



Kennis-Doc2: Gedetailleerde uitleg steekproef muskusrat monitoring

Gebiedstypen

Om de meest optimale inzet van de eDNA methode te behalen is destijds bij de *Projectagenda eDNA bij muskus- en beverratbestrijding* gekozen voor het indelen van (sub)gebieden op basis van de muskusrataanwezigheid. Dat resulteerde in 3 verschillende gebiedstypen waarbij op basis van de geschatte aantallen aanwezige muskusratten (met bijbehorende aanpak plus doelstelling) zijn gedefinieerd.

Het probleem bij die gebiedstypering was, dat deze was gebaseerd op vangstdata (van een eerder jaar) die, vanwege diverse redenen, niet altijd representatief zijn voor de werkelijke, actuele lokale muskusratpopulatie.

De ervaringen uit de recente eDNA projecten hebben geleerd dat het met een eDNA steekproef, goed mogelijk moet zijn om een objectieve, nauwkeurige inschatting te maken van de actuele muskusratpopulatie in een gedefinieerd sub-gebied. Deze steekproef-aanpak zal nog in de huidige projecten worden opgezet. De initiële gebiedstypering gebaseerd op de vangsten van voorgaande jaren wordt nu gebruikt om de gewenste grootte van het sub-gebied te bepalen, en met hoeveel monsters er initieel wordt bemonsterd voor de steek proef. Verder heeft de geografische ligging van het gebied en de populatie druk van de aangrenzende gebieden invloed op de grootte en het bemonsteringsinterval (Tabel 1).

	Gemiddelde vangsten voorgaande 3 jaar	Gemiddelde km waterweg (schatting)	Start aantal trajecten steekproef	Interval bemonstering jaren
Grensgebied	69	1.227	40	0,75*
Binnenland gebied	9	2.058	40	1
Historisch leeg gebied	7	4.286	80	3-5

Tabel 1 Eigenschappen van de verschillende gebiedstypen.

* Het bemonsteringsinterval bij Grensgebied is 0.75 omdat bepaalde migratie routes 2x per jaar bemonsterd kunnen worden, terwijl kavelsloten 1x per jaar kunnen. Ook in de Binnenland en Historisch lege gebieden kunnen sommige boezemwateren die als migratie route dienen met een korter interval bemonsterd worden.

Het is dus mogelijk om *vooraf* objectief te bepalen wat de *actuele* muskusrataanwezigheid van een sub-gebied om daarmee te bepalen of het zinvol is om de eDNA aanpak in te zetten bij het speuren.

Er zullen voor elk van de 3 gedefinieerde gebiedstypen specifieke eDNA veldrichtlijnen worden opgesteld (zie richtlijn 3 inrichten 3 klasse sub-gebieden).

eDNA steekproef

De eerste stap in de muskusrat eDNA aanpak is het typeren van (sub)gebieden om de actuele status van de muskusratpopulatie te bepalen. Hiervoor worden alle muskusratbeheersgebieden opgedeeld in, voor de bestrijders logische, **sub-gebieden**. De grootte van de sub-gebieden wordt deels bepaald door de historische vangsten en geografische ligging. Historisch lege gebieden zijn gebieden waar de afgelopen 3 jaar geen of zeer weinig vangsten waren. Deze grenzen niet direct aan een gebied met een hoog aantal vangsten en kunnen daarom groter gemaakt worden dan gebieden met een hoger aantal vangsten, of die direct grenzen aan een gebied met een hoog aantal vangsten. Voor Historisch lege gebieden komt het geschat aantal waterwegen op ~ 4.200 km. Binnenland gebieden zijn gebieden met nog wel vangsten, en of die grenzen aan gebieden met een hoger aantal vangsten. Deze gebieden kunnen een bufferzone vormen tussen Historisch lege gebieden en grensgebieden en bevatten ~ 2.000 km aan waterwegen. De typering Grensgebied komt voort uit de aanwezigheid van een sub-gebied dat grenst aan een gebied dat niet behoort tot de beheerseenheid en waar veel muskusratten aanwezig zijn zodat migratie een wezenlijk gevaar is. Deze gebieden hebben vaak ook een hoger aantal vangsten. Een Grensgebied heeft ~1200 km waterweg.

Voor ieder sub-gebied wordt een eDNA steekproef genomen van een specifiek aantal 5-km trajecten, zodanig dat er een statistisch betrouwbare inschatting gemaakt kan worden van de muskusrataanwezigheid in het sub-gebied. Voor een "Leeg" sub-gebied is een steekproef nodig van 80 monsters. Voor een "niet-leeg" sub-gebied zijn dit 40 monsters (zie Bijlage II voor toelichting eDNA steekproefgrootte). Hiermee kan de typering van een sub-gebied worden bepaald. Er zijn drie typering mogelijk: "Vol", "Middelvol", en "Leeg".

Interpretatie eDNA steekproef

Wanneer een steekproef is gedaan, is het mogelijk om op basis van de verkregen resultaten een actuele sub-gebiedstypering te doen en bijbehorende acties te bepalen. Omdat het steekproeven betreft, zijn de uitkomsten voorspellend voor een statistisch gedefinieerde range. Uitgaande van een statistische zekerheid van 80% zijn de onderstaande typering en bijbehorende zekerheidsintervallen bepaald (zie Tabel). De achterliggende informatie bij de steekproeven is beschreven in Bijlagen I en II.

De voorgestelde aanpak is een steekproef in twee fasen:

- I. Een steekproef van 40 eDNA monsters die *Middelvol* en *Vol* gebieden kunnen identificeren.
- II. Een steekproef van 40 additionele eDNA monsters om potentiële *Leeg* gebieden te typeren die 0 of 1 positief traject in de Fase-I steekproef hadden.

Grootte steekproef	# positieve 5-km trajecten	Gemiddeld # muskusrat ⁵	eDNA inzet	eDNA veldrichtlijn	Typering sub-gebied
Fase-I					
40	> 6	250	Nee	Traditioneel speuren/vangen	vol
	2 - 6	117	Ja	Heel sub-gebied eDNA bemonsteren	Middelvol
	0 - 1	44	n.v.t.	40 extra monsters analyseren	Leeg? [*]
Fase-II					
80 (40 + 40)	0	2	Nee	Niet meer speuren	Leeg
	1 - 2	31	Ja	Alleen positieve trajecten speuren	Leeg
	3 - 12	102	Ja	Heel sub-gebied eDNA bemonsteren	Middelvol
	> 12 [†]	200	Nee	Traditioneel speuren/vangen	Vol

* Je kan deze uitkomst niet baseren op een steekproef van 40 eDNA 5-km trajectmonsters, daar heb je er minstens 80 voor nodig

⁵ Voorbeeld 2.000 km deelgebied, 1% = 0.01 x 400 5-km traject x 2,5 muskusrat/traject (bouw) = 10 muskusratten

[†] Dit zal vrijwel nooit voorkomen omdat bij de Fase-I steekproef slecht maximaal 1 positief traject is gevonden

Aanvullende eDNA steekproef

Wanneer de “Middelvol” en “Vol” steekproef resultaten aangeven dat de muskusratten niet random verspreid zijn over een sub-gebied, maar **clusteren** in een gedeelte van een sub-gebied, dan is het mogelijk om het sub-gebied op te delen in sub-sub-gebieden. Wanneer er vervolgens weer valide steekproeven worden ontworpen voor deze sub-sub-gebieden, is het waarschijnlijk vaak mogelijk om gedeeltes van sub-gebieden “Leeg” te typeren zodat daar geen acties meer nodig zijn en zo een aanzienlijke besparing te realiseren valt. Het is zeer waarschijnlijk dat de kennis over de gebiedsindelingen die aanwezig is bij de bestrijders hier een cruciale rol bij zullen spelen. Hoe deze aanpak precies werkt staat beschreven in Veldrichtlijn Middelvol gebied Bijlage III.

Conclusie

Uitgaande van een gemiddelde grootte van een sub-gebied van 400 5-km trajecten (= 2.000 km), is een Fase-I steekproef van 40 bemonsterde 5-km trajecten 10% van het totaal.

Voor een “Leeg?” Fase-I + Fase-II steekproef van 80 (= 40 + 40) bemonsterde 5-km trajecten is dit 20% van het totaal.

De besparing op monsters en speuractiviteit kan oplopen tot wel 60% als er op een verantwoorde manier rekening wordt gehouden met geclusterde verspreiding van muskusratten (bijvoorbeeld in een polder).

eDNA veldrichtlijnen bemonstering

De oorspronkelijke insteek was de ontwikkeling van een eDNA veldprotocol met opeenvolgende stappen die gevolgd dienen te worden voor een succesvolle aanpak van muskusrat speuren m.b.v. eDNA.

In de afgelopen jaren is gebleken dat er, als gevolg van de ontelbare variabelen, geen sprake is van één veldprotocol, maar van een set van flexibele eDNA veldrichtlijnen. Hoewel dit de implementatie van eDNA compliceert, is de eDNA methode uiteindelijk veel gemakkelijker te integreren in de dagelijkse praktijk.

Veldrichtlijn Vol gebied

Bij een "Vol" gebied zijn er zoveel muskusratten aanwezig dat speuren m.b.v. eDNA geen toegevoegde waarde heeft. In volle gebieden wordt de eDNA aanpak niet ingezet. De muskusrataanwezigheid zal dus eerst door middel van "traditioneel" speuren en vangen terug moeten worden gebracht naar het niveau van "Middelvol" voordat eDNA kan worden ingezet.

Veldrichtlijn Middelvol gebied

Wanneer een gebied Middelvol is bevatten 2-6 van de trajecten muskusrat eDNA. In dit geval wordt het hele sub-gebied opgevolgd met eDNA. Bemonsteren van alle waterwegen, en positieve en zwak positieve opvolgen met eDNA lokalisatie trajecten indien nodig. De opvolging met eDNA is de reden dat voor gebieden waarvan verwacht wordt dat ze in deze categorie zullen vallen (Grensgebieden en sommige Binnenland gebieden) deze niet zo groot gemaakt als Historisch leeg gebieden. Het is, kijkend naar de vangsten in het verleden waarschijnlijk dat in een Middelvol gebied de trajecten clusteren. Wanneer dit het geval is, dan kan het sub-gebied opgedeeld worden in kleinere sub-sub-gebieden. Deze sub-sub-gebieden worden dan aangevuld tot 40 trajecten en opnieuw getypeerd. Bijvoorbeeld als in sub-sub-gebied A 15 van de 40 bemonsterde trajecten liggen en in sub-sub-gebied B 25 van de bemonsterde trajecten, dan worden er in gebied A 25 extra monsters genomen en in gebied B 15 extra monsters, zodat beide gebieden weer op 40 komen.

Het kan zijn dat er na de indeling van de sub-sub-gebieden uitkomt dat een van deze sub-sub-gebieden bijvoorbeeld gebied A vol is. Hier wordt dan traditioneel gespeurd. Als gebied B Middelvol is wordt deze geheel met eDNA bemonsterd.

Om leeg te bevestigen moeten er altijd in totaal 80 trajecten bemonsterd worden. Dus als een sub-sub-gebied na 40 monsters mogelijk leeg is zouden er nog 40 trajecten bemonsterd moeten worden om leeg te bevestigen. De voorwaarde is hier dat het sub-sub-gebied niet zo klein is dat er met 80 trajecten vlak-dekkend bemonsterd wordt. Als het sub-sub-gebied te klein is kan er met de eDNA coördinator overlegd worden of er vlakdekkend bemonsterd wordt, en hoeveel extra trajecten er eventueel nog genomen moeten worden.

Veldrichtlijn Leeg gebied

Wanneer een gebied na bemonstering van 80 trajecten als Leeg aangeduid kan worden (slechts 0-2 trajecten met eDNA), dan worden de eventuele trajecten met eDNA nog opgevolgd met eDNA (lokalisatie en controle). In principe kunnen alle 3 gebiedstypes Historisch leeg, Binnenland en Grensgebied als leeg geclassificeerd worden. Echter de ligging van deze gebieden ten opzichte van gebieden met hogere populatie moet meegenomen worden in het bemonsteringsinterval. Voor Grensgebieden en Binnenlandgebieden kan het bemonsteringsinterval na leeg bijvoorbeeld 1-3 jaar zijn. Dit wordt bepaald in overleg met de eDNA coördinator.

Met opmerkingen [DM1]: Ik zou zeggen 'Om leeg te bevestigen'

Veldrichtlijn Historisch leeg gebied

Wanneer een Historisch leeg gebied als leeg bevestigd is met eDNA is het bemonsteringsinterval 3-5 jaar. Deze gebieden kunnen langer met rust gelaten worden, omdat ze niet rechtstreeks grenzen aan gebieden met een hogere populatie. Voor Historisch lege gebieden kan net als bij de andere gebieden ervoor gekozen worden om belangrijke migratie routes vaker te bemonsteren dan de poldersloten. Dit zal dan met name gaan om vaarten die een ononderbroken weg vormen van een gebied met een hoge populatie naar het Historisch lege gebied.

Bijlagen

Bijlage I: Oorspronkelijke gebiedstypering

Om de meest optimale inzet van de eDNA methode te behalen is destijds bij de *Projectagenda eDNA bij muskus- en beverratbestrijding* gekozen voor het indelen van (sub)gebieden op basis van de muskusrataanzigtheid. Dat resulteerde in onderstaande tabel waar op basis van de geschatte aantallen aanwezige muskusratten (met bijbehorende aanpak plus doelstelling) vijf verschillende gebiedstypen zijn gedefinieerd.

# bouwen/1000 km	Typering	Aanpak	Doel
> 12	Vol	Vangen zonder eDNA	Beheersbaar maken
4 – 12	Middelvol	Verminderen	Leger maken
2 – 4	Bijna leeg	Volledig-verwijderen	Leeg maken
(recent) 0 – 2	Leeg	Bewaken	Leeg houden
(langdurig) 0	Historisch leeg	Check	Leeg bevestigen

Bijlage II: Grootte van de eDNA steekproef

In deze bijlage wordt in het kort uiteengezet wat de berekening is geweest om te komen tot het juiste aantal monsters voor betrouwbare en informatieve eDNA steekproeven zoals die gebruikt zullen gaan worden in de eDNA aanpak.

Omdat de grootte van een steekproef afhankelijk is van het aantal muskusratten dat in een sub-gebied aanwezig is zijn er 2 typen eDNA steekproeven ontworpen:

1. Steekproef voor een Leeg sub-gebied
2. Steekproef voor een Niet-Leeg sub-gebied (= middelvul + vol)

ad 1. eDNA steekproef verwacht Leeg sub-gebied (bv in Friesland)

- Uitgangspunt is de Friesland *bovengrens* van een *Leeg* sub-gebied: 250 vangsten in 30.000 km; Bij gemiddeld 2,5 muskusratten per locatie, is die grens dus 100 positieve locaties per 30.000 km; Oftewel 100 positieve locaties per 6.000 (= 30.000/5) 5-km trajecten; De kans om een positieve locatie aan te treffen is 100 locaties/6.000 5-km trajecten: **P = 1,7%**.
- De grootte van steekproef wordt berekend met een statistische poweranalyse gebaseerd op een binominale distributie, waarbij je met 80% zekerheid in staat bent om minstens 1 eDNA positief 5-km traject (= een eDNA positieve locatie met minimaal 1 actieve bouw) te vinden, indien er, met 1,7% kans een actieve bouw aanwezig is ergens in een sub-gebied. Deze 80% grens is een algemeen aanvaard niveau in de statistiek;
- De uitkomst is een steekproef van **80** 5-km trajecten per sub-gebied. Dit komt neer op ~24% van elk sub-gebied van ~2.000 km (= ~400 5-km trajecten).

ad 2. eDNA steekproef verwacht Niet Leeg sub-gebied (bv in Noord-Holland)

- Uitgangspunt is de helft van het aantal monsters (5-km trajecten) uit steekproef 1, **40**;
- Hiermee kan minstens één positieve locatie worden bepaald met een kans van **P = 3,3%**: 80 positieve locaties/2.400 5-km trajecten;
- Bij gemiddeld 2,5 muskusratten per locatie, is dat dus 200 muskusratten per 12.000 km;
- Deze steekproef komt neer op ~16% van elk sub-gebied van ~1.500 km (= ~300 5-km trajecten).

NB: Hoewel wellicht contra-intuïtief, doet het er bij deze eDNA steekproeven niet toe hoe groot het te bevragen sub-gebied is. Het aantal samples in de steekproef zal per sub-gebied altijd even groot zijn omdat het gebaseerd is op een kans van voorkomen en de kans is onafhankelijk van de grootte van een gebied.

Grootte steekproef	# positieve 5-km trajecten	% positieve trajecten	Bino-minale kans	Lage range mogelijke muskusrat druk*	Hoge range mogelijke muskusrat druk*	Laag # muskus-rat [§]	Hoog # muskus-rat [§]	Typering sub-gebied
Fase-I								
40	> 6	>13%	0,1%	8,1 - 25%	x	>1.215	>3.750	vol
	2 - 6	4,2 - 13%	48%	1,4 - 12%	6,6% - 22%	210	3.300	Middelvol
	0 - 1	0 - 2,1%	52%	0 - 5%	0,2% - 8,8%	0	1.320	Leeg?
Fase-II								
80 (40 + 40)	0	0%	20%	0 - 2,7%	x	0	405	Leeg
	1 - 2	1,0 - 2,1%	58%	0,1 - 4,5%	0,7% - 6,1%	15	915	Leeg
	3 - 12	3,1 - 13%	22%	1,3 - 7,6%	8,0% - 19%	195	2.850	Middelvol
	> 12	>13%	0%	8,8 - 20%	x	>1.320	>3.000	Vol

* Statistische range uitgaande van het aantal positieve 5-km trajecten in de eDNA steekproef

[§] Voorbeeld Friesland, 1% = 0.01 x 6.000 5-km traject x 2,5 muskusrat/traject (bouw) = 150 muskusratten

Bijlage III: Inzet eDNA steekproeven

Om eDNA steekproeven zo (kosten-)efficiënt mogelijk in te zetten, worden deze uitgevoerd in 2 opeenvolgende deelsteekproeven van elk 40 eDNA monsters. Afhankelijk van de uitkomst van de Fase-I deelsteekproef is een Fase-II deelsteekproef noodzakelijk.

Zoals te zien in Bijlage II, is het met een steekproef van 40 onmogelijk om een sub-gebied "Leeg" te verklaren wanneer er 0 of 1 eDNA positieve monsters worden aangetroffen in de steekproef.

Voor het definitief "Leeg" typeren van een sub-gebied is een steekproef van minimaal 80 monsters nodig.

Door een tweede steekproef uit te voeren van 40 monsters in een deelgebied dat in Fase I een uitkomst had van 0 of 1 positieve 5-km traject, is het mogelijk om tot een steekproef van 80 monsters te komen en op die manier mogelijk wel een gebied als "Leeg" te kunnen typeren.

Gebieden die initieel als Historisch leeg getypeerd zijn, worden gelijk met 80 monsters bemonsterd.

Geografische informatie

Bij de statistische benadering van de steekproeven is ervan uitgegaan dat de positieve muskusratlocaties *random* verdeeld over sub-gebieden zijn. Dat is uiteraard niet de werkelijke toestand. Het is voorspelbaar dat binnen sub-gebieden er weer sub-sub-gebieden zullen zijn die veel of juist weinig muskusratten bevatten ten opzichte van het gemiddelde van een sub-gebied. Dit zou ertoe kunnen leiden dat in sommige sub-gebieden er te veel zal worden gespeurd, terwijl in andere sub-gebieden te weinig. In beide gevallen is dat onwenselijk. Dit kan worden opgelost door sub-gebieden in het geval van **niet-uniforme** verdeling van positieve 5-km steekproef monsters onder te verdelen in sub-sub-gebied en voor ieder sub-sub-gebied weer een goede steekproef te ontwerpen. Op deze manier "zoom" je steeds verder in op specifiekere gebieden met hoge muskusrat aanwezigheid en voorkom je onnodig speuren in gebieden met lage muskusrat aanwezigheid. Hieronder volgen een aantal voorbeelden van het gebruik van sub-sub-gebieden als gevolg van geografische non-random verdeling van positieve 5-km steekproef monsters:

Situatie A

Observatie: Alle of een groot deel van de positieve 5-km trajecten (>3) ligt in één helft van een sub-gebied.

Oplossing: Deel het sub-gebied in 2 gelijke delen en voeg voor het hoge deel 20 nieuwe steekproef samples toe en voor het lage deel 60 nieuwe samples. Met de nieuwe steekproeven van 40 en respectievelijk 80 kan voor ieder sub-sub-gebied een definitieve typering worden vastgesteld.

Wanneer in eerste instantie 4 positieve 5-km trajecten zijn gevonden, en na opdeling 8 respectievelijk 0, dan is de "besparing" via het niet-te-hoeven-bemonsteren lage sub-sub-gebied: $400/2 = 200$, minus steekproef 80 = 120 5-km trajecten, $120/400 = 30\%$ besparing voor het hele sub-gebied.

Situatie B

Observatie: Alle of een groot deel van de positieve 5-km trajecten (>3) ligt in klein deel (20%) van een sub-gebied.

Oplossing: Deel het sub-gebied in 2 delen op basis van de positieve 5-km trajecten en voeg voor het hoge deel $40 - (40 \times 20\%) = 32$ nieuwe steekproef samples toe en voor het lage deel $80 - 32 = 48$ nieuwe samples. Met de nieuwe steekproeven van 40 en respectievelijk 80 kan voor ieder sub-sub-gebied een definitieve typering worden vastgesteld.

Wanneer in eerste instantie 5 positieve 5-km trajecten zijn gevonden, en na opdeling 6 respectievelijk 0, dan is de "besparing" via het lage sub-sub-gebied $400 \times 20\% = 320$, minus steekproef 80 = 240 5-km trajecten, $240/400 = 60\%$ besparing voor het hele sub-gebied.

Situatie etc...

Op deze manier zijn er veel situaties mogelijk, ook door b.v. verbinding met aangrenzende gebieden, etc. Het is wel belangrijk dat **in alle gevallen** er een **statistisch verantwoorde steekproef** wordt gebruikt!

Ook is het evident dat de bestrijders met hun kennis over de gebieden een belangrijke rol spelen in deze aanpak, omdat zij "logische" sub-sub-gebied in sub-gebieden zullen herkennen.

Bijlage III Tabel gebiedseigenschappen

gebied	geschat km waterweg	geschat aantal trajecten	% bij 40 bemonsteren	% bij 80 bemonsteren	vangst 2020	vangst 2021	vangst 2022
1	5.121	1.219	nvt	7	8	5	0
2	4.142	986	nvt	8	14	14	0
3	3.499	833	nvt	10	3	3	0
4	4.384	1.044	nvt	8	16	22	2
5	2.371	564	7	14	10	3	1
6	1.315	313	13	26	70	34	184
7	2.151	512	8	16	41	33	22
8	1.833	436	9	18	5	2	0
9	1.738	414	10	19	23	14	3
10	1.287	306	13	26	23	14	108
11	2.114	503	8	16	1	7	3
12	1.078	257	16	31	71	38	80
13	2.144	510	8	16	0	0	0

Tabel 1 Eigenschappen gebieden

Groen: Historisch leeg, Blauw: Binnenland, Rood: Grensgebied

De classificering van de gebieden (Figuur 1) wordt deels gebaseerd op het aantal vangsten dat er in de afgelopen 3 jaar gedaan was.

Gebied 13 had de afgelopen 3 jaar geen vangsten, maar grenst aan gebied 12, waar wel nog een redelijk aantal vangsten waren, en is daarom een binnenland gebied i.p.v. een Historisch leeg gebied

% trajecten geeft aan het percentage van het geschat aantal trajecten dat bemonsterd wordt