Lichtbakken 42 x 63 x 6 cm.

WP 0950	Zeef	Verder Scientific	Retsch	200x50 mm 500 µm	R60.131.000500
WP 0951	Zeef	Verder Scientific	Retsch	305x40 mm 4,75 mm	R60.158.004750
WP 0952	Zeef	Verder Scientific	Retsch	305x40 mm 4,75 mm	R60.158.004750
WP 0953	Zeef	Verder Scientific	Retsch	305x40 mm 4,75 mm	R60.158.004750
WP 0954	Zeef	Verder Scientific	Retsch	305x40 mm 1,18 mm	R60.158.001180
WP 0955	Zeef	Verder Scientific	Retsch	305x40 mm 1,18 mm	R60.158.001180
WP 0956	Zeef	Verder Scientific	Retsch	305x40 mm 1,18 mm	R60.158.001180
WP 0957	Zeef	Verder Scientific	Retsch	305x40 mm 500 µm	R60.158.000500
WP 0958	Zeef	Verder Scientific	Retsch	305x40 mm 500 µm	R60.158.000500
WP 0959	Zeef	Verder Scientific	Retsch	305x40 mm 500 µm	R60.158.000500
WP 0960	Lichtbak	WVSColor	Smart Light 5000	42 x 63 x 6 cm	3814
WP 0961	Lichtbak	WVSColor	Smart Light 5000	42 x 63 x 6 cm	3814
WP 0962	Lichtbak	WVSColor	Smart Light 5000	42 x 63 x 6 cm	3814

- Binoculair; Leica binoculair met vergrotingsmogelijkheid 7.2 tot 120x, met een oculair van 10x en regelbare lichtbron. Boven- (koud licht in de vorm van twee armen) en onderverlichting (WP0542, WP0543, WP0546)
- Microscoop (vergroting van 100-1000 x) met fasecontrast (WP554)
- Digitale videocamera met beeld analysepakket (Leica Application Suite software DFC420 + LAS)

Het onderhoud van de zeven wordt jaarlijks uitgevoerd door het daartoe gecertificeerde bedrijf Infralab in Kapellen (B.). De daarbij verkregen certificaten worden gearhiveerd op in de map Apparatuur van de afdeling biologie.

Het onderhoud van de microscopen wordt gedaan door een extern, gespecialiseerd bedrijf. Daartoe wordt de microscoop en camera gecontroleerd met een gecertificeerd object-micrometer (certificaatnr. 10506336.1000.1). In het logboek van de afdeling

biologie wordt genoteerd wanneer een apparaat (bijv. microscoop) is gecontroleerd (FM7000, tabblad "Apparatuur").

8 Reagentia, standaarden en controlemonster

NB Standaarden en controlemonster zijn in dit voorschrift niet van toepassing.

Volg bij het gebruik van reagentia de in paragraaf 5 vermelde richtlijnen met betrekking tot veiligheid en milieu.

- Ethanol (C_2H_6O), 96 % v/v (gedenatureerd met 5 % v/v methanol)
- Ethanol (C_2H_6O), 70 % v/v. Uit 96 % v/v wordt een 70 % v/v oplossing gemaakt door 800 ml te verdunnen met 200 ml demiwater
- Koenike-vloeistof: gebruikt voor het conserveren van watermijten. Ook "Koenike" of "Koenikes Gemisch" genoemd.

Recept voor het maken van Koenike:

Meng 2 delen azijnzuur (CH_3COOH 96% v/v), 5 delen glycerine ($C_3H_8O_3$ 87 % v/v) en 3 delen leidingwater.

Voor 1 liter Koenike zijn nodig: 200 ml azijnzuur, 500 ml glycerine en 300 ml leidingwater.

LET OP: azijnzuur en daarmee Koenike-vloeistof is een irriterende oplossing, bij aanraking met de huid direct spoelen met veel water.

- Levulosesiroop: gebruikt voor het ophelderen van wormen. Ook "levulose" genoemd.

Recept voor het maken van levulosesiroop:

Meng 1 deel water met 1 deel fructose ($C_6H_{12}O_6$). Verwarm het mengsel "au bain Marie" bij $\pm 50^\circ C$ gedurende 24 uur; roer onderwijl (schudmachine). Meng deze oplossing vervolgens met 1 deel melkzuur ($C_6H_{12}O_6$); roer. De levulosesiroop is nu klaar.

Voor ongeveer 0,8 liter levulosesiroop zijn nodig: 250 ml water, 250 gram fructose en 400 ml melkzuur. Eerst is de oplossing helder; later wordt ze gelig. De oplossing kan bij kamertemperatuur worden bewaard en is minstens 2 jaar houdbaar (Van Haaren & Soors 2013).

LET OP: levulosesiroop bevat melkzuur, wat een irriterende vloeistof is.

- Melkzuur ($C_3H_6O_3$): gebruikt voor het ophelderen van chironomiden en veel andere organismen (geen wormen!).

NB 1 Bij op het laboratorium bereide oplossingen: vermeld op het etiket de aanmaakdatum en de naam van de oplossing.

NB 2 Voor alle gebruikte chemicaliën geldt een houdbaarheid in een afgesloten (dampdichte) fles van maximaal 3 jaar.

9 Analysemonster

N.v.t.

10 Uitzoeken en determineren van macrofaunamonsters

10.1 Monsterregistratie

Aan het begin van het monsterseizoen wordt via een planningsdocument per monsterpunt een uniek Biolimsnummer (LIMS) aangemaakt.

10.2 Voorbehandeling en uitzoeken van macrofaunamonsters

Monsters worden onder laboratoriumomstandigheden voorbehandeld en uitgezocht.

Levende monsters worden z.s.m. en bij voorkeur binnen 24 uur in behandeling genomen.

In het uiterste geval moeten levende monsters binnen 48 uur verwerkt worden. Zowel datum van bemonstering en datum van uitzoeken wordt genoteerd. Gedurende de periode tussen bemonstering en uitzoeken dienen de monsters in de koelcel (temperatuur $\pm 6^{\circ}\text{C}$) te worden bewaard.

- Alvorens het monster wordt uitgezocht, wordt het voorbehandeld. Hierbij wordt gebruik gemaakt van spoelen en zeven.
- Voor de beschrijving van decanteren en splitsen wordt verwezen naar paragraaf 10.2.4 van dit voorschrift.
- De monsters worden volledig uitgezocht; alle organismen worden verzameld, gedetermineerd en geteld; grote individuen (bijvoorbeeld mossels) worden bij het uitzoeken meteen gedetermineerd en op de werkstaat macrofauna FM7030.A 01.xlsx genoteerd, behalve bij grote monsters en/of grote aantallen individuen; in zulke gevallen worden deelmonsters onderzocht (zie paragraaf 10.2.4 voor fractioneren). Zie Bijlage 2 voor het minimaal te verzamelen aantal organismen per soortgroep).

10.2.1 Voorbehandeling: het spoelen

- Breng het monster of de fractie met veel plantenmateriaal in een emmer van 10 liter of in een witte uitzoekbak.
- Als het monster of de fractie te veel materiaal omvat om in één keer te spoelen, spoel het dan in delen.
- Vul de emmer tot maximaal 25 % (totaal 2,5 l) met monstermateriaal.
- Vul de emmer tot 75 % (totaal 7,5 l) aan met leidingwater.
- Schud en spoel de planten met de hand door het water ("wassen").
- Als er veel dieren losspoelen giet de inhoud van de emmer dan af en toe uit over een zeef met een maaswijdte van maximaal 0,5 mm. Houd de planten in de emmer tegen.
- Verwijder de gespoelde planten uit de emmer en leg ze in een witte uitzoekbak.
- Giet het in de emmer achtergebleven materiaal ook over de 0,5 mm zeef.
- Spoel de zeef uit en breng de fractie over in een uitzoekbak.
- Controleer waterplanten zorgvuldig op achtergebleven organismen, zoals bijvoorbeeld bloedzuigers en (nap)slakjes. Met name drijfbladeren van Gele plomp kunnen veel vastklevende dieren bevatten.

10.2.2 Voorbehandeling: het zeven

- Kijk de zeven na. Ze moeten schoon en onbeschadigd zijn. Zo niet, vervang de zeef dan voor een schone, complete zeef.
- Maak een zeeftoren waarvan de maaswijdte afneemt van de bovenste naar de onderste zeef (boven 4,75 mm, midden 1,88 mm en onder 0,5 mm). Gebruik de tussenringen om meer ruimte te scheppen voor het zeven. Zorg dat de zeven volmaakt op elkaar passen.
- Breng het monster geheel of gedeeltelijk (afhankelijk van de grootte van het monster) op de bovenste zeef en spoel het voorzichtig onder een niet te harde waterstraal met de douchekop uit. Bij veel materiaal wordt dit eerst uitgespoeld in witte uitzoekbakken; vervolgens gaat het materiaal door de zeef.
- Als het gehele monster direct wordt gezeefd spoel dan de emmer en deksel goed uit (zorg ook dat alle bloedzuigers meekomen: deze kunnen zich krachtig vasthechten!).

- NB Let op dat de onderste zeven niet dichtslippen, leeg de zeven voor dit gebeurt. Verzamel eventuele snelle dieren en dieren die weg kunnen vliegen/kruipen eerst uit de zeef direct na voorbehandeling.
- NB Laat een monster niet onbeheerd open staan en sluit emmers (als slechts een gedeelte wordt gezeefd per keer), monsterpotjes (bij analyse) en uitzoekbakken tussentijds af.

10.2.3 Het uitzoeken

Bij Waterproef worden monsters levend uitgezocht en wordt geen microscopie toegepast bij het uitzoeken.

- Gebruik per monster vier glazen potjes van 35 ml.
- Vul drie van de potjes voor minimaal de helft met 70% ethanol en één met ongeveer 10 ml Koenike-vloeistof.
- Plaats de potjes in de gelabelde gaten van het potjesblok om omstoten te voorkomen.
- Voeg een voorbedrukt etiket (Bijlage 5) toe aan ieder potje met daarop de klantcode en het unieke Biolimsnummer, datum van monsterneming en de initialen van de monsternemer.
- Print de macrofaunawerkstaat met daarop het juiste Biolimsnummer en klantcode. Noteer hierop datum van uitzoeken, paraaf van uitzoeker (alleen *eigen* parafen zetten!) en de gegevens van eventueel toegepaste fracties.
- Platwormen en soorten die te groot zijn om te conserveren, zoals zwanenmossels en Posthoornslak worden direct gedetermineerd en op de macrofaunawerkstaat genoteerd (werkstaat macrofauna FM7030.A 01.xlsx).
- Breng de verschillende fracties van het voorbehandelde monster over in aparte uitzoekbakken en voeg een dun laagje water toe.
- Spreid het uit te zoeken materiaal dun uit, zodat de bodem van de uitzoekbak voor meer dan de helft zichtbaar is.
- Verzamel alle macrofauna uit de uitzoekbakken. Gebruik hierbij een pincet (zowel pincetten met spitse- en slappe punt zijn geschikt) en/of een pipet: met een pipet kunnen watermijten makkelijk worden "opgezogen".
- Conserveer de verzamelde organismen zoals vermeld in paragraaf 10.2.5. Verzamel in ieder geval de minimale aantallen zoals vermeld in bijlage 2. Bij te grote monsters zie paragraaf over fractioneren (paragraaf 10.2.4)

10.2.4 Het splitsen van macrofaunamonsters

Bij grote monsters kan het wenselijk zijn monsters op te splitsen in deelmonsters. Volg daarbij de volgende stappen. Deze methode volgt het Handboek Hydrobiologie 12: Macrofauna: Werkvoorschrift B - 6 III Versie februari 2014.

Aanwijzing vooraf:

Werk per fractie! Als je een kwart van een monster uitzoekt moet van alle drie zeven een kwart worden uitgezocht. Het is niet toegestaan om bijv. uit de fijne fractie een kwart uit te zoeken, en uit de andere fracties een ander deel dan een kwart.

1. Meng het monster zo goed mogelijk met zo min mogelijk schade aan organismen. Verdeel het materiaal gelijkmatig over de zeef van de betreffende fractie waar je mee bezig gaat (grof, middelgrof, fijn).
2. Neem een eerste deelmonster uit de zeef en breng dit over in een aparte, schone uitzoekbak. Laat de rest op de zeef liggen.
3. Noteer de deelmonstergrootte (bijvoorbeeld 1/4).

4. Zoek dit eerste deelmonster volledig uit en sorteer alle organismen in de gebruikelijke diergroepen (paragraaf Bijlage 2).
5. Tel het aantal individuen per diergroep. Indien er voldoende individuen van een soortgroep zijn aangetroffen en verzameld, wordt deze diergroep niet verder onderzocht (zie lijst zoekcriteria Bijlage 2). Noteer de deelmonster grootte van de diergroep(en) waarvan inmiddels voldoende individuen zijn aangetroffen op de werkstaat macrofauna (FM7030.A 01.xlsx).
6. Ga door met volgend(e) deelmonster(s) tot dat men voor elk van de diergroepen minstens het vereiste aantal individuen heeft verzameld. Let op: elk deelmonster dat men in behandeling neemt voor nog onvoldoende verzamelde diergroepen, moet men volledig uitzoeken voor die groepen. Voor diergroepen die beneden het zoekcriterium blijven zoekt men alle deelmonsters compleet uit: voor deze diergroepen wordt dus het hele monster uitgezocht.
7. Noteer de deelmonster grootte voor elke overige hoofdgroep waarbij deelmonsters zijn onderzocht.

10.2.5 Conservering van de uitgezochte organismen

Algemene richtlijnen:

- De hoeveelheid conserveringsmiddel in de flesjes waar organismen in worden opgeborgen dient ruimschoots meer dan het volume van de geconserveerde organismen samen te zijn. De zoekflesjes worden tot de "hals" gevuld. Wanneer er erg veel en/of veel grote organismen worden geconserveerd: potjes niet "aanstampen", maar een tweede flesje gebruiken of een grotere nemen.
- Sluit de potjes goed en kantel na toevoeging van de conserveringsvloeistof de pot voorzichtig, zodat het hele monster goed wordt doordrenkt met conserveringsmiddel.
- Na afloop van het uitzoeken wordt de ethanol waarin de organismen zijn geconserveerd vervangen door verse 70% ethanol.

Specifieke richtlijnen per diergroep:

- Platwormen worden in water gebracht en direct levend gedetermineerd. Ze worden na determinatie niet bewaard.
- Chironomiden, wormen en overige invertebraten worden geconserveerd op 70% ethanol.
- Watermijten worden geconserveerd in Koenike-vloeistof.

10.3 Determinatie en tellen van macrofauna-organismen

Het determineren en tellen gebeurt met een stereomicroscop met vergrotingsmogelijkheid van minimaal 7.2 tot 120x. Preparaten, bijv. van wormen (Oligochaeta) worden bestudeerd met een lichtmicroscop bij een vergroting van minimaal 100x. Wanneer voor de determinatie een vergroting tot 120x is vereist, kan ook worden gedetermineerd met de stereomicroscop.

Met de aan de microscoop gekoppelde camera kunnen invertebraten, indien gewenst, opgemeten worden en gefotografeerd.

10.3.1 Determineren

Algemene instructies voor het determineren van macrofauna:

- Controleer voordat je begint het monsternummer.
- Breng de dieren vanuit het monsterpotje over in een petrischaal. Spoel het potje na met 70% ethanol of Koenike om eventueel achtergebleven individuen over te brengen.

- Zorg dat het monster niet uitdroogt tijdens het determineren; dek zo nodig de petrischaal af met een grotere petrischaal.
- Determineer per potje (dansmuggenlarven, overig, mijten en wormen).
- Noteer de determinatie op de werkstaat (FM 7030). Noteer datum van determinatie en paraaf.
- Determineer tot op laagst mogelijke taxonomische niveau; bij voorkeur tot op soort. Voor de determinatieniveaus per groep zie Bijlage 2b. In de lijst wordt een aantal belangrijke opmerkingen over bepaalde groepen gemaakt. Eventuele actualiseringen worden bijgehouden in het logboek (FM 7000).
- Gebruik stereomicroscop voor het determineren van dieren in de petrischaal en een preparatenmicroscop voor het determineren van geprepareerde (delen van) dieren.
- Gebruik determinatieliteratuur die is vermeld in Bijlage 4.
- Gebruik referentiecollectie (fysieke collectie en beeldbank) bij twijfel aan een determinatie. Het onderhoud van de referentiecollectie wordt beschreven in Bijlage 5.
- Voeg waardevolle, zeldzame of bijzondere soorten toe aan de collectie. Volg hierbij richtlijnen als vermeld in Bijlage 5.
- Gebruik wanneer relevant het logboek, bijv. bij eventuele onzekerheden. Maak een aantekening en geef aan hoe hiermee is omgegaan (bijvoorbeeld: 'ter bevestiging opgestuurd naar expert X').
- Noteer op de macrofaunawerkstaat (bijlage 8) de courante naam (TWN-code) en eventueel het ontwikkelingsstadium en geslacht (indien eenvoudig vast te stellen zoals bij bepaalde genera van watermijten en kevers) het aantal van de gedetermineerde exemplaren en eventuele bijzonderheden.
- Na determinatie worden de afzonderlijke macrofaunagroepen (m.u.v. watermijten, wormen en dansmuggenlarven) samengebracht in één potje en eventueel aangevuld met ethanol. Zorg dat er in ieder potje een etiket (bijlage 5) zit waarop de juiste informatie over de inhoud van het potje staat.
- Markeer de deksel van het potje zodat goed zichtbaar is dat het potje klaar is wat betreft determinatie. Sla het monsterpotje op in de collectie volgens paragraaf 14 (archivering monsters). Zorg voor een duurzame bewaring van het monster gedurende vijf jaar (zie paragraaf 14 Archivering).
- Ga voor de naamgeving uit van de meest recente TWN-lijst (www.aquadesk.nl/twn-list/nl), waarvan de codes worden gebruikt bij het invoeren in Biolims.
- Voor 2^e lijnscontrole zie paragraaf 13 Lijnscontroles.
- Voor 3^e lijnscontrole (ringonderzoeken) zie paragraaf 13 Lijnscontroles.

Nadere instructies voor de determinatie van macrofauna

- Interpreteer het beschreven kenmerk op de juiste manier en doe dit zo mogelijk in combinatie met illustraties. Raadpleeg desgewenst andere literatuur zoals de aanvullende determinatie-, achtergrond- en gebiedsliteratuur (Bijlage 4). Gebruik zoveel mogelijk verschillende kenmerken om de determinatie te bevestigen.
- Bij twijfel over de keuze in de determinatietabel moeten beide mogelijkheden gevolgd worden; één van de twee blijkt dan vaak de meest waarschijnlijke; vraag om bevestiging bij een collega.
- Laat je collega-analist ook een paraaf zetten op de werkstaat (als 2^e analist).

- Raadpleeg zo veel mogelijk illustraties als ondersteuning en verduidelijking van kenmerken (foto database van www.Waarneming.nl; let op alleen gevalideerde foto's gebruiken!) om de determinatie te bevestigen.
- Probeer tijdens determinaties zoveel mogelijk dieren intact te houden (halve dieren niet dubbeltellen). Als er toch onderdelen loskomen bewaar deze elementen dan in hetzelfde potje als het organisme.
- Benut ecologische informatie en de bekende verspreiding van een soort en vergelijk die met de locatie. Een soort die uit de literatuur bekend is van brak water zal niet in zoet water voorkomen. Controleer in zulke gevallen nogmaals of de determinatie klopt en bewaar zo nodig het organisme in een apart flesje.
- Benut het netwerk van externe experts (Bijlage 7: Lijst van externe experts) bij "moeilijke gevallen" door een foto of het dier zelf op te sturen en/of plaats een foto van het dier op het forum van macrofaunawerkgroep op Waarneming.nl (<http://forum.waarneming.nl/smf/index.php?board=183.0>).
- Noteer bij twijfelgevallen een hoger taxonomisch niveau wanneer de soort niet met zekerheid is vast te stellen; determineer dan tot het eerstvolgende, hogere taxonomische niveau waarover men wel zeker is (bijv. genus).
- Bewaar moeilijke gevallen in een apart flesje bij het monster. Zo kan het beestje in een later stadium alsnog worden gedetermineerd, worden gefotografeerd en/of opgestuurd ter determinatie door een (externe) expert.

10.3.2 Gebruik van de referentiecollectie

In een excelbestand is aangegeven welk materiaal in de referentiecollectie aanwezig is (F:\CBV\Team biologie\Team 1 - Macrofauna\Referentiecollectie. Het onderhoud van de referentiecollectie staat beschreven in Bijlage 5.

11 Berekeningen

N.v.t.

12 Evaluatie en controles

N.v.t. evaluatie.

12.1 Controle van de data

Resultaten worden genoteerd op de macrofaunawerkstaat (FM7030) en vervolgens in [Biolims](#) ingevoerd.

Met betrekking tot het uitvoeren van controles op de gegenereerde resultaten gelden de volgende richtlijnen:

- Controleer de invoer in Biolims door de soorten en aantallen die op de werkstaat genoteerd zijn.
- Controleer elkaars data: data van analist 1 moeten worden gecontroleerd door analist 2.
- Controleer eventueel toegepaste fracties. Bijv: als van chironomiden $\frac{1}{4}$ van het monster is uitgezocht, moet de factor voor de gedetermineerde dieren uit deze diergroep 4 zijn.
- Noteer na controle op elke bladzijde van de werkstaat paraaf en datum van de controle.
- Maak een excelspreadsheet van de resultaten van alle macrofauna-analyses van de betreffende opdracht (bijv. 'meetnet Waternet 2017'). Controleer de Excelsheet op onwaarschijnlijke soorten, invoerfouten, stem naamgeving af, controleer op

vreemde aantallen en verkeerd gebruikte levensstadia. Breng verbeteringen aan in Biolims.

- Vul een vrijgaveformulier in. *Er is nu nog geen vrijgaveformulier. Hiervoor is een registratie aangemaakt.*
- Geef de resultaten vrij door de lijsten te flatteren in QMA. Voor het flatteren van data wordt een handleiding gevolgd (zie F0180).

13 Lijnscontroles

13.1 Eerste lijnscontrole

Is niet nader ingevuld. De analist controleert zichzelf door de algemene richtlijnen (paragraaf 10.3).

13.2 Tweede lijnscontrole

Er worden twee typen tweede lijnscontroles uitgevoerd: duplo's en 'controletesten'.

13.2.1 Duplo's

Jaarlijks wordt driemaal een heel regulier macrofaunamonster voor een tweede keer gedetermineerd. Er wordt naar gestreefd om daarnaast eenmaal een externe tweede lijnscontrole te organiseren, d.w.z. determinaties door een extern lab.

Na determinatie worden de verschillen onderzocht. Verschillen komen voort uit gemaakte fouten, determinatieniveau en aantallen.

- **Fouten**

Binnen de categorie gemaakt fouten is nog verschil in mate van fout-zijn: soort fout, genus goed; genus fout, familie goed; familie fout, soortgroep goed, zie tabel:

Analist 1	Analist 2	Analist 3	Analist 4	Juistheid
Arrenurus globator	Arrenurus sinuator	Arrenurus spec.	Mideopsis orbicularis	Arrenurus globator

In dit voorbeeld heeft Analist 1 juist gedetermineerd, maar Analist 2 heeft een fout gemaakt; wel heeft hij juist tot genus gedetermineerd. Analist 3 heeft niet doorgedetermineerd tot soort, terwijl dat wel kon; analist 4 heeft zowel soort als genus fout.

De **juistheid** wordt bepaald door het exemplaar gezamenlijk nogmaals te determineren. Als daarna nog twijfel blijft bestaan, kan het worden opgestuurd naar een externe expert.

- **Verschillen in taxonomisch niveau**

Analist 1	Analist 2
Glyptotendipes pallens agg.	Glyptotendipes spec.

Het komt voor dat er tussen de verschillende analisten een uiteenlopend taxonomisch niveau wordt gehanteerd, bijv. soort versus genus bij juveniele stadia. In het voorbeeld van bovenstaande tabel heeft analist 2 niet doorgedetermineerd en analist 1 wel.

Dit verschil is verklaarbaar en acceptabel: gewoonlijk worden bij dansmuggen alleen 4^e (= volgroeide) stadia doorgedetermineerd, maar vaak kan het 3^e ook wel. Dergelijke gevallen worden niet fout gerekend. Wel is het doel dat ieder uiteindelijk tot een zelfde determinatie komt. Daarom worden dergelijke verschillen uitgewerkt in een 'policy', een determinatie-afspraken, die wordt genoteerd in het determinatie-afsprakenlogboek (F:\Team Biologie\ Kwaliteit \ Logboek \ Macrofauna \ Determinatie-afspraken macrofauna WP).

- **Aantallen**

Bij hogere aantallen organismen worden in de praktijk altijd verschillen gevonden tussen analisten. Daarom wordt hier praktisch mee omgegaan.

De verslaglegging wordt gedaan in de kwaliteitsmap van het team Biologie.

13.2.2 *Controletesten*

Bij de controletesten worden steeds 10 individuele macrofauna-organismen onderzocht. Deze worden door alle analisten gedetermineerd. De verschillen die dit oplevert worden bijgehouden in een kwaliteitslogboek (Excel).

De verschillen worden in sommige gevallen met foto's en tekst gedocumenteerd.

13.3 **Derde lijnscontroles**

Wanneer een ringonderzoek over macrofauna wordt georganiseerd doet Team Biologie hieraan mee. Voor macrofauna worden die bijna jaarlijks georganiseerd. De verslagen van de ringonderzoeken worden gearcheeerd op F:\CBV\Team Biologie\Team 1 – Macrofauna \ Kwaliteit \ Lijncontroles en ringtesten \ C – Derde lijnscontroles. In het logboek (FM7000) wordt genoteerd dat aan het ringonderzoek is meegegaan. De resultaten van het ringonderzoek worden intern besproken; deze bespreking wordt vastgelegd in het logboek (FM7000).

14 **Rapportage, Archivering en afvoer van monsters**

14.1 **Rapportage**

De procedure met betrekking tot rapporten is vastgelegd in voorschrift F0200 "Rapportage". De rapportage gebeurt in overeenstemming met de wensen van de opdrachtgever.

De projectleider volgt de rapportage tot aflevering bij de klant. Vóór het versturen van de rapportage wordt deze geïnfatueerd door een analist collega. De projectleider is verantwoordelijk voor aflevering van het rapport bij de klant.

14.2 **Archivering**

Macrofaunamonsters worden voor een periode van minimaal 5 jaar in kratten, gesorteerd op jaar en opgeslagen in ruimte 0.13. Na deze vijf jaar wordt geïnventariseerd of er instanties zijn die interesse hebben in het monstermateriaal, zoals bijvoorbeeld Naturalis, experts van bepaalde soortgroepen of eventueel andere geïnteresseerden. Zo niet dan wordt het materiaal afgevoerd. De potjes zijn voorzien van etiketten met monsternummer, jaartal en monsternemer/analist. De overzichten van de lijsten met monstercodes worden in ordners bewaard.

14.3 Afvoer

Indien na 5 jaar geen interesse voor oude monsters blijkt worden de monsters als chemisch afval afgevoerd.

15 Verwijzingen naar interne documenten (SPV's)

FM7000. Logboek biologie.

FM7030. Macrofauna werkstaat.

Overige verwijzingen

Bijkerk R. (red.) (2014) Handboek Hydrobiologie. Biologisch onderzoek voor de ecologische beoordeling van Nederlandse zoete en brakke oppervlaktewateren. Rapport 2014 - 2, Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer.

NEN-EN-ISO 5667-3 (2012). Water - Monsterneming - Deel 3: Conservering en behandeling van watermonsters (ISO 5667-3:2012,IDT).

Bijlagen

Bijlage 1	Taxa die tot de macrofauna worden gerekend
Bijlage 2a	Maximale aantallen te verzamelen per soortgroep
Bijlage 2b	Determinatieniveaus per soortgroep
Bijlage 3	Prepareren wormen voor determinatie
Bijlage 4a	Determinatieliteratuur macrofauna
Bijlage 4b	Groeps codering determinatieliteratuur macrofauna
Bijlage 5	Referentiecollectie T7031
Bijlage 6	Gebruik en onderhoud determinatieliteratuur macrofauna T7030
Bijlage 7	Lijst van externe experts.
Bijlage 8	Determinatieformulier

Bijlage 1. Taxa die tot de macrofauna worden gerekend

De afgrenzing van macrofauna is enerzijds bepaald door de overwegende grootte van de vertegenwoordigers per taxonomische hoofdgroep (gewoonlijk groter dan 0,5 mm).

De aquatische stadia van de volgende groepen ongewervelde dieren behoren tot de macrofauna:

Porifera (sponzen), Coelenterata (holtedieren), Bryozoa (mosdierpjes),

Plathelminthes (platwormen),

Nemertea (snoer-), Annelida (gelede wormen waaronder borstelwormen en bloedzuigers),

Mollusca (weekdieren waaronder slakken en tweekleppigen), Arachnida (geleedpotigen waaronder spinnen en mijten), Crustacea (kreeftachtigen) (exclusief Cladocera, Ostracoda en Copepoda) en Insecta (insecten).

Tot macrofauna worden **niet** gerekend: watervlooien, vissen(-larven), amfibieën, Nematoda, Gastrotricha, (en andere microscopische orde) en ook niet de volwassen stadia van in het water levende larven zoals volwassen dansmuggen.

Bijlage 2a. Minimale aantallen te verzamelen per soortgroep.

Het minimale aantal te verzamelen individuen per macrofaunagroep in monsters (aangepast naar Bijkerk, 2014 Bijlage 12B.1).

Macrofaunagroep		Minimaal te verzamelen aantal
Odonata	Llibellen	50
Ephemeroptera	Haften	50
Diptera	Vliegenlarven (m.u.v. Chironomidae)	50
Trichoptera	Kokerjuffers	100
Tricladida	Platwormen	25
Hirudinea	Bloedzuigers	50
Hydrachnidia	Watermijten	100
Heteroptera	Wantsen	100
Chironomidae	Dansmuggen	100
Coleoptera	Kevers	100
Oligochaeta	Wormen	100
Polychaeta	Borstelwormen	25
Isopoda	Waterpissebedden	50
Amphipoda	Vlokreeften	50
Crustacea	Overige Kreeftachtigen	50
Gastropoda	Slakken	100
Bivalvia	Tweekleppigen	50

Het aantal van 100 chironomiden wijkt af van het aantal wat in het Handboek wordt genoemd (150). Uit eigen validatie-onderzoek blijkt dat het uitzoeken van 100 chironomiden per monster voldoende is. Bij dit onderzoek werd per monster geen of slechts enkele nieuwe soorten gevonden wanneer 50 extra chironomidenlarven werden uitgezocht. De invloed daarvan op de KRW-score is dan ook minimaal, zodat 100 voldoende werd geacht.

Bijlage 2b. Determinatieniveaus per soortgroep

Groep (wetenschappelijk)	Groep (Nederlands)	Determinatieniveau	Uitzonderingen
Porifera	Sponzen	Tot op soort	
Coelenterata	Holdedieren	Tot op soort	
Bryozoa	Mosdierpjes	Tot op soort	
Tricladida	Platwormen	Tot op soort	Juveniele Schmidtea en Polycelis tot genus
Oligochaeta	Borstelarme	Tot op soort	
Hirudinae	Bloedzuigers	Tot op soort	Piscicolidae tot op familie
Polychaeta	Borstelwormen	Tot op soort	Juveniele tubificiden tot familie
Bivalvia	Tweekleppigen	Tot op soort	Sphaerium < 1 cm tot genus
Gastropoda	Slakken	Tot op soort	Stagnicola tot genus
Hydrachnella	Mijten	Tot op soort	
Crustacea	Kreeftachtigen	Tot op soort	
Collembola	Springstaarten	Collembola	Alleen Podura aquatica
Ephemeroptera	Haften	Tot op soort	
Odonata	Libellen	Tot op soort	
Heteroptera	Wantzen	Tot op soort	
Coleoptera	Kevers	Tot op soort	
Megaloptera	Slijkvliegen	Tot op soort	
Neuroptera	Gaasvlieg	Tot op soort	
Diptera (overige families)	Vliegen en muggen	Genus (soms soort)	
Chironomidae	Dansmuggen	Tot op soort	Chironomus exuviae en poppen tot genus
Trichoptera	Kokerjuffers	Tot op soort	Phryganea tot op genus
Lepidoptera	Rupsen	Tot op soort	

Opmerkingen:

- De beschreven niveaus geven, voor zover de literatuur en staat van het organisme het toelaten, een minimaal determinatieniveau aan.
- Tot op soort determineren betekent voor zover de huidige literatuur het toelaat. Bijv. bij chironomiden zijn tabellen ontworpen voor 4^e stadium larven; jongere larven kunnen niet altijd tot soort gedetermineerd worden, maar wel tot genus.
- Bij een genus met één soort wordt altijd de soortnaam gebruikt.
- In het logboek (FM7000) worden ontwikkelingen over determinatie-inzichten bijgehouden.

Bijlage 3. Prepareren van Oligochaeta (borstelarme) wormen ten behoeve van determinatie

Oligochaeta (borstelarme wormen) zijn geringde wormen die tot macrofauna worden gerekend. Ze zijn deels zonder verdere behandeling te determineren, maar veel soorten kunnen alleen aan de hand van interne structuren worden gedetermineerd. Om die structuren te kunnen waarnemen moeten ze worden opgehelderd in levulosesiroop (Van Haaren & Soors 2013).

De wormen worden bij het uitzoeken geconserveerd in $\pm 70\%$ ethanol. Elders wordt wel 96% voorgeschreven (Bijkerk, red. 2014) maar dan worden de wormen hard en lastiger te hanteren. Bij conservering in $\pm 70\%$ ethanol blijven ze soepel en eenvoudiger te hanteren.

Benodigdheden:

- Levulosesiroop (zie Hoofdstuk 5 voor recept)
- Inbedmiddel
- Objectglaasjes
- Dekglaasjes
- Petrischaaltjes
- Preparatiennaal
- Pincet (harde en slappe punt)
- Kraanwater

De ethanol wordt uitgespoeld in een petrischaaltje. Vervolgens worden de wormen uitgezocht. Een aantal soorten zijn goed herkenbaar vanuit het schaalpje. Deze exemplaren worden gedetermineerd en gaan vervolgens in een potje met verse 70% ethanol. Vervolgens wordt er onderscheid gemaakt tussen de soorten die tijdelijk geprepareerd moeten worden en de exemplaren die niet tot soort gedetermineerd kunnen worden. De laatste groep betreft voornamelijk juveniele Tubificidae. Deze exemplaren worden genoteerd en gaan in het potje met ethanol. De exemplaren die geprepareerd moeten worden, worden eerst in een petrischaaltje met water gelegd zodat de ethanol wordt afgespoeld. De staarten kunnen verwijderd worden zodat de wormen niet meer ruimte in nemen dan nodig op het preparaat. Van de tubificidae worden alleen de sexueel volwassen exemplaren (te herkennen door de aanwezigheid van een zadel in sement 10) geprepareerd. Van de overige families worden alle exemplaren, met uitzondering van de exemplaren die goed herkenbaar zijn in de petrischaal, geprepareerd. Als de ethanol is uitgespoeld kunnen de wormen in de levulosesiroop worden gelegd. De levulosesiroop zorgt voor opheldering waardoor borstels en inwendige kenmerken duidelijk zichtbaar worden. De wormen worden zo recht mogelijk en zonder elkaar te raken in de vloeistof uitgespreid. Vervolgens wordt het preparaat afgedekt met een dekglasje. Als er veel grote exemplaren aanwezig zijn kan het zijn dat de beesten niet meteen ophelderen waardoor belangrijke kenmerken voor determinatie niet zichtbaar zijn. In zo'n geval wordt er gewacht met het determineren van de wormen totdat de wormen zijn opgehelderd. Dit kan enkele minuten tot maximaal één dag duren. Na de determinatie gaat het restant van de wormen terug in het potje. In een aantal gevallen worden er vaste preparaten gemaakt, zoals bij bijzondere soorten en/of soorten die in de referentiecollectie worden opgeborgen.

Van Haaren, T. & J. Soors 2013. Aquatic Oligochaeta of the Netherlands and Belgium. KNNV Publishing. Zeist, 302p.