

Handreiking Waterspitsmuis

Een hulpmiddel voor onderzoek en kaders voor toetsing



Handreiking Waterspitsmuis

Een hulpmiddel voor onderzoek en kaders voor toetsing

Versie 1.0 - mei 2025

S.A. (Sil) Westra - Silvavir Ecologisch Advies

Inhoud

Inleiding	5
Beschrijving methoden	6
Minimale ervaring onderzoeker	9
Beschrijving leefgebied en microhabitat	10
Minimale onderzoeksinspanning	11
Casestudie: handreiking in een praktijkvoorbeeld met plangebied	14
Resultaten en interpretatie daarvan	15
Discussie	15
Dankwoord	16
Bijlage 1: Randvoorwaarden onderzoek met inloopvallen	17
Bijlage 2: Randvoorwaarden onderzoek eDNA water	17
Bijlage 3: Randvoorwaarden onderzoek eDNA bodem	18
Bijlage 4: Randvoorwaarden detectie en kwantificatie van DNA met qPCR	18
Bijlage 5 Randvoorwaarden onderzoek met cameravallen	19
Referentielijst	20



Figuur 1. Cameravallen worden effectief ingezet voor het inventariseren van waterspitsmuizen.

Inleiding

In Nederland heeft de waterspitsmuis (*Neomys fodiens*) een beschermde status binnen de Omgevingswet. Dat betekent dat er een omgevingsvergunning is vereist wanneer er activiteiten in het leefgebied van de waterspitsmuis plaatsvinden die negatieve effecten kunnen hebben op het dier. Om vast te kunnen stellen of er effecten zijn te verwachten bij activiteiten zoals ruimtelijke ingrepen, is verspreidingsonderzoek noodzakelijk wanneer de waterspitsmuis in een projectgebied kan voorkomen.

Momenteel vormt voor provincies en andere vergunningverlenende organisaties onderzoek middels inloopvallen de juridisch geaccepteerde methode om de aanwezigheid van waterspitsmuizen vast te stellen. De laatste jaren worden er echter, afhankelijk van de onderzoeker en het verantwoordelijk bevoegd gezag, steeds vaker alternatieve onderzoeksmethoden toegepast, zoals environmental DNA (eDNA) en cameravallen (figuur 1). Aangezien BIJ12

–de uitvoeringsorganisatie van het Interprovinciaal Overleg– nog niet beschikt over een kennisdocument voor de waterspitsmuis en er tot op heden geen protocollen of provinciale handreikingen beschikbaar zijn voor de soort, is er grote behoefte aan gestandaardiseerde methoden voor onderzoek en kaders voor toetsing van waterspitsmuisonderzoek. Deze handreiking voorziet in die behoefte en is opgesteld in overeenstemming met het inventarisatieprotocol voor waterspitsmuis van het Netwerk Groene Bureaus en is mede gebaseerd op basis van recente onderzoeken naar de effectiviteit van verschillende inventarisatiemethoden (Smaal M. & W. van Manen, 2022; Verhees et al., 2024; Westra et al., 2024).



Figuur 2. Inloopvallen worden effectief in het microhabitat van waterspitsmuis geplaatst.

Beschrijving methoden

In 2024 is er door Silvavir, Wetterskip Fryslân, Datura, Zoogdiervereniging en Natuurbalans grootschalig veld-onderzoek gedaan waaruit is gebleken dat inloopvallen, camera-vallen, eDNA-bodem en eDNA-water alle vier ongeveer even geschikt en betrouwbaar zijn voor het aantonen van aanwezigheid van waterspitsmuis (Westra et al., 2024). Iedere methode heeft echter voor- en nadelen en de keuze voor een specifieke methode is mede afhankelijk van de onderzoeksvraagstelling. Hieronder volgt een korte beschrijving van deze methoden en later in dit document staan randvoorwaarden waar deze methoden aan moeten voldoen.

Inloopvallen

Aluminium inloopvallen (live traps) worden sinds lange tijd gebruikt om kleine zoogdieren levend te kunnen vangen voor onderzoek. Doorgaans worden ze in een raai van twintig vallen uitgezet (steeds twee vallen om de 10 meter) langs een traject van ongeveer 100 meter. Het plaatsen van vallen in tweetallen moet voorkomen dat meer algemene muizensoorten alle vallen bezetten; het vergroot de vangkans van de schaarsere doelsoort. De vallen worden in geschikt microhabitat voor de waterspitsmuis geplaatst, indien mogelijk zo dicht mogelijk bij open water (figuur 2). Het verblijfs gedeelte van de val is gevuld met droog hooi, gepelde zonnebloempitten, wortel en levende

meelwormen. De hier gehanteerde methode is identiek aan de IBN-methode (Bergers & La Haye, 2000) en vormt de afgelopen decennia de standaardmethode voor inventarisaties naar aanwezigheid van de waterspitsmuis. Het grote nadeel van deze methode is dat het vangen en hanteren van dieren stress veroorzaakt met soms zelfs de dood tot gevolg. Om dit te minimaliseren wordt er bemonsterd volgens een gestandaardiseerde werkwijze (bijlage 1).

eDNA watermonsterafname

De aanwezigheid van DNA in het water wordt bemonsterd volgens randvoorwaarden (bijlage 2). Met een bemonsteringsschip worden tussen vijftien tot dertig submonsters verzameld in een mengmonster van in totaal ongeveer 1 liter. Hierbij worden over een lengte van zo'n honderd meter ongeveer iedere vijf meter sub-monsters genomen in het bovenste deel van de waterkolom. Het monster wordt vervolgens in het veld gefiltreerd met behulp van een PES-filter met een poriegrootte van 0,22-1,20 µm (figuur 3). Het filter met filtraat wordt verdeeld over twee epjes met een conserverende vloeistof (lyserende preservatie buffer) en idealiter bewaard bij -20 °C (maximaal enkele dagen op kamertemperatuur). Bij elk meetpunt worden nieuwe steriele handschoenen gebruikt om contaminatie tussen de verschillende meetpunten te voorkomen. De epjes worden vervolgens

op een laboratorium geanalyseerd op aanwezigheid van waterspitsmuis DNA. Het grootste voordeel van eDNA is dat de methode niet leidt tot ongerief van de dieren en dat het veldonderzoek relatief gemakkelijk is en weinig tijd kost.

eDNA bodemmonsterafname

Aanwezigheid van DNA in de bodem wordt bemonsterd volgens randvoorwaarden (bijlage 3). Hierbij wordt met de hand strooiselmateriaal van de bovenste centimeter van de bodem geschraapt over een traject van in totaal ongeveer honderd meter. Als het meetpunt zich in waterrijk gebied bevindt, wat in het geval van waterspitsmuis vrijwel altijd het geval is, dan worden alle monsters direct langs de waterlijn op flauw aflopende oevers genomen bij potentiële opgangen, wisseltjes en vraatplekjes van waterspitsmuis. Op deze manier wordt per sample steeds ongeveer 200 milliliter strooiselmateriaal van vijftien tot dertig sub-monsters verzameld in een pot met een conserverende vloeistof (lyserende preservatie buffer), waarna deze wordt geschud en drie maal ongeveer 25 milliliter van het vocht wordt geconserveerd in drie buizen met 25 milliliter ethanol, die bewaard worden bij 4 °C. Bij elk meetpunt worden nieuwe steriele handschoenen gebruikt om contaminatie tussen de verschillende meetpunten te voorkomen. De buizen worden vervolgens op een laboratorium geanalyseerd op aanwezigheid van waterspitsmuis DNA. Het grootste voordeel van eDNA is dat de methode niet leidt tot ongerief van de dieren en dat het veldonderzoek relatief gemakkelijk is en weinig tijd kost.

Detectie en kwantificatie van DNA in afgenomen monsters

De detectie en kwantificatie van het geïsoleerde DNA uit bodem- en watermonsters wordt bepaald met de zogenaamde quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) methode, een kettingreactietechniek die wordt gebruikt om een specifiek DNA-segment te vermenigvuldigen (Kralik & Ricchi, 2017). De qPCR methode wordt uitgevoerd volgens randvoorwaarden (bijlage 4). Hierbij wordt gebruik gemaakt van experimenteel gevalideerde soort-specifieke primers en probes – synthetische stukjes DNA die uitsluitend aan het DNA van de doelsoort binden (Uchii et al., 2019). De analyse wordt uitgevoerd met twaalf PCR-replica's, waarbij de waterspitsmuis als aanwezig kan worden beschouwd als ten minste één van deze twaalf replica's positief is. Een uitzondering daarop zouden snelstromende- of grote beoemwateren kunnen zijn waarbij lage concentraties eDNA (één of twee positieve replica's) gevonden wordt, en bodemmonsters negatief zijn. Mogelijk dat in dat geval gesteld kan worden dat het eDNA van elders aangevoerd is door het water. Uit de terugkoppeling van het resultaat van de analyse moet blijken of het bemonsteren gelukt is, de analyse goed is gegaan en wat in het geval van lage concentraties de mogelijke oorzaken daarvan zijn. Positieve en negatieve controle groepen dienen te worden meegenomen om de kans op vals negatieve en positieve resultaten uit te sluiten. En het is van belang dat de gebruikte primers en probes in de praktijk op gevoeligheid, robuustheid en specificiteit zijn gecontroleerd. Om de randvoorwaarden voor een juist uitgevoerde extractie en qPCR te borgen wordt ten



Figuur 3. Met een vacuümpomp wordt het watersample door een filter getrokken.



minste de praktijkrichtlijn NPR-7394 gevolgd. De NPR-7394 beschrijft een aantal algemene principes die kunnen worden toegepast bij het opstellen en verbeteren van een kwaliteitssysteem in laboratoria voor het moleculairbiologisch onderzoek van water en de specifieke principes bij kwaliteitsborging van moleculairbiologisch onderzoek voor micro-organismen en eDNA waarbij gebruik wordt gemaakt van qPCR.

Cameravallen

Voor het onderzoek met camera's wordt een aangepaste en verdekt opgestelde cameraval met macrofunctie gebruikt. Dat wil zeggen dat de opstelling op minder dan 30 centimeter effectief scherpe foto's van kleine zoogdieren moet kunnen maken. Een voorbeeld van zo'n cameraopstelling is de Struikrover®. Dat zijn op de grond geplaatste cameravallen die gebruikt worden om kleine zoogdieren te inventariseren (Smaal & van Manen, 2022). Een Struikrover® bestaat uit een korte, robuuste pvc-buis, met daarin een houten plateau waarop aan de achterzijde een camera wordt bevestigd (figuur 4). In een uitsparing aan de voorzijde van het houten plateau ligt een geperforeerd blikje sardientjes als lokmiddel. Een standaard onderzoekseenheid bestaat uit twee camera's welke op 50-100 meter van elkaar worden uitgezet. De camera's zijn ingesteld op fotostand en werken 24 uur per dag. De triggergevoeligheid staat op zijn gevoeligst ingesteld en per trigger worden er tien foto's (minimaal twee) achter elkaar gemaakt met een zo kort mogelijke interval. De camera's registreren gedurende tenminste 28 onafgebroken dagen waarnemingen. Het grote voordeel van onderzoek met cameravallen is dat ze niet invasief zijn en gemakkelijk lang kunnen blijven staan, en ook andere soorten registreren. Om camera's zo effectief mogelijk in te zetten wordt gewerkt met een gestandaardiseerde werkwijze (bijlage 5).



Figuur 4. De Struikrover wordt beaasd met een blikje sardines.

Minimale ervaring onderzoeker

De veldecoloog die het veldwerk uitvoert moet minimaal een goed beeld hebben van de levenswijze en ecologie van de waterspitsmuis, optimaal microhabitat van waterspitsmuizen in het veld kunnen herkennen en op de hoogte zijn van hoe de onderzoeksmethoden op de juiste manier uit te voeren. U leest hieronder welke rol en welke eisen de provincie Fryslân stelt aan de kwaliteiten van de ecologisch deskundige en aan het onderzoek dat hij/zij uitvoert.

Onder een ecologisch deskundige verstaat de provincie Fryslân (het bevoegd gezag) een persoon, die meerdere jaren aantoonbare ervaring en (soort)specifieke ecologische kennis heeft voor het project waarvoor hij/zij is gevraagd. De benodigde kennis en ervaring zijn opgedaan, doordat de deskundige:

- op HBO-, dan wel universitair niveau een opleiding heeft genoten met als zwaartepunt (Nederlandse) ecologie; en/of
- als ecooloog werkzaam is voor een ecologisch adviesbureau, zoals een bureau welke is aangesloten bij het Netwerk Groene Bureaus;

Met betrekking tot soorten of specifieke soorten kan als deskundige ook iemand worden aangemerkt die:

- op MBO-niveau een opleiding heeft afgerond met als zwaartepunt natuurwetgeving, soortenherkenning (meer dan alleen basiskennis) en zorgvuldig handelen ten opzichte van die soorten; en/of
- zich aantoonbaar actief inzet op het gebied van de soortinventarisatie-werkgroepen en/of bescherming en is aangesloten bij en werkzaam voor de daarvoor in Nederland bestaande organisaties (bijvoorbeeld

Zoogdiervereniging, RAVON, Stichting Das en Boom, Vogelbescherming Nederland, Vlinderstichting, KNNV, NJN, IVN, EIS Nederland, FLORON, SOVON, STONE, It Fryske Gea, Staatsbosbeheer, Natuurmonumenten en Stichting Beheer Natuur en Landelijk gebied).

Onder specifieke ecologische kennis wordt in ieder geval verstaan:

- kennis van de algemeen erkende en wetenschappelijke bewezen onderzoeksmethoden/ methodieken en protocollen;
- kennis van de algemeen erkende Kennisdocumenten van BIJ12;
- de deskundige kan specifieke maatregelen begeleiden op het gebied van soorten- en gebiedsbescherming;
- de deskundige herkent de functionaliteit van leefgebieden van beschermde soorten.

Met schriftelijke aantoonbare ervaring wordt verstaan:

- een opgebouwde portfolio waaruit de kennis en ervaring blijkt. De portfolio kan bestaan uit een LinkedIn account of een opgesteld curriculum vitae.
- In de portfolio is weergegeven: de genoten opleiding, de werkgever (indien relevant), eventuele cursussen/ certificaten, lidmaatschap(pen) van natuurverenigingen, maar bijvoorbeeld ook verwijzingen naar ecologische rapportages waar de deskundige bij betrokken is geweest of publicaties in wetenschappelijke tijdschriften of overige publicaties van de hand van de ecologische deskundige.

Bij twijfelgevallen dient te worden overlegd met het bevoegd gezag.



Figuur 5. De waterspitsmuis komt voor langs nagenoeg alle typen wateren met ruige oevervegetatie.

Beschrijving leefgebied en microhabitat

De waterspitsmuis is de grootste spitsmuis van Europa. De soort wordt aangetroffen in zeer uiteenlopende biotopen: meestal is bodembedekkende vegetatie aanwezig en water binnen 500 meter (Twisk et al., 2010). De waterspitsmuis komt in ons land vooral voor op plaatsen waar de samenstelling van de vegetatie op matig voedselrijke omstandigheden wijst (Broekhuizen et al., 1996). Schoon, arm tot matig voedselrijk, vrij snelstromend tot stilstaand water met een rijke watervegetatiestructuur en een goed ontwikkelde bodembedekkende oevervegetatie bieden geschikte omstandigheden (figuur 5). Leefgebieden zijn vaak langgerekte en lopen evenwijdig aan de oever maar de soort wordt ook in aaneengesloten natte gebieden gevonden. Geschikte vegetaties variëren van vochtig kruidenrijk grasland tot elzenbroekbossen (Bekker, 2016). Een recente zenderstudie laat zien dat dichte en korte vegetatie (<1m) de voorkeur heeft boven hogere vegetatie (1-15m) en dat open plekken worden vermeden (van der Putten et al., 2025). De waterspitsmuis komt

in alle provincies voor, maar het zwaartepunt ligt in de laagveengebieden in Fryslân, Overijssel, Noord-Holland en Zuid-Holland. Op de zandgronden is de soort meer gebonden aan beek- en rivierdalen.

In een lijnvormig veenweidegebied met slootjes bedraagt de oppervlakte van een territorium gemiddeld 250 bij 0,75 meter (Lange et al., 1996). Waterspitsmuizen maken jaarrond gebruik van hetzelfde territorium waardoor er gedurende het jaar geen verschillen zijn in het voorkeurshabitat. Daarbij wordt gebruik gemaakt van bestaande schuilplaatsen, maar ze graven ook zelf holen. Ook maken ze bolvormige nesten van gras en mos op beschutte plekken op de oever. In het najaar is de populatiedichtheid van waterspitsmuizen het hoogst omdat dit aan het einde van een relatief lange voortplantingsperiode ligt, waarin een vrouwtje tot wel drie worpen met gemiddeld drie tot acht jongen kan hebben gehad.

Minimale onderzoeksinspanning

Om voldoende inspanning te leveren om de waterspitsmuis met voldoende zekerheid te kunnen aantonen of (juridisch) te kunnen uitsluiten zijn richtlijnen voor onderzoeksinspanning geformuleerd (tabel 1). Hierbij is de onderzoeksperiode en de grootte van het leefgebied leidend in het bepalen van de minimale onderzoeksinspanning. Omdat de reproductieve periode van waterspitsmuizen loopt van maart tot oktober zijn de mannetjes zwervende en krijgen vrouwtjes in deze periode meerdere worpen met jongen. Daarmee is de populatie en trefkans van de soort het grootst in het najaar. In de winter zijn waterspitsmuizen territoriaal en beperkt actief en deze periode is niet geschikt voor onderzoek. Indien onderzoek plaats vindt in de suboptimale periode moet de reden daarvan worden onderbouwd.

- De onderzoeksinspanning wordt in het geval van bijvoorbeeld een watergang of oeverlijn berekend per eenheid lijnvormig habitat (uitgedrukt in meters)

of in het geval van bijvoorbeeld veen of moeras per aaneengesloten leefgebied (uitgedrukt in hectaren).

De definitie van lijnvormig habitat (uitgedrukt in meters) betreft ruig begroeide oeverlijnen langs sloten, kanalen, beken, poelen, meren en andere open wateren (figuur 6). Ter bepaling van het aantal strekkende meters worden alle oevers apart van elkaar beoordeeld en berekend. Dat wil zeggen als de oeverzones van een 100 meter lange sloot aan beide zijden geschikt habitat vormt, dan is de totale oppervlakte geschikt lijnvormig habitat hier dus 200 meter. Als de oeverzone met geschikt habitat breder is dan 5 meter dan wordt deze gerekend tot aaneengesloten habitat. In dat geval wordt dus niet de lengte maar de oppervlakte berekend.

De definitie van aaneengesloten habitat (uitgedrukt in hectaren) betreft geschikte microhabitats zoals natte ruigten, moerasvegetaties, structuurrijk rietland, drassige



Figuur 6. Een voorbeeld van lijnvormig habitat van waterspitsmuis. De oeverzone van beide zijden van de sloot zijn geschikt terwijl de korte grazige vegetatie daarbuiten niet geschikt is.

Figuur 7. Een voorbeeld van aaneengesloten habitat van waterspitsmuis. Zowel de oeverzone langs het open water als daarbuiten is bedekt met dichte structuurrijke ruige vegetatie.

- hooilanden, natte oevervegetaties, extensief gebruikte natte weilanden en veengebieden (figuur 7). Hier wordt open water op minder dan 5 meter van de oeverlijn meegerekend tot het leefgebied. Open water met een gemiddelde diepte van 50 centimeter of minder valt in zijn geheel binnen het te bepalen oppervlakte geschikte leefgebied.
- eDNA samples worden altijd in duo voor zowel bodem als water afgenomen.
 - Indien onderzoek wordt uitgevoerd in de suboptimale periode dan wordt eDNA (bodem+water) plus ten miste één extra onderzoeksmethode toegepast

De minimale onderzoeksinspanning wordt gebaseerd op een eenheid geschikt leefgebied van 300 meter of 1,5 ha. Het benodigde onderzoek kan nooit minder zijn dan de hiervoor aangegeven minimale onderzoeksinspanning. Indien het te onderzoeken geschikt leefgebied binnen het plangebied groter is dan 4,5 ha. of het lijnvormige habitat langer is dan 900 meter dan:

- wordt een onderzoeksinspanning geleverd van ten minste driemaal de minimale onderzoeksinspanning per eenheid geschikt leefgebied.
- wordt eDNA (bodem+water) plus ten miste één extra onderzoeksmethode toegepast, ongeacht de onderzoeksperiode.
- indien voor de bepaling van het aantal af te nemen eDNA samples wordt vastgehouden aan de minimale onderzoeksinspanning per ruimtelijk eenheid is een extra onderzoeksmethode in de optimale periode niet noodzakelijk.
- worden de eDNA samples in ten minste twee fasen verzameld; dat wil zeggen niet allemaal in één veld-bezoek maar in verschillende bezoeken met ten minste vier weken tussentijd en bij ieder bezoek telkens ruimtelijk gelijkmatig verspreid over het plangebied.
- maatwerk in overleg met het bevoegd gezag blijft mogelijk.

Tabel 1: Minimale onderzoeksinspanning per methode per eenheid leefgebied.

Onderzoeksperiode	Eenheid geschikt leefgebied [1]	MINIMALE ONDERZOEKSINSPANNING:
Suboptimaal: mrt-jul	Leefgebied per 1,5 ha.	eDNA bodem en water: duo samples én wildcamera: 2 stuks, 8 weken
	Lijnvormig habitat per 300 m	eDNA bodem en water: duo samples én wildcamera: 2 stuks, 8 weken
Optimaal: aug-nov	Leefgebied per 1,5 ha.	eDNA bodem en water: duo samples óf wildcamera: 2 stuks, 4 weken óf inloopvallen: 20 stuks, 8 bezoeken
	Lijnvormig habitat per 300 m	eDNA bodem en water: duo samples óf wildcamera: 2 stuks, 4 weken óf inloopvallen: 20 stuks, 8 bezoeken
Niet geschikt: dec-feb	Leefgebied per 1,5 ha.	nvt
	Lijnvormig habitat per 300 m	nvt

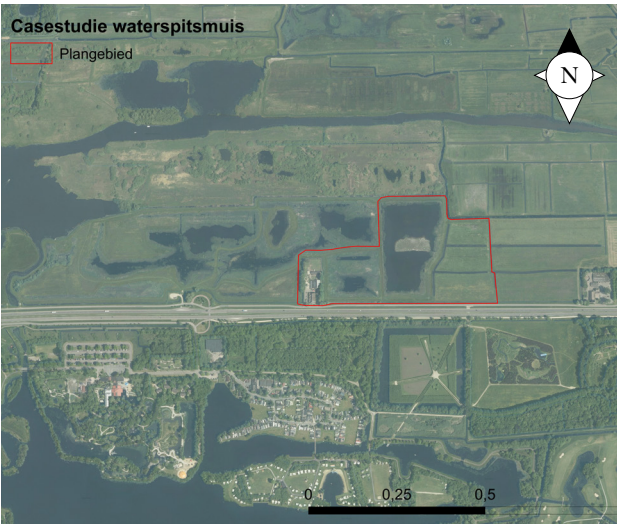
1 Onderzoeksinspanning wordt berekend per eenheid lijnvormig habitat (uitgedrukt in meters) in het geval van bijvoorbeeld een watergang of oeverlijn of per aaneengesloten leefgebied (uitgedrukt in hectaren) in het geval van bijvoorbeeld veen of moeras. Indien het te onderzoeken geschikt leefgebied binnen het plangebied groter is dan 4,5 ha. of het lijnvormige habitat langer is dan 900 meter dan:

- wordt een onderzoeksinspanning geleverd van ten minste driemaal de minimale onderzoeksinspanning per eenheid geschikt leefgebied;
- wordt eDNA (bodem+water) plus ten miste één extra onderzoeksmethode toegepast, ongeacht de onderzoeksperiode;
- worden de eDNA onderzoeken gefaseerd uitgevoerd; dat wil zeggen niet in één werkgang maar in verschillende maanden met ten minste vier weken tussentijd en telkens ruimtelijk gelijkmatig verspreid over het plangebied.
- Indien voor de bepaling van het aantal af te nemen eDNA samples wordt vastgehouden aan de minimale onderzoeksinspanning per ruimtelijk eenheid, is een extra onderzoeksmethode in de optimale periode niet noodzakelijk.
- Maatwerk in overleg met het bevoegd gezag blijft mogelijk.

Casestudie: handreiking in een praktijkvoorbeeld met plangebied

In deze casestudie schetsen we een beeld van hoe deze handreiking in de praktijk kan worden toegepast. Het fictieve plangebied bestaat uit een boerenbedrijf met veenweidegebied, natte ruigtes, rietmoeras en open water. Een deel van de graslanden komt in de winter onder water te staan (figuur 8).

Figuur 8. ligging plangebied voor case studie.



Nadat in het voorafgaande ecologisch traject is bepaald dat soortgericht onderzoek noodzakelijk is wordt allereerst de totale oppervlakte potentieel leefgebied van waterspitsmuis bepaald binnen het plangebied. Hierbij wordt gekeken naar aanwezigheid van het geschikt microhabitat bestaande uit goed ontwikkelde oevervegetatie en/of moerasvegetatie. Hierna wordt op basis de geplande onderzoeksperiode met behulp van tabel 1 bepaald wat de in te zetten onderzoeksmethode(n) en -inspanning is om de aanwezigheid van de waterspitsmuis in het plangebied te kunnen aantonen dan wel juridisch uit te sluiten.

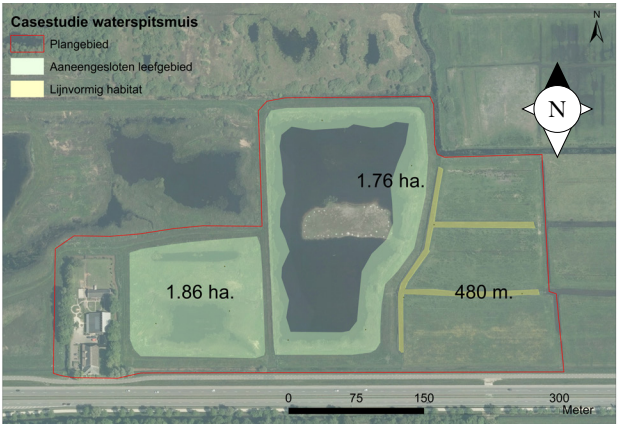
Tijdens een veldbezoek en het bestuderen van luchtfoto's kan worden opgemaakt wat de totale oppervlakte aaneengesloten geschikt waterspitsmuisleefgebied binnen plangebied is:

1.86 ha. + 1.76 ha. = 3.62 ha. en de totale lengte aan geschikt lijnvormig habitat binnen plangebied is 480 meter (figuur 9). Het eiland in de waterplas wordt niet

meegerekend omdat daar geen geschikt microhabitat aanwezig is (zandplaat met zeer minimale begroeiing).

Op basis van de oppervlakten geschikt leefgebied betekent dit dat volgens tabel 1 in de suboptimale periode (maart - juli) een inzet van in totaal vijf duo eDNA sample afnames (water en bodem) én tien cameravallen (gedurende acht weken) vereist zijn om het volledige plangebied te inventariseren.

Figuur 9. Plangebied met daarin het berekende geschikt leefgebied voor waterspitsmuis.



De verdeling bestaat uit drie duo eDNA samples en es Struikrovers binnen 3.62 ha. aaneengesloten leefgebied en twee duo eDNA samples en vier Struikrovers langs het 480 meter lijnvormige habitat.

Op basis van de oppervlakten geschikt leefgebied betekent dit dat volgens tabel 1 in de optimale periode (augustus – november) een inzet van in totaal vijf duo eDNA sample afnames óf tien cameravallen (gedurende vier weken) om het volledige plangebied te inventariseren. De verdeling bestaat daarbij uit drie duo eDNA samples of zes cameravallen binnen 3.62 ha. aaneengesloten leefgebied en twee duo eDNA samples of vier cameravallen langs de 480 meter lijnvormig habitat (figuur 10).

Wanneer de onderlinge afstand tussen deelgebieden groter is dan 400 meter dan dienen deze te worden beschouwd als aparte plangebieden. In dat geval kunnen de oppervlaktes en lengtes van te onderzoeken

leefgebied niet bij elkaar worden opgeteld, maar geldt voor de afzonderlijke plangebieden een minimale onderzoeksinspanning zoals weergegeven in tabel 1.

In de optimale onderzoeksperiode zou de invulling van het veldonderzoek voor deze casestudie kunnen worden uitgevoerd volgens onderstaand schema. De vereiste onderzoeksinspanning betreft het nemen van vijf duo eDNA samples óf inzet van tien cameravallen. Een voorbeeld van een gecombineerde uitvoer van het veldonderzoek is als volgt:

- Dag 1: uitzetten cameravallen 4x en afname eDNA watermonsters 3x
- Dag 28: ophalen cameravallen en afname eDNA bodemonsters 3x

Resultaten en interpretatie daarvan

Indien er op één of meerdere onderzoekslocaties waterspitsmuis wordt aangetoond geldt dat de soort aanwezig moet worden geacht in het gehele plangebied. Indien de soort niet wordt aangetoond dan kan de aanwezigheid van de soort juridisch worden uitgesloten voor een periode van drie jaar.

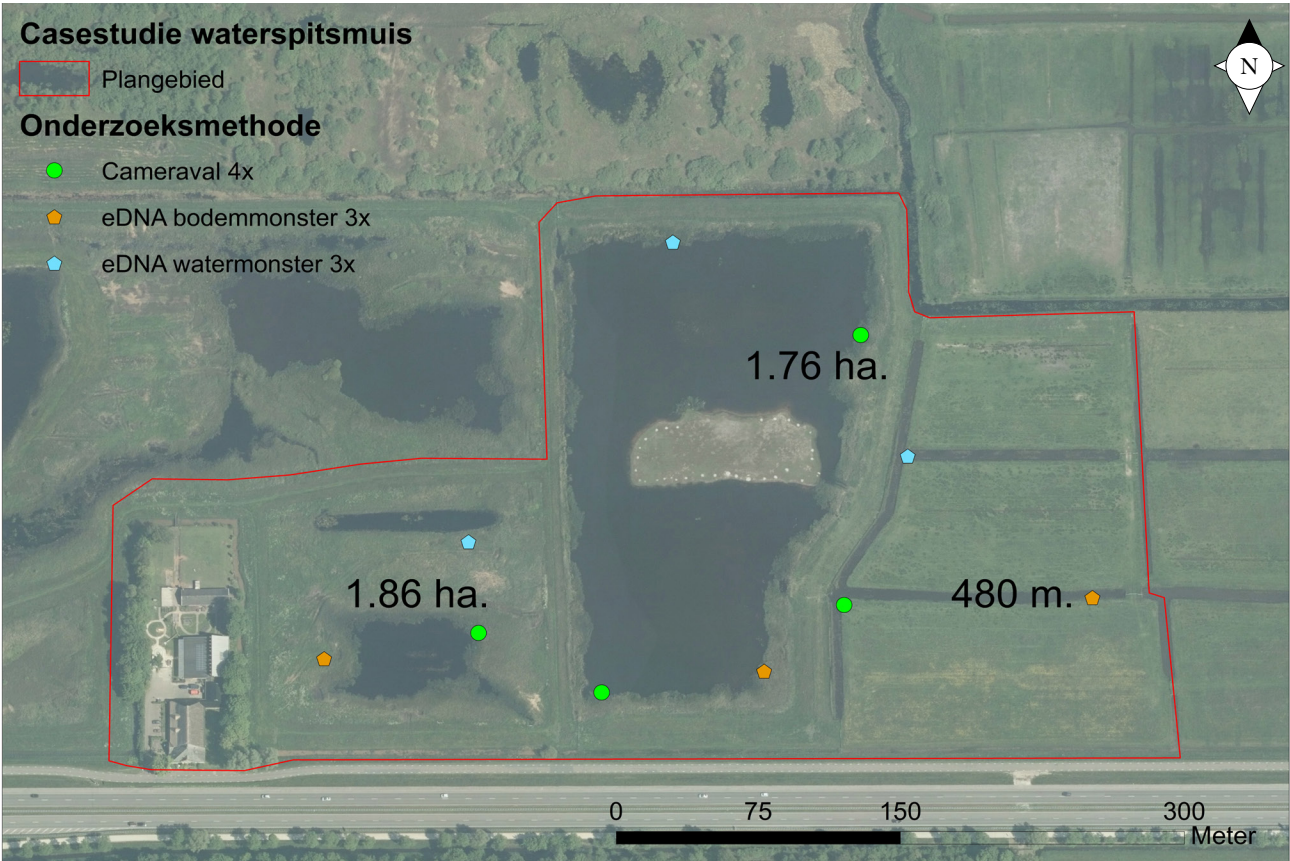
Indien er in de Nationale Databank Flora en Fauna (NDFD) recente gegevens (niet ouder dan drie jaar) aanwezig zijn van waterspitsmuis binnen een straal van 500 meter van het plangebied kan worden aangenomen dat de soort aanwezig is en hoeft dit niet onderbouwd te worden met

onderzoek. Compensatie en mitigatie van leefgebied valt buiten de scope van deze handreiking.

Discussie

Ondanks de overeenkomstige trefkansen hebben de hier voorgeschreven methoden voor- en nadelen en is de keuze voor een specifieke inventarisatiemethode mede afhankelijk van de vraagstelling. Het grootste voordeel van cameravallen en eDNA is dat ze, in tegenstelling tot inventarisaties met inlooppvallen, niet leiden tot ongerief van de dieren (inclusief bijvangsten). Inlooppvallen blijven echter de aangewezen methode voor gericht onderzoek naar de populatiegrootte en staat van instandhouding omdat geen van de andere methoden daar momenteel geschikt voor zijn. eDNA is mogelijk minder goed inzetbaar in 'landhabitat' en het nemen van monsters uit stromende wateren zou een vertekend beeld kunnen geven over de exacte locatie waar een waterspitsmuis aanwezig is omdat het DNA mogelijk over grotere afstanden door het water wordt meegevoerd. De afbreeksnelheid van dierlijk DNA in zoetwater lijkt relatief kort, hooguit enkele weken (Dejean et al. 2011, Thomsen et al. 2012). Snelheid van afbraak van DNA in bodems is afhankelijk van vocht en temperatuur. Voor de waterspitsmuis wordt meestal de natte fractie van de oeverzone bemonsterd waardoor ook hier DNA naar verachting sneller afbreekt dan in drogere bodems. Gericht nader onderzoek naar afbreeksnelheden van (waterspitsmuis) DNA in bodems is wenselijk.

Figuur 10. Locaties van inzet verschillende methoden op kaart.



Dankwoord

Met dank aan onderstaande personen uit de voor deze handreiking samengestelde klankbordgroep. In mondelinge en schriftelijk reacties op conceptstukken werd door jullie inhoudelijke kritische en waardevolle feedback gegeven wat de kwaliteit van de handreiking aanzienlijk heeft aangescherpt. Maar belangrijker nog; het heeft ervoor gezorgd dat de neuzen dezelfde richting op staan en dat toekomstige vergelijkbare richtlijnen voor waterspitsmuisonderzoek zoals een toekomstig kennisdocument en soorteninventarisatieprotocol van het NGB en nu hopelijk niet ver van elkaar gaan afwijken. Ik kijk uit naar vervolgonderzoek met jullie en anderen. Hier zijn meer dan voldoende aanknopingspunten voor. Dank en tot snel.

- Joris Verhees (Natuurbalans – Limes Divergens BV)
- Dick Bekker (Zoogdiervereniging)
- Teun Tamsma (Wetterskip Fryslan)
- Jelle van Zweden (Centraal Bureau voor de Statistiek)
- David Ekkers (Waardenburg Ecology en werkgroep eDNA Netwerk Groene Bureau's)
- Peter Roemers (Waardenburg Ecology en werkgroep eDNA Netwerk Groene Bureau's)
- Kelly Rebergen (Blom Ecologie en werkgroep eDNA Netwerk Groene Bureau's)
- John Melis (JM Ecologie en werkgroep eDNA Netwerk Groene Bureau's)
- Roy Mol (Silvavir Ecologisch Advies)

BIJLAGE 1: Randvoorwaarden onderzoek met inloopvallen (type Heslinga/Longworth)

- De buitentemperatuur komt in de week waarin het onderzoek plaats vindt niet onder de 5 graden Celsius ongeacht de periode van het jaar.
- In de vier weken voorafgaand aan het onderzoek heeft geen vorst plaats gevonden.
- Als standaard onderzoekseenheid wordt een raai van twintig inloopvallen paarsgewijs geplaatst om de 10 meter (10 x 2 inloopvallen) over een lengte van 100 meter.
- Een onderzoekseenheid wordt ingezet op een meetpunt met een diameter van maximaal 100 meter.
- Op locaties met meerdere meetpunten is de onderlinge afstand tussen meetpunten meer dan 100 meter.
- De vallen worden geplaatst in geschikt habitat waarbij instroming door regen of onderwater komen door een stijgende waterstand niet mogelijk is. De plaatsing is dusdanig beschermt dat directe invloed van de zon wordt voorkomen. Ook dient er in de plaatsing rekening te worden gehouden dat het aas zo min mogelijk uit de vallen raakt.
- Voorafgaand aan de inventarisatie vindt een gewenningsperiode van tenminste drie dagen plaats waarbij de inloopvallen niet-actief zijn maar wel hooi en aas bevatten (pre-baiten).
- Na de gewenningsperiode vindt de inventarisatie plaats waarbij de vallen tenminste drie aaneengesloten dagen op scherp staan. Tijdens inventarisaties in de optimale periode vinden er na een bezoek om scherp te stellen acht valcontroles plaats bij een interval van circa acht uur.
- De inloopvallen worden voorzien van droog hooi.
- De inloopvallen worden ruimschoots voorzien van levende meelwormen en voldoende geschikt voedsel voor andere muizensoorten, zoals meerdere stukken wortel plus twee eetlepels gepelde zonnebloempitten.
- Na iedere vangst of nadat het hooi nat is geworden, worden het hooi en aas aangevuld en/of ververs.

BIJLAGE 2: Randvoorwaarden onderzoek eDNA water

- De buitentemperatuur komt in de week waarin het onderzoek plaats vindt niet onder de 5 graden Celsius ongeacht de periode van het jaar.
- In de weken weken voorafgaand aan het onderzoek heeft geen vorst plaats gevonden.
- Als standaard onderzoekseenheid worden twee monsterafnames gedaan waarvan één een watersample en één een bodemsample betreft (duosample).
- Een duosample wordt afgenomen op een meetpunt met een diameter van maximaal 100 meter.
- Op locaties met meerdere meetpunten is de onderlinge afstand tussen meetpunten meer dan 100 meter.
- Bij elk meetpunt worden nieuwe steriele handschoenen gebruikt om contaminatie tussen de verschillende meetpunten te voorkomen.
- Een watersample bestaat uit vijftien tot dertig submonsters verzameld in één mengmonster.
- Submonsters worden genomen over een lengte van maximaal 100 meter.
- Monsters worden afgenomen het bovenste deel van de waterkolom zonder de bodem aan te roeren of waterplanten te raken.
- Het mengmonster wordt ter plaatse gefiltreerd met behulp van een PES-filter met een poriëgrootte van 0,22-1,20 µm.
- Het in het laboratorium te analyseren filter met filtraat wordt verdeeld over twee epjes met een conserverende vloeistof (lyserende preservatie buffer).
- De epjes worden idealiter bewaard bij -20 °C (maximaal enkele dagen op kamertemperatuur).
- Aanvullingen op deze randvoorwaarden, die het laboratorium waar mee wordt samengewerkt stelt – zoals een samplingprotocol –, worden nauwkeurig gevolgd.
- In gebieden waar duo eDNA samples niet (goed) mogelijk zijn [bijvoorbeeld door beperkte aanwezigheid van (geschikte) oppervlaktewateren, of sterk stromende wateren die interpretatie van de eDNA resultaten bemoeilijken] worden extra bodemsamples afgenomen of er wordt een aanvullende onderzoeksmethode ingezet. Dit gebeurt op ten minste evenveel meetpunten als het aantal watersamples dat minimaal had moeten worden afgenomen (tabel 1).

BIJLAGE 3: Randvoorwaarden onderzoek eDNA bodem

- De buitentemperatuur komt in de week waarin het onderzoek plaats vindt niet onder de 5 graden Celsius ongeacht de periode van het jaar.
- In de vier weken voorafgaand aan het onderzoek heeft geen vorst plaats gevonden.
- Als standaard onderzoekseenheid worden twee monsterafnames gedaan waarvan één een water-sample en één een bodemsample betreft (duosample).
- Een duosample wordt afgenomen op een meetpunt met een diameter van maximaal 100 meter.
- Op locaties met meerdere meetpunten is de onderlinge afstand tussen meetpunten meer dan 100 meter.
- Bij elk meetpunt worden nieuwe steriele handschoenen gebruikt om contaminatie tussen de verschillende meetpunten te voorkomen.
- Een bodemsample bestaat uit vijftien tot dertig submonsters verzameld in één mengmonster.
- Submonsters worden genomen over een lengte van maximaal 100 meter.
- Monsters worden afgenomen door met de hand strooiselmateriaal van de bovenste centimeter van de bodem te schrapen.
- Alle monsters worden zoveel mogelijk direct langs de waterlijn op flauw aflopende oevers genomen bij potentiële opgangen, wisseltjes en vraatplekjes van waterspitsmuis.
- Het mengmonster wordt verzameld in een pot met een conserverende vloeistof (lyserende preservatie buffer).
- De pot met het mengmonster wordt geschud en drie maal ongeveer 25 milliliter van het vocht wordt overgebracht in drie buizen met 25 milliliter ethanol.
- De in het laboratorium te analyseren buizen worden bewaard bij 4 °C.
- Aanvullingen op deze randvoorwaarden, die het laboratorium waar mee wordt samengewerkt stelt – zoals een samplingprotocol –, worden nauwkeurig gevolgd.

BIJLAGE 4: Randvoorwaarden detectie en kwantificatie van DNA met qPCR

- De analyse wordt uitgevoerd met 12 PCR-replica's, waarbij de waterspitsmuis als aanwezig kan worden beschouwd als ten minste één van deze twaalf replica's positief is.
- Positieve en negatieve controle groepen dienen te worden meegenomen om de kans op vals negatieve en positieve resultaten uit te sluiten.
- De gebruikte primers en probes zijn in de praktijk op gevoeligheid, robuustheid en specificiteit gecontroleerd.
- Om de randvoorwaarden voor een juist uitgevoerde extractie en qPCR te borgen wordt ten minste de praktijkrichtlijn NPR-7394 gevolgd.
- Uit de terugkoppeling van het resultaat van de analyse moet blijken of het bemonsteren gelukt is, de analyse goed is gegaan en wat in het geval van lage concentraties de mogelijke oorzaken daarvan zijn.

BIJLAGE 5 Randvoorwaarden onderzoek met cameravallen (Struikrover® of vergelijkbaar)

- De buitentemperatuur komt in de weken waarin het onderzoek plaats vindt niet onder de 5 graden Celsius ongeacht de periode van het jaar.
- In de vier weken voorafgaand aan het onderzoek heeft geen vorst plaats gevonden.
- Als standaard onderzoekseenheid worden twee cameravallen geplaatst met een onderlinge afstand van 50 tot 100 m.
- Een onderzoekseenheid wordt ingezet op een meetpunt met een diameter van maximaal 100 meter.
- Op locaties met meerdere meetpunten is de onderlinge afstand tussen meetpunten meer dan 100 meter.
- De camera's maken op minder dan 30 centimeter afstand scherpe foto's van kleine zoogdieren.
- De camera's zijn ingesteld op fotostand en werken 24 uur per dag.
- Er wordt beaasd met een blikje sardientjes op oliebasis waarbij een gaatje wordt geprikt op de kopse kant.
- De reactietijd (triggersnelheid) van de camera moet 0,3 seconden of minder zijn.
- De cameravallen worden ingesteld op tien (minimaal twee) foto's per trigger met een zo kort mogelijke interval (maximaal 30 seconden) tussen triggers.
- In de optimale periode in het najaar (augustus, september, oktober, november) bedraagt de inventarisatieduur tenminste 28 aaneengesloten dagen, tijdens de suboptimale periode (maart-april-mei-juni-juli) is de trefkans lager en bedraagt de inventarisatieduur tenminste 56 aaneengesloten dagen.
- Tijdens inventarisaties in de suboptimale periode is een tussentijdse controle aanbevolen, waarbij de batterijen, SD-kaart en het aas ververs worden.
- Houd met de plaatsing van cameravallen rekening met eventueel stijgende waterstanden en plaats deze op voldoende afstand van de waterlijn.

REFERENTIELIJST

Bekker, D.L., 2016. Waterspitsmuis – *Neomys fodiens*. In: S. Broekhuizen, K. Spoelstra, J.B.M. Thissen, K.J. Canters, & J.C. Buys (Eds.). Atlas van de Nederlandse zoogdieren (pp. 169–171). Natuur van Nederland 12, Naturalis Biodiversity Center & EIS Kenniscentrum Insecten en andere ongewervelden, Leiden.

Bergers, P.J.M., 1997. Kleine zoogdieren inventariseren: het kan efficiënter. Zoogdier 8(3): 3–7.

Bergers, P. J. M. & M. La Haye, 2000. Kleine zoogdieren betrouwbaarder en efficiënter inventariseren. De Levende Natuur 101: 52-58.

Broekhuizen, S., B. Hoekstra, V. van Laar, C. Smeenk & J.B.M. Thissen, 1996. Atlas van de Nederlandse Zoogdieren. Stichting uitgeverij van de Koninklijke Nederlandse Natuurhistorische Vereniging, Utrecht.

Datura Molecular Solutions, 2020. Handleiding: qPCR-kit Waterspitsmuis. Wageningen. Geraadpleegd op 20-06-2024. <https://datura.nl/zelf-regelen/handleidingen-sample-kits>

Dejean T., A. Valentini, A. Duparc, S. Pellier-Cuit, F. Pompanon, P. Taberlet & C. Miaud, 2011. Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems. PLoS ONE 6:e23398. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023398>

La Haye, M. & S. Westra, 2015. Veldonderzoek noordse woelmuis in het Oostzanerveld met eDNA. Rapport 2015.040. Bureau van de Zoogdiervereeniging, Nijmegen.

Lange, R., P. Twisk, A. van Winden & A. van Diepenbeek, 1996. Zoogdieren van West-Europa. Stichting uitgeverij van de Koninklijke Nederlandse Natuurhistorische Vereniging en de Vereniging voor Zoogdierkunde en Zoogdierbescherming, Utrecht.

Van der Putten, T.A.W., J.J.F. Verhees, Z. Koma, P.H. van Hoof, D. Heijkers, W.F. de Boer, H.J. Esser, G. Hoogerwerf & P. Lemmers, 2025. Insights into the fine-scale habitat use of Eurasian Water Shrew (*Neomys fodiens*) using radio tracking and LiDAR. Journal of Mammalogy, gyae146. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyae146>

Smaal M. & W. van Manen, 2022. Detecting and monitoring small mammals with trail cameras. Lutra 65(2): 247-257.

Thomsen P.F., J. Kielgast, L.L. Iversen, C. Wiuf, M. Rasmussen, M.T.P. Gilbert, L. Orlando, E. Willerslev, 2012. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. Molecular Ecology 21:2565–73. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05418.x>

Twisk, P., A. van Diepenbeek & J.P. Bekker, 2010. Veldgids Europese Zoogdieren. KNNV uitgeverij, Zeist.

Uchii, K., Doi, H., Okahashi, T., Katano, I., Yamanaka, H., Sakata, M. K., et al. (2019). Comparison of inhibition resistance among PCR reagents for detection and quantification of environmental DNA. DNA 1, 359–367

Verhees, J.J.F., T.A.W. van der Putten, P.H. van Hoof, D. Heijkers, P. Lemmers, H.J. Esser & W.F. de Boer, 2024. Comparing the effectiveness of short-focal camera trapping, live trapping, and soil eDNA for surveying small mammals: A case study on Eurasian water shrew (*Neomys fodiens*). European Journal of Wildlife Conservation 70:13. <https://doi.org/10.1007/s10344-023-01760-5>

Westra, S.A., T. Tamsma, A. van der Veen, K. van Bochove, D. Bekker, J. Verhees, T. van der Meij, J. van Zweden, E. van Burg, 2024. Waterspitsmuizen aantonen kan op vier manieren. De Levende Natuur125(5):182-187.



