

Protocol

Onderzoeksmethode voor Aziatische duizendknoop



Hoe onderzoek je grond
op aanwezigheid van
Aziatische duizendknoop?



Onderzoeksmethode voor Aziatische duizendknopen

Vanaf 1 januari 2022 geldt een
handelsverbod voor Aziatische duizendknopen.

Hoe onderzoek je de grond op
Aanwezigheid van Aziatische duizendknopen?



Fotografie: Milieuadviesbureau Geofoxx

Inhoudsopgave

1: Aanleiding	4
2: Onderzoekstappen	6
3: Vooronderzoek	8
4: Locatieinspectie	9
5: Inspectie en monsterneming plant- of grondmateriaal	11
6: Laboratoriumwerkzaamheden	15
Protocol #1 - Plantenmateriaal (fractie > 20 mm).....	16
Protocol #2 - Bodem (fractie < 20mm)	20
7: Onderzoeksrapportage: Verwerking, interpretatie en toetsing.....	27
Bijlage 1: Formulier locatieinspectie JDK	28
Bijlage 2: Veelgestelde vragen (FAQ)	29

Colofon

Deze onderzoeksmethode is tot stand gekomen in opdracht van de Brancheorganisaties voor bodemadvies- en onderzoeksbureau's en de brancheorganisatie voor geaccrediteerde laboratoria, kalibratie- en inspectie-instellingen:

- Vereniging Kwaliteitsborging Bodembeheer (VKB): <https://vkb-online.nl/>
- Vereniging van Milieu Adviesbureaus (VvMA): <https://vvma.nl/>
- Federatie van de Nederlandse Verenigingen van Laboratoria en Inspectie-Instellingen (Fenelab) <https://fenelab.nl/>

De onderzoeksmethode is opgesteld door de werkgroep onderzoeksmethode Aziatische Duizendknoop bestaande uit: Johan van de Wiel en Luuk de Vetten van Geofoxx, Bram van de Pas van Econsultancy, Ad van der Horst van IBland, Henk Oort van Mateboer Milieutechniek, Vincent Lesage van SGS, Mèrijn Smit van AL-west, Erik Langerak, Arjan Veldhuizen en Frank Hoeberichts van Eurofins.

1: Aanleiding

Aziatische duizendknopen, zoals de Japanse duizendknoop, zijn woekerplanten die nagenoeg onuitroeibaar zijn en tot veel problemen leiden: zo veroorzaken Aziatische duizendknopen bijvoorbeeld onveilige verkeerssituaties (zichtbelemmering), tasten ze funderingen aan en overwoekeren andere flora. Aziatische duizendknopen verspreiden zich met name door menselijk handelen, zoals maaien en grondverzet.

Om verdere verspreiding via menselijk handelen te voorkomen, is in 2019 door Probos, Aequator en Geofoxx het “Landelijk protocol omgaan met Aziatische duizendknopen” openbaar toegankelijk gepubliceerd via <https://bestrijdingduizendknoop.nl/protocol/>. Hierin is beschreven hoe belangrijk het is om voorafgaande aan (grond)werkzaamheden te weten of er zintuiglijk sprake is van Aziatische duizendknopen in de grond. Bovendien geldt er vanaf 1 januari 2022 een handelsverbod op Aziatische duizendknopen, waar het vervoer van grond met duizendknopen ook onder valt. Als gevolg daarvan rijzen vragen over **wanneer er voldoende bewijs is dat er géén Aziatische duizendknopen in grond aanwezig zijn?**

De Vereniging Kwaliteitsborging Bodembeheer (VKB) én Vereniging van Milieu Adviesbureaus (VVMA) hebben vernoemd protocol met de leden gedeeld. De ervaringen en inzichten zijn verwerkt in voorliggend protocol. Tevens is door Fenelab gewerkt aan standaardisering van de analysemethode en het vaststellen van de vitaliteit van plantenresten. Deze gezamenlijke inspanning beoogt het “standaardiseren” van vooronderzoek, locatieinspecties en grondonderzoek naar Aziatische duizendknopen.

De term “Aziatische duizendknopen” wordt in deze onderzoeksmethode gebruikt voor drie soorten: de Sachalinse, Japanse en Bastaard duizendknoop – die in de volksmond allen bekend staan als de Japanse duizendknoop (JDK). In dit document wordt met de afkorting “JDK” dan ook deze drie soorten duizendknoop bedoeld. De Afghaanse duizendknoop wordt ook steeds vaker gesignaleerd, maar lijkt ten opzichte van de andere varianten minder invasief. Het is echter belangrijk dat ook deze soort duizendknoop zich niet verder kan verspreiden.

Aziatische duizendknopen bestaan met name uit vrouwelijke planten, waardoor natuurlijke verspreiding via de zaden *vooral* nog niet relevant is. Aziatische duizendknopen verspreiden vegetatief via de stengel(knopen) en de wortels, waarbij plantendelen van een à twee gram al kiemkrachtig zijn.



Afbeelding 1: de Japanse duizendknoop

In tegenstelling tot chemisch onderzoek waarbij een verontreiniging wordt uitgedrukt in gehalten, gaat het bij Aziatische duizendknopen om een biologische verontreiniging. Dit betekent dat één klein stukje zich kan vermenigvuldigen. Door het uitvoeren van onderzoek kan in de meeste gevallen worden gesteld of er wel of geen sprake is van Aziatische duizendknopen in de grond. Er kan echter geen 100% garantie gegeven worden, gezien het een steekproef en een momentopname blijft.

In de praktijk kunnen bodemonderzoeken naar de chemische samenstelling en Aziatische duizendknopen mogelijk ook gecombineerd worden uitgevoerd, zodat de onderzoekslasten beperkt zijn (zowel in doorlooptijd als kosten).

Handelsverbod voor Aziatische duizendknopen

In Nederland geldt vanaf 1 januari 2022 een nationaal verkoopverbod voor Aziatische duizendknopen. In het Besluit Natuurbescherming (en daarmee in de Wet Natuurbescherming, vanaf 2023 Omgevingswet), wordt het onder zich of voorhanden hebben, vervoeren of ten vervoer aanbieden (van delen van invasieve exoten) expliciet aangemerkt als verhandelen. Gelet op deze ruime definitie maakt het hierbij niet uit of het gaat om de delen van de duizendknoop zelf, of om de delen van de duizendknoop in een partij grond die wordt getransporteerd.

Dit betekent dat grondtransport met (levensvatbare delen van) Aziatische duizendknopen verboden is tenzij een vrijstelling van toepassing is. Vrijstelling geldt indien het niet-commerciële doeleinden betreft, indien het plaatsvindt in het kader van uitroeiing, bestrijding of beheersing en op voorwaarde dat geen verdere verspreiding of introductie in het milieu plaatsvindt. Daarnaast is er een vrijstelling voor het verhandelen of in bezit hebben van dode delen of dode producten van Aziatische duizendknopen.

Zie ook het "*Besluit van 14 juli 2021, houdende wijziging van het Besluit natuurbescherming en het Besluit activiteiten leefomgeving in verband met een handelsverbod voor Aziatische duizendknopen en wijziging van het Besluit kwaliteit leefomgeving in verband met de additionele aanwijzing van door de provincies te bestrijden invasieve uitheemse soorten*" op <https://zoek.officielebekendmakingen.nl/stb-2021-381.html>

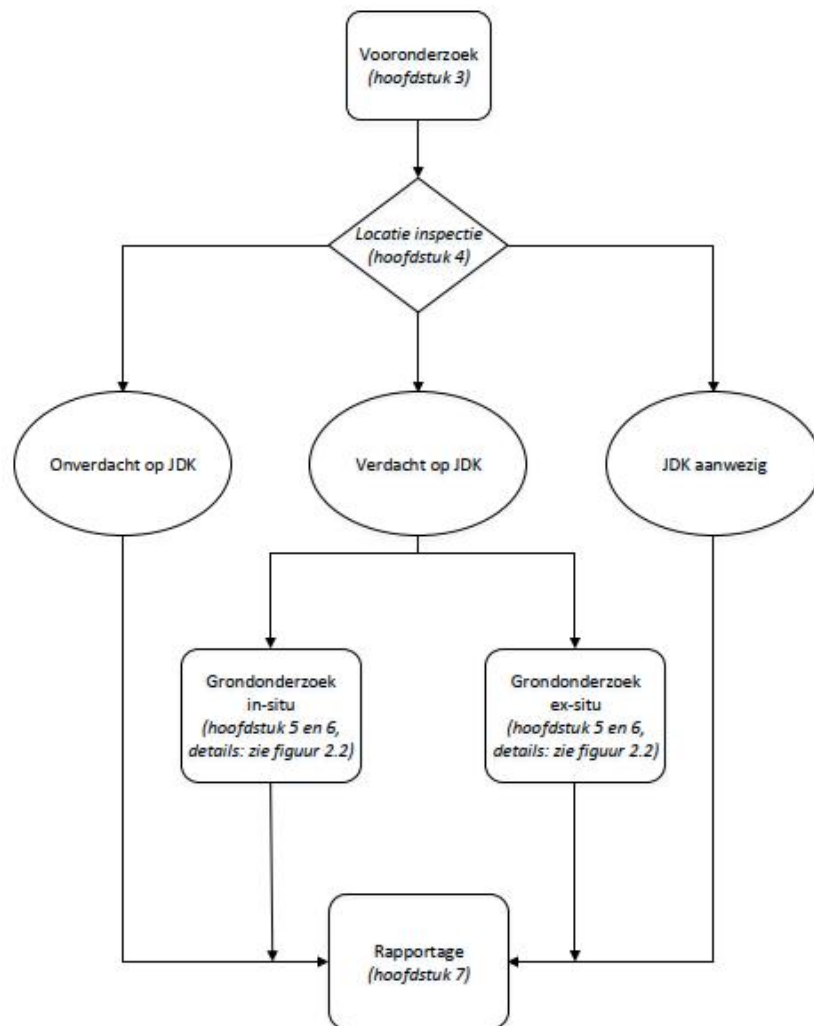
Disclaimer: Deze onderzoeksmethode is in eigen beheer en met zorg opgezet op basis van gangbare technieken, inzichten en methodes. Het blijft mogelijk dat er afwijkingen voorkomen. Deze afwijkingen komen door het steekproefsgewijze karakter van het onderzoek niet aan het licht. Daar komt bij dat de betrouwbaarheid van de locatieinspecties seizoensafhankelijk zijn en dat onderzoek naar de bodem een momentopname is. Verandering van de aanwezigheid van duizendknopen als gevolg van het bodemgebruik kan na het onderzoek plaatsvinden. VKB, VVMA en Fenelab zijn niet aansprakelijk voor schade die voortkomt uit bovengenoemde aspecten.

2: Onderzoekstappen

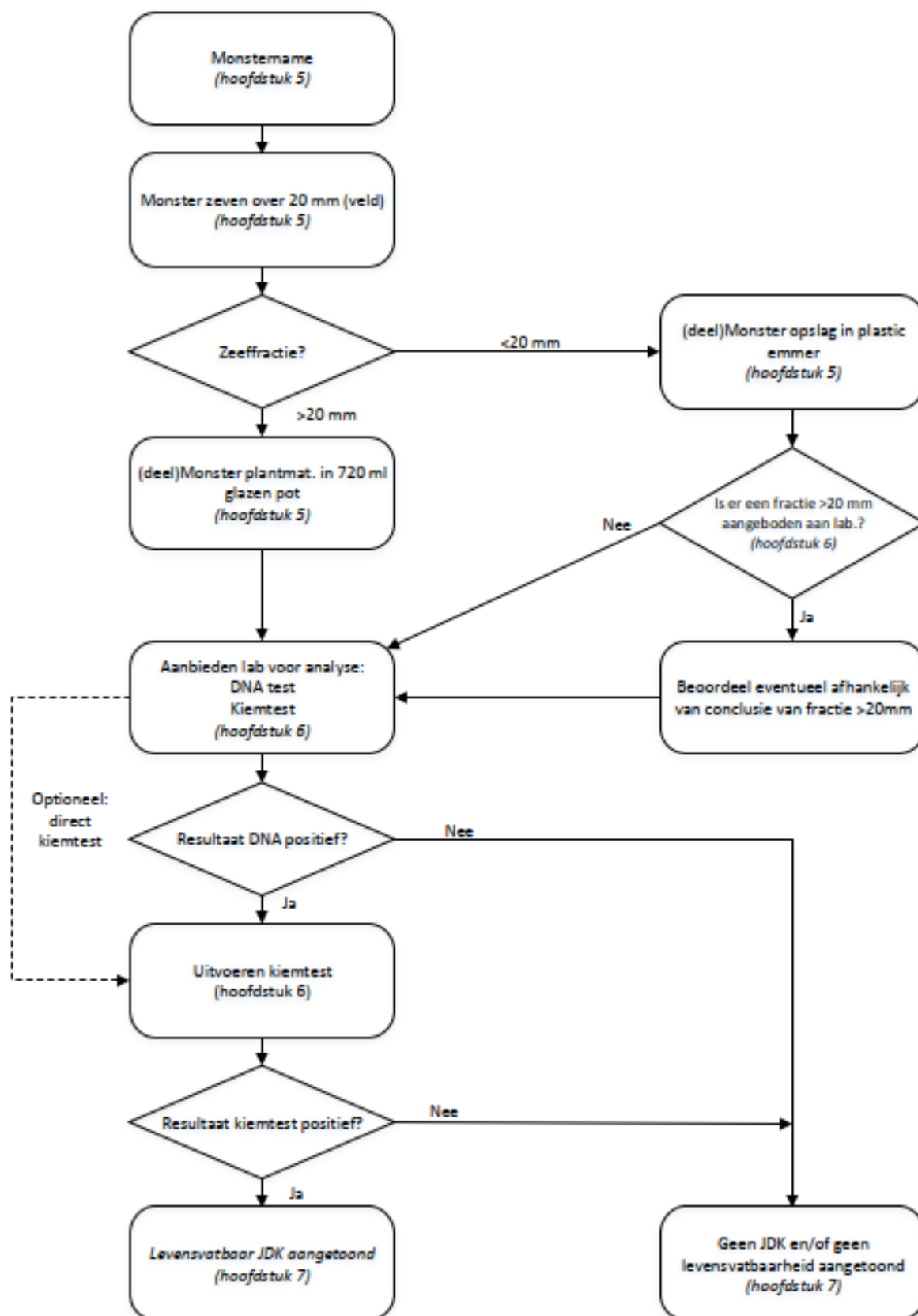
In onderstaande figuur zijn de onderzoekstappen gevisualiseerd. Op basis van het vooronderzoek, de locatieinspectie en de visuele inspectie van de grond en het plantmateriaal wordt gekeken of er al kan worden vastgesteld dat er Aziatische duizendknopen aanwezig zijn. Als redelijkerwijs gesteld kan worden dat de locatie onverdacht is op basis van het vooronderzoek en de locatieinspectie, kan men in overleg met de opdrachtgever direct overgaan op de rapportage. Ook juist als al met zekerheid vastgesteld kan worden dat er Aziatische duizendknopen aanwezig zijn, is vervolg onderzoek niet altijd noodzakelijk (de conclusie is reeds duidelijk).

Als de locatie verdacht is en/of niet evident is om welke plantsoort het gaat waarvan wortel/plantmateriaal is aangetroffen, dan wordt het verzamelde verdachte wortelmateriaal met behulp van DNA analyse of een kiemproef onderzocht. Wanneer er geen verdacht grof wortelmateriaal aanwezig is (>20 mm) kan eventueel de fijne fractie van de grond met haarwortels worden geanalyseerd (<20 mm). Dit kan bijvoorbeeld nodig zijn indien het depot gezeefd is of bij extractief gereinigde grond. Uit de DNA analyse danwel een kiemproef zal blijken of er Aziatische duizendknopen aanwezig zijn in het bemonsterde materiaal. Het is hierbij belangrijk dat een representatief monster is genomen.

Indien aangetoond wordt dat de Aziatische duizendknopen in een gronddepot of deellocatie aanwezig zijn, wordt het gehele depot of de deellocatie als verontreinigd met Aziatische duizendknopen beschouwd.



Figuur 2.1 Onderzoekstappen geschematiseerd



Figuur 2.2 schematische weergave monstername en laboratoriumonderzoek

3: Vooronderzoek

In-situ locaties

Via openbaar beschikbare informatie wordt gekeken of bekend is of op de locatie Aziatische duizendknopen voorkomen. Dit kan opgezocht worden via onder andere:

- Locatiegegevens, informatie van opdrachtgever;
- Gemeentelijke website;
- (telefonisch) contact met de ecooloog van de gemeente;
- Nationale Database Flora en Fauna (Het NDFF is op moment van schrijven nog niet openbaar toegankelijk, maar zal waarschijnlijk in de toekomst wel omgebouwd worden tot een open datavoorziening).

Op basis van bovenstaande bronnen kan men wel identificeren of er Aziatische duizendknopen aanwezig zijn of waren op de locatie, maar niet dat ze er niet zijn. Aziatische duizendknopen verspreiden zich met name via maaien en graafwerkzaamheden, waardoor gesteld worden dat het terreingebruik van invloed is op hoe verdacht een locatie is. De volgende locaties (niet-limitatief) zijn relatief “verdacht” en behoeven in ieder geval (extra) aandacht:

- oevers van watergangen en –lichamen;
- weg en –spoorbermen;
- bouwlocaties;
- overige plekken waar veel grond- en maaiwerkzaamheden plaats vinden.

Desondanks komen Aziatische duizendknopen overal voor; in zowel het stedelijk gebied, als natuurgebieden en het buitengebied. Daarom wordt *altijd* aanbevolen om een locatieinspectie uit te voeren (zie hoofdstuk 4). Op basis van het vooronderzoek en de locatieinspectie kan het in enkele gevallen nodig zijn om een grondonderzoek uit te voeren (zie hoofdstuk 5).

Gronddepots (ex-situ)

Het heeft de voorkeur om een locatieinspectie te doen vóórdat het gronddepot wordt ontgraven (in-situ). Zie hiervoor voorgaand kopje.

Bij ex-situ gronddepots worden de partijgegevens opgevraagd bij de opdrachtgever. Denk daarbij aan: herkomstlocatie, historie, aard en grootte van de partij en het materiaal, wijze waarop het materiaal beschikbaar is gesteld of respectievelijk is toegepast. De herkomstlocatie dient te worden vergeleken met de database van gemeenten, terreinbeheerder of het NDFF (zie voorgaand kopje). Op basis van het vooronderzoek kan mogelijk ook al worden aangenomen dat er geen Aziatische duizendknopen in de grond aanwezig zijn, bijvoorbeeld als:

- het RAG gecertificeerde grond is;
- het thermisch gereinigde grond is;
- grond is afkomstig uit een (primaire) zandwinning;
- grond is afkomstig uit een diepere bodemlaag dan de gemiddeld laagste grondwaterstand.

In andere gevallen wordt aanbevolen om een locatieinspectie uit te voeren (zie hoofdstuk 4). Op basis van het vooronderzoek en de locatieinspectie zal het in veel gevallen ook nodig zijn om het plantmateriaal in de depots visueel te beoordelen en in enkele gevallen zelfs analytisch te onderzoeken (zie hoofdstuk 5).

4: Locatieinspectie

Doelstelling

Een maaiveldinspectie is essentieel om de locatie op te delen in homogene (deel)locaties zodat de effectiviteit van het onderzoek wordt vergroot. De doelstelling is om de oppervlakte van de verdachte locaties zoveel mogelijk in te perken en om te identificeren of er Aziatische duizendknopen reeds zichtbaar zijn boven het maaiveld. Voor onderzoek naar Aziatische duizendknopen in de bodem wordt verwezen naar hoofdstuk 5.

Eisen deskundige JDK

De deskundige dient Aziatische duizendknopen, in de verscheidene stadia en seizoenen, te kunnen herkennen¹.

De deskundige voldoet aan de volgende eisen:

- is werkzaam als ecooloog óf heeft succesvol een cursus herkenning van Aziatische duizendknopen afgerond;
- houdt kennis en ervaring op peil;
- heeft kennis van 'schoon' werken, om contaminatie van invasieve exoten te voorkomen;
- het nemen van grepen dient enkel te geschieden door een deskundige die op de hoogte is van onderliggend protocol.

Afbakening (deel)locatie

Bij de uitvoering van de visuele inspectie moet het betreffende terrein/depot vrij inspecteerbaar zijn. Er moet een zo groot mogelijk deel van de te inspecteren locatie vrij zijn van objecten (afdekkingen, opgeslagen materialen, verhardingen, enz.). Ook behoort de te inspecteren oppervlakte voldoende representatief te zijn voor de gehele (deel)locatie. Onvoldoende inspecteerbare delen vallen buiten het inspectiegebied. Inspecteer tevens tot tenminste drie meter rondom elke deellocatie en/of aangrenzende perceelsgrenzen.

Uitvoering

De visuele inspectie van het maaiveld wordt per (deel)locatie separaat uitgevoerd, waarbij opgelet wordt dat men niet per ongeluk (bijvoorbeeld via de schoenzolen) plantmateriaal mee neemt naar de volgende (deel)locatie. Deel het maaiveld van de (deel)locatie op in 'inspectiestroken' van maximaal 1,5 m en inspecteer de volledige onderzoekslocatie strook voor strook in twee richtingen haaks op elkaar. Voor lijnvormige en grootschalige (deel)locaties met een oppervlakte groter dan 1 ha mag worden afgeweken van de bovengenoemde systematiek, hetzij door in één richting te inspecteren hetzij door een steekproefsgewijze inspectie van het maaiveld. Een steekproefsgewijze inspectie moet altijd in het groeiseizoen worden uitgevoerd, wanneer de plant duidelijk zichtbaar afsteekt boven het maaiveld. Bij een steekproefsgewijze inspectie dient wel extra gelet te worden op aanwezige bermen, oevers, kale plekken, perceelsgrenzen en overige plekken waar veel werkzaamheden plaats vinden of hebben gevonden.

In het geval van moeilijk begaanbaar terrein is de inzet van getrainde honden voor de inspectie een optie. Dit is echter niet verplicht.

In de bijlage is een invulformulier voor de locatieinspectie toegevoegd, als hulpmiddel om te beoordelen hoe betrouwbaar de locatieinspectie was. Hierbij dient te worden aangegeven of er recent werkzaamheden zijn genomen of dat er sprake is geweest van grondwerkzaamheden (bijvoorbeeld maaien, aflagen, kabels en leidingen). Bij voorkeur wordt de inspectie in het groeiseizoen uitgevoerd (mei - oktober). Aziatische duizendknopen zijn in normale omstandigheden in het groeiseizoen goed te herkennen.

In de winter heeft een maaiveldinspectie een lager betrouwbaarheidsgehalte. Wanneer er gemaaid is op de locatie is de inspectie in elk geval onbetrouwbaar in de winter (efficiëntie is minder dan 80%). Wanneer een inspectie in de winter wordt uitgevoerd, moet er worden gelet op aanwezigheid van afgestorven stengels en onbegroeide plekken. Onbegroeide plekken kunnen worden veroorzaakt door beschaduwing / concurrentie van Aziatische duizendknopen. Op de stronken zijn vaak de rode knoppen die in het voorjaar uitlopen al goed zichtbaar.

¹ Zie ook infoblad A van het landelijk protocol, vrij toegankelijk op <https://bestrijdingduizendknoop.nl/protocol/>

Ga als deskundige tenminste de volgende punten na om te bepalen of de maaiveldinspectie afdoende is om te stellen dat de locatie *onverdacht* is op Aziatische duizendknopen:

1. er zijn geen Aziatische duizendknopen waargenomen;
 - 1.1. de inspectie is in het groeiseizoen uitgevoerd (max. 100% efficiëntie);
 - 1.1.1. er zijn de afgelopen drie maanden geen maai of grondwerkzaamheden uitgevoerd;
 - 1.1.2. de gehele deellocatie is onderzocht (zo niet, splits eventueel deellocaties uit).
 - 1.2. de inspectie is buiten het groeiseizoen uitgevoerd (max. 80% efficiëntie);
 - 1.2.1. er zijn de afgelopen zes maanden geen maaiwerkzaamheden én het afgelopen jaar geen grondwerkzaamheden uitgevoerd (opgemerkt wordt dat dit visueel niet altijd vast te stellen is, en dit ook nagegaan dient te worden bij de terreinbeheerder);
 - 1.2.2. er zijn geen (verdachte) afgestorven stengels of onbegroeide plekken aanwezig;
 - 1.2.3. de gehele deellocatie is onderzocht (zo niet, splits eventueel deellocaties uit).

Markeer alle aangetroffen Aziatische duizendknopen op een kaart en maak foto's van de locatie. De schaal van de kaart moet zo worden gekozen dat de locaties voldoende nauwkeurig kunnen worden vastgesteld (handvat: 1:500 voor locaties onder 1 hectare). Bepaal de oppervlakte van de (deel)locatie.

Hoewel er geen wetgeving is die u verplicht om aan bijvoorbeeld de gemeente te melden dat er Aziatische duizendknopen voorkomen op de locatie, wordt wel geadviseerd om dit te doen. Hiernaast kunt u waarnemingen registreren via bijvoorbeeld de app "snAPP de exoot", zodat deze ook in de landelijke database terecht komen van NDFF.

Conclusie veldinspectie

Indien met de locatieinspectie reeds Aziatische duizendknopen worden geconstateerd is verder onderzoek niet nodig (er is sprake van een nul-tolerantie, elk stukje plant kan uitgroeien tot een groeihaard). Indien op een deellocatie al reeds met zekerheid kan worden aangetoond dat er Aziatische duizendknopen aanwezig zijn, hoeft het plantmateriaal en/of de grond niet te worden bemonsterd. Dit kan uiteraard wel gedaan worden om te onderzoeken of het plantmateriaal levenskrachtig (ontkiembaar) is, bijvoorbeeld op locaties waar bestrijding plaats vindt.

Indien redelijkerwijs kan worden vastgesteld dat er geen Aziatische duizendknopen aanwezig zijn, is vervolgonderzoek eveneens niet nodig. Dit dient vastgesteld te worden door een onafhankelijk deskundige op basis van bijvoorbeeld de visuele waarnemingen, waar men ook rekening moet houden met het groeiseizoen en recente grond- of maaiwerkzaamheden. Visuele inspectie is dus in de meeste gevallen voldoende om locaties uit te sluiten, als de grond niet recent geroerd of de vegetatie gemaaid is. De efficiëntie van de uitgevoerde veldinspectie dient tenminste 80% te zijn (zie paragraaf "uitvoering" en bijlage 1).

Indien de aanwezigheid van Aziatische duizendknopen niet uitgesloten kan worden, kan men een tweede keer een veldinspectie doen (in betere omstandigheden) of een aanvullende onderzoeksinspanning doen door een "grondonderzoek" uit te voeren en plant- en/of wortelmateriaal te analyseren met behulp van een DNA-analyse of een kiemproof (zie hoofdstuk 5).

5: Inspectie en monsterneming plant- of grondmateriaal

Dit hoofdstuk heeft betrekking op de analyse van plantenmateriaal en bodem en omvat de processtappen vanaf de overdracht van monsters aan het laboratorium.

Er zijn verscheidene redenen om ervoor te kiezen een “bodemonderzoek” naar Aziatische duizendknopen uit te voeren. Denk bijvoorbeeld aan:

- Verticale afperking (tot hoe diep groeit het?);
- Bepalen of plantmateriaal nog kiemkrachtig is na bestrijding (zoals verhitten of “root reset”);
- Extra zekerheid krijgen buiten het groeiseizoen;
- Door recente werkzaamheden kan een inspectie niet afdoende zekerheid geven (zoals bij depots);
- (langdurige) monitoring van de locatie is niet mogelijk (zoals bij ex-situ depots).

Inspectie vindt plaats op de bovengrond (0,3 m-mv) of de verdachte bodemlaag. Controleer de bodemlaag op verdacht wortelmateriaal; controleer de gaten, grepen of sleuven (“meetpunten”) en bodemlagen één voor één om besmetting te voorkomen. Het aantal meetpunten is afhankelijk van de grootte van de (deel)locatie; zie ook de onderzoeksstrategieën voor in-situ en ex-situ onderzoek.

De meetpunten moeten op basis van de visuele inspectie over de (deel)locatie worden verdeeld. Indien er sprake is van een homogene locatie, kunnen de meetpunten aselekt worden verdeeld. In het geval van afperking rondom een groeihaard kunnen de meetpunten naar eigen inzicht verdeeld worden (handvat: 3 m vanaf de groeihaard boven maaiveld). Geef de posities van de gaten aan op een kaart of plattegrond en meet de punten in met een GPS of vanaf een vast punt.

Er dient van het meest onverdachte deel gewerkt te worden richting het meest verdachte deel om contaminatie te voorkomen. De mate van verdachtmaking kan op basis van ervaring afgeleid worden van de nabijheid van een groeiplaats, verspreidingsroutes (watergang, spoor, wegen) of zichtbaar (recent) grondverzet of maaibeheer.

De visuele inspectie van de opgegraven grond moet als volgt worden uitgevoerd:

- inspecteer de grond op wortelmateriaal, in het geval van zeefbare grond zoals zand kan dit gedaan worden met behulp van een zo fijn mogelijk zeef doch maximaal 20 mm zeefmaat;
- als alternatief mag men de grond ook op een verharde ondergrond verspreiden over een laagdikte van 2 cm en de grond uitharken met een hark met een tandbreedte van 2 cm;
- verzamel per deellocatie per traject van maximaal 0,5 m alle verdachte wortelmateriaal;
- verpak het verdachte materiaal op adequate wijze als monstermateriaal:
 - Grof materiaal (>20 mm; plantenmateriaal): gebruik een slibpot (720 mL) of ander gesloten verpakking van minimaal 600 en maximaal 1.000 mL groot. De wortelstukken dienen een lengte te hebben van minimaal 0,5 cm en maximaal 10 cm. Snij eventueel in het veld de plantendelen kleiner (doch met de “knopen” van de wortel) om aan deze lengte te voldoen.
 - In het geval van een kiemproef dient het gezamenlijke wortelmateriaal minimaal 50 gram en maximaal 200 gram te wegen. Stukken kleiner dan 5 mm worden niet meegenomen in de kiemproef (uitgangspunt is dat aangeleverde fractie >20 mm is);
 - In het geval van DNA-analyses dient een mengmonster samengesteld te worden van de meest verdachte plantdelen tot maximaal 10 met een afmeting van 5-10 cm. Dit is noodzakelijk om de betrouwbaarheid van de DNA analyse te garanderen. Eventueel kan men uiteraard ook meerdere mengmonsters samen stellen. Zeer grote wortelstukken hebben kwalitatief weinig meerwaarde. De uitkomst van de analyses is op monsterniveau, waarbij elk worteldeel wordt onderzocht per monster. Het heeft daarom slechts beperkte waarde om meerdere stukken of delen afkomstig van dezelfde wortel aan te leveren.
 - Fijn materiaal (<20 mm; bodem): indien men de fijne fractie, inclusief grond, wilt bemonsteren kan men een emmer gebruiken van 10L. Hoe kleiner de plantendelen, hoe minder kiemkrachtig de plantendelen zijn. Bij onderzoek naar de fijne fractie dient derhalve een DNA analyse te worden uitgevoerd.

- Opmerking: De bemonsteringswijze is anders bij onderzoek naar Japanse duizendknoop dan bij een reguliere AP04 keuring (gaten of sleuven in plaats van boringen, en zeven). Indien men het onderzoek uitvoert in aanvulling op een AP04 keuring, dient men daarom in totaal drie emmers te bemonsteren (twee voor de AP04 keuring, één voor Japanse duizendknoop).
- neem binnen een (deel)locatie (meng)monsters per traject van maximaal 0,5 m;
- (optioneel) bepaal per meetpunt en per traject van maximaal 0,5 m het bodemtype;
- dicht de gaten na afloop van het onderzoek; breng hierbij het uitgegraven, niet bemonsterde, materiaal terug op oorspronkelijke meetpunt en de diepte van de laag;
- zorg ervoor dat na monsterneming van deellocatie al het materiaal (handschoenen, schoenen, boor, zeef, kraan) schoon is en ontdaan van gronddeeltjes, voordat men de (deel)locatie verlaat en volgende (deel)locatie bemonsterd. Om materiaal schoon te houden wordt aanbevolen om zoveel mogelijk in droge omstandigheden te werken. Bij DNA-analyse kunnen zeer kleine plantdelen immers de resultaten van een laboratoriumanalyse beïnvloeden.

Afhankelijk van de resultaten van de visuele inspectie van het wortelmateriaal en de deellocaties moet een afweging worden gemaakt of en hoeveel mengmonsters en individuele monsters moeten worden samengesteld. Oranje wortels en witte rizomen zijn in principe verdacht, zie tevens ook informatieblad A (Herkenning) van het eerder genoemde Landelijk protocol.

Vaak kan al op basis van de locatieinspectie, danwel de beoordeling van de gezeefde wortels door een deskundige, al met zekerheid gesteld worden of er wel of niet sprake is van Aziatische duizendknopen. Indien op een deellocatie al reeds met zekerheid kan worden aangetoond dat er Aziatische duizendknopen aanwezig, hoeft het wortelmateriaal en de grond niet te worden geanalyseerd (dit kan ter verificatie van de visuele beoordeling wel aangeboden worden aan de opdrachtgever).

Wortelmateriaal van Aziatische duizendknopen is visueel te determineren maar het is wel lastiger dan het plantdeel wat zich boven het maaiveld bevindt (zo hebben meerdere planten oranje wortels of witte uitlopers). Indien er ook bij de deskundige hierover twijfel is, dient men bij het aantreffen van verdacht wortelmateriaal per (deel)locatie één mengmonster samen te stellen van het wortelmateriaal.

Bij grote hoeveelheden plantmateriaal kan per wortel een stukje (met knoop) worden afgesneden. Voor de mengmonsters van het verdachte plantmateriaal kan een slijbpot (720 ml) worden aangeleverd. Een gevulde slijbpot bevat afdoende materiaal voor de laboratoria om zowel een DNA als een kiemproef uit te voeren. Indien er geen verdacht plantmateriaal aanwezig (>20mm) is, kan eventueel een representatief mengmonster van de grond (met haarwortels) samengesteld worden. Bemonstering van fijn materiaal is in de praktijk alleen relevant voor gronddepots.



Afbeelding 5.1: uitgezeefde oranje wortel van Japanse duizendknoop

Onderzoeksstrategie in-situ grond (grond die nog aanwezig is in bodem)

Maak gaten met een minimum van 0,3 m diep in de bovengrond (wortelzone of in de verdachte bodemlaag. Hierbij wordt opgemerkt dat Aziatische duizendknopen (veel) dieper kunnen wortelen naar de ondergrond in de vorm van penwortels, maar dat de meeste wortels in deze bovengrond aanwezig zijn. In de bovengrond of verdachte

bodemlaag moet minimaal een gat van 30 cm x 30 cm worden gegraven. Als alternatief kunnen ook sleuven worden gegraven met een minigraver of kraan. In navolgende tabel is het aantal aanbevolen gaten en analyses opgenomen. Hier mag indien beargumenteerd en in overleg met de opdrachtgever van worden afgeweken. Redenen om af te wijken zijn bijvoorbeeld de doelstelling van het onderzoek, heterogeniteit van de locatie, en de uitvoerbaarheid.

Tabel 5.1: onderzoekstrategie in-situ grond

Oppervlakte (in ha) Locatie / deelgebied	Gaten tot maximaal 0,5 m in de verdachte laag	Aantal te analyseren (meng)monsters van verdacht wortelmateriaal
<0,01	3	1
0,01-0,05	4	1
0,05-0,1	6	1
0,1-0,15	8	2
0,15-0,20	12	2
0,20-0,30	13	3
0,30-0,40	14	3
0,40-0,50	17	3
0,50-0,70	18	3
0,70-0,90	21	4
0,90-1,00	22	4
P (p=aantal hectare)	11+11p	2+2p

OPMERKING De onderzoeksstrategie is afgeleid van de strategie 'verdachte locatie met diffuse bodembelasting, heterogeen verdeeld' van NEN 5707.

Onderzoeksstrategie ex-situ depotkeuring

Om van een homogene partij te spreken moet sprake zijn van dezelfde historie en herkomst, een eenduidige en gelijke textuur, vergelijkbare samenstelling / vergelijkbaar percentage aan bijmengingen en aaneengesloten percelen of depots. Dat betekent ook de verwachting van eenzelfde mate van belasting met Aziatische duizendknopen. Depots die niet homogeen zijn of niet aan elkaar grenzen mogen niet als één partij worden onderzocht.

Bij gronddepots is het lastiger om bij de maaiveldinspectie Aziatische duizendknopen te detecteren. Derhalve dient bij depots van meer dan 500 ton sleuven of grepen met een minigraver of kraan te worden gegraven (in plaats van handmatig met een schep inspectiegaten).

Per depot van maximaal 2.000 ton worden *minimaal* zes sleuven of grepen gegraven. Per depot van maximaal 10.000 ton worden *minimaal* 12 sleuven of grepen gegraven.

De sleuven of grepen worden zo representatief mogelijk gezet op basis van de visuele inspectie (of aselectief in een homogene situatie). Opgemerkt wordt dat indien het depot in combinatie met asbest wordt onderzocht, het depot maximaal 2.000 ton groot mag zijn (richtlijn voor asbestonderzoek). Hieruit wordt een hoeveelheid materiaal uit de partij genomen, die zonder verwijdering van de grove fractie (>20 mm) een maximale monstergrootte heeft van 500 kg.

Op de grove fractie (>20 mm) wordt visueel vastgesteld of er verdacht materiaal aanwezig is. Van het verdachte wortelmateriaal wordt een mengmonster samengesteld. Indien van een depot al reeds met zekerheid kan worden aangetoond dat er Aziatische duizendknopen aanwezig zijn, hoeft het wortelmateriaal niet te worden geanalyseerd (dit kan ter verificatie van de visuele beoordeling wel aangeboden worden aan de opdrachtgever).

Wortelmateriaal van Aziatische duizendknopen is visueel te determineren, maar het is wel lastiger dan het plantdeel wat zich boven het maaiveld bevindt (er hebben meerdere planten oranje wortels of witte uitlopers).

Indien er ook bij de deskundige hierover twijfel is, dient men bij het aantreffen van verdacht wortelmateriaal per (deel)locatie één mengmonster te samenstellen van het wortelmateriaal. Bij grote hoeveelheden wortelmateriaal kan per (soort) wortel een stukje worden afgesneden.

Wanneer er geen verdacht grof wortelmateriaal aanwezig is (>20 mm) kan eventueel de fijne fractie van de grond met haarwortels worden geanalyseerd (<20 mm). Dit kan bijvoorbeeld nodig zijn indien het depot reeds gezeefd is of bij extractief gereinigde grond.

Voor en na monsterneming dient al het materiaal (handschoenen, schoenen, boor, zeef, kraan) schoon gemaakt te worden en ontdaan van gronddeeltjes, voordat men het volgende depot bemonsterd. Een enkele cel kan de resultaten van een DNA analyse beïnvloeden.

In het geval van grond met Aziatische duizendknopen die (thermisch) gereinigd is of als de kiemkracht van verdacht wortel- en/of plantmateriaal gewenst is om te analyseren, dient een kiemproef te worden uitgevoerd. Als het gaat om een biologisch dode bodem, dient het verdachte plantmateriaal (dus niet grond) tijdens een kiemproef opgekweekt te worden in een (schone) vruchtbare grond.

Transport en opslag van monstername tot overdracht aan het laboratorium

Na monsternamen moeten worden getransporteerd en voor overdracht naar het lab worden opgeslagen bij 0° C tot omgevingstemperatuur. Bevroren en ontdooien van monster materiaal wordt afgeraden, omdat dit DNA-materiaal kan beschadigen.

Indien op de bodem op andere parameters moet worden onderzocht, let dan op de daarvoor geldende richtlijnen betreft temperatuur.

6: Laboratoriumwerkzaamheden

Dit hoofdstuk heeft betrekking op de analyse van plantenmateriaal en bodem en omvat de processtappen vanaf de overdracht van monsters aan het laboratorium.

De analyseprocedure beschreven in figuur 2.2, geeft technisch het proces weer vanaf monstername. Er zijn daar twee matrices te onderscheiden; plantenmateriaal en bodem. Het onderscheid daartussen wordt bepaald door de fractie waarin het in veld wordt verzameld.

Doordat deze twee matrices significant van elkaar verschillen zijn er twee analyseprotocollen opgesteld:

- *Protocol #1* beschrijft de analyse van plantenmateriaal op Aziatische duizendknopen. Dit is de fractie >20 mm
- *Protocol #2* beschrijft de analyse van bodem op Aziatische duizendknopen. Dit is de fractie <20 mm.

In de protocollen worden de volgende handelingen en daarbij eisen beschreven.

1. Algemene monstervoorbehandeling
2. Maken van deelmonsters voor DNA-analyse en kiemproef
3. Homogeniseren van deelmonsters voor DNA-analyse
4. DNA-analyse
5. Kiemproef

DNA-analyse Aziatische duizendknopen:

In een monster van Aziatische duizendknopen kan door middel van de techniek "Polymerase chain reaction (PCR)" Aziatische duizendknopen worden geïdentificeerd.

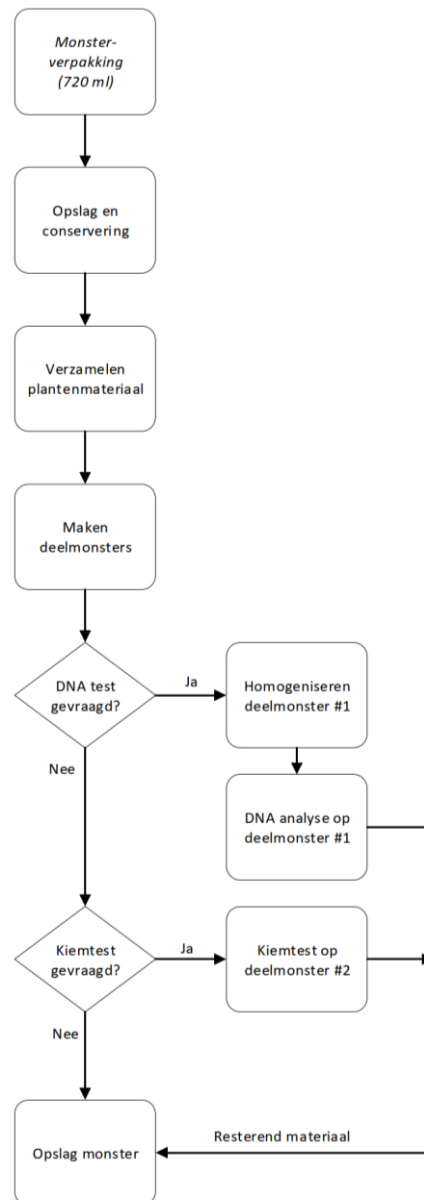
Elke bacterie, schimmel, planten of diersoort heeft zijn eigen DNA. Hoewel DNA grotendeels van soort tot soort hetzelfde is, zijn er bepaalde kleine stukjes die soort-specifiek zijn. Aan deze stukjes kan men identificeren of het gaat om Aziatische duizendknopen.

Opgemerkt wordt dat, hoewel onwaarschijnlijk, de soort-specifieke stukjes DNA waarop Aziatische duizendknopen geïdentificeerd kunnen worden, mogelijk overlapt met aanverwante soorten. Dit kan uiteindelijk alleen met verder onderzoek worden uitgesloten. Hiernaast kan er geen onderscheid worden gemaakt tussen kiemkrachtig en niet-kiemkrachtig materiaal. Dit kan bijvoorbeeld relevant zijn bij gereinigde grond.

Protocol #1 - Plantenmateriaal (fractie > 20 mm)

Dit protocol beschrijft de eisen en handelingen voor het analyseren van een laboratorium monster voor DNA of kiemproef op plantenmateriaal, verkregen volgens (veldwerkprotocol) na zieving over 20mm.

Er zijn twee analyses voorzien in dit protocol. Het betreft een test op aanwezigheid doormiddel van een DNA of qPCR test en een test op levensvatbaarheid. Daarbij wordt doormiddel van een kiemproef, vastgesteld of het materiaal levensvatbaar is en kan verspreiden.



Figuur 6.1. Werkwijze na bemonstering van de fractie >20 mm (plantenmateriaal)

Conservering

Voor monsterverpakking, overdacht en transport zie hoofdstuk 5.

Bewaarcondities op lab:

- Indien koel (4 ± 3 °C), 1 maand.

Lage temperatuur is niet dwingend, maar wordt aangeraden om microbiologische activiteit en schimmelgroei te beperken bij langdurige opslag.

Algemene monstervoorbehandeling

Monstervoorbehandeling omvat het verkrijgen van representatieve (deel)monsters uit het bij de monsterneming verkregen monster. Deze handelingen vinden plaats in het laboratorium.

Het uitgangspunt van dit protocol is dat de kans op vals negatieve resultaten zo klein mogelijk moet zijn, omdat een klein deel van een plant de potentie heeft te groeien. De monstervoorbehandeling en deelmonsternamen is daarom een kritisch onderdeel. Nadat is vastgesteld welke analyses uitgevoerd moeten worden op het materiaal worden de volgende stappen doorlopen:

Stap 1. Selecteer en verzamel monstermateriaal. Beoordeel de geschiktheid van het monstermateriaal.

Verzamel handmatig de organische plantendelen uit de verpakking en verwijder eventueel (los) aanhangende grond van het monster.

Het verwijderen van aanhangende grond is beschreven om een zuiverdere schatting van de hoeveelheid monstermateriaal bij verdere deelmonsternamen mogelijk te maken.

Stap 2. Vaststellen aantal plantendelen

Bepaal de hoeveelheid plantendelen. Gebruik daarvoor de onderstaande definitie.

Ga verder naar stap 3 of stap 4

Plantdeel: delen van plant dat aan één stuk aan elkaar verbonden is. Bladeren worden voor deze definitie niet inbegrepen.

Als een plantendeel < 0,5 cm in lengte, dan is het toegestaan om deze niet mee te tellen. Dit om onnodige analysekosten te voorkomen. Het uitgangspunt is namelijk dat de fractie aangeleverd in het lab al > 20mm is. Kleine delen in het monster zijn dus in principe afkomstig van de grotere delen. (Bijvoorbeeld door breken van grotere plantendelen tijdens verpakken en transport) Daarnaast is vastgesteld dat een plantendeel < 0,4 cm niet meer kiemkrachtig is.

Stap 3. Deelmonsternamen DNA-analyse

Werkwijze als er '1-10' plantendelen zijn aangeleverd;

- Snij en/of knip een klein deel van **elk** afzonderlijk plantendeel af voor DNA test. Doe dit zodanig dat de levensvatbaarheid van het materiaal niet in het geding komt: bijvoorbeeld een blad, deel van stengel, zijtak of wortel etc. Voer dit uit zodanig dat de massa van elk deel gelijk is. Deze beoordeling mag visueel.

Het is voor de DNA test niet relevant of het plantendeel levensvatbaar is. In tegenstelling tot de kiemproef. Uit de praktijk blijkt dat een ervaren persoon een beoordeling van levensvatbare delen én verdeling van massa visueel goed kan maken. Als richtlijn mag een plantendeel niet minder dan 1:10 vertegenwoordigd zijn in het mengsel. De minimale hoeveelheid materiaal wordt daarom niet voorgeschreven.

- Zorg dat er voldoende materiaal verzameld wordt zodat dit in een volgende stap kan worden gehomogeniseerd. Sla het materiaal voor de DNA test op in een geschikte verpakking. Dit is deelmonster #1. In Stap 4 worden de handelingen van DNA-analyse verder beschreven.
- Sla de resterende plantendelen op. Dit is deelmonster #2.

Als de grootste lengtemaat van het plantendeel > 30 cm in lengte is, dan is het toegestaan om een deel te verkleinen tot 30 cm.

Werkwijze deelmonsternamen als er '>10' plantendelen zijn aangeleverd;

In dit geval is het niet mogelijk om een 1:10 verhouding te verkrijgen voor de DNA-analyse. Daarom moeten er meerdere sets van monsters worden gemaakt om tot die verhouding te komen.

- Tel het aantal plantendelen en verdeel ze in gelijke sets van plantendelen. Doe dit zodanig dat elke set maximaal 10 plantendelen bevat. Bijvoorbeeld in geval van 13 delen: 1 set van 7 plantendelen en 1 set van 6 plantendelen.
- Behandel deze sets van plantendelen verder als afzonderlijke monsters volgens Stap 3.
- Sla de resterende plantendelen op. Dit is deelmonster #2.

Stap 4. Deelmonstername kiemproef:

Indien geen DNA-analyse is gevraagd:

- Neem het monster, verkregen na Stap 2, in zijn geheel in behandeling.

Indien wel DNA-analyse is gevraagd:

- Neem deelmonster #2, in zijn geheel, in behandeling voor de kiemproef. Verder op het protocol wordt de kiemproef beschreven.

Monsteranalyse

Monsteranalyse omvat de stappen die nodig zijn om vanaf het deelmonster van de algemene monstervoorbehandeling tot een resultaat te komen voor DNA analyse en kiemproef.

Homogeniseren deelmonster voor DNA-analyse (Deelmonster #1)

Op het moment dat deelmonster #1 (Stap 3) niet in zijn geheel in behandeling kan worden genomen voor de analyse, zal het moeten worden gehomogeniseerd.

- Deelmonster #1 moet zodanig gemengd en/of vermalen worden dat verdere deelmonstername een representatief deelmonster oplevert.

Het vermalen van plantenmateriaal kan lastig zijn. Het kan bestaan uit zowel hardere als zacht (en nat) materiaal. Cryogeen malen, i.c.m. een messenmolen kan geschikt zijn als eerste stap.

- Er is geen eis aan de hoeveelheid monster die moet worden ingezet bij het vermalen.
- Het homogeniseren mag in meerdere opeenvolgende stappen.
- Laboratoria zijn vrij in het kiezen van een homogenisatiemethode. Het volledige homogenisatieproces moet daarom wel onderdeel zijn van de methodevalidatie. Daarbij is het verplicht om aan te tonen dat het proces voldoende geschikt is om Aziatische duizendknopen aan te tonen bij een startverhouding van 1:10 (plantendelen van Aziatische duizendknopen : plantendelen anders dan Aziatische duizendknopen).
- Er moet aangetoond worden dat er geen risico is dat er DNA-contaminatie op treed na een meng/vermalingsstap.

DNA-analyse (op deelmonster #1)

Hieronder staan puntsgewijs de handelingen en zaken waaraan de DNA-analyse moet voldoen.

- Een deelmonster van de gehomogeniseerde plantendelen wordt gebruikt voor de extractie en opzuivering van DNA.
- Het gezuiverde DNA wordt gebruikt voor een qPCR reactie met als specifiek target het DNA van de Aziatische duizendknopen.
- Neem controles mee zowel voor de DNA extractie-stap als voor de PCR-stap.
- De uitgevoerde qPCR test is gevoelig genoeg om in het geval van een verhouding van tenminste 1:10 (plantendelen van Aziatische duizendknopen : plantendelen anders dan Aziatische duizendknopen) in het aangeleverde monster een positief signaal te genereren.
- De DNA-analyse, mag niet de soorten planten beschreven in tabel 6.1 als Aziatische duizendknopen aanduiden (vals positieven).

Tabel 6.1. Plantensoorten die niet bij de DNA proef als positief gekenmerkt wordt als zijnde ADK.

Naam #1	Naam #2
Polygonum aviculare	gewoon varkensgras
Polygonum persicaria	perzikkruid
Polygonum capitatum	kogelduizendknoop
Rumex crispus	krulzuring
Rumex pulcher	fraaie zuring
Rumex obtusifolius	ridderzuring
Rumex acetosa	veldzuring
Falopia convolvulus	zwaluwtong
Falopia aubertii	bruidsluier

Fallopia dumetorum	heggeduizendknoop
Muehlenbeckia axillaris	
Muehlenbeckia complexa	
Persicaria wallichii*	Afgaanse duizendknoop
Persicaria x fennica*	Finse duizendknoop

* Persicaria wallichii (Afgaanse duizendknoop) & Persicaria x fennica (Finse duizendknoop) zijn nog niet door de laboratoria getest (vanwege een gebrek aan beschikbaarheid over oorspronkelijk materiaal). Vanuit genetisch perspectief is het zeer onlogisch dat deze een (vals)positief resultaat geven.

Kiemproef (deelmonster #2)

De kiemproef is gebaseerd op relevante aspecten van CSS99048: 'Soil, sludge and treated biowaste - Determination of viable plant seeds and propagules' en is van toepassing op wortelmateriaal van Aziatische duizendknopen in grond- en bodemmonsters. Het monstermateriaal (dwz. Schoon materiaal tussen 0,5 cm – 10 cm) wordt gedurende de analyse bij een gunstige bodemvochtigheidsgraad in een belichte en geconditioneerde ruimte weggezet, waarna de opgekomen kiemplanten worden gedetermineerd of ze van een Aziatische duizendknoop zijn.

Werkwijze:

Het deelmonster uit Stap 3 wordt indien nodig opgeknipt in stukken van max. 10 cm met een scherpe snoeischaar. Er wordt per monster minimaal 50 en maximaal 200 gram wortelmateriaal ingezet.

Er is een eis aan gewicht gesteld, omdat dit in de praktijk blijkt een betere richtlijn te zijn voor deze test dan andere maten, zoals aantallen of lengte.

Als er meer dan 200 gram wortelmateriaal wordt aangeleverd, wordt redelijkerwijs van ieder worteldeel een deelmonster genomen en ingezet.

Als er minder dan 50 gram wortelmateriaal is aangeleverd, moet een disclaimer geplaatst worden; "Te weinig monstermateriaal aangeleverd, al het aangeleverde materiaal is ingezet".

Monstermateriaal dat overblijft, wordt tot twee weken na de rapportage van de analyse in de koeling bewaard.

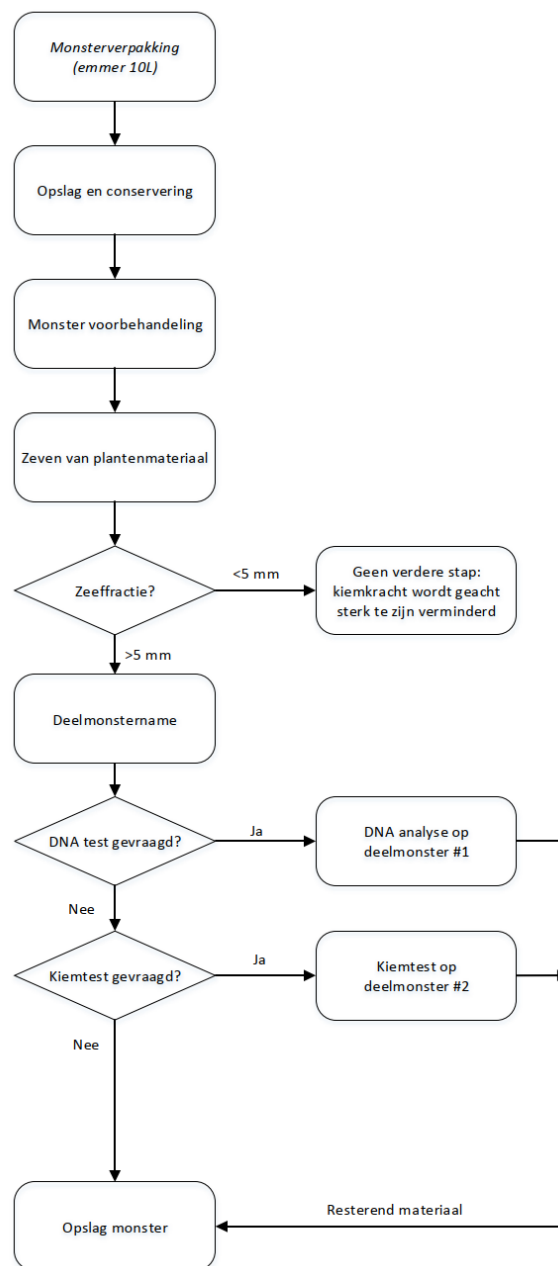
1. Er wordt visueel beoordeeld of het wortelmateriaal lijkt op dat van een Aziatische Duizendknoop. Dit wordt op het monsterformulier genoteerd.
2. Het wortelmateriaal dat wordt ingezet, wordt eerst ingewogen.
3. Het onderzoek wordt eerst voorzien van een capillaire teeltmat.
4. Er wordt ca. 3 liter substraat (potgrond) aangebracht en gelijkmatig verdeeld in een lege, schone onderzoeksbak. Hierop wordt het wortelmateriaal gelijkmatig uitgespreid. Het substraat is qua voeding en zuurgraad toegespitst op groeiomstandigheden Aziatische Duizendknopen.
5. Er worden 3 gerstzaden toegevoegd ter controle.
6. Er wordt nogmaals ca. 3 liter substraat aangebracht over de worteldelen en gerstzaden in de onderzoeksbak, en gelijkmatig verdeeld. Alle worteldelen moeten bedekt zijn met substraat.
7. De onderzoeksbak wordt bevochtigd tot volledige verzadiging.
8. De onderzoeksbak wordt afgedekt met een transparante kunststofplaat en in de geconditioneerde ruimte geplaatst.
9. De onderzoeksbak wordt gedurende een periode van 6 weken weggezet onder gunstige klimaatomstandigheden: licht en warmte, zonder direct zonlicht, in geconditioneerde ruimte.
10. Het vochtverlies wordt dagelijks beoordeeld. Vochtverlies door verdamping en plantopname wordt handmatig aangevuld; de bakken mogen niet te ver uitdrogen.
11. Het monster wordt tweemaal per week visueel beoordeeld op opgekomen kiemen.
12. Het onderzoek is afgerond wanneer de Aziatische duizendknoop kiemt (positieve test), of wanneer de maximale onderzoekduur van 6 weken is verstreken zonder dat kiemen waarneembaar zijn (negatieve test). Het testresultaat is dus negatief of positief.
13. Wanneer er minder dan 2 zomergerstzaden zijn opgekomen, is de kiemproef niet representatief en moet deze worden herhaald. Als er geen wortelmateriaal meer beschikbaar is, moet een herbemonstering worden aangevraagd.

14. Van het eindresultaat wordt een foto gemaakt door middel van een foto-opstelling. De foto wordt bijgevoegd op het analyseverslag.

Protocol #2 – Bodem (fractie < 20mm)

Dit protocol beschrijft de eisen en handelingen voor het analyseren van een laboratorium monster voor DNA of kiemproef op plantenmateriaal, verkregen uit bodem.

Er zijn twee analyses voorzien in dit protocol. Het betreft een test op aanwezigheid doormiddel van een DNA of qPCR test en een test op levensvatbaarheid. Daarbij wordt doormiddel van een kiemproef, vastgesteld of het materiaal levensvatbaar is en kan verspreiden.



Figuur 6.2. Werkwijze na bemonstering van fractie <20 mm (bodem)

Conservering

Voor monsterverpakking, overdacht en transport zie hoofdstuk 5.

Bewaarcondities op lab:

- Indien koel (4 ± 3 °C), 1 maand.

Lage temperatuur is niet dwingend, maar wordt aangeraden om microbiologische activiteit en schimmelgroei te beperken bij langdurige opslag.

Protocol monstervoorbehandeling bodem (fractie < 20 mm)

Monstervoorbehandeling omvat het verkrijgen van representatieve (deel)monsters uit het bij de monsterneming verkregen monster. Deze handelingen vinden plaats in het laboratorium.

Het uitgangspunt van dit protocol is dat de kans op vals negatieve resultaten zo klein mogelijk moet zijn, omdat een klein deel van een plant de potentie heeft te groeien. De monstervoorbehandeling en deelmonsternamen is daarom een kritisch onderdeel.

Doorloop de volgende stappen voor elk aangeleverd monster:

- Stel vast welke analyses uitgevoerd moeten worden op het materiaal
- Bepaal geschiktheid van monstermateriaal en voer zieving uit als eerste stap om plantenmateriaal te scheiden van bodem, volg Stap 1.
- Verkrijg plantenmateriaal uit zeeffracties, volg Stap 2.
- Indien DNA-analyse moet worden uitgevoerd, volg Stap 3.
- Indien kiemproef moet worden uitgevoerd, volg Stap 4.

Stap 1. Algemene monstervoorbehandeling

- Beoordeel de geschiktheid van het monstermateriaal. En maak een inschatting van de hoeveelheid organisch materiaal.
- Maak een deelmonster van 0,25-2 kg bedoelt voor verdere analyse op Aziatische Duizendknopen, afhankelijk van de geschatte hoeveelheid organisch materiaal. Richtlijn is om ongeveer 50-200 gram organisch materiaal te verkrijgen. Voer de deelmonsternamen uit d.m.v. steken en hanteer eisen uit NVN 7302 § 5.3.2.
- Zeef het verzamelde deelmonster over een zeefopstelling met een zeef met maaswijdte van 20 en 5 mm.

Het nat zeven van monstermateriaal wordt aangeraden. Het is niet toegestaan het monster te drogen bij temperaturen hoger dan kamertemperatuur.

- Controleer of er plantendelen op de zeef van 20 mm aanwezig zijn. Dit is zeeffractie #1. Rapporteer de aanwezigheid als de massa meer is dan 5% van zeeffractie #2.
- Verzamel de fractie die op de zeef van 5 mm blijft liggen. Dit is zeeffractie #2.
- Verzamel de fractie die door de zeef van 5 mm gaat. Dit is zeeffractie #3.

Indien een DNA-test is aangevraagd, zorg dan dat de zeven zodanig schoon zijn dat er geen contaminatie op kan treden. Er worden geen analyses uitgevoerd op zeeffractie #3.

Er worden geen analyses uitgevoerd op zeeffractie #3; De waarschijnlijkheid dat een plantendeel van ADK kiemkrachtig is, neemt sterk af naarmate de plantendelen kleiner worden. Het risico op een vals negatieve uitslag wordt verwacht zeer laag te zijn bij de fractie kleiner dan 5 mm. Uit onderzoek is gebleken in de fractie kleiner dan 5 mm, specifiek enkel nog de knopen van een plant mogelijk zouden kunnen ontkiemen. Daarnaast is het onwaarschijnlijk dat in een natuurlijke bodem enkel plantendelen aanwezig zijn < 5 mm.

Stap 2 Verzamelen plantendelen voor DNA en kiemproef

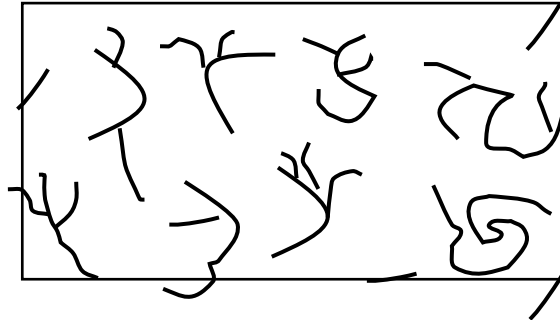
- Verzamel zo goed als mogelijk uit zeeffractie #1 (> 20 mm) en #2 (> 5 mm), alle organische plantendelen. Dit is deelmonster #1. Gebruik voor een plantdeel de volgende definitie:

Plantdeel: delen van plant dat aan één stuk aan elkaar verbonden is. Bladeren worden voor deze definitie niet inbegrepen.

- Optie: Indien de hoeveelheid plantendelen erg groot is (meer dan ~200 gram), verzamel dan willekeurig zoveel materiaal totdat een oppervlakte van maximaal een vel papier van A4 formaat (210x297mm)

gevuld is voor de DNA-test. Dit is deelmonster #2. Houd hier rekening met een ruimte van ongeveer 1 cm tussen de plantendelen. Zie onderstaande afbeelding als voorbeeld van het principe.

In dit geval wordt mogelijk niet het gehele monster doorzocht. Echter in bovenstaande gevallen zoveel materiaal voorhanden om een representatieve uitspraak te kunnen doen over het monster. Bij onzekerheid zou de opdrachtverlener kunnen vragen om meerdere zevingen en analyses.



Afbeelding 6.1. Weergave van verzameling van plantendelen uitgespreid op een vel papier.

- Indien de hoeveelheid plantendelen erg klein is (<50 gram) en er minder dan 2 kg behandeling is genomen bij het zeven (in Stap 1), zal het nodig zijn om nog meer te zeven tot een maximum van 2 kg ingezet materiaal.

Indien het evident is dat dit niet zal leiden tot een significante vermeerdering van de hoeveelheid plantendelen dan is het niet verplicht om het gehele monster te onderzoeken.

- Indien uiteindelijk de hoeveelheid plantendelen erg klein is (<50 gram), ondanks het vergroten van de monsterhoeveelheid, dan moet dit kenbaar gemaakt worden aan de klant met een melding dat de representativiteit van de test hierdoor kan zijn verminderd.

Stap 3 Deelmonstername DNA-analyse

Prepareer nu deelmonsters voor het uitvoeren van DNA-analyse en kiemproef. Waarbij eerst een deelmonster voor DNA-analyse moet worden genomen.

Indien DNA-analyse is gevraagd:

- Selecteer uit deelmonster #1, of #2 (indien deelmonster #1 > 200 g) de 10 grootste plantendelen.
- Snij en/of knip een klein deel van elk afzonderlijk plantendeel af voor DNA test. Doe dit zodanig dat de levensvatbaarheid van het materiaal niet in het geding komt: bijvoorbeeld een blad, deel van stengel, zijtak of wortel etc. Voer dit uit zodanig dat de massa van elk deel gelijk is. Deze beoordeling mag visueel.

Het is voor de DNA test niet relevant of het plantendeel levensvatbaar is. In tegenstelling tot de kiemproef. Uit de praktijk blijkt dat een ervaren persoon een beoordeling van levensvatbare delen én verdeling van massa visueel goed kan maken. Als richtlijn mag een plantendeel niet minder dan 1:10 vertegenwoordigd zijn in het mengsel. De minimale hoeveelheid materiaal wordt daarom niet voorgeschreven.

- Zorg dat er voldoende materiaal verzameld wordt zodat dit in een volgende stap kan worden gehomogeniseerd. Sla het materiaal voor de DNA test op in een geschikte verpakking. Dit is deelmonster #3. In Stap 1 worden de handelingen van DNA-analyse verder beschreven.
- Sla de resterende plantendelen op. Dit is deelmonster #4.

Stap 4 Deelmonstername kiemproef

Indien geen DNA-analyse is gevraagd:

- Neem het monster, verkregen na Stap 2, in zijn geheel in behandeling.

Indien wel DNA-analyse is gevraagd:

- Neem deelmonster #3, in zijn geheel, in behandeling voor de kiemproef. In Stap 3 worden de handelingen van kiemproef verder beschreven.

Monsteranalyse

Monsteranalyse omvat de stappen die nodig zijn om vanaf het deelmonster van de algemene monstervoorbehandeling tot een resultaat te komen.

- Indien DNA-analyse moet worden uitgevoerd, zie Stap 1 en Stap 2.
- Indien kiemproef moet worden uitgevoerd, zie Stap 3.

Homogeniseren deelmonster voor DNA-analyse (deelmonster #3)

Op het moment dat deelmonster #1 (Stap 2) niet in zijn geheel in behandeling kan worden genomen voor de analyse, zal het moeten worden gehomogeniseerd.

- Deelmonster #1 moet zodanig gemengd en/of vermalen worden dat verdere deelmonsternamen een representatief deelmonster oplevert.

Het vermalen van plantenmateriaal kan lastig zijn. Het kan bestaan uit zowel hardere als zacht (en nat) materiaal. Cryogeen malen, i.c.m. een messenmolen kan geschikt zijn als eerste stap.

- Er is geen eis aan de hoeveelheid monster die moet worden ingezet.
- Het homogeniseren mag in meerdere opeenvolgende stappen.
- Laboratoria zijn vrij in het kiezen van een homogenisatiemethode. Het volledige homogenisatieproces moet daarom wel onderdeel zijn van de methodevalidatie. Daarbij is het verplicht om aan te tonen dat het proces voldoende geschikt is om Aziatische duizendknopen aan te tonen bij een startverhouding van 1:10 (plantendelen van Aziatische duizendknopen : plantendelen anders dan Aziatische duizendknopen).
- Er moet aangetoond worden dat er geen risico is dat er DNA besmetting kan plaatsvinden.

DNA-analyse (op deelmonster #3)

Hieronder staan puntsgewijs de handelingen en zaken waaraan de DNA-analyse moet voldoen.

- Een deelmonster van de gehomogeniseerde plantendelen wordt gebruikt voor de extractie en opzuivering van DNA.
- Het gezuiverde DNA wordt gebruikt voor een qPCR reactie met als specifiek target het DNA van Aziatische duizendknopen.
- Neem controles mee zowel voor de DNA extractie-stap als voor de PCR-stap.
- De uitgevoerde qPCR test is gevoelig genoeg om in het geval van een verhouding van tenminste 1:10 (plantendelen van Aziatische duizendknopen : plantendelen anders dan Aziatische duizendknopen) in het aangeleverde monster een positief signaal te genereren.
- De DNA-analyse, mag niet de soorten planten beschreven in tabel 6.2 als Aziatische duizendknopen aanduiden (vals positieven).

Tabel 6.2. Plantensoorten die niet bij de DNA proef als positief gekenmerkt wordt als zijnde ADK.

Naam #1	Naam #2
Polygonum aviculare	gewoon varkensgras
Polygonum persicaria	perzikkruid
Polygonum capitatum	kogelduizendknoop
Rumex crispus	krulzuring
Rumex pulcher	fraaie zuring
Rumex obtusifolius	ridderzuring
Rumex acetosa	veldzuring
Falopia convolvulus	zwaluwtong
Falopia aubertii	bruidsluier
Falopia dumetorum	hegeduizendknoop
Muehlenbeckia axillaris	
Muehlenbeckia complexa	
Persicaria wallichii*	Afgaanse duizendknoop
Persicaria x fennica*	Finse duizendknoop

* *Persicaria wallichii* (Afgaanse duizendknoop) & *Persicaria x fennica* (Finse duizendknoop) zijn nog niet door de laboratoria getest (vanwege een gebrek aan beschikbaarheid over oorspronkelijk materiaal). Vanuit genetisch perspectief is het zeer onlogisch dat deze een (vals)positief resultaat geven.

Kiemproef (deelmonster #4)

De kiemproef is gebaseerd op de relevante onderdelen van CSS99048: 'Soil, sludge and treated biowaste - Determination of viable plant seeds and propagules' en is van toepassing op wortelmateriaal van Aziatische duizendknopen in grond- en bodemonsters. Het monstermateriaal (d.w.z. Schoon materiaal tussen 0,5 cm – 10 cm) wordt gedurende de analyse bij een gunstige bodemvochtigheidsgraad in een belichte en geconditioneerde ruimte weggezet, waarna de opgekomen kiemplanten worden gedetermineerd of ze van een Aziatische duizendknoop zijn.

Werkwijze:

Het deelmonster uit Stap 3 wordt indien nodig opgeknipt in stukken van max. 10 cm met een scherpe snoeischaar. Er wordt per monster minimaal 50 en maximaal 200 gram wortelmateriaal ingezet.

Er is een eis aan gewicht gesteld, omdat dit in de praktijk blijkt een betere richtlijn te zijn voor deze test dan andere maten; zoals aantallen of lengte.

Als er meer dan 200 gram wortelmateriaal wordt aangeleverd, wordt redelijkerwijs van ieder worteldeel een deelmonster genomen en ingezet.

Als er minder dan 50 gram wortelmateriaal is aangeleverd, moet een disclaimer geplaatst worden; "Er is minder dan 50 gram wortelmateriaal aangeleverd, dit is te weinig, al het aangeleverde materiaal is ingezet".

Monstermateriaal dat overblijft, wordt tot twee weken na de rapportage van de analyse in de koeling bewaard.

1. Er wordt visueel beoordeeld of het wortelmateriaal lijkt op dat van een Aziatische Duizendknoop. Dit wordt op het monsterformulier genoteerd.
2. Het wortelmateriaal dat wordt ingezet, wordt eerst ingewogen.
3. Het onderzoek wordt eerst voorzien van een capillaire teeltmat.
4. Er wordt ca. 3 liter substraat (potgrond) aangebracht en gelijkmatig verdeeld in een lege, schone onderzoeksbak. Hierop wordt het wortelmateriaal gelijkmatig uitgespreid. Het substraat is qua voeding en zuurgraad toegespitst op groeicondities Aziatische Duizendknopen.
5. Er worden 3 gerstzaden toegevoegd ter controle.
6. Er wordt nogmaals ca. 3 liter substraat aangebracht over de worteldelen en gerstzaden in de onderzoeksbak, en gelijkmatig verdeeld. Alle worteldelen moeten bedekt zijn met substraat.
7. De onderzoeksbak wordt bevochtigd tot volledige verzadiging.
8. De onderzoeksbak wordt afgedekt met een transparante kunststofplaat en in de geconditioneerde ruimte geplaatst.
9. De onderzoeksbak wordt gedurende een periode van 6 weken weggezet onder gunstige klimaatomstandigheden: licht en warmte, zonder direct zonlicht, in een geconditioneerde ruimte.
10. Het vochtverlies wordt dagelijks beoordeeld. Vochtverlies door verdamping en plantopname wordt handmatig aangevuld; de bakken mogen niet te ver uitdrogen.
11. Het monster wordt tweemaal per week visueel beoordeeld op opgekomen kiemen.
12. Het onderzoek is afgerond wanneer de Aziatische duizendknoop kiemt (positieve test), of wanneer de maximale onderzoekduur van 6 weken is verstreken zonder dat kiemen waarneembaar zijn (negatieve test). Het testresultaat is dus negatief of positief.
13. Wanneer er minder dan 2 zomergerstzaden zijn opgekomen, is de kiemproef niet representatief en moet deze worden herhaald. Als er geen wortelmateriaal meer beschikbaar is, moet een herbemonstering worden aangevraagd.
14. Van het eindresultaat wordt een foto gemaakt door middel van een foto-opstelling. De foto wordt bijgevoegd op het analyseverslag.

7: Onderzoeksrapportage: Verwerking, interpretatie en toetsing

Meld nieuwe groeilocaties in het informatiesysteem dat gehanteerd wordt door de terreineigenaar (en/of NDFF). Het onderzoek wordt samengevat weergegeven in een (brief)rapport. Hierin is tenminste opgenomen:

- Auteur, opdrachtgever, datum van uitvoering, exacte locatie, etc.
- De onderzoeksmethode en eventuele afwijkingen van de methode;
- Resultaten van het vooronderzoek;
- Resultaten van het veldwerk en eventueel “bodemonderzoek”;
- Toetsing en conclusies;
 - Optioneel: advies met betrekking tot regelgeving, verwerkings- of bestrijdingsmogelijkheden;
- Tekening van onderzoekslocatie (inclusief noordpijl, schaalbalk, schaal bij voorkeur 1:500);
- Ingevuld veldwerkformulier.

Bijlage 1: Formulier locatieinspectie JDK

Datum inspectie (dd-mm-jjjj): Locatie:

Veldwerker: Paraaf:

Jan	Feb	Mrt	Apr	Mei	Jun	Jul	Aug	Sep	Okt	Nov	Dec

Kiemplanten met name van eind maart tot april; Winterbeeld in november-februari.

Omstandigheden inspectie:

Moment	Daglicht (100%)
	Schemering
	Donker (<50%)

Neerslag	Droog (100%)
	Neerslag
	Mist (<50% indien methode 3)
	Anders, namelijk:

Maaiveld	Braakliggend, ongeroerd (100%)
	Vegetatie lager dan 10 cm, niet gemaaid (100%)
	Vegetatie hoger dan 10 cm, niet gemaaid (100% in "groene" maanden)
	Vegetatie, gemaaid
	Geroerde grond (in situ)
	Geroerde grond (depot)
	Sneeuw
	Verharding
	Anders, namelijk:

Uitvoer inspectie

Methode 1	Stroken van 1,5 m, twee richtingen (<1 ha)
Methode 2	Stroken van 1,5 m, een richting (>1 ha)
Methode 3	Steekproefsgewijs (>1 ha, periode mei-september)

Efficiëntie	>95%	Hele locatie inspecteerbaar, daglicht, droog, geen recente werkzaamheden, etc.
	>80%	
	>50%	
	<50%	Buiten groeiseizoen, objecten/recente werkzaamheden, etc.

Resultaten / Aantekeningen

Bijlage 2: Veelgestelde vragen (FAQ)

1. Bestaat er een onderzoeksplicht naar Aziatische duizendknopen?

Nee, er is op moment van schrijven geen wettelijke onderzoeksplicht. Het is echter verboden om grond te vervoeren met (levensvatbare delen van) Aziatische duizendknopen, tenzij een vrijstelling van toepassing is. Het kan natuurlijk wel gevraagd zijn vanuit bijvoorbeeld een bestek, contract of andere wijze.

2. Wat wordt bedoel met nultolerantie?

Als er één stukje levensvatbaar plantmateriaal van Aziatische duizendknopen aanwezig is, is dit te veel. Eén stukje kan namelijk op termijn uitgroeien tot een groeihaard. Er wordt daarom niet getoetst aan een concentratienorm of gehalte, zoals gebruikelijk bij chemisch bodemonderzoek. Op basis van een onderzoek is de plant simpelweg wel of niet aangetroffen.

Er wordt met een nultolerantie NIET bedoeld dat met een onderzoek een 100% garantie gegeven kan worden dat er geen Aziatische duizendknoop aanwezig is in een depot of locatie.

3. Wanneer moet een bodemonderzoek uitgevoerd worden?

Dit dient vastgesteld te worden door een onafhankelijk deskundige op basis van bijvoorbeeld de visuele waarnemingen en verspreidingsroutes, waar men ook rekening moet houden met het groeiseizoen en recente grond- of maaiwerkzaamheden. Visuele inspectie is dus in de meeste gevallen voldoende om locaties uit te sluiten, als de grond niet recent geroerd of de vegetatie gemaaid is. De efficiëntie van de uitgevoerde veldinspectie dient tenminste 80% te zijn (zie bijlage 1).

4. Waarom mogen we geen reguliere grondboor gebruiken in plaats van gaten of sleuven graven?

Het gebruik van een grondboor biedt onvoldoende zekerheid dat er delen van wortelstokken mee naar boven komen. De boor gaat tussen de wortelstokken door of de fragmenten vallen er weer uit. Indien in de toekomst blijkt dat met een edelmanboor (met 2x50 grepen) ook betrouwbaar genoeg is in combinatie met een DNA analyse, zal dit meegenomen worden in een nieuwe versie van deze onderzoeksmethode.

5. Is het wel voldoende om tot 0,3 m-mv te graven (in-situ locaties)?

De meeste wortels bevinden zich in deze laag. Er kunnen wel penwortels groeien tot de grondwaterstand. Hoewel voor bestrijding van Aziatische duizendknopen het handig kan zijn om deze diepte ook te weten, is voor bevestiging van de aanwezigheid van duizendknoop niet nodig. Op locatie waar grondverzet heeft plaats gevonden, kan afhankelijk hiervan de verdachte laag uiteraard dieper liggen.

6. Er is duizendknoop aanwezig op mijn locatie of depot, wat nu?

Bepaal eerst of het nodig is om écht werkzaamheden uit te voeren binnen de groeihaard. Indien dit toch moet gebeuren, gebruik dan het protocol op www.bestrijdingduizendknoop.nl. Indien men de groeihaard wil bestrijden, maar dan gebruik van de beslisboom.

In het geval van een depot, is op dit moment thermische reiniging op tenminste 70 graden Celsius de meest gangbare methode om er voor te zorgen dat de grond toepasbaar is. Opgemerkt wordt dat transport van grond met levensvatbare delen van Aziatische duizendknopen verboden is (tenzij dit bijvoorbeeld gedaan wordt om het te bestrijden).

Voor feedback op het protocol of tips kunt u mailen naar info@vkb-online.nl



fenelab

