

Op zoek naar DNA van kleine marterachtigen

Pilotstudie najaar 2021

A&W-rapport 21-329



in opdracht van

provinsje fryslân
provincie fryslân 

Op zoek naar DNA van kleine marterachtigen

Pilotstudie najaar 2021

A&W-rapport 21-329

M. Sikkema
D. Bos
G.A. de Groot
M. Smaal

Foto Voorplaat

Hermelijn in Struikrover(r) Box, Foto: Buro Smaal

M. Sikkema, D. Bos, G.A. de Groot, M. Smaal, 2022

Op zoek naar DNA van kleine marterachtigen. Pilotstudie najaar 2021. A&W-rapport 21-329

Altenburg & Wymenga ecologisch onderzoek, Feanwâlden

Opdrachtgever

Provinsje Fryslân

Tweebaksmarkt 52
8911 KZ Leeuwarden
Telefoon 058 29 25 925

Uitvoerders

Altenburg & Wymenga ecologisch onderzoek bv

Suderwei 2
9269 TZ Feanwâlden
Telefoon 0511 47 47 64
info@altwym.nl
www.altwym.nl

Buro Smaal

Witterstraat 25
9401 SE Assen
Telefoon 06 43 92 93 81
matthijssmaal@gmail.com
www.burosmaal.nl

Wageningen Environmental Research (WENR)

Postbus 47
6700 AA Wageningen
Telefoon 0317 485 962
g.a.degroot@wur.nl
www.wageningenur.nl

© Altenburg & Wymenga ecologisch onderzoek bv. Overname van gegevens uit dit rapport is toegestaan met bronvermelding.

Projectnummer

21-329

Projectleider

M. Sikkema

Status

Definitief

Autorisatie

Goedgekeurd

Paraaf

A. Rippen

Datum

29 juni 2022



Kwaliteitscontrole

D. Bos

Paraaf



Inhoud

1	Inleiding	1
1.1	Doel van het onderzoek	1
1.2	Leeswijzer	2
2	Methode	3
2.1	DNA-verzamelbuizen	3
2.2	Struikrover® Box	4
2.3	Geurbuis	5
2.4	Spiegelbuis	6
2.5	Verificatie en betrouwbaarheid	7
2.6	Onderzoeksgebied	7
2.7	Proef afbraaksnelheid DNA	9
3	Resultaten veldproef	11
3.1	Bezoekfrequentie van marterachtigen per verzamelunit	11
3.2	eDNA in de verzamelunits en efficiëntie daarvan	12
3.3	Praktijkervaringen met de verschillende methoden	15
3.4	Kosten per valtype	15
3.5	Conclusie veldproef	17
4	Resultaten afbraaksnelheid DNA	18
4.1	Ervaringen uit eerder onderzoek (via experts en literatuurstudie)	18
4.2	Experimentele check van afbraaksnelheid	19
4.3	Conclusie afbraaksnelheid	21
5	Conclusies en aanbevelingen	22
5.1	Antwoord op de hoofdvragen	22
5.2	Conclusies	23
5.3	Aanbevelingen	25
6	Literatuur	27
	<i>Bijlage 1. Ideeën ter verbetering van de gebruikte technieken</i>	28
	<i>Bijlage 2. Kostenschatting per valtype</i>	29

Dankwoord

Dank aan Staatsbosbeheer voor het verlenen van toestemming voor het uitvoeren van deze pilot in hun terrein. Ook dank aan Pim en Mieke Lollinga van Faunavisie Wildcare in Westernieland voor het warme welkom en de behulpzaamheid bij het uitvoeren van de afbraakproef.

1 Inleiding

De provincie Fryslân is op zoek naar manieren om een goede monitoring van kleine marterachtigen (Wezel, Hermelijn en Bunzing) op te zetten om zodoende de Staat van Instandhouding (Svl) te kunnen bepalen. Hiervoor zijn gegevens nodig over huidige aantallen, trends en verspreiding van kleine marterachtigen. Veel van deze informatie is nu nog niet beschikbaar (van Norren & La Haye 2021).

Om een manier te vinden om de Svl in de toekomst wel te kunnen vaststellen, heeft de Zoogdiervereniging een expertmeeting georganiseerd (d.d. 29 juni 2021). Hierin is besproken welke data en welke onderzoekstechnieken denkbaar zijn. Er is een advies geformuleerd om twee sporen te verkennen voor het verzamelen van voldoende informatie over deze soorten. Eén spoor betreft het opzetten van een netwerk van cameravallen, om zodoende de informatie te verzamelen over het verspreidingsgebied van de soorten en eventuele trends daarin. Het tweede spoor betreft het verkennen van de mogelijkheid om de populatieomvang van Bunzing, Hermelijn en Wezel te meten met behulp van DNA. Er is geadviseerd om hiervoor een pilot uit te voeren met verschillende technieken voor het verzamelen van DNA van deze kleine marterachtigen. De Provincie Fryslân heeft vervolgens aan Altenburg & Wymenga gevraagd om een dergelijke pilot op te zetten en uit te voeren in het najaar van 2021.

De pilot betreft een onderzoek naar Bunzing, Hermelijn en Wezel, waarbij de haalbaarheid is getoetst van verschillende mogelijke methoden om bruikbaar DNA te verzamelen van deze soorten. De pilot is uitgevoerd in samenwerking met Buro Smaal en Wageningen Environmental Research (WENR).

1.1 Doel van het onderzoek

Het doel van de pilot is het vinden van de meest geschikte methodiek per martersoort voor het verzamelen van DNA voor individuele herkenning. Op de lange termijn is het doel om naast het wildcamera-meetnet voor het in beeld brengen van de verspreiding, ook een DNA-meetnet te plaatsen om de dichtheid en populatieontwikkeling van de soorten te bepalen op provinciaal niveau.

Het netwerk van cameravallen dient vragen te beantwoorden t.a.v. het verspreidingsgebied (toename, afname, stabiel), wat eerste informatie over een trend kan geven. Om een niveau dieper te gaan en daadwerkelijk iets over aantalsontwikkeling van de betreffende soorten te kunnen zeggen, is het DNA netwerk nodig. Dit geeft -in theorie- inzicht in de dichtheid en kan daarom belangrijk bijdragen aan het bepalen van de populatietrend.

Hoofdvragen

- 1- Wat is de haalbaarheid van verschillende verzameltechnieken om aan DNA materiaal te komen?
- 2- Na hoeveel dagen onder veldomstandigheden is het DNA nog van voldoende kwaliteit voor de gewenste (verwantschaps-) analyses?
- 3- Wat zijn daarmee op hoofdlijnen de kosten per techniek?
- 4- Wat is de meest geschikte methodiek per martersoort voor het verzamelen van DNA voor individuele herkenning, gezien het gestelde lange termijn doel?

Om deze vragen te beantwoorden is een pilot opgezet waarin drie verschillende 'DNA-verzamelbuizen' zijn getest. Deze worden besproken in hoofdstuk 2. De pilot is uitgevoerd om te

onderzoeken hoe vaak DNA uit verschillende bronnen te verzamelen is. Binnen het beschikbare budget was het niet haalbaar om het verzamelde DNA te analyseren. Dit beperkt uiteraard de interpretatie van de resultaten, maar geeft wel een beeld van de haalbaarheid van het eerste deel van de methode: is het überhaupt mogelijk om monsters te verzamelen. Om toch een indruk te krijgen van de kansen dat de verschillende monsters bruikbaar DNA opleveren, is parallel hieraan is een kleine proef opgezet waarbij werd gekeken naar de afbraaksnelheid van het DNA in twee monstertypen (keutels en speeksel). Bekend is namelijk dat DNA uit verschillende bronnen onder natuurlijke omstandigheden in een verschillend tempo zal vergaan, wat van invloed is op verschillen in haalbaarheid van verschillende monstertypen en dus verzamelmethoden.

1.2 Leeswijzer

In hoofdstuk 2 zullen eerst de gebruikte methoden worden besproken. Hoofdstuk 3 zal per methode de resultaten bespreken. Hoofdstuk 4 geeft inzicht in de afbraaksnelheid van DNA. Tot slot zal in hoofdstuk 5 een antwoord worden gegeven op de onderzoeksvragen, voorafgegaan door een discussie en gevolgd door een aanbeveling.



Foto 1.1 Hermelijn.

2 Methode

In dit hoofdstuk worden de verschillende methoden besproken waarmee DNA van de doelsoorten is getracht te verzamelen. Ook wordt het onderzoeksgebied waarin de pilot is uitgevoerd toegelicht. Tot slot wordt de opzet van de afbraaksnelheid proef besproken, deze is opgezet en uitgevoerd om gevoel te krijgen bij het benodigde of optimale interval waarmee de verzamelunits moeten worden bemonsterd. Dit is nodig zodat een zo optimaal mogelijk interval kan worden bepaald, waarbij een balans moet worden gevonden tussen de efficiëntie (zo weinig mogelijk veldbezoeken) en het verzamelen van bruikbare resultaten (DNA verzamelen voordat het vervallen is).

2.1 DNA-verzamelbuizen

Er zijn drie soorten 'DNA-verzamelbuizen' getest op effectiviteit. Dit zijn een geurbuis, spiegelbuis en Struikrover® Box. Van elk type verzamelbuis zijn 20 stuks gemaakt en ingezet. In elk van deze typen buizen zijn enkele methoden toegepast om de marterachten te lokken en om DNA te verzamelen. Soms bestaat daarbij overlap; een ei dient zowel voor het lokken van marters als voor het verzamelen van speeksel van de bijtrand. Ook tussen de verschillende buizen bestaat enige overlap in toegepaste methoden, zo is bijv. zowel in de geurbuis als in de spiegelbuis klittenband aangebracht om haren mee te verzamelen. In tabel 2.1 is per verzamelbuis een overzicht te vinden van de verschillende manieren om marterachtigen te lokken en om potentiële DNA bronnen te bemachtigen.

In de paragrafen 2.2 t/m 2.4 worden de verschillende modellen toegelicht. In deze paragraaf worden eerst enkele algemene opmerkingen over de verzamelbuizen geplaatst, en een overzicht gegeven van de verschillende eigenschappen. Voor alle buizen geldt dat het feit dat het een buis is, wat de marterachtigen al lokt doordat deze van nature nieuwsgierig zijn en hopen verkennen.

Tabel 2.1 Overzicht van gebruikte methoden per verzamelbuis om marterachtigen te lokken en om verschillende bronnen DNA te bemachtigen. In de eerste rij is ook geschetst met welke methode beoordeeld is welke soort de buis al dan niet heeft bezocht (verificatie).

	Methode	Potentiële DNA bron	Middel om te bemachtigen	Struikrover® Box	Geurbuis	Spiegelbuis
Verificatie marterachtige	Camera			x		
	Sporenbed				x	x
Lokmiddel	Ei			x		
	Struikroverolie			x		
	Mais met geuren				x	
	Spiegel					x
eDNA bronnen		Speeksel	Ei	x		
		Huidcellen	Struikroverolie op schuurpapier	x		
		Haren	Struikroverolie op schuurpapier	x		
		Haren	Klittenband		x	x
		Speeksel/neusslijm	Spiegel			x
		Keutels	Buis	x	x	x
		Urine	Buis	x	x	x

Uit tabel 2.1 is op te maken dat een enkele middel bij meerdere verzamelbuizen is toegepast (klittenband). Bij de interpretatie van de resultaten moet hiermee rekening worden gehouden, zo klittenband bijvoorbeeld 40 keer ingezet en is de methode spiegel 20 keer ingezet. Tabel 2.2 geeft overzicht van de potentieel maximaal score per methode van verzamelen van DNA per controleronde.

Tabel 2.2 Overzicht van het aantal keren dat een methode voor het verzamelen van DNA is ingezet.

	Potentiële DNA bron	Middel om te bemachtigen	Struikrover® Box	Geurbuis	Spiegelbuis	Totaal
eDNA bronnen	Speeksel	Ei	20			20
	Huidcellen	Struikroverolie op schuurpapier	20			20
	Haren	Struikroverolie op schuurpapier	20			20
	Haren	Klittenband		20	20	40
	Speeksel en/of neusslijm	Spiegel			20	20
	Keutels	Buis	20	20	20	60
	Urine	Buis	20	20	20	60

Controleronden

Elk van de 60 ingezette buizen is 3 maal gecontroleerd. De buizen zijn in het veld geplaatst op 29 oktober 2021. De eerste controle vond plaats op 11 en 12 november. De tweede controle vond plaats op 25 en 26 november, de derde en laatste controleronde was op 9 december. Het interval tussen de controles was daarom steeds 13 of 14 dagen (60 maal 13 dagen en 120 maal 14 dagen interval).

Tape en muizenlijm voor het verzamelen van haren

Tape en muizenlijm voor het verzamelen van haren zijn in deze pilot niet gebruikt. Tape is niet gebruikt omdat na wat eerste testen in en rond huis bleek dat de kleefkracht na uitdrogen van de tape al snel verdwijnt (pers. med. M. Smaal). De reden om af te zien van muizenlijm, is dat het een zeer kleverig middel is dat praktisch gezien onhandig lijkt te zijn. Het lijkt namelijk moeilijk om de lijm na een eerste inzet te vervangen/verversen, dit zou betekenen dat voor elke controleronde nieuwe buizen moeten worden uitgelegd ¹.

2.2 Struikrover® Box

De Struikrover® Box is bestaat uit een buis van 20 cm diameter en 50 cm lengte. Aan één zijde van de buis is een opening van 7,5 cm doorsnee, deze dient als toegang voor de marterachtigen. De andere zijde van de buis bestaat uit een te openen deksel. In de buis is een plank geschoven met op het uiteinde aan de zijde van de toegang een lange spijker waarop een ei kan worden geprikt. Aan de andere zijde van de plank is een frame bevestigd waarop een daarvoor aangepaste cameraval kan worden geplaatst. Het scherpstelpunt van de camera moet met een voorzetlens worden aangepast, afhankelijk van het gebruikte type camera (hier Browning Strike

¹ In de aanloop naar de pilot is al wel met de eigen IvD (Instituut voor Dierenwelzijn, intern bij A&W) het eventuele gebruik van muizenlijm besproken. Bij enkele thuishesten blijkt de lijm niet sterk genoeg om het gewicht van een Wezel te dragen, zodat het niet te verwachten is dat kleine marterachtigen dodelijk gewond raken of zwaar ongerief zullen ondervinden van de lijm. Door de toepassing in een buis wordt de kans sterk verkleind dat een muis of bijv. een Winterkoning in de lijm verstrikt raakt. Zodoende is na enig overleg het gebruik van muizenlijm voor het verzamelen van haren van kleine marterachtigen in eerste instantie door ons niet beoordeeld als een dierexperiment in de zin van de WoD (Wet op de Dierproeven).

Force HD Pro X) moet eventueel ook de IR belichting deels worden afgedekt. Tussen de camera en het ei bevindt zich een stuk grof schuurpapier waarop zogenaamde 'Struikroverolie' is aangebracht. Dit is een in Duitsland bestelde olie waarvan een aantrekkingskracht op marterachtigen wordt verondersteld.



Foto 2.1 Een Struikrover® Box gezien vanaf de achterkant.

2.3 Geurbuis

De geurbuis bestaat uit een 100 cm lange buis van 10 cm diameter. Aan één zijde bevindt zich een opening van 10 cm die dient als ingang. Aan de andere zijde van de buis bevindt zich een compartiment van 10 cm lengte waarin maïs zit met toegevoegde geurstoffen als lokmiddel (leverextract, anijs en zalmolie). Door een kleine opening van 3 cm is de toegang tot de maïs beperkt, zodat deze niet in enkele nachten door muizen en ratten wordt verorberd. Net voor deze opening naar de maïs, bevindt zich een uitgang van 5 cm diameter aan de zijkant van de buis. Aan de bovenzijde van deze uitgang is klittenband aangebracht. Tussen de opening en de uitgang bevindt zich een sporenbed.



Foto 2.2 Het compartiment van een geurbuis.

2.4 Spiegelbuis

Evenals de geurbuis bestaat de spiegelbuis uit een 100 cm lange buis, maar dan met een diameter van 12 cm diameter. Aan één zijde bevindt zich een opening van 12 cm die dient als ingang. Aan de andere zijde van de buis bevindt zich plexiglas en een spiegel, zodat het lijkt alsof het mogelijk is om door de buis heen te lopen. Aan de bovenzijde en zijkanten van de spiegel is klittenband aangebracht. In het midden van de buis bevindt zich een sporenbed.



Foto 2.3 Spiegelbuis, de plank met sporenbed, spiegel en klittenband wordt in de buis geschoven..

2.5 Verificatie en betrouwbaarheid

Omdat het verzamelde DNA binnen deze pilot niet geanalyseerd is, is ervoor gekozen om bij elke verzamelbuis een verificatiemethode toe te passen om te kunnen bepalen of deze door één van de doelsoorten is betreden. En zodoende beter in te schatten of er DNA is verzameld of niet. Zonder deze verificatie is van bijvoorbeeld een aangevreten ei niet vast te stellen of deze door een Wezel of een Gewone bosmuis is aangevreten.

Bij de spiegelbuis en geurbuis zijn daarom sporenbedden in de buis aangebracht, in de Struikrover® Box is een wildcamera geplaatst. Met die beide methoden kan worden vastgesteld of één van de doelsoorten in de buis geweest is. Met de camerabeelden kan vervolgens ook gecontroleerd worden of er van het ei gegeten is of niet. Bij de geurbuis en spiegelbuis is wel vast te stellen of de buis is betreden door één van de doelsoorten, maar het is zonder analyse van de DNA monsters niet mogelijk om vast te stellen of er DNA is achtergebleven op bijv. de spiegel.

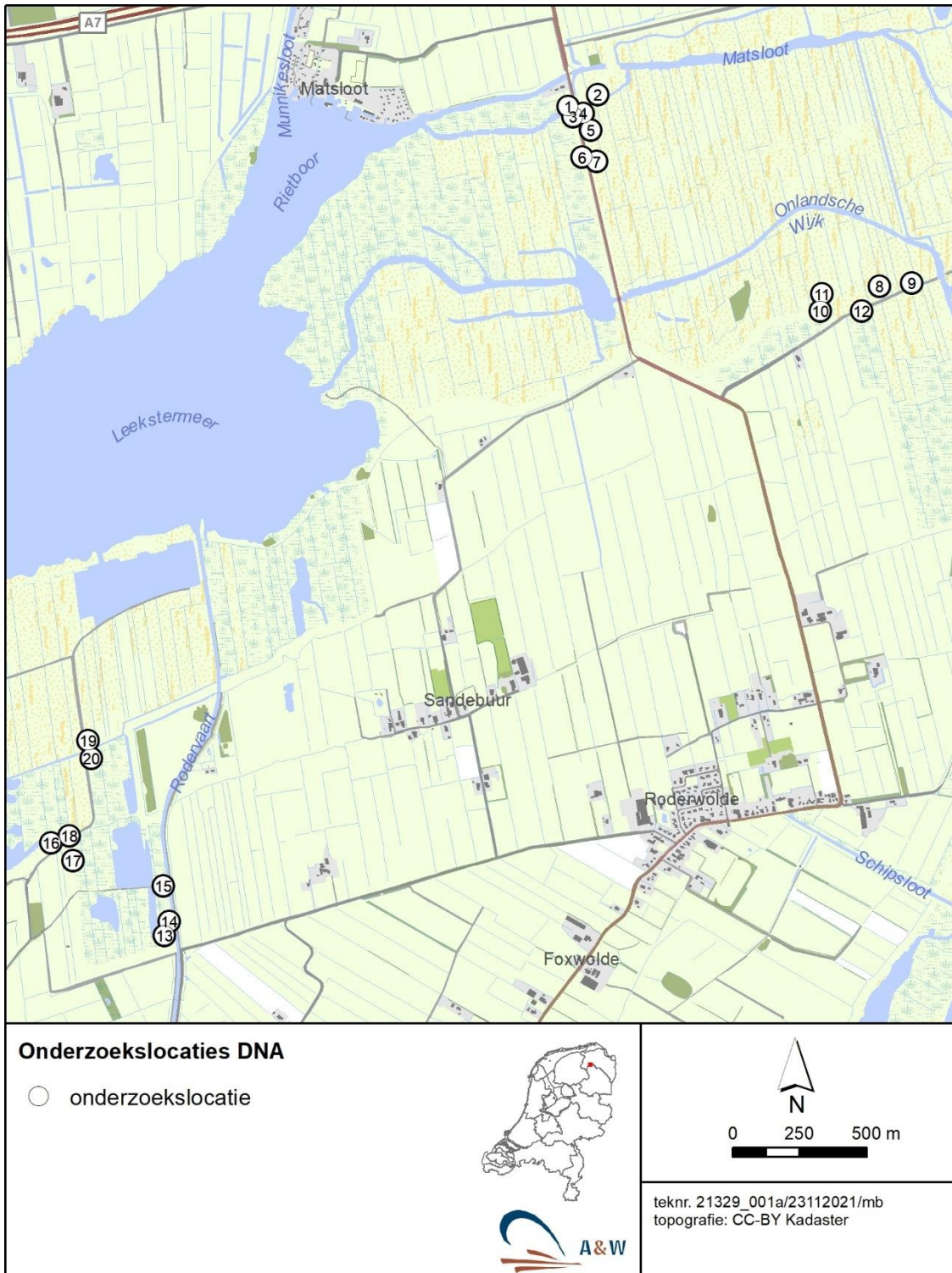
Dit is een belangrijke beperking bij het interpreteren van resultaten. Want ook mét deze verificatie in de vorm van camera of sporenbed is niet altijd met zekerheid vast te stellen of er daadwerkelijk goed DNA van de doelsoorten is achtergebleven. Ook wanneer de buis is bezocht door bijv. een Wezel, kan het ei immers ook slechts alleen door Bruine ratten of muizen zijn aangevreten.

Wanneer de buis is bezocht door één van de doelsoorten en er zijn mogelijke DNA bronnen aangetroffen (snuitafdruk op de spiegel of aangevreten ei), dan is er binnen deze pilot vanuit gegaan dat er daadwerkelijk DNA is verzameld. In dergelijke gevallen is het DNA bemonsterd en is het verzamelde materiaal bewaard.

Ook met deze verificaties is het daarom zonder analyse van de DNA monsters niet mogelijk om te bepalen of er daadwerkelijk bruikbaar DNA is achtergelaten en verzameld. Dit geldt voor alle gebruikte methoden en is een belangrijke kanttekening bij de gepresenteerde resultaten.

2.6 Onderzoeksgebied

De pilot is uitgevoerd in de Onlanden in zuidwest Groningen. In dit gebied is de aanwezigheid van alle drie kleine marterachtigen bekend (eigen data M. Smaal). De verschillende typen verzamelbuizen zijn in 20 clusters uitgezet, waarbij in elk cluster van elk type één buis is geplaatst. De locaties van de inzet van de verschillende methoden is weergegeven op de kaart in figuur 2.1.



Figuur 2.1 Onderzoeksgebied met de locaties waar de verschillende methoden zijn getest.

2.7 Proef afbraaksnelheid DNA

Om een idee te krijgen van het benodigde interval waarmee de verzamelunits moeten worden bemonsterd, is kennis over de afbraaksnelheid van het verzamelde DNA nodig. Dit is nodig zodat een zo optimaal mogelijk interval kan worden bepaald, waarbij een balans moet worden gevonden tussen de efficiëntie (zo groot mogelijk interval tussen de veldbezoeken) en het verzamelen van bruikbare resultaten (DNA verzamelen voordat het vervallen is). Hiervoor is een proef opgezet voor DNA verzameld uit speeksel en keutels.

Voor de proef is het van belang om de exacte leeftijd/ouderdom van het verzamelde DNA te weten. Dit is alleen mogelijk in een experimentele setting. Er is daarom contact gezocht met wildopvang Faunavisie Wildcare in Westernieland (Pim en Mieke Lollinga). Daar zaten drie Wezels in de opvang. Van deze drie Wezels is getracht speeksel te verzamelen en daarnaast konden zeer verse keutels verzameld worden. De proef is uitgevoerd in de periode 27-januari t/m 16-februari 2022.

Speeksel

In eerste instantie is geprobeerd om de drie Wezels van een serie aangeprikte eieren te laten eten, vergelijkbaar aan de eieren in de geurbuis en de Struikrover® Box. De Wezels in de opvang zijn echter niet gewend om van eieren te eten en vertoonden behalve nieuwsgierigheid naar een nieuw object in het verblijf, geen duidelijke interesse in de eieren. Ze zaten wel enkele keren met de snuit bij de eieren, maar het was niet 100% zeker dat ze van de eieren gegeten hebben. Het bleef daarom onzeker of er met de eieren wel DNA uit speeksel verzameld was. Er is daarom besloten om over te stappen op plan B; het aanbieden van eendagskuikens (idee P. Lollinga). Er zijn een tiental pootjes en kopjes van eendagskuikens ontdaan van huid en aan een dun draad geregen, deze zijn vervolgens boven het verblijf gehangen. De Wezels doken er gelijk bovenop en haptten fanatiek in de delen van eendagskuikens. Wanneer ze enkele keren in de delen van eendagskuikens hadden gebeten, werd het materiaal in een bakje gelegd² en werd het volgende eendagskuiken in de bak gehangen. Deze delen van kuikens (de prooiresten) zijn met een interval in duplo bemonsterd met een swab. Dit is een beproefde methode, die bijvoorbeeld ook wordt toegepast voor het bemonsteren van aangevallen schapen om te bepalen of zij al dan niet slachtoffer zijn geworden van een wolf.

We realiseren ons dat er mogelijk een verschil bestaat in de afbraaksnelheid van speeksel dat achterblijft op een ei of op een stuk vlees van een eendagskuiken. Dit blijft een kleine onzekerheid in het resultaat van de proef. Het alternatief zou zijn om de proef uit te voeren met eieren met een kleine marterachtige in gevangenschap die wel gewend is om eieren te eten.

Bewaring van de prooirest tot bemonstering

Het materiaal is verzameld en in open plastic bakjes in een garage in een Struikrover® Box bewaard. Dit is gedaan om zo goed mogelijk najaarscondities in een Struikrover® Box na te bootsen. Het najaar is de beste tijd van het jaar om een dergelijk meetnet in de praktijk uit te voeren, de nachten zijn in het najaar warmer dan in januari/februari. Daarom is besloten de proef in een (onverwarmde en vrijstaande) garage uit te voeren, om zodoende de allerlaagste nachttemperaturen enigszins te temperen. Tijdens het uitvoeren van de proef in de periode 27-1 t/m 16-2 was het overigens vochtig en opmerkelijk zacht weer voor de tijd van het jaar. Geschikte condities voor het uitvoeren van de proef.

² Om een interval tot bemonstering te genereren zijn de prooiresten bewaard tot bemonstering, zie onder.

Keutels

De bak waarin de Wezels bij Faunavisie Wildcare verbleven is verschoond vlak voor de dag waarop het materiaal is verzameld. Alle aanwezige keutels waarom daarom relatief vers. Tijdens het uitvoeren van de proef verschenen er nieuwe keutels, waarvan tot op een kwartier nauwkeurig bekend was hoe oud deze waren. Deze zijn verzameld en in een geopend epje zonder alcohol bewaard in een Camera® Box in dezelfde garage.



Foto 2.4 Wezel in de opvang bij Faunavisie Wildcare in Westernieland. Het ei is aangeprikt en wacht om te worden gelikt door de Wezel. De Wezels (drie in deze bak) toonden uit nieuwsgierigheid wel interesse in het ei, maar likten er niet aan.

3 Resultaten veldproef

In dit hoofdstuk worden de resultaten van de pilot met de drie verschillende methoden om DNA te verzamelen beschreven.

In de resultaten spelen twee zaken door elkaar heen:

- 1) bij welke methode worden het vaakst marterachtigen naar de verzamelunit gelokt; en
- 2) wanneer, hoe vaak en met welke methode is DNA te verzamelen?

Hieronder wordt in paragraaf 3.1 eerst de resultaten met betrekking tot eerste vraag behandeld, door per soort te kijken naar het aantal keren dat een marterachtige de verschillende soorten verzamelunits heeft bezocht. Daarna wordt in paragraaf 3.2 bekeken hoe vaak er vervolgens DNA achterbleef bij de verschillende verzamelunits. Dit resultaat is een gevolg van bezoekfrequentie en verzamelmethode. We zullen bespreken in hoeverre onderscheid kan worden gemaakt in units die weinig bezocht werden maar toch relatief veel DNA verzamelden of juist andersom. Uiteindelijk draait het erom met welke methode het meeste DNA wordt verzameld bij gelijke inspanning. Daarna volgen in paragraaf 3.3 nog enkele praktijkervaringen met de verschillende methoden.

3.1 Bezoekfrequentie van marterachtigen per verzamelunit

Er zijn zowel wezels als hermelijnen in de vangunits vastgesteld (zie tabel 3.1). Bunzingen zijn tijdens de pilot in het geheel niet aangetroffen. In 47 gevallen ging het zeker om wezel. Deze soort is in alle rondes aangetroffen. In vier gevallen ging het zeker om hermelijn, maar dit gebeurde alleen in ronde 2 en 3. In de geurbuis en de spiegelbuis zijn vijf keer sporen aangetroffen van wezel of hermelijn, waarbij uiteindelijk niet met zekerheid tot op soort kon worden geïdentificeerd.

De Struikrover® Box werd het vaakste bezocht (29 keer is aanwezigheid vastgesteld), gevolgd door de spiegelbuis (17 keer) en de geurbuis (10 keer bezoek). De bezoekkans is dus het hoogst voor de Struikrover® Box.

In aanvulling op de doelsoorten hebben bruine rat en bosmuis (niet-doelsoort) vrijwel alle buizen bezocht (> 95%).

Tabel 3.1 Bezoekfrequentie van de verschillende soorten kleine marterachtigen per type verzamelbuis.

	Wezel	Hermelijn	Wezel en/of Hermelijn	Bunzing	Totaal
Struikrover® Box	26	3	0	0	29
Geurbuis	8	0	2	0	10
Spiegelbuis	13	1	3	0	17
Totaal	47	4	5	0	56

3.2 eDNA in de verzamelunits en efficiëntie daarvan

In paragraaf 3.1 is aangegeven dat er 56 bezoeken zijn vastgesteld aan de verzamelunits. Maar niet altijd is er DNA achtergebleven. Van wezels is 12 keer géén DNA aangetroffen, terwijl het dier wel aantoonbaar op bezoek is geweest (zie tabel 3.2 volgende bladzijde). Rondes 2 en 3 hebben meer opgeleverd dan ronde 1 (respectievelijk 18, 18 en 10 DNA monsters).



Foto 3.1 Zelfs een Vos had toegang tot het ei in de Struikrover® Box, de toegang moet derhalve groot genoeg zijn voor een Bunzing.

Van wezel en hermelijn samen zijn uiteindelijk 46 DNA monsters bemachtigd. De speekselmonsters waren het meest frequent (25 keer bemachtigd, zie tabel 3.3), veel vaker dan een afdruk van een snuit (10 keer), haren (4), keutels (3) of urine (4). Echter, door het ontwerp van de verschillende buizen, worden niet alle potentiële DNA bronnen evenveel bemonsterd (zie § 2.1 en tabel 2.2). Daarom is het aantal keren dat DNA is aangetroffen verdisconteerd voor het aantal keren dat er is geprobeerd om dit DNA te verzamelen, dit noemen we de trefkans (zie tabel 3.3).

Tabel 3.3 Aantal verzamelde DNA monsters per DNA bron en per type verzamelbuis. De trefkans is berekend als de verhouding tussen het aantal keer dat een monster is genomen en het maximaal aantal keer dat dit had kunnen gebeuren tijdens de studie.

	Haar	Ontlasting	Snuit	Speeksel	Urine	Eindtotaal
Struikrover® Box	3			25	1	29
Geurbuis		1				1
Spiegelbuis	1	2	10		3	16
Eindtotaal	4	3	10	25	4	46
Max per ronde	60	60	20	20	60	
Max deze studie	180	180	60	60	180	
Trefkans	0,02	0,02	0,17	0,42	0,02	

Trefkansen

De trefkansen verschillen aanzienlijk tussen verschillende combinaties van potentiële DNA bron en het middel om het monster te bemachtigen. De Struikrover® Box werd, zoals benoemd in paragraaf 3.1, het vaakst bezocht. Binnen de Struikrover® Box bleek de methode van speeksel verzamelen het vaakst een monster op te leveren. Huidcellen zijn niet aangetroffen, haren, keutels en urine slechts in zeer geringe mate. De keren dat er haren en keutels lagen was er ook van de eieren gegeten.

De geurbuis werd het minst vaak bezocht (10 keer), en de daar toegepaste middelen om DNA te bemachtigen (het klittenband, of de buis zelf) hebben maar zeer weinig opgeleverd (1 keer ontlasting). De kans om in een spiegelbuis een monster te nemen lag daar tussen in. De spiegelbuis is 17 keer bezocht en leverde 16 monsters. Dit waren in 10 gevallen afdrucken van een snuit. Haren, ontlasting en urine zijn slechts enkele keren in de spiegelbuis aangetroffen.

De trefkans om een DNA monster te bemachtigen was met deze set-up daarom het hoogst met een ei (trefkans speekselmonster is 0,42), gevolgd door een afdruk van een snuit in een spiegelbuis (trefkans is 0,17).

De spiegelbuis heeft met 12 cm een grotere diameter dan de geurbuis, en deze werd ook vaker bezocht. Mogelijk heeft dit met de diameter te maken. De geurbuis en de spiegelbuis hadden verder vergelijkbare maten, vorm en kleuren, maar de Struikrover® Box week daarin iets af. De buizen verschilden verder van elkaar in aanwezigheid van voedsel (het ei), lokmiddel (de struikrover olie en mais met geurstof) en de aanwezigheid van de camera (zie tabel 2.1). Het is niet geheel duidelijk welke van deze factoren ertoe heeft geleid dat de Struikrover® Box uiteindelijk de hoogste bezoekfrequentie had.

Andere methodiek voor bunzing nodig

Niet alle drie de doelsoorten hebben de vallen bezocht. Voor een complete monitoring lijkt het wenselijk om voor Bunzing een aparte methode te ontwikkelen.

3.3 Praktijkervaringen met de verschillende methoden

Gedoe in het veld verminderen

Bij de eerste controle ronde is bij elke Struikrover® Box eerst naar de camerabeelden gekeken, zodat daarna nauwkeurig op de juiste plek op het ei een swab kon worden genomen. Dit is erg arbeidsintensief en lijkt inefficiënt.

Bij de tweede ronde is daarom gepoogd om efficiënter te werken, door het ei sowieso te bemonsteren als ervan gegeten was. Vervolgens zijn thuis de beelden van de cameravallen bekeken en zijn de monsters van de eieren van vallen waarop geen Wezel of Hermelijn te zien was weggegooid. Belangrijke overweging hier is dus de kostprijs van een DNA monstersetje i.r.t. werktijd.

Bij de monsters van de spiegels is het niet te zien of het monster van een marterachtige is of van bijv. een muis of rat. De spiegel is altijd bemonsterd als er sporen van Wezel of Hermelijn op het sporenbed zichtbaar waren.

Verzamelen van haren

Het klittenband bleek niet goed te werken voor het verzamelen van haren. Het blijkt bovendien te worden gegeten door Bruine ratten. Het schuurpapier blijkt echter prima te werken voor het verzamelen van haren. Deze blijven stevig in het schuurpapier (middelgrof) hangen, ook in weer en wind. Het schuurpapier kan om de haar heen worden uitgeknipt, het afgeknipte stuk schuurpapier met haar kan vervolgens in een droge envelop worden bewaard.

“Wenperiode” van 3 weken nodig voor Hermelijn

Hermelijnen betreden een buis of box pas na 3 weken. Dat is in lijn met eerdere ervaringen van Matthijs Smaal met de traditionele Struikrover®, waarbij Hermelijnen pas vastgesteld worden na een periode van ca. 20 dagen (Smaal & van Manen 2023).

3.4 Kosten per valtype

De kosten voor het maken van de verschillende valtypes zoals deze tijdens deze proef zijn gebruikt, zijn voor alle drie de typen gelijk en bedragen € 100,- per stuk. Daarvan zijn een kwart materiaalkosten en drie kwart manuren. Dat is excl. kosten voor gebruik van de cameraval die in de Struikrover® Box zat.

Kostprijs op hoofdlijnen per te verzamelen individuele DNA profiel

De financiële lasten van een monitoringprogramma op basis van individuele DNA profielen zullen hoog zijn, dit kan mogelijk belemmerend zijn. Deze kosten ontstaan vooral omdat er specialistisch veldwerk en labwerk nodig is. Het is daarom zinvol om op hoofdlijnen te laten zien waarin de kosten verschillen tussen de verschillende methoden zoals die hier getest zijn.

Om de kosten van de geteste methodieken onderling te kunnen vergelijken, schatten we hieronder de kosten om tot een succesvolle bepaling van één individueel DNA-profiel van de doelsoorten te komen. Een monitoring programma heeft daarnaast nog kosten voor reistijd van de veldwerkers, en analyse- en rapportage tijd op kantoor, maar we denken dat het niet verhelderend is om die kosten hier in deze berekening mee te nemen. We beperken ons hier daarom tot de vergelijking van de te verwachten kosten per methode. Zie voor de berekening, een toelichting en de gebruikte parameters bijlage 2.

De geschatte kosten (E) zijn voor het belangrijkste deel bepaald door de trefkans op een DNA monster (tabel 3.3), onder de hier gemaakte aannames. Bijvoorbeeld: omdat er wel vijftig vallen van het type geurbuis moeten staan om één keutelmonster te verzamelen, zijn de kosten voor deze methodiek het hoogst. De kosten voor lab analyse (ca. 150-200 euro/monster afhankelijk van het aantal aangeleverde monsters) worden vooral hoog wanneer veel monsters geen succesvol DNA-profiel opleveren, bijvoorbeeld omdat het niet een van doelsoort was maar van een bruine rat waar een monster van is verzameld. De kosten van lab analyse worden een groter aandeel van de totale kosten naarmate DNA in het veld efficiënter wordt verzameld. Bij de buis met een camera is dit het geval, en de schatting van kosten is voor deze techniek het laagst. Bij een buis met ei, zonder camera is er een gereede kans dat een ander dier van het ei heeft gegeten, zodat niet ieder monster succesvol tot een profiel van de doelsoort wordt herleidt. Ondanks de besparing op een camera leidt dit daarom toch tot hogere kosten per succesvolle bepaling van één individueel DNA-profiel van de doelsoorten.

Tabel 3.4 Schatting van de kosten per succesvol DNA profiel, afhankelijk van vangunit. Zie bijlage 2 voor units per parameter en toelichting.

parameter		a	b	c	d	f	e	E
DNA bron	Valtype	benodigde aantal vallen voor 1 DNA monster (=1/trefkans)	factor	kostprijs productie	kostprijs controle	houdbaarheid DNA (dagen)	aantal controles nodig om trefkans te halen	kosten voor 1 succesvol individueel DNA-profiel
speeksel op ei	Camerabuis	2,4	1,0	€ 40	€ 11,20	1	15	€ 695,24
speeksel op ei	Buis-met sporenbed	2,4	1,5	€ 10	€ 9,33	1	15	€ 835,71
urine,ontlasting	Geurbuis-sporenbed	50,0	1,0	€ 10	€ 9,33	7	3	€ 2.100,00
Snuit	Spiegelbuis-sporenbed	5,9	1,5	€ 10	€ 9,33	1	15	€ 1.623,53

De schatting/berekening van de kosten per methodiek berust op een aantal aannames en inschattingen. Op basis van de nu beschikbare kennis is dit de best mogelijke inschatting. De werkelijke kosten kunnen (fors) hoger of lager uitvallen wanneer één of enkele parameters in de praktijk niet haalbaar blijken te zijn. Zo is hier aangenomen dat er 60 buizen per dag kunnen worden gecontroleerd, tijdens de veldproef in deze pilotstudie waren dat 'slechts' 30 per dag (maar mogelijk kan er met meer routine sneller gewerkt worden). Een dergelijke inschatting kan veel effect hebben op de uiteindelijke kosten per succesvol monster. Wanneer we in de berekening bijvoorbeeld uitgaan van 30 controles per dag, dan lopen de kosten voor speeksel op ei in een camerabuis al op tot €1.095,- en voor ontlasting in een geurbuis tot €3.500,- per monster.

Andersom kunnen de kosten fors verlaagd worden wanneer de effectiviteit van de bemonstering kan worden verhoogd. Zo zijn de geschatte kosten per monster op dit moment hoog voor uitwerpselen, doordat de in deze pilot gevonden trefkans laag is. Wanneer het echter lukt om met een aangepast ontwerp of meer ervaring, de trefkans van uitwerpselen te verdubbelen, dan zakt de prijs per monster naar €1.150,- per monster.

De kosten voor het verzamelen van speekselmonsters kunnen dalen door gebruik te maken van cameravallen met een wifi verbinding. Camera's met wifi verbinding (bijv. van het merk Seissiger) sturen gemaakte beelden vanuit het veld rechtstreeks door. Hierdoor is het mogelijk om de swabs zo snel mogelijk te nemen nadat door een doelsoort van het ei is gegeten, waardoor de kwaliteit van het monster hoger is en de kans op uitval in het lab kleiner. De swabs zijn in dat geval ook altijd van één individu, wat voor succesvolle analyse noodzakelijk is. Bovendien zijn dagelijkse

veldbezoeken niet meer nodig waarmee de kosten drastisch verminderen. Het verzamelen van speekselmonsters kan daardoor effectiever en efficiënter worden.

3.5 Conclusie veldproef

- Het is mogelijk gebleken gericht DNA te verzamelen met de geteste methodes, maar de verschillen tussen DNA bronnen en doelsoorten zijn onderling groot. Mogelijk is dit een gevolg van het feit dat de hier gepresenteerde gegevens voortvloeien uit een pilotproject van beperkte omvang en niet zijn gebaseerd op jarenlange praktijkervaringen. Het valt te verwachten dat voor meeste parameters pas na enkele jaren goede gemiddelden kunnen worden bepaald.
- Bunzingen hebben in deze studie de vangunits niet bezocht. Bunzingen wijken in hun gedrag en ecologie enigszins af van de andere doelsoorten (Muskens & Broekhuizen 1998). Mogelijk moet voor Bunzing een specifieke verzamelmethode worden ontwikkeld.
- De meer houdbare en stabiele bronnen van DNA, zoals haren en uitwerpselen, zijn beduidend minder vaak verzameld dan de meer instabiele speekselmonsters.
- De verzamelde speekselmonsters bleken niet geschikt voor analyse. Mogelijk zijn de monsters beter te gebruiken wanneer deze worden verzameld vanaf een ei in plaats van vanaf een kuiken, dat blijft op dit moment onzeker. De houdbaarheid van speekselmonsters is zeer waarschijnlijk minder dan 24 uur.
- De verzamelde keutelmonsters bleken echter voor een langere periode geschikt voor analyse. Als stelregel kan gehanteerd worden dat de keutels tot een week vrijwel zeker geschikt blijven voor analyse (onder relatief koele en droge omstandigheden). Mogelijk zijn de keutels tot twee weken bruikbaar.
- Er zijn verbeteringen van de gebruikte technieken denkbaar. In de bijlage 1 staat een aantal ideeën benoemd.
- De combinatie van een Struikrover® Box (al dan niet met camera) met een ei bleek de grootste kans op een DNA monster te leveren.
- Het is zeer regelmatig voorgekomen dat meerdere soorten de vangunits hebben bezocht. Met name niet-doelsoorten als bruine rat en bosmuis frequenteren de buizen. Afhankelijk van de gekozen methode levert dit mogelijk grote aantallen monsters op en daarmee hoge analysekosten. Het is aannemelijk dat ook meerdere individuen van één soort dezelfde vangunits binnen eenzelfde ronde bezochten. Dit heeft onbekende consequenties voor de vaststelling van een individueel DNA profiel en dit compliceert de vaststelling van een individueel DNA profiel mogelijk.

Onzekerheden

Er bestaan nog een flink aantal onzekerheden, die invloed hebben op het in hoofdstuk 5 geformuleerde advies:

1. de mate waarin een genomen monster succesvol tot een individueel DNA profiel zal kunnen worden herleid;
2. de mate waarin deze analyses verstoord worden als meerdere individuen van één soort DNA-sporen in de vangunits hebben achtergelaten;
3. de onzekerheid in de schatting van enkele parameters voor het berekenen van de kosten per succesvol monster;
4. de mate waarin kan worden voldaan aan de aannames van de modellen voor berekening van aantallen.

4 Resultaten afbraaksnelheid DNA

Er is een test gedaan om te kijken hoe lang het verzamelde DNA materiaal onder veldomstandigheden goed genoeg blijft om te gebruiken voor analyses. Hierbij moet een onderscheid worden gemaakt in twee verschillende typen DNA-analyses. Voor het bepalen van de soort waartoe het verzamelde DNA behoort is slechts weinig materiaal nodig, dit materiaal mag ook ouder en meer verweerd zijn, slechts kleine DNA fragmenten zijn hiervoor veelal goed genoeg. Voor het opstellen van individuele DNA-profielen is iets beter en jonger materiaal nodig.

Daarom is een test uitgevoerd om enig inzicht te krijgen ten aanzien van de 'houdbaarheid' van DNA. De opzet van de test is beschreven in paragraaf 2.7, de resultaten hiervan worden hieronder besproken.

4.1 Ervaringen uit eerder onderzoek (via experts en literatuurstudie)

Keutels

Eerder onderzoek aan DNA afbraak in keutels van zoogdieren liet zien dat de snelheid waarmee de kwaliteit achteruit gaat sterk varieert en verschilt tussen diersoorten en afhankelijk is van het dieet (Tighe *et al.* 2020). Daarbij is een verschil zichtbaar tussen keutels van herbivoren en carnivoren, waarbij de keutels van carnivoren meestal sneller in kwaliteit achteruitgaan, vermoedelijk doordat deze rijker zijn aan dierlijke eiwitten en daardoor meer micro-organismen bevatten die DNA afbreken. Ervaring uit onderzoek van WENR liet zien dat keutels van Edelherten van enkele weken oud nog goed bruikbaar waren voor individuele genetische herkenning. Maar ook voor hondachtigen kunnen keutels van enkele weken oud nog bruikbaar zijn. Zo maakt WENR met regelmaat gebruik van Wolvenkeutels die vermoedelijk al tenminste een week oud zijn, en lieten Panasci *et al.* (2012) voor keutels van Coyote zien dat individuele herkenning via microsatelliet-merkers nog altijd mogelijk was bij een ouderdom van 10 dagen, hoewel de kwaliteit van de verkregen data duidelijk beter was bij keutels van minder dan 5 dagen oud. Belangrijker is dan ook vooral het vochtgehalte, aangezien in vochtige keutels micro-organismen beter gedijen en het DNA sneller afbreken (Vynne *et al.* 2012). Dit vochtgehalte, en daarmee de afbraaksnelheid, wordt bepaald door zowel weersomstandigheden als het type habitat waar de keutel werd achtergelaten. Bij regenachtig weer loopt de DNA kwaliteit sneller terug, al blijkt het lastig om een exacte maximale ouderdom aan te geven voor regenachtig weer, zeker wanneer de weersomstandigheden dagelijks fluctueren (zoals in Nederland). Wel blijft uit onderzoek van WENR dat voor keutels van wetlandsoorten, vaak aangetroffen op vochtige bodem, meestal geldt dat alleen vrij verse keutels (één tot maximaal twee dagen oud) bruikbaar zijn. Dit geldt onder andere voor otter (Koelewijn *et al.* 2010) en noordse woelmuizen (La Haye & De Groot 2017).

Speeksel

Gepubliceerde studies die expliciet hebben gekeken naar het effect van ouderdom of type bemonstering van speeksel op de mogelijkheden voor gebruik in DNA analyse, zijn zeer beperkt. De meeste beschikbare studies zijn gebaseerd op menselijke monsters. Daaruit blijkt dat indien speeksel direct wordt opgevangen op filterpapier en ingedroogd, en vervolgens droog wordt bewaard, de DNA kwaliteit maandenlang vrijwel niet achteruit gaat (Sirker *et al.* 2016). Echter, indien speeksel niet wordt ingedroogd, maar zonder verder behandeling wordt bewaard bij kamertemperatuur, neemt de DNA kwaliteit binnen 24 uur zeer sterk af (Yao *et al.* 2016). Deze laatste situatie lijkt het meest op de veldbemonstering bij marters, waarbij het speeksel wordt achtergelaten op een object en daar blootgesteld blijft aan de omgevingscondities tot aan de

bemonstering. De meest relevante voorbeelden in de literatuur komen van onderzoek waarbij speeksel werd bemonsterd van karkassen, om zo de predator vast te stellen. In de betreffende gevallen werd standaard gebruik gemaakt van bemonstering via swabs (Harms *et al.* 2015, Hopken *et al.* 2016, Piaggio *et al.* 2020). Zowel Harms *et al.* (2015) en Piaggio *et al.* (2020) vergeleken het succespercentage van genotypering van wolven-speeksel bemonsterd van karkassen op verschillende tijdstippen na predatie. Beiden lieten zien dat dit succespercentage al na 24 uur was gedaald tot ruim beneden de 50% (gemiddeld 25% in de studie van Piaggio *et al.* (2020)). Hopken *et al.* (2016) maakten gebruik van swabmonsters van zowel eieren als karkassen van vogels van grotere ouderdom, genomen tussen de 1 en 8 dagen na predatie. Weliswaar was dit succesvol bij 11 van de 14 eieren (78.5%) en 3 van de 7 karkassen (42%), maar de auteurs vermelden niet hoe de ouderdom verdeeld was over de verschillende monsters, en welke monsters wel of niet succesvol waren. Het is dan ook goed mogelijk dat alle succesvolle monsters van beperkte ouderdom waren.

4.2 Experimentele check van afbraaksnelheid

In 2022 werd een experiment uitgevoerd waarbij speeksel en keutels van een kleine marter op verschillende tijdstippen na de productie ervan werden bemonsterd, om zo meer zicht te krijgen op het effect van ouderdom op de kans dat het monster nog bruikbaar is voor DNA analyse. Voor dit experiment werd gebruik gemaakt van monsters van een in gevangenschap gehouden wezel (*Mustela nivalis*). De volgende monsters waren beschikbaar:

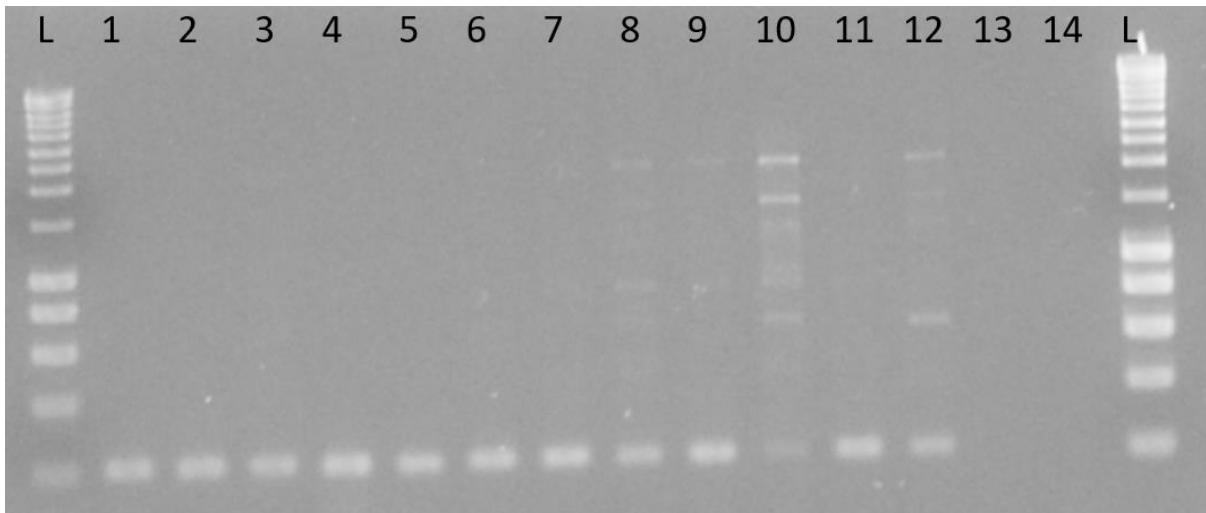
- Keutelmonsters: Twee keutels, afkomstig van dezelfde wezel, werden binnen 15min na productie geraapt en in open (in de buitenlucht) bewaard. Bemonstering van beide keutels vond plaats na achtereenvolgens 2, 4, 6, 8, 12 en 16 dagen. Dit resulteerde in totaal in $2 \times 6 = 12$ monsters voor DNA analyse. Bemonstering vond telkens plaats door een keutelfragment af te breken en in een potje met 96%-ethanol te bewaren (gekoeld bij 4 graden Celsius).
- Speekselmonsters: 1 monster werd verkregen door een wezel te laten likken aan een ei, waarbij na 15 uur het ei werd afgeveegd met een swab om DNA te bemonsteren. Omdat het echter zeer lastig bleek om de wezel te interesseren in het ei, werd gekozen voor een alternatieve aanpak, waarbij eendagskuikens werden aangeboden. Verschillende kuikens met slijmresten erop werden open (in de buitenlucht) bewaard, waarna op verschillende tijdstippen telkens een ander deel van een kuiken werd bemonsterd middels swabs. 1 monster werd genomen na 15 uur, daarna telkens twee monsters na respectievelijk 25, 48, 95, 144 en 191 (grofweg 1, 2, 4, 6 en 8 dagen).

Alle monsters werden gekoeld getransporteerd naar Wageningen, waar DNA extractie plaatsvond volgens standaardprotocollen voor respectievelijk keutelmonsters en swabmonsters met speeksel, die reeds beschikbaar waren bij WENR (en standaard worden toegepast voor onderzoek naar o.a. otter en wolf). Op alle DNA extracten werd vervolgens een analyse uitgevoerd om de DNA kwaliteit te toetsen. Hiertoe werd gebruik gemaakt van een analyse voor soortsbepaling van zoogdieren, op basis van een fragment van het mitochondriale genoom (mtDNA). Hierbij wordt allereerst het betreffende DNA fragment vermenigvuldigd middels een PCR-reactie. Vervolgens kan het DNA van dit fragment zichtbaar worden gemaakt op een agarosegel. Indien een band verschijnt, geeft dit aan dat blijkbaar DNA aanwezig was van voldoende kwaliteit om te worden vermenigvuldigd. Daarna werd de identiteit van dit DNA gecheckt door middel van sequencing. Hierbij wordt de exacte code van het vermenigvuldigde fragment bepaald, en vergeleken met referentiecodes van wezel en andere diersoorten. Deze analyse werd ingezet omdat het opzetten van een individubepaling (het eigenlijke toekomstige

doel) voor wezel binnen het huidige budget niet haalbaar was. Belangrijk is om in gedachten te houden dat voor een individubepaling gemiddeld een iets betere DNA kwaliteit nodig is dan voor soortsbepaling.

Figuur 4.1 toont een foto van de banden die zichtbaar waren op agarosegel voor de 12 keutelmansters. Daarop is zichtbaar dat alle 12 monsters een duidelijke band lieten zien van de juiste lengte. Dit geeft aan dat zelfs uit de oudste monsters nog succesvol DNA kon worden gewonnen dat bruikbaar was voor PCR analyse. Verificatie via sequencing toonde aan dat het PCR product inderdaad in alle gevallen afkomstig was van wezel-DNA. Wel is zichtbaar dat bij keutels met een ouderdom van 8 dagen of ouder meerdere banden zichtbaar worden. Dit geeft aan dat ook PCR producten werden gevormd met onverwachte lengtes. Dit is een teken dat het beschikbare DNA van verminderde kwaliteit was.

De agarosegel met PCR producten op basis van de speekselmonsters liet eveneens een band zien voor alle monsters (geen foto getoond). Verificatie via sequencing maakte echter duidelijk dat in alle gevallen dit DNA afkomstig was van kip. Dit is goed verklaarbaar aangezien swab-monsters werden afgenomen bij een kippenei of kippenkuiken, maar onverwacht aangezien de gebruikte merker specifiek gemaakt is voor detectie van zoogdieren. Uit ervaring met eerdere projecten weten we echter dat indien weinig of geen bruikbaar zoogdier-DNA aanwezig is, deze merker kan overspringen op het vermeerderen van DNA van niet-doelsoorten. Dat dit voor de huidige monsters inderdaad gebeurde, geeft aan dat wezel-DNA uit het speeksel ofwel vrijwel niet aanwezig was, ofwel van te geringe kwaliteit was voor een succesvolle analyse. Het feit dat dit reeds voor deze soortsbepaling het geval was, maakt het zeer onwaarschijnlijk dat dit type speekselmonsters geschikt zou zijn voor een individubepaling.



Figuur 4.1 Foto van agarose gel met PCR producten op basis van monsters van keutelfragmenten van toenemende ouderdom. 1+2 = 2 dagen oud, 3+4 = 4 dagen oud, 5+6 = 6 dagen oud, 7+8 = 8 dagen oud, 9+10 = 12 dagen oud, 11+12 = 16 dagen oud, 13+14 = negatieve controle (water), L = referentieladder met banden voor verschillende fragmentlengtes. De gebruikte merker zou een band moeten vertonen ter hoogte van de onderste band van de referentieladder (200bp). Dit is voor alle 12 monsters inderdaad het geval.

4.3 Conclusie afbraaksnelheid

Zowel uit eerder onderzoek als uit het hier nieuw uitgevoerde experiment blijkt dat DNA in keutelmonsters gemiddeld flink langer van goede kwaliteit blijft dan in speekselmonsters, en dat de succeskans bij gebruik van keutels daarmee flink hoger ligt. De bruikbare ouderdom van keutels ligt in de range van enkele dagen tot enkele weken, waarbij geldt dat de succeskans bij keutels die op een droge plek liggen (zoals in een overdekte buis op een plek die niet overstroomd) vaak na enkele weken nog zeer behoorlijk is. Dit komt overeen met de resultaten voor de wezelkeutels, die allen een goed resultaat lieten zien, inclusief de twee keutelfragmenten van ruim twee weken oud. Wel nam de DNA kwaliteit na een week (8 dagen en ouder) zichtbaar geleidelijk af. Aangezien in de huidige test gebruik werd gemaakt van een soortsbepaling, en voor individuele herkenning gemiddeld een iets betere DNA kwaliteit nodig is, zou het waardevol zijn om in geval van keutelbemonstering van kleine marterachtigen ofwel te proberen om keutels binnen een week te rapen, ofwel eerst een uitgebreidere pilotstudie te doen op basis van een analysemethode voor individuele herkenning.

Voor speekselmonsters geldt dat de (geringe) beschikbare literatuur suggereert dat bij swab-bemonstering van karkassen (de meest realistische en kansrijke methode) de succeskans al binnen een dag tot beneden de 50% daalt. Niet voor niets wordt bij o.a. onderzoek aan schade dan wolven dan ook een limiet van 24 uur aangehouden voor monsternamen. In dit licht is het geen grote verrassing dat de DNA analyse voor wezel-DNA op de bemonsterde eendagskuikens niet succesvol was. Het feit dat ook de monsters van 15 en 25 uur oud niet succesvol waren kan toeval zijn geweest, maar geeft wel aan dat de slagingskans beperkt is, zeker indien het doel zou zijn om over te gaan naar individuele herkenning. Het is mogelijk dat een gerichte optimalisatie van de analysemethode de slagingskans zou verbeteren monsters van circa een dag oud. Maar aangezien dagelijkse bemonstering in het geval van populatieonderzoek voor kleine marters waarschijnlijk überhaupt niet reëel is, is het zeer de vraag of dit de moeite waard is. Het lijkt verstandiger om bemonstering te beperken tot andere bronnen, zoals keutels en eventueel haren.

5 Conclusies en aanbevelingen

In dit hoofdstuk geven we een antwoord op de gestelde onderzoeksvragen en doen we een aanbeveling voor het eventuele vervolg. We sommen daartoe eerst de belangrijkste bevindingen op.

5.1 Antwoord op de hoofdvragen

- 1- *Wat is de effectiviteit van verschillende verzameltechnieken om aan DNA materiaal te komen?*

De meest geschikte methodiek voor het verzamelen van DNA van Wezel is een (camera-)buis met een ei als lokmiddel. De buis moet in het najaar (sept-nov.) worden uitgezet in het veld, want dat is de periode waarin wezels in grote aantallen aanwezig en actief zijn (Smaal & van Manen 2017). Gegeven de resultaten van de afbraakproef is het voorlopig nog zeer onzeker op DNA uit speeksel op een ei daadwerkelijk bruikbaar is.

Voor hermelijnen moet de buis langer in het veld liggen dan 3 weken (Smaal & van Manen 2023), bij voorkeur tenminste 4 weken. Er zijn van hermelijn in deze pilot weinig monsters bemachtigd. Dat maakt de methode voor deze soort vooralsnog minder geschikt. Verdere optimalisering (ervaring opdoen) is hiervoor vereist.

Voor Bunzingen is in deze pilot geen geschikte methode naar voren gekomen.

De effectiviteit van de verschillende verzameltechnieken varieert tussen zeer gering (trekans < 0,02) tot redelijk of zelfs goed (trekans 0,17 in een spiegelbuis respectievelijk 0,42 in een camerabuis).

- 2- *Na hoeveel dagen onder veldomstandigheden is het DNA nog van voldoende kwaliteit voor de gewenste (verwantschaps-) analyses?*

Er zijn twee methodes getest om deze vraag te beantwoorden, ontlasting en speeksel. Het verzamelen van speeksel bleek geen bruikbare resultaten op te leveren, ook niet wanneer dit materiaal zeer vers was (enkele uren). Een belangrijke kanttekening daarbij is dat het speeksel werd verzameld van bijtenden op een eendagskuiken. Mogelijk blijft speeksel dat is achtergelaten op een ei langer bruikbaar. Hoe dan ook, moet er voor gebruik van speeksel als DNA bron vanuit worden gegaan dat het niet langer bruikbaar is dan enkele uren (< 24 u). Dit vereist dat de verzamelbuizen dagelijks worden bezocht en bemonsterd, hetgeen veel arbeid vereist en daarnaast resulteert grote aantallen monsters waarvan een groot deel DNA van niet-doelsoorten zoals Bruine rat bevatten. Ondanks dat speeksel het vaakst en het gemakkelijkst te verzamelen bleek, lijkt het daardoor helaas geen kansrijke methode om daadwerkelijk in te zetten.

De houdbaarheid van ontlasting als DNA bron staat daar haaks tegenover. Ontlasting bleek na 16 dagen nog steeds geschikt als bron van DNA materiaal voor soortbepaling, bepaling van individuen vereist iets betere kwaliteit DNA. Tot 8 dagen lijkt de kwaliteit van het materiaal aanzienlijk beter te zijn dan daarna, het is daarom aan te bevelen om ervoor te zorgen dat de monsters maximaal een week oud zijn. Het gebruik van ontlasting als methode voor het

verzamelen van DNA lijkt daarom kansrijk, wekelijkse controles van de verzamelbuizen zijn voldoende. De methode voor het verzamelen van ontlasting van marterachtigen moet echter wel worden geoptimaliseerd, omdat de trefkans van de methode nog laag is.

3- *Wat zijn daarmee op hoofdlijnen de kosten per techniek?*

Op hoofdlijnen zijn de kosten per gebruikte techniek het grootst voor de geurbuis met een sporenbed (orde van €2.000,- per monster) en het laagst voor de buis met cameraval en een ei (orde van €600,- per monster).

4- *Wat is de meest geschikte methodiek per martersoort voor het verzamelen van DNA voor individuele herkenning, gezien het gestelde lange termijn doel?*

Voor Wezel en Hermelijn lijkt op dit moment het verzamelen van speeksel vanaf een ei de beste methode om DNA te verzamelen. Maar let daarbij op de kanttekeningen die genoemd staan in o.a. §5.2 Het doel van de pilot was om de meest geschikte methodiek per martersoort te vinden voor het verzamelen van DNA voor individuele herkenning. Op de lange termijn is het doel om naast het wildcamera-meetnet voor het in beeld brengen van de verspreiding, ook een DNA-meetnet te plaatsen om de dichtheid en populatieontwikkeling van de soorten te bepalen op provinciaal niveau. Gezien dit lange termijn doel is voor Wezel en Hermelijn de Struikrover® Box voor het verzamelen van speeksel vanaf een ei of voor het verzamelen van keutels het meest geschikt, met name doordat deze methode is te combineren met het cameravalnetwerk. Maar er zijn nog onzekerheden en nadelen, we hebben essentiële en nieuwe veldinformatie aangedragen om deze afweging beter te kunnen maken.

Voor Bunzing kunnen we op dit moment nog geen antwoord geven op deze vraag. Om onduidelijke redenen heeft de Bunzing, ondanks bevestigde aanwezigheid in het onderzoeksgebied, geen gebruik gemaakt van de geteste methoden. Om een antwoord op deze vraag te verkrijgen ten aanzien van Bunzing, zal geëxperimenteerd moeten worden. Bijvoorbeeld in een gebied waarvan we veronderstellen dat er veel Bunzingen leven, zoals de Noardlike Fryske Wâlden, zodat de trefkans groter is. Of allicht kan geëxperimenteerd worden met andere methoden die meer toegespitst zijn op Bunzing, zoals bijvoorbeeld grotere buizen, langere perioden van uitleggen en eventueel buizen met een sluisje/voorportaal.

5.2 Conclusies

In deze discussie gaan we in op de gevonden resultaten en bespreken we deze in het licht van dit achterliggende doel.

Over de methodes

Met ei (in deze studie in een buis met daarbij een cameraval) was het goed mogelijk speeksel te verzamelen. De andere mogelijke bronnen van DNA werden aanzienlijk minder frequent verzameld.

Het ei zat in deze studie in een buis met een camera, maar cameravallen (of een sporenbed) zijn op zich niet nodig voor het verzamelen van speeksel-DNA met een ei. Wanneer er van het ei is gegeten, dan kan een speekselswab worden genomen. DNA uit speeksel blijkt echter snel af te breken en blijkt al gauw niet meer bruikbaar (H.4), bovendien kan dit tot onnodig veel monsters (en daarmee hoge analysekosten) leiden omdat vrijwel dagelijks bemonsterd moet worden. Dit komt hieronder ook aan de orde bij de kostenschatting (§3.4).

Wanneer een sporenbed wordt aangebracht, kan het aantal te analyseren monsters verminderen doordat er minder analyses worden gedaan van swabs waarbij van het ei is gegeten door een niet-doelsoort (m.n. Bruine rat). Er is dan echter wel veel ervaring nodig met het kunnen onderscheiden van sporen van Bruine rat, Wezel, Hermelijn en Bunzing. Dat is beslist geen sinecure. Alternatief daartoe is het gebruik van cameraboxen. Nadeel van het gebruik van cameraboxen is dat de inzet van cameravallen moet worden betaald en dat er altijd een risico is op het verdwijnen van cameravallen of dat deze kapot gaan. Een duidelijk voordeel is, dat er aanvullend op de DNA gegevens ook direct gegevens over aan- en afwezigheid van de verschillende soorten voorhanden is. De methode kan dan ook door minder ervaren personen worden toegepast.

Hoewel het voorkomen van alle drie de kleine marterachtigen in het studiegebied bekend is, zijn er binnen deze pilot geen DNA monsters of waarnemingen van Bunzing verzameld. Mogelijk heeft dit te maken met de gekozen diameters van de verzamelunits, hoewel daartegenin moet worden gebracht dat een Vos twee maal aan een ei in een Struikrover® Box gelikt heeft. Een andere reden kan zijn dat de ecologie en het voorkeursbiotoop van de Bunzing enigszins van die van Wezel en Hermelijn verschilt (Müskens & Broekhuizen 1998). Het valt daarom te overwegen om de gebruikte methodieken nogmaals te testen gedurende een langere periode in gebieden waar de Bunzing ogenschijnlijk talrijk is, zoals bijv. de Noardlike Fryske Wâlden. Maar de kans is groot dat voor deze soort een specifieke methode moet worden ontwikkeld.

Binnen deze pilot hebben we verschillende bronnen van DNA verzameld. Op voorhand had het verzamelen van haren de voorkeur omdat dit een stabielere en langer houdbare bron lijkt te zijn. Uit de resultaten van de hier geteste methodes lijkt het verzamelen van haren amper monsters op te leveren, ondanks bezoek van de doelsoorten. We zien overigens wel kansen voor een verbeterde methode voor het verzamelen van haren (zie bijlage 1).

De buis met de camera heeft sterke overlap met het cameravalnetwerk waar Dekker & Jonge Poerink (in voorb.) aan werken. Het onderscheid met dat netwerk zit dan in de details van de plaatsing van de camera's, maar vooral in de verwachting dat men op grond van DNA ook het aantal individuen kan onderscheiden en daarmee iets van dichtheden kan berekenen. Wanneer binnen een dergelijk te ontwikkelen netwerk gebruik wordt gemaakt van de Struikrover® Box, kan het verzamelen van DNA aanvullend op een cameravalnetwerk plaatsvinden. De Struikrover® Box zou daarvoor eigenlijk geoptimaliseerd moeten worden voor het verzamelen van keutels en/of haren. Het verzamelen van DNA kan dan als het ware meeliften op het cameravalnetwerk, de meerwaarde zit dan vooral in het kunnen aantonen van het aantal individuen. De hamvraag is of dat opweegt tegen de extra kosten.

Vertaling naar dichtheden

De berekening van aantallen en dichtheden dieren uit individuele DNA profielen is niet alleen theoretisch denkbaar, het is ook praktisch toegepast bij bijvoorbeeld otters, wolven en andere diersoorten. Dit zijn soorten waarbij een groot deel van de totale populatie individueel kan worden herkend door zo'n profiel. Bij diersoorten met grotere populaties, zoals de kleine marterachtigen, wordt het lastig om dat te bewerkstelligen. De aantalsschattingen moeten dan berusten op berekeningen met Merk en Terugvang (CMR = Capture Mark Recapture) modellen. Er kunnen foutenmarges ontstaan die belemmerend groot kunnen worden als niet aan de aannames wordt voldaan die bij deze modellen horen of wanneer de steekproefomvang te klein is.

Het voert te ver om al die aannames hier op te sommen, maar de belangrijkste aannamen zijn dat; (1) ieder individu evenveel kans zal hebben om bemonsterd te worden (in de val te komen en succesvol een DNA profiel af te staan), (2) dat er voldoende menging optreedt van individuen

in de ruimte tussen verschillende bemonsteringsperiodes en (3) dat de levensduur zodanig is (in relatie tot de bemonsteringsfrequentie) dat er een gereede kans is op hervangst. Tenslotte moet een voldoende grote steekproef worden verzameld. Op schaal van één of enkele deelgebieden, zoals bijv. polders die representatief zijn voor de provincie, zal dit naar verwachting mogelijk zijn. Hoewel vooralsnog onduidelijk blijft of binnen enkele polders een voldoende grote steekproef kan worden verzameld om te extrapoleren naar de gehele provincie.

Eindconclusie

De gedachte achter al dit werk is dat aantallen en dichtheden van de doelsoorten kunnen worden berekend wanneer individuele DNA profielen kunnen worden opgesteld. Met als doel de Staat van Instandhouding niet alleen te baseren op verandering in verspreiding, maar ook op verandering in talrijkheid.

Gebruik van DNA en het bepalen van individuele DNA profielen is vooralsnog de enige methode om iets te kunnen zeggen over aantalsontwikkelingen en trends van de doelsoorten. Voordat dit spoor van individuele herkenning op basis van DNA verder ingeslagen kan worden, is het nodig om de geteste methoden eerst verder te verfijnen. De proef zoals die in deze pilot is uitgevoerd, heeft nog geen methode opgeleverd die zondermeer kan worden ingezet op grotere schaal en voor langere periode. Het is daarom raadzaam om, alvorens over te gaan tot het opzetten van een meetnet met vast protocol, gedurende langere periode ervaring op te doen met het verzamelen van DNA met meerdere methoden en in meerdere gebieden.

Het hoogst haalbare met deze methode, is een index op basis van enkele representatieve deelgebieden. Het valt echter te verwachten dat zowel de onzekerheidsmarge als de verschillen tussen de jaren groot zullen zijn, en dat het mede daardoor (vele) jaren zal duren voordat een significante trend zichtbaar zal worden.

5.3 Aanbevelingen

Het is mogelijk om DNA op niet invasieve manier te bemachtigen ten behoeve van individuele herkenning van kleine marterachtigen. De resultaten van dit onderzoek geven aan dat speeksel en uitwerpselen hiervoor het best kunnen worden benut als bron van DNA. De methoden om deze te verzamelen hebben echter baat bij verdere verfijning en optimalisering, zodat het geheel aanzienlijk (kosten)efficiënter wordt.

Mogelijk zijn haren of urine ook geschikt als bron van DNA, maar daarover is op dit moment nog onvoldoende kennis. Evenals voor het gebruik van uitwerpselen, moet daarvoor eerst een efficiëntere wijze van verzamelen worden gevonden.

Gezien de gesignaleerde onzekerheden, nadelen en potentiële kosten bevelen we aan om nu nog niet direct vol in te zetten op de beoogde monitoring van populatie omvang van kleine marterachtigen op basis van individuele DNA profielen. De meest prangende onzekerheden die eerst beantwoord moeten worden, bestaan ten aanzien van de daadwerkelijke berekening van dichtheden, de mogelijke complicaties daarbij en de benodigde steekproefomvang en de haalbaarheid daarvan.

Uit de hier gepresenteerde resultaten ligt een combinatie met een cameravalnetwerk voor de hand. Waarbij het verzamelen van DNA materiaal uit speeksel en uitwerpselen kan meeliften op een nieuw te realiseren meetnet op basis van cameravallen. Daarbij kan de hier ontwikkelde en eventueel verder verfijnde Struikrover® Box dienen als efficiënte wijze voor het verzamelen van

presentiedata en daarbij tegelijkertijd dienen als DNA verzamelmethode. Deze combinatie achten wij de meest kansrijke methode voor het bepalen van de Staat van Instandhouding van kleine marterachtigen in de provincie.

6 Literatuur

- Harms V., Nowak C, Carl S, Munoz-Fuentes V. (2015) Experimental evaluation of genetic predator identification from saliva traces on wildlife kills. *Journal of Mammalogy* 96, p. 138-143.
- Hopken M.W., Orning E.K., Young J.K., Piaggio A.J. (2016) Molecular forensics in avian conservation: a DNA-based approach for identifying mammalian predators of ground-nesting birds and eggs. *BMC Research Notes* 9: 14.
- Koelewijn H.P., Jansman H.A.H., Boerwinkel M.C., Perez Haro M. (2010) The reintroduction of the Eurasian otter (*Lutra lutra*) into the Netherlands: hidden life revealed by noninvasive genetic monitoring. *Conservation genetics* 11: p. 601-614.
- La Haye M., De Groot G.A. (2017) Soort- en individuele herkenning van noordse woelmuis met eDNA: een pilot langs het kanaal Omval-Kolhorn. Rapport Zoogdierverseniging.
- Müskens, G. & S. Broekhuizen, 1998. Het leefgebied van een Bunzing. *De Levende Natuur* 99 (5): 185-188 (1998).
- van Norren, E. & La Haye, M. (2021). Verslag expert meeting met voorstel monitoring kleine marterachtigen ihkv Staat van instandhouding Fryslân (Notitie 2021.26). Zoogdierverseniging.
- Panasci M., Ballard W.B., Breck S., et al. (2012). Evaluation of fecal DNA preservation techniques and effects of sample age and diet on genotyping success. *Wildlife Management* 75: p. 1616-1624.
- Piaggio A.J., Shriner S.A., Young J.K., et al. (2020) DNA persistence in predator saliva from multiple species and methods for optimal recovery from depredated carcasses. *Journal of Mammalogy* 101: p. 298-306.
- Sirker M., Schneider P.M., Gomes I. (2016) A 17-month time course study of human RNA and DNA degradation in body fluids under dry and humid environmental conditions. *Int. Journal of Legal Medicine* 130: p. 1431-1438.
- Smaal, M., van Uchelen E. & van Manen, W. 2019. Kleine marters en andere grijze soorten in de provincie Groningen in 2018. Steekproefsgewijze nulmeting met beoordeling staat van instandhouding. Rapport Stichting Struikrovers 2019/01. Stichting Struikrovers, Assen.
- Smaal, M. & W van Manen, 2017. Monitoring weasels (*Mustella nivalis*) with nest boxes. *Lutra* 60(1): 19-26.
- Smaal, M. & W van Manen, 2023. Detection and monitoring of small mammals by trailcamera. *Lutra* 66(1).
- Tighe A.J. Overby S., Thurman K. et al. (2020) Investigating a simplified method for noninvasive genetic sampling in East African mammals using silica dried scat swabs. *Ecology and Evolution* 10: p. 3330-3337.
- Vynne, C., Baker, M.R. , Breuer, Z.K. , Wasser, S. K. (2012). Factors influencing degradation of DNA and hormones in maned wolf scat. *Animal Conservation*, 15: p. 184–194.
- Yao W., Mei C., Nan X., Hui L. (2016) Evaluation and comparison of in vitro degradation kinetics of DNA in serum, urine and saliva: a qualitative study. *Gene* 590: p.142-148.

Bijlage 1. Ideeën ter verbetering van de gebruikte technieken

In deze bijlage staan een aantal Ideeën voor verbetering van de gebruikte technieken uitgeschreven.

Kastval met 'nooduitgang' voor het verzamelen van DNA uit haren en van één exemplaar

Voor het opstellen van individuele profielen is het noodzakelijk dat het verzamelde DNA materiaal van één individu afkomstig is. We hebben daarom nagedacht over een verbeterde methode om haren van een enkel individu te verzamelen. Dit kan doormiddel van een dichtslaande inloopval, vergelijkbaar aan een val waarmee marterachtigen kunnen worden gevangen voor bijvoorbeeld zenderonderzoek. Door aan de achterkant van de val een nauwe ontsnappingsmogelijkheid met haarval aan te bieden, kunnen de marterachtigen zichzelf bevrijden waarbij ze haren achterlaten. Doordat de inloopval na het bezoek dichtgeslagen is, kan er geen tweede exemplaar meer in lopen.

Het is op voorhand echter niet uit te sluiten dat deze methode aanzienlijke stress veroorzaakt. Bovendien moet de val zodanig afgesteld worden dat de marters nog wel kunnen ontsnappen maar dat haren achterblijven. Hiervoor is een proefperiode noodzakelijk met twee à drie controle ronden per etmaal, zodat gevangen exemplaren die het niet lukt om uit de val te ontsnappen alsnog bevrijd kunnen worden voordat deze van honger, dorst en stress overlijden.

Gebruik van camera's met wifi verbinding

Camera's met wifi verbinding sturen gemaakte beelden vanuit het veld rechtstreeks door. Hierdoor is het mogelijk om de swabs zo snel mogelijk te nemen nadat door een doelsoort van het ei is gegeten, waardoor de kwaliteit van het monster hoger is en de kans op uitval in het lab kleiner. Bovendien zijn dagelijkse veldbezoeken niet meer nodig waarmee de kosten drastisch verminderen. Het verzamelen van speekselmonsters kan daardoor effectiever en efficiënter worden. We hebben praktijkervaring met dergelijke camera's (bijv. van het merk Seissiger), deze voldoen goed. De kosten voor dataverkeer zijn verwaarloosbaar laag in vergelijking tot overige kosten.

Sluisje om meer keutels te kunnen verzamelen

Het aanbrengen van een 'voorportaal' kan meer keutels en urine opleveren. Deze ervaring komt van het gebruik van nestkasten voor Wezels en Hermelijnen (Smaal & van Manen 2017). In deze nestkasten gebruikten deze soorten het sluisje als latrine, het eigenlijke verblijf hielden ze schoon. Het kan een manier zijn om meer keutels en urine te verzamelen. Het nadeel van deze methode is de timing van de bezoeken, omdat de kasten zeer onregelmatig worden gebruikt en het DNA tamelijk vers moet zijn, is het moeilijk te bepalen hoe vaak de kasten moeten worden gecontroleerd. Mogelijk kan een verklikker die een sms stuurt na een bezoek uitkomst bieden.

Door het aanbrengen van een sluisje ontstaat wel het risico dat Bosmuizen deze volslepen met blad en nestmateriaal.

Bijlage 2. Kostenschatting per valtype

Om de geteste methodieken onderling te kunnen schalen in termen van geld, schatten/berekenen we hier de kosten om tot een succesvolle bepaling van één individueel DNA-profiel van de doelsoorten te komen.

Tabel bijlage 3.1 Betekenis van de parameters, units en toelichting

Parameter	Betekenis	Unit	Opmerking
E	kosten om tot een succesvolle bepaling van een individueel DNA-profiel van de doelsoorten te komen.	(euro/succesvol profiel)	Dit is de som van de kosten om de vallen te maken, om ze te controleren en uit te zetten, en de kosten voor lab-analyse
$a*b*c$	<u>kosten om de vallen te maken</u>		
A	benodigde aantal vallen voor 1 DNA monster (=1/trefkans)	#	Bij de camerabuis is de trefkans groot en is het aantal vallen dat nodig is om een DNA monster te krijgen klein
B	factor	-	Er moeten soms meer monsters naar het lab om tot een succesvol profiel van de doelsoort te komen. Bij de monsters van de spiegels is het niet te zien of het monster van een marterachtige is of van een muis. De spiegel wordt altijd bemonsterd als er sporen van Wezel of Hermelijn op het sporenbed zichtbaar zijn.
c	kostprijs_productie	euro/val	de camerabuis is duurder in productie vanwege hoge kosten camera, afschrijven in 40 rondes (naar schatting 10 monsters verzameld). De kosten voor het maken van de verschillende valtypes zijn gelijk en bedragen € 100,- per stuk, daarvan zijn een kwart materiaalkosten. Dat is excl. de cameraval die in de Struikrover® Box zat (300 euro)
$a*b*d*e$	kosten om de vallen te controleren en uit te zetten		
d	kostprijs_controle	euro/val	de camerabuis is duurder in controleren en uitzetten omdat de camera moet worden ingesteld en de beelden moeten worden gecontroleerd

e	aantal controle rondes nodig om de gebruikte trefkans te halen ($= 1 + 14/f$)	# rondes	het aantal benodigde controle rondes hangt af van de veroudering/afbraak van DNA, welke mogelijk varieert per valtype. De gebruikte trefkansen (zie hfdst 3) hebben betrekking op 14 dagen. Bij een kortere periode neemt die trefkans af, en daarvoor corrigeren we hiermee. We tellen 1 dag erbij om de val uit te zetten.
f	aantal dagen waarna monster onbruikbaar is	dagen	Afhankelijk van het type DNA bron (speeksel/haar) en het microklimaat in de buis verschilt de afbraaksnelheid en de noodzaak tot vaker controleren.
b*g	kosten voor lab-analyse		
g	kostprijs voor labanalyse	euro/monster	deze parameter is onafhankelijk van valtype, maar wel mede bepalend voor onze schatting

Aannames tav tarieven en kosten

parameter	naam	unit	Waarde
h	dagtarief veldwerk	euro/dag	560
i	factor extra controle tijd camerabuizen	-	1,2
j	aantal vallen per dag controleren	#	60
f	aantal dagen waarna monster onbruikbaar is	dagen	1 voor speeksel, 7 voor uitwerpselen en haren
g	kostprijs voor labanalyse	euro/monster	200



Adres

Suderwei 2
9269 TZ Feanwâlden
Telefoon 0511 47 47 64
info@altwym.nl

www.altwym.nl

Adres Amsterdam

Gebouw Matrix II,
Science Park 400/K1.08/1.09
1098 XH Amsterdam