

Memo Waterspitsmuis



Nader eDNA onderzoek naar het voorkomen van de Waterspitsmuis

Project : Ecologische verbingszone Grote Waterloop

Datum : 16 november 2021

Status : Definitief

Opgesteld door : Freek Derks

1. Inleiding

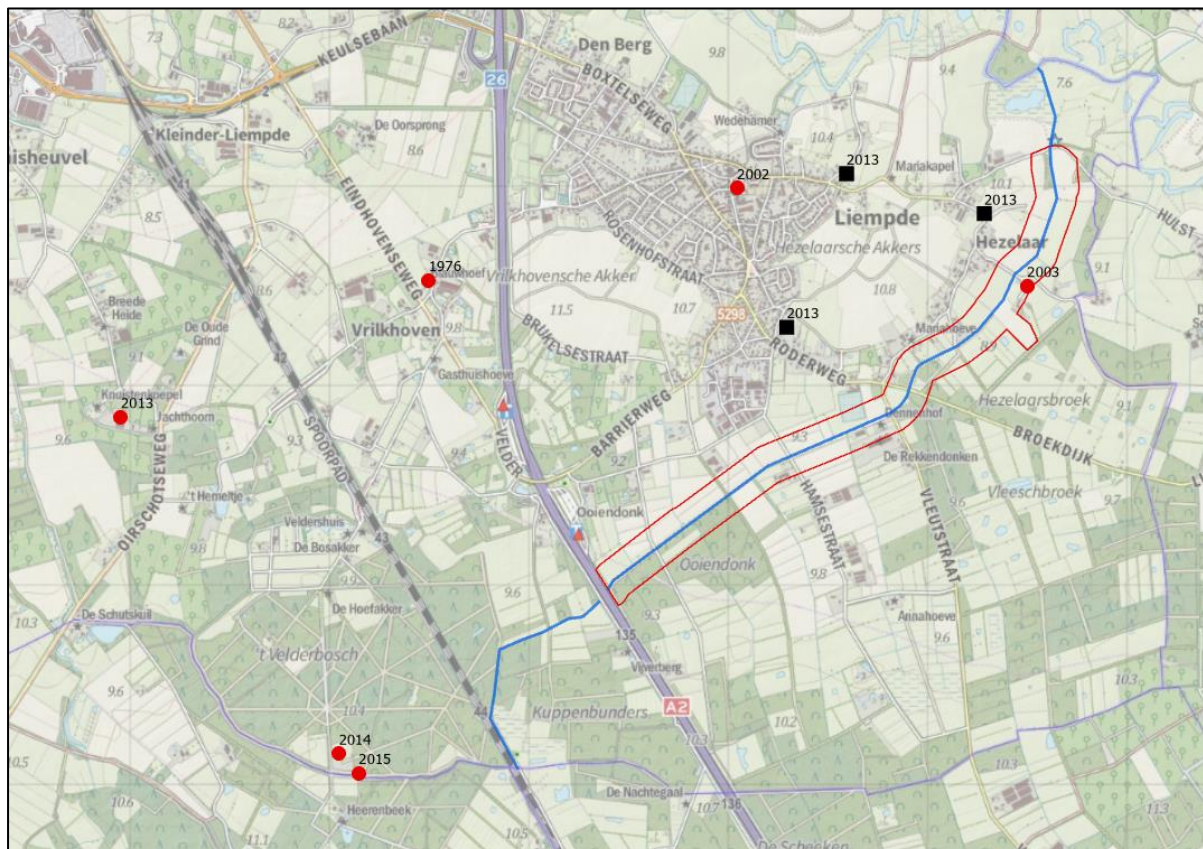
Het Waterschap de Dommel is voornemens om de ecologische verbingszone (EVZ) en Natte Natuurzone (NNZ) Grote Waterloop te realiseren. 15 jaar geleden zijn delen hiervan reeds aangelegd, de ontbrekende schakels moeten nu worden ingericht voor een volwaardig functioneren van de EVZ/NNZ.

In de voorbereidingsfase is een Quicksan flora en fauna uitgevoerd om te toetsen of de beoogde inrichting in strijd is met de natuurwetgeving. Uit de beschikbare gegevens blijkt dat op 1 kilometer van het plangebied de Waterspitsmuis in het verleden is aangetroffen, een vrij zeldzame en beschermde muizensoort.

Het projectgebied kan geschikt leefgebied en verblijfplaatsen bieden voor de Waterspitsmuis door de aanwezigheid van kruidenrijke vegetaties, overgangen van nat naar droog en schuilmogelijkheden.

Het plangebied zal door de inrichtingsvoorstellen beter geschikt zijn als leefgebied, foerageergebied en migratieroute voor de Waterspitsmuis. Echter de werkzaamheden kunnen tijdelijk het leefgebied en verblijfplaatsen vernietigen of verstoren wat strijdig is met de Natuurwetgeving.

Nader onderzoek naar de Waterspitsmuis is benodigd om vast te stellen of de Waterspitsmuis in het plangebied voorkomt, er mitigerende maatregelen benodigd zijn of een ontheffing moet worden aangevraagd. Het nader onderzoek is uitgevoerd middels eDNA, een onderzoeksmethode waarbij met bodemonsters DNA-sporen worden verzameld en geanalyseerd. Deze memo geeft een samenvatting van het uitgevoerde eDNA onderzoek.



Figuur 1: Waarnemingen Waterspitsmuis, Rood = Braakbalonderzoek, Zwart = Losse waarneming (bron: NDFD)

2. Onderzoeksgebied

De Grootte Waterloop ligt ten zuiden van Liempde en stroomt van natuurgebied De Mortelen tot de Dommel. Het plangebied van de EVZ/NNZ bestaat uit een ca. 3km lang traject van een 25meter brede strook aan beide zijden van de watergang. De Grootte Waterloop is veelal aan de noordzijde omsloten door intensieve landbouw en aan de zuidzijde door bos of natuurlijk beheerde graslanden. Het is een brede watergang welke op plaatsen diep ingesneden in het landschap ligt. Afvoeren kunnen sterk fluctueren afhankelijk van het hemelwateraanbod bovenstrooms en de waterstand in de Dommel. De nog niet ingerichte delen van de waterloop bestaan uit steile en sterk begroeide oevers met ook in de beek veel ondergedoken of drijvende waterplanten. De directe omgeving bestaat uit landbouwpercelen of natuurlijk begroeide graslanden, houtwallen en bos.



Figuur 2&3: Het karakter van de Grootte Waterloop

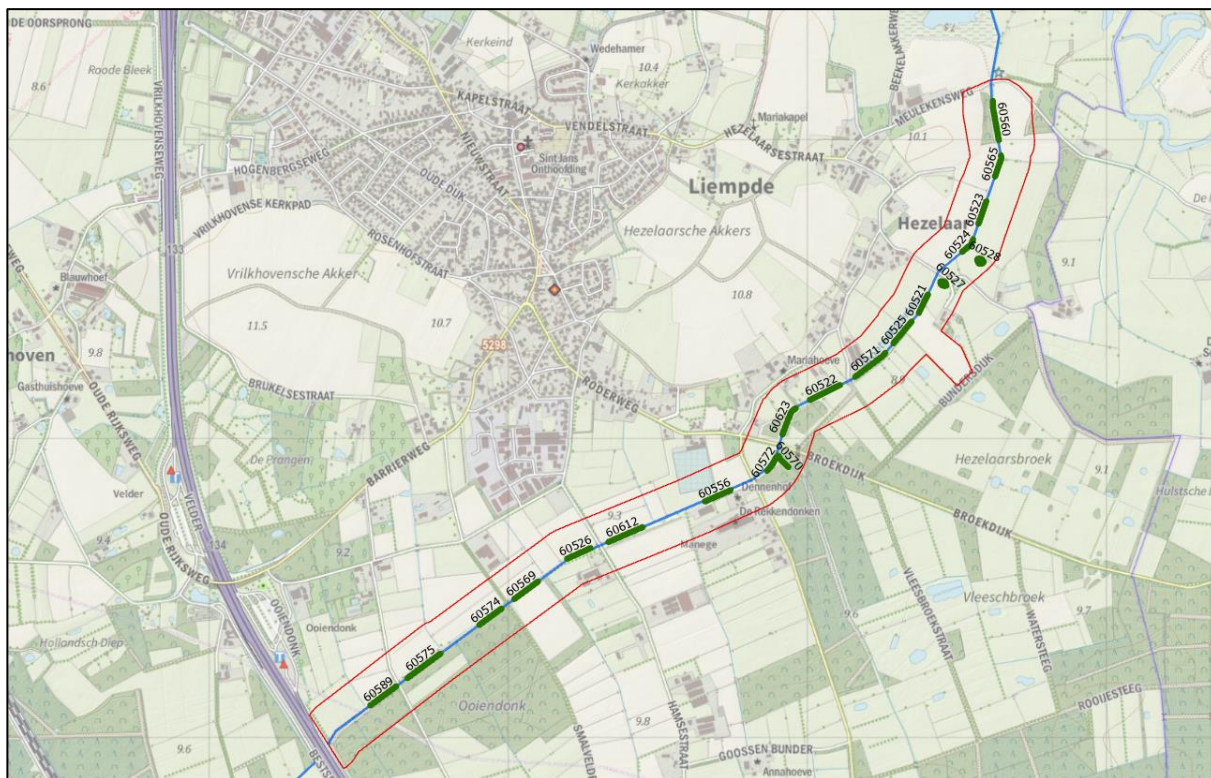
3. eDNA onderzoek

Middels eDNA onderzoek kan de aanwezigheid van Waterspitsmuis redelijkerwijs aangetoond worden. Datura Molecular Solutions BV heeft dit onderzoek uitgevoerd. Zij hebben reeds jarenlange ervaring met het verzamelen en analyseren van DNA voor verschillende soortgroepen. Voor dit project zijn er bodemonsters genomen, dit is een beproefde methode. Datura heeft de methode in de praktijk getest doormiddel van lifetraps in een onderzoeksgebied te plaatsen. Daar werden Waterspitsmuizen gevangen, in 100% van de bodemonsters werd eveneens DNA van waterspitsmuis aangetroffen en in 75% van de watermonsters. In dit project is gekozen voor het verzamelen van bodemonsters, dit is intensiever maar betrouwbaarder dan watermonsters.

Medewerkers van Datura hebben het eDNA onderzoek uitgevoerd op 13 en 14 september 2021. Tijdens het veldbezoek is het projectgebied van de Grootte Waterloop beoordeeld en verdeeld in 20 trajecten. Deze 20 trajecten zijn gekozen op basis van potentieel habitat en gunstige omstandigheden, m.a.w. de kans op aantreffen van DNA van Waterspitsmuis zou daar het grootst moeten zijn.

De bodemonster zijn genomen in het potentiële habitat op de overgang van water naar oever, daar waar vaak een smal randje aanwezig is wat potentieel gebruikt zou kunnen worden door Waterspitsmuis om te foerageren. De bodemonsters werden verzameld, gekoeld bewaard en geanalyseerd in het laboratorium. Datura maakt daartoe gebruik van een 2-staps qPCR protocol. In de bijlage is meer te lezen over de kwaliteitswaarborging.

Figuur 4 toont een weergave van de 20 bemonsterde trajecten. In de bijlage is een uitgebreide beschrijving van de trajecten opgenomen.



Figuur 4: Overzicht bemonsterde trajecten



Figuur 5&6: Traject 60522 en 60572

4. Resultaten

De resultaten van het eDNA onderzoek zijn eenduidig: in geen van de 20 monsters is DNA van de Waterspitsmuis aangetroffen.

Het kan in theorie voorkomen dat we locaties van de Waterspitsmuis hebben gemist of DNA is verweerd, echter wij achten deze kans zeer klein.

Ondanks het voorkomen van Waterspitsmuis in de directe omgeving bevat het onderzoeksgebied slechts weinig geschikt habitat. De oevers zijn veelal steil en de omgeving nog grotendeels in gebruik als intensieve landbouw. Een mogelijke oorzaak van het ontbreken van Waterspitsmuis kan het relatief voedselrijke water met sterke fluctuaties zijn.

5. Conclusie

In het plangebied van de Groote Waterloop zijn geen sporen van Waterspitsmuis aangetroffen. Op basis van het onderzoek kan worden geconcludeerd dat er geen Waterspitsmuizen aanwezig zijn in het onderzoeksgebied.

In de ontwikkeling van de EVZ/ NNZ van de Groote Waterloop is het niet benodigd rekening te houden met de aanwezigheid van Waterspitsmuis. Uiteraard blijft de algemene zorgplicht van toepassing.

Zoals in de Quickscan reeds geschreven kan het plangebied extra geschikt gemaakt worden door het realiseren van structuur zoals: kruidenrijke graslanden, mantel-zoomvegetatie, takkenrillen, poelen en natuurvriendelijke oevers.

6. Bijlage

De volgende bijlagen behoren bij deze memo:

- + Onderzoekresultaten eDNA Datura

eDNA onderzoek waterspitsmuis langs de Groote Waterloop



Colofon

Titel	eDNA onderzoek waterspitsmuis langs de Groote Waterloop
Tekst, foto's en samenstelling	S. Roemaat, K. van Bochove, J. Rook
In opdracht van	Staro Natuur en Buitengebied
Naam opdrachtgever	Freek Derks
Rapportnummer	RA21176
Datum opstelling	20-10-2021
Aantal pagina's	12
Veldwerk	Roemaat, S., van Bochove K., J. Rook 2021. eDNA onderzoek waterspitsmuis langs de Groote Waterloop. Rapport RA21176, Datura, Wageningen.
Contactpersoon vanuit Datura	Staro Natuur en Buitengebied
Wijze van citeren	Freek Derks



Datura Molecular Solutions BV

Gevestigd te:

Agro Business Park 10
6708 PW Wageningen
Nederland

+31(0)629455328

www.datura.nl

kees.vanbochove@datura.nl

Inhoudsopgave

1. Doelstelling.....	4
2. Methode.....	4
2.1 Bemonstering	4
2.2 Laboratoriumanalyse	6
2.3 Kwaliteitswaarborging	7
2.3.1 Hoe vals positieve waarnemingen worden voorkomen	7
2.3.2 Hoe vals negatieve waarnemingen worden voorkomen (qPCR)	8
3. Resultaten.....	10
Bijlagen 1.	11

1. Doelstelling

De doelstelling van onderhavig onderzoek is het aantonen van de aan- of afwezigheid van waterspitsmuis (*Neomys fodiens*) aan de hand van (e)DNA onderzoek. Hiervoor is gebruik gemaakt van bodemmonsters. Dit onderzoek is uitgevoerd in opdracht van Staro Natuur en Buitengebied.

2. Methode

2.1 Bemonstering

De bemonstering is uitgevoerd door medewerkers van Datura Moleculair Solutions B.V. In totaal zijn er 20 bodemmonsters verzameld. De monsters zijn allen verzameld op de overgang van water naar land, langs trajecten van 50-100 meter. In figuur 1 is geeft een overzicht van het onderzoeksgebied. In figuur 2-4 zijn details zichtbaar van de bemonsterde trajecten. Een beschrijving van de monsterde locaties is opgenomen in bijlagen 1.

De bodemmonsters zijn verzameld door met een steriele handschoen de bovenste millimeters van de bodem af te schrapen en over te brengen naar een pot water. Het eDNA lost op in het water, en vervolgens is 75 mL water geconserveerd in een conserveringsvloeistof, en naar het laboratorium van Datura getransporteerd.

Figuur 1: Overzicht van de bemonsterde trajecten.



Figuur 2. Detail van de noordoostelijke monstertrajecten.



Figuur 3. Detail van de monstertrajecten die zich centraal in het onderzoeksgebied bevonden.



Figuur 4. Detail van de zuidwestelijke monstertrajecten.



2.2 Laboratoriumanalyse

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

1. Het eDNA in het bodemonster is geëxtraheerd met behulp van de Qiagen Dneasy Blood & Tissue kit. Storende stoffen als humuszuren kunnen detectie van het eDNA inhiberen wat kan leiden tot vals negatief resultaat. Gedurende de extracties zijn deze inhiberende stoffen zo veel mogelijk verwijderd.
2. Er wordt altijd een controle uitgevoerd om na te gaan of eDNA detectie in een monster geïnhibeerd wordt. Dit wordt gedaan door een bekende hoeveelheid van een fragment artificieel DNA toe te voegen. Vervolgens wordt de concentratie gemeten van dit fragment artificieel DNA. Dit wordt zowel gedaan in een reactie waar een hoeveelheid monster aan toegevoegd wordt, als in een reactie waar geen monster aan toegevoegd wordt. Als DNA detectie in een monster geïnhibeerd wordt, dan is de gemeten concentratie artificieel DNA in de reactie waarin monster toegevoegd wordt lager ten opzichte van de reactie waaraan geen monster aan toegevoegd is. Met name in zuur water, waarin veel organische deeltjes aanwezig zijn kan inhibitie optreden. In een dergelijk geval wordt een extra zuivering stap uitgevoerd of wordt het monster verdund. Vervolgens wordt opnieuw gekeken of de inhiberende stoffen voldoende verwijderd zijn.

3. Detectie van eDNA vindt plaats door middel van een real-time quantitative PCR. Het principe achter deze techniek is dat een specifiek deel van het DNA zeer vaak vermenigvuldigd (geamplificeerd) wordt. Datura maakt gebruik van soort-specifieke primers die uitsluitend DNA van de doelsoort vermenigvuldigen. Datura werkt gebruikt bovendien een soort-specifieke probes (een soort primer) die uitsluitend binden aan eDNA van de doelsoort. Binding van de probe aan het vermenigvuldigde eDNA van de doelsoort resulteert in een fluorescent signaal. Dit signaal wordt gedetecteerd met behulp van een qPCR platform (CFX96 Touch™ van Bio-Rad). De qPCR detectie wordt uitgevoerd met 12 replica's. Daardoor kan zeer gevoelig gedetecteerd worden. De qPCR detectie wordt uitgevoerd met de TaqMan® Environmental Mastermix 2.0 (Life Technologies®). Naast het eDNA monster worden PCR reacties uitgevoerd waaraan geen monster is toegevoegd. Deze moeten negatief zijn. Zodoende kan bevestigd worden dat de analyse schoon is uitgevoerd en er geen contaminatie optreedt. Tenslotte worden ook enkele reacties geanalyseerd waaraan een bekende concentratie DNA is toegevoegd. Deze reacties moeten positief zijn. Dit bevestigt dat de analyse juist is uitgevoerd.

2.3 Kwaliteitswaarborging

2.3.1 Hoe vals positieve waarnemingen worden voorkomen

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

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

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

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

1. Er wordt gebruik gemaakt van een **2-staps** qPCR protocol, hetgeen de kans op aspecifieke detectie verkleint;
2. Gebruik van zeer **specifieke primers** waarmee uitsluitend eDNA van de doelsoort gedetecteerd kan worden. De primers zijn ontwikkeld met behulp van specialistische software;
3. Een qPCR detectie wordt uitgevoerd met behulp van een zeer specifieke **probe**. Deze probe hecht uitsluitend aan DNA van de doelsoort, hetgeen resulteert in een fluorescent signaal;
4. De primers en probe zijn in het laboratorium getest. Eerst is getest of de qPCR detectie inderdaad negatief resultaat geeft na het toevoegen van DNA van (verwante) soorten;

5. Vervolgens is de methode **gevalideerd** door het testen van veldmonsters. Er zijn eDNA monsters verzameld op locaties waar de doelsoort niet voorkomt. Er werd geen eDNA gedetecteerd in deze monsters. Zodoende kon aangetoond worden dat de methode niet resulteert in positieve detectie als de doelsoort niet aanwezig is.

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

1. Verschillende onderdelen van de analyse workflow worden uitgevoerd in fysiek gescheiden laboratorium ruimtes. Het samenstellen van de eDNA monster kits en het voorbereiden van de qPCR reagentia vindt plaats in een **DNA clean room**. Dit is een ruimte waarin geen DNA monsters aanwezig zijn. Zodoende kunnen we garanderen dat er geen DNA aanwezig is in de eDNA monster kits en de reagentia (zoals de primers en probes) die later gebruikt worden in de eDNA analyses. Het extraheren van de eDNA monsters gebeurt in een **eDNA laboratorium**. Dit is een ruimte waarin uitsluitend lage concentraties DNA aanwezig zijn. Vervolgens worden hier de eDNA monsters samen met de qPCR reagentia in een 96-well plaat gepipetteerd. Deze plaat wordt luchtdicht afgesloten. Tenslotte wordt de qPCR uitgevoerd in een **post-PCR laboratorium**. In dit laboratorium wordt het eDNA vermeerderd en hier zijn dus hoge concentraties DNA aanwezig.
2. Er wordt een **unidirectionele workflow** gehanteerd om contaminatie van de DNA clean room en het eDNA laboratorium te voorkomen. Dit houdt in dat materialen die eenmaal in het post-PCR laboratorium geweest zijn niet meer terug mogen naar de DNA clean room en eDNA laboratorium. Ook medewerkers van Datura mogen niet dezelfde dag van een post-PCR laboratorium terug naar een ruimte waarin weinig DNA aanwezig is.
3. In iedere analyse worden **controle analyses** uitgevoerd. Zo worden er monsters geëxtraheerd waaraan geen slotwater is toegevoegd (zogenaamde extractie controles). In de qPCR worden naast de extractie controles ook negatieve PCR controles meegenomen. Zodoende kan heel nauwkeurig gemonitord worden of er inderdaad geen contaminatie optreed.

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

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

2.3.2 Hoe vals negatieve waarnemingen worden voorkomen (qPCR)

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

1. Per monster worden meerdere **submonsters** verzameld. Hiermee wordt de kans vergroot dat eDNA in het monster terecht komt.

2. Een zeer gevoelige **qPCR detectie** in eDNA water- en bodemonsters wordt uitgevoerd met behulp van **12 replica's**. Wanneer minder replica's uitgevoerd worden kan er minder gevoelig gedetecteerd worden. Meer dan 12 qPCR replica's leidt echter niet tot gevoeliger detectie;
3. Gebruik van een **zeer korte merker** van maximaal 100 basepaar;
4. In ieder monster wordt **vastgesteld of de qPCR detectie geïnhibeerd** wordt door storende stoffen. Indien dit het geval is wordt er een **extra zuiveringstap** uitgevoerd. Vervolgens wordt nogmaals getest of de inhiberende stoffen er inderdaad geen inhibitie meer optreedt (zie methode voor een uitgebreidere beschrijving);
5. Er wordt altijd een **positieve controle** van de doelsoort DNA meegenomen in de qPCR detectie. Deze controle moet altijd resulteren in positieve detectie. Ook als alle monsters negatief zijn, kan zodoende vastgesteld worden dat de detectie juist is uitgevoerd.

3. Resultaten

Over het algemeen kan gesteld worden dat het onderzoeksgebied suboptimaal biotoop bevat voor waterspitsmuis. De meeste oevers waren zeer stijl, en de strook potentieel habitat was over het algemeen zeer smal. Vaak was er op 1-2 meter afstand van de watergang een pad aanwezig of begon er een akker of een voor waterspitsmuis ongeschikte (droge) bebossing.

In geen enkel monster is eDNA van waterspitsmuis gedetecteerd. Op basis hiervan kan de conclusie getrokken worden dat waterspitsmuis afwezig is in het onderzoeksgebied.

Een overzicht van het resultaat van dit onderzoek wordt weergegeven in Tabel 1. Iedere analyse is uitgevoerd met behulp van 12 qPCR replica's (zie 2.2 Laboratoriumanalyse). De resultaten worden weergegeven als het aantal replica's (van de 12 replica's) dat positief scoorde voor eDNA van waterspitsmuis in het betreffende monster. Indien er een score van "0/12" is bekomen, betekent dit dat er geen eDNA van de doelsoort in het betreffende monster is aangetroffen. Indien er minstens 1 positieve replica is in een monster (i.e. '1/12' of hoger) betekent dit dat er eDNA van de doelsoort is gedetecteerd. Het aantal positieve replica's is een grove maat voor de concentratie eDNA van de doelsoort: bij een laag aantal positieve replica's (e.g. '1/12') is de verwachting dat de eDNA concentratie van de doelsoort zeer laag is.

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

Tabel 1: Resultaten qPCR analyses van waterspitsmuis

Monsternummer	Type monster	Resultaat waterspitsmuis
60527	Bodem	0/12
60528	Bodem	0/12
60521	Bodem	0/12
60522	Bodem	0/12
60523	Bodem	0/12
60524	Bodem	0/12
60525	Bodem	0/12
60526	Bodem	0/12
60556	Bodem	0/12
60560	Bodem	0/12
60565	Bodem	0/12
60569	Bodem	0/12
60570	Bodem	0/12
60571	Bodem	0/12
60572	Bodem	0/12
60574	Bodem	0/12
60575	Bodem	0/12
60589	Bodem	0/12
60612	Bodem	0/12
60623	Bodem	0/12

Bijlagen 1.

In de onderstaande tabel is per locatie een korte beschrijving van de bemonsterde locatie opgenomen.

60589	Zeer steile oevers. Bemonsterd op de minst steile delen van beide oevers. Oevers met een zeer dichte vegetatie van rietgras. De watergang grotendeels begroeit met riet.
60575	Noordwestkant is minder steil dan de noordoost kant. Gesampled op de minst steile delen van beide kanten van de oever. Oevers met een zeer dichte vegetatie van rietgras. De watergang grotendeels begroeit met riet.
60574	Zuidoost kant van watergang was zeer steil (vrijwel verticaal). Niet bemonsterd omdat deze zeer steil was. Alleen noordwestoever bemonsterd. Geen riet in de watergang. Oevers rietgras, watergang af en toe riet.
60569	Beide oevers zeer steil, suboptimal habitat. Geen riet in de watergang. Oevers rietgras, watergang af en toe riet.
60612	Langs een maisveld (noordwestkant) met veel brandnetels. Noordwestkant erg steil (eerste 50 cm vrijwel verticaal). Aan de zuidkant bemonsterd, iets minder steil.
60526	Zeer steile oevers. Zuidkant iets minder steil, daarom aan de zuidkant bemonsterd. Hier er daar was er direct aan het watergrenzen en smal strookje (circa 10 cm) horizontale oever die potentieel gebruikt zou kunnen worden door waterpitsmuis.
60556	Noordwestoever zeer steil (vrijwel verticaal). Zuidkant hier en daar met ~10 cm een smal strookje horizontale oever die potentieel gebruikt zou kunnen worden. Ruige oevers, zeer dicht begroeit met rietgras en hier en daar brandnetel.
60572	Noordoostkant zeer steil (vrijwel verticaal). Noordoost oever verruigd, vrijwel alleen brandnetel. Aan de zuidkant waren 'horizontale delen' aanwezig waar waterspitsmuis potentieel zou kunnen foerageren. Hier waren ook gangen in de oevers aanwezig (waarschijnlijk (muskus?)rat). brandnetel verruigde oevers. De zuidoevers waren begroeit met rietgras en egelskop.
60623	Beide oevers zeer steil (vrijwel verticaal). Gesampled aan beide kanten op de minst steile stukken. Noordkant verruigd, veel brandnetel en rietgras. Zuidkant dichte vegetatie van rietgras.
60522	De noorwestkant was begraasd door schapen. Voor de zekerheid is deze oever niet bemonsterd (ivm DNA dat mogelijk door schapen verplaatst zou kunnen zijn). Zuidelijke kant gesampled, zeer steile oever. Geen riet in de watergang. Zuiderlijke oever begroeid met rietgras, en hier en daar grote egelskop.
60571	Zeer steile (vrijwel verticaal) en ruige zuidelijke oever begroeid met rietgras. Noordwestkant steile oever begroeid met gras en brandnetel. Alleen de noordkant bemonsterd omdat direct onder de steile oever hier een daar een smal randje (10 cm) aanwezig was die potentieeel gebruikt zouden kunnen worden door waterspitsmuis om te foerageren.
60525	Noordoever vrijwel verticaal. Zuidoever iets minder steil, daarom bemonsterd aan de zuidkant. Begroeid met dichte grasvegetatie en brandnetel. Afwatering van het boerenperceel mond uit in de beek. Watergang niet begroeid met riet.
60521	Noordwest oever zeer steil. Zuidkant betreft een flauwe oever begroeid met een dichte mat van rietgras. Verder brandnetel, lisdodde, harig wilgenroosje en grote egelskop. Alleen zuidkant bemonsterd.
60523	Noordwestkant zeer steil (vrijwel verticaal), begroeit met rietgras en brandnetel. Zuidzijde bemonsterd. Hier een daar flauwe delen aanwezig met moerasspirea, kattestaart, veenwortel en een dichte zode van rietgras.

60524	Noordwest oever zeer steil (vrijwel verticaal). Zuidoost oever af en toe afgevlakte stukken. Bemonsterd aan de zuidoostoever. Veel rietgras en brandnetel.
60527	Kleine poel die deels drooggevallen is. Schaars begroeit aan de zuikant, en noordkant begroeit met riet. Rondom gehele poel bemonsterd.
60528	Kleine poel die deels drooggevallen is. Schaars begroeit. Rondom gehele poel bemonsterd.
60565	Noordwestkant zeer steil (vrijwel verticaal), begroeit met rietgras en brandnetel. Zuidoostzijde soms iets minder steil. Daarom zuidoostzijde bemonsterd. Zuidoostzijde dicht begroeit met rietgras.
60560	Noordwestoever zeer steil (vrijwel verticaal). Gesampled zuidoostkant, steile oever met gras en brandnetels, met hier en daar delen waar de oever flauwer was doordat de oever ingezakt was. Vooral deze flauwe/ingezakte delen van de oever bemonsterd. Noordkant ligt langs een perceel met bomen (gemengd).
60570	Zijwater van de groote waterloop. Matig steile (45graden) some verharde oevers tussen omliggend gemengde vegetatie. Gesampled aan beide zijde. Oevers hebben een vegetatie van rietgras, brandnetel, bramen. Open watergang, veel kroos, ligt deels in de schaduw door bomen.