

MACROFAUNA UITZOEKEN PARTJESMETHODE

Eigen methode

1 ONDERWERP EN TOEPASSINGSGEBIED

Dit voorschrift beschrijft de methode voor het uitzoeken van levende zoete tot brakke macrofaunamonsters afkomstig uit het oppervlaktewater, de oever en de waterbodem. Het doel van de analyse is zo goed en efficiënt mogelijk vaststellen welke macrofauna in het monster aanwezig is. Dit voorschrift beschrijft de voorbereiding (uitzoeken) van macrofaunamonsters in voorbereiding op de analyse tot op soort beschreven in A06.008 (macrofauna determinatie)

De beschreven uitzoekmethode is geschikt voor het uitzoeken van monsters die verzameld zijn volgens de multihabitatmethode of een vergelijkbare methode. De analyseresultaten geven een betrouwbaar beeld van de soortensamenstelling en de ordegraad van abundantie. De resultaten zijn geschikt voor het uitvoeren van ecologische beoordelingen.

2 BEGINSEL

In dit voorschrift wordt de methode van uitzoeken beschreven. Er wordt uitgezocht volgens de partjesmethode. Bij deze methode wordt een representatief beeld gegeven van de aanwezige dieren in een monster, maar wordt ook gekeken naar de biodiversiteit. Uitzoeken volgens de partjesmethode heeft als doel om methodische verschillen te verkleinen en de vergelijkbaarheid van monsters te vergroten. Een monster wordt gespoeld over een zeeftoren met verschillende maaswijdtes, waarbij de onderste zeef altijd een maaswijdte heeft van 500 µm. Het materiaal wordt vervolgens op alle zeven in gelijke fracties verdeeld. Uit iedere zeeffractie wordt vervolgens een zelfde fractie uitgezocht voordat verder wordt gegaan met een volgende fractie. Wanneer de beoogde uitzoekaantallen van een bepaalde hoofdgroep worden bereikt volgt een berekende schatting aan de hand van de fractie van het monster waaruit de organismen zijn uitgezocht.

3 TOESTELLEN EN HULPMIDDELEN

De volgende toestellen en hulpmiddelen worden gebruikt bij het uitzoeken:

- 3.1 Zeef met een maaswijdte van 500µm (gecontroleerd zie H12)
- 3.2 Zeven met diverse maaswijdtes;
- 3.3 Uitzoekbak: licht doorlatend afmetingen ±60x40x7cm;
- 3.4 Uitzoektafel met onder- en optioneel boven verlichting;
- 3.5 Fractieverdeler: met de fracties 1/4, 1/8, 1/16;
- 3.6 Lepel of schepje;
- 3.7 Pincetten;
- 3.8 Pipetten
- 3.9 Pipetspenen;
- 3.10 Keukenzeefje (plat);
- 3.11 Petrischaal;
- 3.12 Dampdichte potjes of potjes: dampdicht en goed afsluitbaar;

- 3.13 Etiketten;
- 3.14 Potjesblok;
- 3.15 Telmachine;
- 3.16 Microscoop en/of binoculair (niet gecontroleerd);
- 3.17 fm06.026 Uitzoekformulier macrofauna partjesmethode
- 3.18 Koelkast, koelcel of koeling met temperatuurbereik 5°C +/- 3°C (NEN-EN-ISO 5667-3:2024 en);

4 CHEMICALIËN EN REAGENTIA

De volgende chemicaliën worden gebruikt voor de conservering:

- 4.1 Ethanol 70%;
Bereiding:
Uit 90 % wordt een 70 % oplossing gemaakt door 800 ml ethanol 90% te verdunnen met 200 ml demiwater
- 4.2 Koenike-vloeistof.
Bereiding:
Meng 2 delen azijnzuur (CH₃COOH 96%), 5 delen glycerine (C₃H₈O₃ 87 %) en 3 delen leidingwater.

5 OPSLAG EN KOELING

De monsters worden bij binnenkomst direct opgeslagen in de koelkast (3.18) totdat deze worden uitgezocht. Wanneer een monster wordt opgeslagen om op een later moment aan verder te werken dan wordt de gehele zeeftoren in een bak met daarin een klein laagje (2mm) water en afgedekt in de koelkast (3.18) geplaatst.

6 UITVOERING

- 6.1 Voorbehandeling
 - Controleer de 500µm zeef (3.1) op geldigheid van de controle en of deze , schoon en onbeschadigd zijn;
 - Stapel de gewenste zeven (2 of 3) van fijn naar grof. Verzeker je ervan dat de fijnste zeef van 500 µm (3.1) zich onderaan de stapel bevindt;
 - Haal grote stenen, stukken hout en takken die het verdelen onmogelijk maken uit de emmer en spoel deze af boven de zeeftoren. Leg deze voorwerpen eventueel in een bak of emmer om later te controleren of er organismen uitgekropen zijn.
 - Breng (een deel van) het monster op de bovenste zeef en spoel het voorzichtig onder een zachte waterstraal (douchekop). Ga hiermee door tot het volledige monster gespoeld is.
 - Spoel per zeef voorzichtig het materiaal zodat er in de zeef een voor zover mogelijk homogene verdeling van organismen en materiaal ontstaat
 - Spoel de monsteremmer goed uit en controleer op achtergebleven organismen.
 - Laat de zeeftoren tussentijds in elkaar staan en dek deze af zodat organismen niet kunnen ontsnappen;
 - Vul het uitzoekformulier (3.17) volledig in (gebruik eventueel nvt of "-")

- Noteer nauwkeurig welke technieken of afwijkende handelingen zijn toegepast die van invloed kunnen zijn bij het verdelen van schattingen na determinatie van het monster.

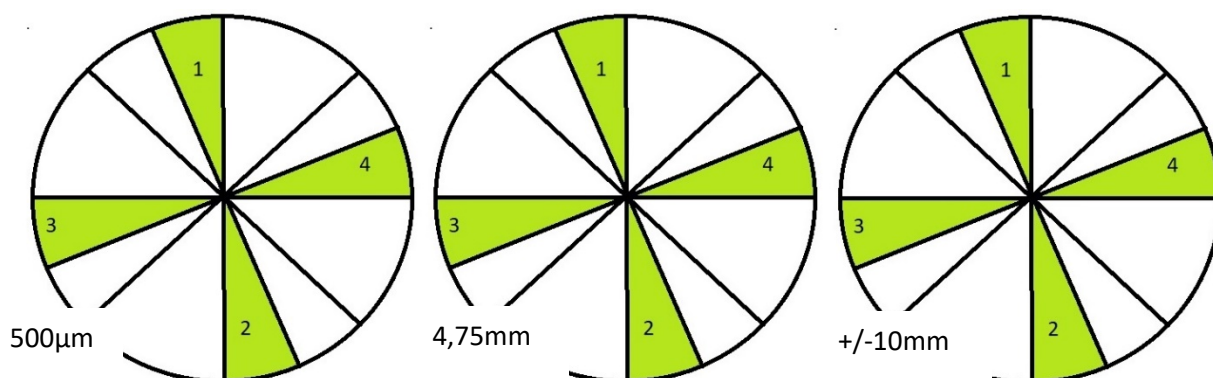
6.2 Uitzoeken

- Controleer of de uitzoekbak (3.3) en de verdiepte lichtbak schoon zijn.
- Zorg voor voldoende potjes gevuld met conserveringsmiddel. Afhankelijk van de soortensamenstelling worden een x aantal potjes met organismen gevuld. Hou er rekening mee dat (zachte) soorten of groepen kunnen beschadigen wanneer ze bij andere, vaak harde en/of stekelige organismen in de pot worden gestopt. Voor soortenrijke monsters worden 8 potjes gebruikt. In de volgende tabel is een voorbeeld weergegeven hoe een verdeling kan worden toegepast waarbij beschadiging zoveel mogelijk wordt voorkomen.

Potje	Inhoud
1	Wormen en Dansmuggen
2	Haften en Libellen
3	Mollusken en Bloedzuigers
4	Kreeftachtigen
5	Kevers en Wantsen
6	Kokerjuffers
7	Mijten
8	Screening (diverse groepen)

Tabel 1: Voorbeeld verdeling groepen over uitzoekpotjes.

- Zorg voor voldoende licht in de uitzoekbak (3.3). Gebruik van de onder verlichting is verplicht, gebruik bovenlicht naar eigen behoefte en omstandigheden;
- Verdeel het materiaal op de gebruikte zeven in hetzelfde aantal fracties met behulp van een fractieverdeler (3.5). Houd de fracties zo klein dat er minimaal 4 fracties van elke zeef nodig zijn om van de talrijkste groepen de standaard uitzoekaantallen te bereiken. In de praktijk worden de meeste monsters in 16 of 32 fracties verdeeld. Laat de fractieverdeler (3.5) in de 500 µm zeef (3.1) staan tijdens het uitzoeken om migratie van dieren zo veel mogelijk tegen te gaan;
- Bij het verdelen van fracties kan gebruik worden gemaakt van een extra set zeven om een fractie verder op te delen naar zeer kleine fracties;
- Om in te kunnen schatten welke fractieverdeling er dient te worden toegepast wordt altijd van fijn naar grof gewerkt (d.w.z. er wordt met de fijnste zeef begonnen). Idealiter wordt het aantal organismen van de meest dominante aanwezige groep dat moet worden uitgezocht met 4 fracties van elk uit te zoeken zeeffractie bereikt. Uitzondering hierop zijn Crustacea hiervoor zijn 2 tegenoverliggende partjes voldoende;
- Breng (een deel van) de fractie over in een uitzoekbak (3.3). Zorg ervoor dat minstens 50% van de bodem van de uitzoekbak (3.3) onbedekt is. Dek de intacte zeeftoren tijdens het uitzoeken af zodat er geen organismen ontsnappen;
- Zorg voor voldoende water in de uitzoekbak (3.3) zodat organismen beter opvallen als ze bewegen.
- Vang de organismen zonder deze te beschadigen en verzamel deze in het daarvoor bestemde potje of schaalpje. Hiervoor kan o.a. gebruik worden gemaakt van een zachte pincet voor zachte organismen en/of een pipet met pipetspeen voor kleine organismen;
- Kies als 2de fractie de tegenoverliggende fractie op de zeef. De 3de fractie precies tussen fractie 1 en 2 in en de 4de daar weer tegenover. In figuur 1 is hier een voorbeeld van gegeven.



Figuur 1: fractieverdeling met 4 x 1/16 partje.

- Als het standaard uit te zoeken aantal voor een bepaalde groep wordt bereikt (zie tabel 2) moet de fractie voor deze groep volledig worden uitgezocht, tenzij er meer dan 10 extra individuen aanwezig zijn. In dit geval worden ze geteld en genoteerd op het uitzoekformulier (3.17) onder "Aantal niet verzameld". Noteer daarnaast het aantal verzamelde individuen en de zeeffractie onder "Aantal verzameld" respectievelijk onder "Fractie (=breuk)". De genoteerde gegevens worden meegenomen in de berekening van de factor voor de groep. Een aantal voorbeeldberekeningen zijn beschreven in bijlage 1.

Code	Groep	Groep NL-naam	Aantal individuen
APHIR	Hirudinae	Bloedzuigers	50
APOLI	Olichochaeta	Wormen	100
APPOL	Polychaeta	Borstelwormen	25
ARACH	Prostimata	Mijten	100
MOCHAS	Gastropoda	Slakken	100
MOBIV	Bivalvia	2-kleppigen	50,25*
CRAMP	Amphipoda	Vlokreeften	50
CRISO	Isopoda	Pissebedden	25
CRREM	Crustacea	Kreeftachtigen overig	35
IDCHI	Chironomidae	Vedermuggen	100
IDREM	Ceratopogonidae	Knutten	10
IDREM	Diptera overig	Vliegen	50
INCOL	Coleoptera	Kevers (adult)	100
INCOL	Coleoptera	Kevers (larven)	20
INCOL	Coleoptera	Scirtidae (larven)	20
INEPH	Ephemeroptera	Haften	(25,25,25)**
INHET	Heteroptera	Wantsen	100
INLEP	Lepidoptera	Rupsen	25
INODO	Odonata	Libellen	50,50***
INTRI	Trichoptera	Kokerjuffers	100
INREM	Plecoptera	Steenvliegen	50
INREM	Megaloptera	Slijkvliegen	25
COLMB	Collembola	Springstaarten	10

*Sphaeridae 50, Dreissenidae 25

**Baetidae, Caenidae, overig

*** Zygoptera, Anisoptera

Tabel 2: standaard aantal uit te zoeken individuen per groep.

- Wanneer een groep qua uitzoekaantallen “vol” is en er wordt later nog een andere verschijningsvorm aangetroffen van deze groep waarvan het vermoeden bestaat dat die nog niet is verzameld dan wordt deze in het “screening” potje gestopt. Dit moet duidelijk op het etiket van het potje zijn aangegeven. Dit potje wordt bij de analyse als laatste gedetermineerd. Als blijkt dat hier soorten in zitten die niet zijn aangetroffen binnen de uitzoekaantallen, dan worden deze soorten ingevoerd met aantal 1 en factor 1.00 (=zee fractie in *Dawaco*).
- Wanneer binnen een uit te zoeken groep een duidelijke dominantie bestaat van 1 verschijningsvorm dan mag deze bij het uitzoeken een aparte telling krijgen binnen de groep. Vaak zijn dit subfamilies binnen soortenrijke groepen of verschillende stadia of verschijningsvormen binnen een soortgroep. Deze wordt samen met de toegekende fractie genoteerd en brengt een extra berekening met zich mee (zie bijlage 1). Minder ervaren uitzoekers moeten altijd overleggen met een ervaren analist wanneer zij een dominantie van een soort of familie vermoeden;
- Wanneer tijdens het uitzoeken de indruk is dat de soortenrijkdom binnen een groep dermate groot is dat het aantal uit te zoeken individuen van invloed kan zijn voor een goed beeld van de soortensamenstelling, dan mag er bij uitzondering afgeweken worden van het voorgeschreven standaard aantal. Overleg hierover met een ervaren analist en vermeld de motivatie voor deze keuze op het uitzoekformulier (3.17). De extra verzamelde dieren worden in het screeningspotje (ethanol/koenike) gestopt. De verwerking hiervan vind op dezelfde manier plaats als wordt beschreven onder het verwerken van soorten in het screeningspotje zoals eerder is beschreven;
- Te kleine niet determineerbare amphipoda (<5mm) worden op een zo laag mogelijk taxonomisch niveau geschat en onder die naam ingevuld op het uitzoekformulier (3.17). De TWN-lijst is ten behoeve van de naamgeving leidend. Bijvoorbeeld kleine (niet determineerbare) vlokreeften (inclusief *Crangonyx*) opnemen als Gammaridea juveniel met bijbehorende fractie. Bij de uit te zoeken aantallen worden deze amphipoda kleiner dan 5mm buiten de standaard uit te zoeken aantallen gehouden;
- Bloedzuigerbroed word buiten beschouwing gelaten;
- Als het monster is uitgezocht worden alle verzamelde organismen overgebracht in dampdichte potjes (3.12). Dit geldt niet voor platwormen, deze worden direct levend gedetermineerd. De taxa, aantallen en fracties worden genoteerd op het uitzoekformulier (3.17).
- Het monster wordt altijd volledig bekeken en doorzocht.

7 CONSERVEREN

Conserveer alle groepen in ethanol (4.1), met uitzondering van de watermijten, conserveer deze in Koenike-vloeistof (4.2).

In potjes (3.12) die met ethanol (4.1) zijn afgevuld en veel organismen bevatten is het verstandig om na het uitzoeken de ethanol (4.1) te verversen en de potjes (3.12) geheel af te vullen. Zoek de afgegoten ethanol (4.1) wel na op uitgespoelde organismen.

8 ETIKETTERING

Alle monsterpotjes worden geëtiketteerd met een etiket waarop minimaal de volgende gegevens staan:

- Lab.Nr;
- Meetpuntcode;
- Meetpuntomschrijving;
- Bemonsteringsdatum;
- Analysemethode of testcode;
- Op het screeningpotje moet duidelijk staan aangegeven dat dit het screeningpotje betreft.

Opmerking: *De monsters worden na binnenkomst op het laboratorium aangemeld in het LIMS. Er wordt een sticker met Lab.Nr op het veldformulier geplakt (zie M06.006 Macrofauna bemonstering). De 2de sticker wordt bewaard in de project(map) om op de verzamelpot te worden geplakt (zie A06.008 Macrofauna determinatie). Met behulp van het etikettenprogramma kunnen de etiketten voor de monsterpotjes en uitzoekformulier worden geprint.*

9 AFVAL EN RESTMATERIAAL

Het restmateriaal van het uitgezochte monster wordt weggegooid in een prullenbak. Restanten van conserveringsmiddelen worden sterk verdund met water en weggespoeld via het riool.

10 OPSLAG

De monsters worden tussen bemonsteren en uitzoeken op het laboratorium altijd bewaard in de koelkast (3.18). Dit geldt ook voor de monsters waar de volgende werkdag verder aan moet worden gewerkt. De zeeftoren wordt dan in een emmer (zeven Ø200mm) of in een bak (zeven Ø200mm en Ø300mm) geplaatst en afgedekt zodat organismen niet kunnen ontsnappen. In de bak moet een klein laagje water aanwezig zijn dat niet tot in de zeef reikt. Dit is om de luchtvochtigheid hoog te houden in de zeeftoren, maar het mag niet zo hoog komen dat de organismen kunnen gaan bewegen.

De uitgezochte monsters worden opgeslagen in het donker bij kamertemperatuur.

11 ADMINISTRATIE

Zorg voor een juiste administratieve afhandeling. Bewaar het uitzoekformulier (3.17) samen met het veldformulier in de projectmap.

12 KWALITEITSCONTROLES

- 1^{ste} uitzoekbak controle. Iedere eerste uitzoekbak van een monster met materiaal van de 500 µm zeef (3.1) wordt door een collega nagekeken op achtergebleven organismen en bij goedkeuring afgetekend op het uitzoekformulier (3.17).
- Jaarlijks vindt een collegiale toetsing plaats volgens F-SPV F00.016 Interne audits en het bijbehorende registratieformulier fm06.032
- De 500µm zeef (3.1) wordt jaarlijks gecontroleerd volgens C-SPV C06.004 Controle zeven en netten

13 GEBRUIKTE NORMEN EN AFWIJKINGEN

EN 17136:2019 conservering macrofauna toevoegen 70% ethanol i.p.v. 96% ethanol

14 LITERATUUR EN NORMEN

- Handboek hydrobiologie
- NEN 6519:2023 Ontw. NI: Water - Methods in hydrobiology - Analysis of macroinvertebrates from inland surface water
- NEN-EN-ISO 5667-3:2024 en: Water quality - Sampling - Part 3: Preservation and handling of water samples
- NEN-EN 17136:2019 en: Water quality - Guidance on field and laboratory procedures for quantitative analysis and identification of macroinvertebrates from inland surface waters

Bijlage 1 VOORBEELDBEREKENINGEN

In Dawaco vul je bij de schattingen de zeeffractie in. Dit is een decimaal getal ≤ 1 en volgt uit de breuk door het bovenste getal van de breuk te delen door de onderste. In Dawaco kan de zeeffractie tot 2 decimalen achter de komma worden ingevoerd.

Voorbeeldberekening 1:

Analist A verzameld 100 dansmuggen uit 4 partjes van 1/16 uit iedere zeef, verder zitten er geen dansmuggen in deze 4 partjes.

4 partjes van 1/16 maken samen 4/16.

De zeeffractie is in dit geval $4 \div 16 = 0.25$

Voorbeeldberekening 2:

Analist B verzameld 52 vlokreeften uit 5 partjes van 1/16 uit iedere zeef.

De zeeffractie is in dit geval $5 \div 16 = 0.31$

Wanneer de aantallen niet mooi uitkomen binnen een partje is er in Dawaco de optie om een schatting toe te voegen aan je zeeffractie.

Voorbeeldberekening 3:

Analist C verzameld 100 wormen uit 4 partjes van 1/16 uit iedere zeef maar heeft nog 15 wormen in het 4de partje zitten. Deze worden geteld en ingevuld bij de schatting.

Hier is dus een zeeffractie van 0.25 met een schatting van 15.

Dawaco berekent dan dat er $(100+15) \times (1 \div 0.25) = 115 \times 4 = 460$ wormen totaal in het monster zitten.

Dominante voorkomende soorten/stadia

Soms zijn er binnen een uit te zoeken groep soorten of stadia die zeer dominant voorkomen. Zo kan het bijvoorbeeld zijn dat er in een monster 1000 wantsen zitten, waarvan er 975 tot de familie *Micronecta* (+/- 4 soorten) behoren en de overige 25 wantsen tot de familie *Corixidae* (+/- 30 soorten).

Het uitzoekaantal voor wantsen is 100, dit betekent dat 1 op de 20 (1000÷50) wantsen in het determinatie potje komt. Dan zitten er in dat potje 98 *Micronecta* en 2 andere soorten wantsen. Dat betekent dat er soorten gemist worden, dit is onwenselijk.

In deze situatie word er voor gekozen om een beperkt aantal *Micronecta* te verzamelen, bijvoorbeeld 20, zodat er ruimte blijft om de overig aanwezige soorten wantsen te verzamelen. De *Micronecta* en de overige wantsen krijgen dan elk een aparte schatting. In Dawaco zijn er opties om per “soort”, “groep” of “groep+stadium” afzonderlijk te schatten.

Verschillende verschijningsvormen binnen soortgroepen en stadia maakt het lastig voor beginnende hydrobiologische medewerkers om hierin een afweging te maken. Wanneer het niet bekend is wat de soortendiversiteit binnen groepen en verschijningsvormen is of welke dieren überhaupt wel of niet kunnen worden gedetermineerd dient het de aanbeveling om vaak advies aan collega's te vragen, keuzes af te stemmen en om hier van te leren.