



UNIE VAN
WATERSCHAPPEN



UNIE VAN
WATERSCHAPPEN



Ondersteuning van muskusrat en beverrat beheer met behulp van eDNA

Resultaten van het LIFE MICA project

Auteurs: Mirjam Boonstra¹, Timo Breit², Rob Dekker², Wim Ensink², Selina van Leeuwen², Dolf Moerkens³

1: Wetterskip Fryslân, 2: Universiteit van Amsterdam, 3: Unie van Waterschappen

Inhoud

1. Introductie.....	2
1.1 Voorafgaand onderzoek.....	2
1.2. Life MICA en test gebieden	3
2 Resultaten.....	4
2.1 Testen van de veldaanpak.....	4
2.2 Opschaling van praktijktesten.....	6
2.3 Semi-willekeurige steekproeven.....	13
2.4 Beverratten eDNA	22
2.5 Testen buiten Nederland	23
3. Ontwikkelde hulpmiddelen.....	25
3.1 Autosampler	25
3.2 Op afstand bestuurbare boot.....	26
3.3 Handmatige bemonstering	26
3.4 eDNA-app	27
4. Inschatting besparing eDNA aanpak.....	28
5. Discussie en conclusies.....	29
6. Toekomst en aanbevelingen	30

1. Introductie

Nederland is een waterrijk land waarvan 60% overstromingsgevoelig is. Vanwege deze gevoeligheid voor overstromingen vormen invasieve soorten zoals muskusratten en beverratten niet alleen een bedreiging voor ecosystemen, maar ook voor infrastructuur ter voorkoming van overstromingen. Nederland heeft ongeveer 300.000 km², de 21 Waterschappen zijn verantwoordelijk voor het beheer van muskusratten en beverratten. Het opsporen van beverratten en muskusratten door de visuele sporen die ze achterlaten is een gespecialiseerde vaardigheid. Daarom wordt het beheer uitgevoerd door ~400 professionele bestrijders in dienst van de waterschappen.

De totale kosten van muskusratten- en beverratbeheer bedragen meer dan 35 miljoen euro per jaar. Speuren is het duurste onderdeel van het beheer en vormt 70 % van de totale kosten. De Waterschappen willen de bestaande populatie muskusratten in Nederland uitroeien en in 2034 aanwezigheid beperken tot de landsgrenzen, en dan met name de grens met Duitsland. Nederland is een deltagebied, en er komen veel rivieren en kleinere waterwegen vanuit Duitsland Nederland binnen, die gemonitord zullen moeten worden om her-kolonisatie te voorkomen. Beverratten zijn al grotendeels tot aan de grens met Duitsland teruggedrongen. In tegenstelling tot Duitsland heeft Vlaanderen ook eigen professionele bestrijders, die in veel gebieden in Vlaanderen succesvol zijn geweest in het terugdringen van populaties muskusratten. Migratie vanuit Vlaanderen naar Nederland is dus een minder groot probleem dan migratie vanuit Duitsland.

Vanwege de hoge kosten van het speuren wilden de Waterschappen onderzoeken of detectie van muskusrat en beverrat door middel van environmental (omgevings) DNA (eDNA) kan worden gebruikt als een sneller, kosten effectiever en mogelijk nauwkeuriger alternatief voor visueel speuren, voornamelijk in gebieden met een lage muskusrat/beverrat populatiedichtheid. De Dutch Genomics and Support Provider (MAD, UvA) was benaderd om onderzoek te doen naar de mogelijkheid van eDNA als extra hulpmiddel voor de detectie van muskusratten en beverratten. Dit onderzoek was deel betaald door de EU via het LIFE MICA project, en door de Unie van Waterschappen.

1.1 Voorafgaand onderzoek

Dit onderzoek vond plaats vóór het LIFE MICA-project. Om te bepalen of muskusrat eDNA kan worden gedetecteerd in oppervlaktewater werden qPCR-primers en taqman-probes ontwikkeld. Primers werden getest op specificiteit, om ervoor te zorgen dat de qPCR alleen muskusrat eDNA detecteert. De qPCR werd vervolgens getest op oppervlaktewatermonsters genomen van locaties met bevestigde muskusrattenaanwezigheid en van locaties waar geen visuele sporen van muskusratten waren gevonden.

De testen bevestigden de aanwezigheid van muskusratten voor de locaties met bekende muskusrattenaanwezigheid. Een van de monsters waarvan werd verwacht dat deze negatief zou zijn voor muskusratten-eDNA, kwam positief terug en verdere inspectie wees uit dat er inderdaad muskusratten op deze locatie waren. Dit was de eerste keer dat een muskusrat werd gedetecteerd met behulp van eDNA in een situatie waarin er geen visuele sporen waren.

Meestal wordt eDNA-onderzoek uitgevoerd door grote hoeveelheden water, vaak 5-10 liter, te bemonsteren. Gezien de 300.000 km aan waterwegen in Nederland bleek dit al snel geen haalbare aanpak voor de detectie van muskus en beverratten. Een aanpak met het nemen van 500 ml gepoolde monsters (om de 25 m wordt 2.5 ml water opgenomen, en in dezelfde bemonsterfles gepompt) over 3-5 km werd daarom getest en er werd vastgesteld dat de qPCR gevoelig genoeg was om muskus en beverrat eDNA in deze monsters (hierna pool monsters genoemd) te detecteren.

1.2. Life MICA en test gebieden

Na de initiële experimenten werd het onderzoek verdergezet in de context van LIFE MICA. LIFE MICA was een door de EU gesubsidieerde samenwerking tussen overheden en onderzoeksorganisaties in België, Duitsland, en Nederland. Het doel is om nieuwe beheer strategieën en technische hulpmiddelen te ontwikkelen, om schade aan ecosystemen en infrastructuur te voorkomen. Voor het eDNA-deel van het project zijn verschillende testgebieden geselecteerd in Nederland, België en Duitsland. Andere projecten binnen LIFE MICA zijn slimme vangkooien, wild camera's, DNA mapping, een dashboard met vangstgegevens van de partners, milieu-impact en outreach. Deze projecten zullen door de verantwoordelijke partners in afzonderlijke rapporten worden beschreven. Er wordt onder een kort overzicht gegeven van de testgebieden, op basis van de beschrijving in de LIFE MICA-financieringsaanvraag. Figuur 1 toont de LIFE MICA testgebieden in Nederland.

1.2.1. Hunze & Aa's langs de Duitse grens (gebied 11)

Beverratten in Nederland bevinden zich meestal in de buurt van de grens met Duitsland. Door succesvol beheer heeft Nederland geen eigen populatie beverratten meer. De grensgebieden van Hunze & Aa's lopen voortdurend risico op her-kolonisatie als gevolg van inefficiënt beheer en de daaruit voortvloeiende hogere populaties over de grens in Duitsland en het aantal waterwegen dat de grens oversteekt. De oostgrens van het beheersgebied van Hunze & Aa's is daarom gekozen voor het testen van de eDNA-methode op beverrat detectie, omdat het een hoog migratiegebied is voor beverratten uit Duitsland. Muskusratten migreren ook vanuit Duitsland, maar Hunze & Aa's heeft ook nog steeds een eigen muskusrattenpopulatie. In 2018 waren er 147 beverratten gevangen in het beheersgebied van Hunze & Aa's. Twee van de belangrijkste natuurgebieden zijn het Lieftingsbroek (Natura 2000) en het Metbroekbos. Het gebied bevat 4.690 km watergangen en sloten en 717 km dijken.

1.2.2. Noord-Holland ten Noorden van Alkmaar (gebied 9)

Het gebied Noord-Holland boven Alkmaar maakt deel uit van het beheergebied van Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier. Het wordt de laatste jaren gekenmerkt door een lager aantal vangsten in vergelijking met andere gebieden in Noord-Holland en Nederland. In 2018 waren in dit gebied 409 muskusratten gevangen. Het gebied heeft ongeveer 11.000 km waterweg en 1.882 km dijken, en heeft één groot Natura 2000-gebied in de duinen bij de kust (19.430 ha).

1.2.3. Wetterskip Fryslân (gebied 8)

Wetterskip Fryslân is zeer succesvol geweest in het terugdringen van de muskusrattenpopulatie, van 2.668 in 2014 naar slechts 552 in 2018. Het gebied telt circa 30.000 km aan waterwegen en bevat 17 Natura 2000-gebieden, geheel of gedeeltelijk. Het lage aantal vangsten, geografische ligging en

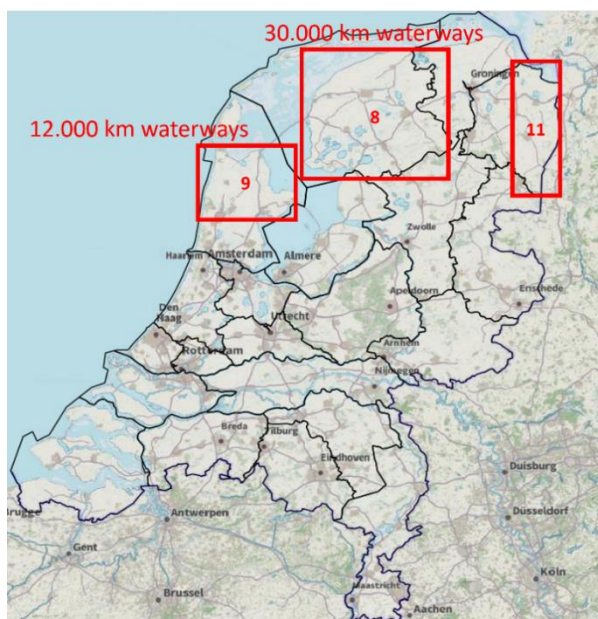
natuurlijk belang maakten Wetterskip Fryslân zeer geschikt voor deelname aan het experiment. De aangrenzende beheersgebieden hebben aan de start van het project nog steeds hoge vangstaantallen in vergelijking met Wetterskip Fryslân, waardoor dit beheersgebied model staat voor de gewenste toekomstige situatie waarin de muskusrattenpopulaties in het binnenland zo goed als uitgeroeid zijn en her-populatie voornamelijk vanuit Duitsland zal plaatsvinden.

1.2.4. België, Galmaarden en Hoogstraten (gebieden 6 en 7)

Het gebied van Hoogstraten in Vlaanderen bevat het Natura 2000-gebied "Heesbossen, Vallei van de rivieren Marke en Merkske, Ringven en zijn valleien langs de Heerlese Loop". Het heeft de afgelopen jaren een zeer laag aantal vangsten gehad, 1 muskusrat werd gevangen in 2017 en geen enkele in 2018. Het gebied Galmaarden/Markvallei Herne omvat 10% van het Natura 2000-gebied BE2400009 "Hallerbos en nabije boscomplexen met brongebieden en heiden". Na een periode van lage vangsten (minder dan 10 in 2014) was er een stijging naar 40 in 2017. Het gebied heeft te maken met een toestroom vanuit Wallonië via de rivier de Mark. In beide gebieden is een pilot eDNA experiment gedaan.

1.2.5. Duitsland Aschauteiche (gebied 2)

Het Aschauteiche gebied bestaat uit 50 visvijvers en een smal deel van de rivier de Aschau. De laatste jaren zijn er in dit gebied geen muskusratten gevangen, maar beverratten zijn er nog wel aanwezig. Er zijn otters aanwezig in dit gebied, en de focus in dit gebied zijn de slimme vangkooien om bijvangst van otters te voorkomen. In dit gebied is een pilot gedaan.



Figuur 1 LIFE MICA gebieden in Nederland. Gebied 8 & 9 zijn de muskusrat focus gebieden, Gebied 11 is het Beverrat focusgebied

2 Resultaten

2.1 Testen van de veldaanpak.

De eerste testen binnen LIFE MICA waren gefocust op het verbeteren van de lab protocollen, veld aanpak, en het testen van de bemonsterapparatuur beschreven in deel 3 van dit verslag. Tijdens deze periode was er een interne controle ontwikkeld om inhibitie van de qPCR te detecteren. Door gebruik van een interne controle wordt bevestigd dat een test negatief is omdat er geen DNA van de doelsoort

is, en niet omdat de PCR niet heeft gewerkt door inhibitie (verstoring van de PCR). Deze testen vonden met name plaats gedurende de periode 2019-2021.

De basis van de veldaanpak is het verzamelen van poolmonsters. Hiervoor wordt over een lengte van 3-5 km steeds een kleine hoeveelheid oppervlaktewater bemonsterd, tot een eindvolume van 500 ml. De trajecten van 3-5 km worden monitoringstrajecten genoemd. Wanneer een monitoringstraject positief is voor muskusrat eDNA, dan wordt het opgevolgd. In de eerste versie van de veldaanpak werden de 5 km trajecten opgevolgd met puntmonsters van 25 ml om de 100 m. Bij de eerste opvolging bleek al dat dit niet haalbaar is, omdat het te arbeidsintensief en te duur is om voor 3-5 km 30-50 puntmonsters te nemen. Het komt ook niet overeen met wat er bekend is van het gedrag van muskusratten. Een onderzoek naar het leefgebied en aantal bouwen van met GPS gezenderde muskusratten liet zien dat hun leefgebied tussen de 317 en 2.704 m ligt, met een gemiddelde van 1.132 m (Heeres & Struijf 2016). Vanwege het gemiddelde leefgebied van muskusratten is de opvolging aangepast naar trajecten van 1 km om het leefgebied van de muskusratten beter te kunnen lokaliseren, deze trajecten worden lokalisatie trajecten genoemd. Voor elk 1 km traject wordt wederom 500 ml water bemonsterd.

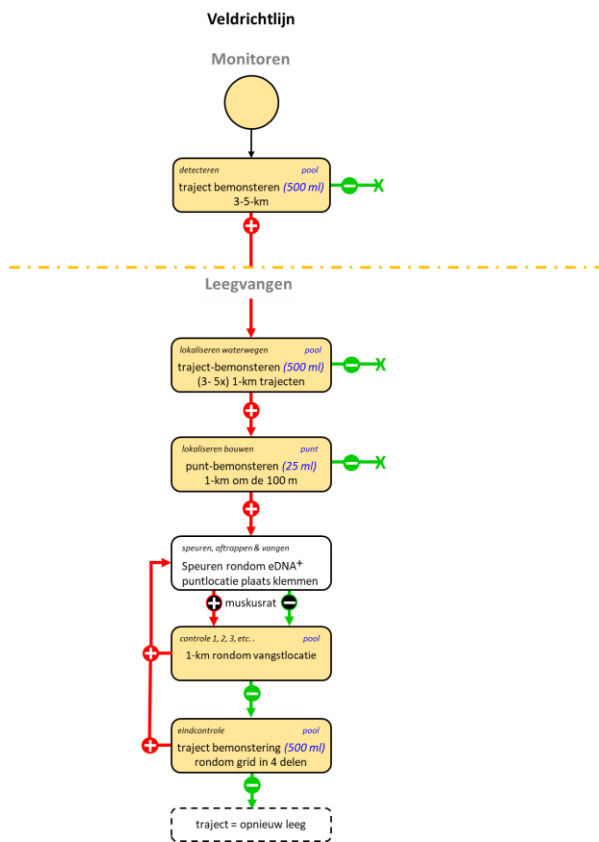
Zo nodig kunnen er langs de oevers van een positief 1 km lokalisatie traject puntmonsters genomen worden om de bouwen te lokaliseren. Het nemen van puntmonsters is niet altijd nodig. Zoals eerder genoemd is het onderscheiden van sporen van muskusratten van andere dieren een gespecialiseerde vaardigheid, en soms kunnen de visuele sporen niet duidelijk zijn. In deze gevallen kan een positief lokalisatie traject extra focus geven, waardoor sporen die in andere situaties gemarkeerd werden als behorend tot een ander dier, toch als muskusrat spoor geïdentificeerd worden, omdat de eDNA uitslag extra zekerheid geeft. Ook kan het voorkomen dat muskusratten geen of zeer weinig sporen achterlaten. In deze gevallen kunnen puntmonsters eraan bijdragen dat de bouwen toch gevonden worden.

Grenswaarden voor detectie zijn ook bepaald in dit deel van het project. Monsters met een concentratie beneden 1 pg/l worden als negatief (-) gescoord, omdat bij het opvolgen van deze waarden de lokalisatie trajecten of puntmonsters negatief waren, en er op deze trajecten geen muskusratten gevangen waren. Concentraties van ≥ 1 pg/l, en < 10 pg/l worden als zwak positief (+/-) gescoord, en concentraties van ≥ 10 pg/l als positief (+). Het is momenteel niet mogelijk om aan de hand van de concentratie te bepalen hoeveel muskusratten er op een positief traject zitten. Een enkele muskusrat kan een concentratie geven van ≥ 10 pg/l terwijl meerde muskusratten een concentratie tussen 1 pg/l, en 10 pg/l kunnen geven. Factoren die hier een rol bij spelen, zijn bijvoorbeeld, de breedte en diepte van een waterweg (verdunding), stroming en het gedrag van de dieren. Het is onwaarschijnlijk dat de concentratie gebruikt kan worden om precies het aantal muskusratten aan te tonen, omdat er zoveel variabelen in het veld zijn. Ook is het precies weten van het aantal muskusratten niet nodig. Wat belangrijk is, is te weten of ze er zitten, en of ze allemaal weggevangen zijn.

Om zeker te weten of alle muskusratten weggevangen zijn, worden er 3-5 controle trajecten van een km genomen rondom de vangst locatie. Bemonsteren rondom de vangst locatie wordt gedaan om er zeker te zijn dat er niet alleen geen muskusratten meer op de vangplek zitten, maar ook om te bepalen of er geen verdrijving plaatsgevonden heeft. Afhankelijk van de resultaten kunnen de stappen van lokalisatie/punt-bemonsteren en controle meerdere keren doorlopen worden. Ook als er geen vangst is, dan wordt na ongeveer 4 weken een controle gedaan.

Figuur 2 geeft de veld-richtlijn weer. Het eerste deel, het nemen van de monitoringstrajecten is gestandaardiseerd. De andere stappen zijn optioneel, omdat de bestrijder al sporen gezien kan

hebben, in welk geval er niet bemonsterd hoeft te worden. Het is wel aan te bevelen om altijd een controle te doen. Hoe een positief monitoringstraject opgevolgd wordt, wordt bepaald in overleg met een bestrijder.



Figuur 2 Veld-Richtlijn

Monitoring

- Meest gestandaardiseerde deel

- 3- 5 km tracks

eDNA+ of eDNA+/- monitoring trajecten kunnen worden opgevolgd met 1 km

Lokalisatie trajecten.

Indien nodig kan na lokalisatie puntbemonstering worden uitgevoerd om holen te lokaliseren.

Na de laatste vangst worden 1 km controle trajecten bemonsterd rond de vangstlocatie.

Lokalisatie en puntbemonstering zijn optioneel.

- *Het is mogelijk dat het hol in een eerdere stap is gelokaliseerd.*

2.2 Opschaling van praktijktesten

Bij de start van het project was het plan om alle watergangen in de proefgebieden te

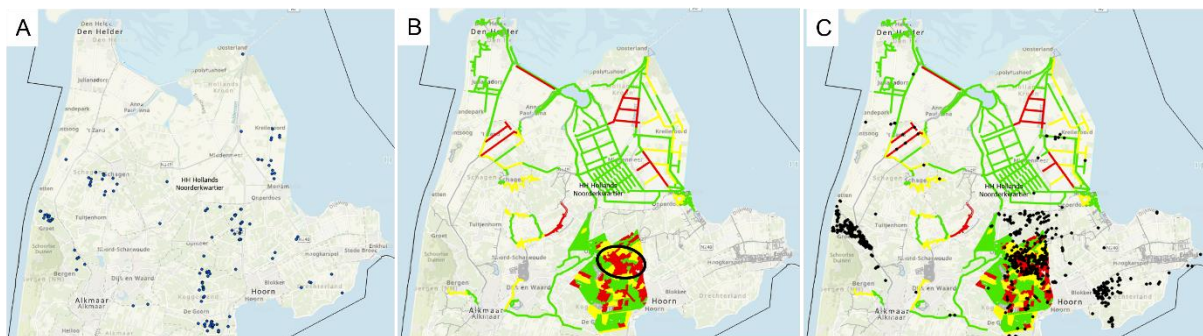
bemonsteren. Om te bepalen of dit de juiste aanpak was, werd gestart met bemonstering in polders in Noord-Holland (gebied 9) en Wetterskip Fryslân (gebied 8). Polders moeten ter voet of vanaf een quad bemonsterd worden, en zijn daarom het moeilijkst om te bemonsteren. De polder in Noord-Holland had relatief veel vangsten, 52% (174) van de totale vangsten (335) in 2021 in gebied 9 werden hier gedaan. De polder in Wetterskip Fryslân daarentegen had sinds 2020 geen vangsten meer.

2.2.1 Resultaten opschaling 2022: Noord-Holland ten Noorden van Alkmaar (gebied 9)

Voor de polder in Noord-Holland werd in 2022 een relatief hoog aantal eDNA-positieve trajecten verwacht, omdat deze polder in de voorgaande jaren het hoogste aantal vangsten in gebied 9 had, 54% (174) van de totale vangsten (324) in 2021. Het werkelijke aantal eDNA-positieve trajecten was echter veel hoger dan verwacht. Maar liefst 49% van de trajecten in deze polder bevatte eDNA. Interessant is dat een gebied met zeer weinig vangsten in de voorgaande jaren, slechts gemiddeld 12 vangsten in de periode 2019-2021, een zeer hoog aantal muskusrat-eDNA-positieve trajecten had. In dit kleine gebied bevatte in totaal 75 % van de trajecten eDNA (Fig. 3B. In de eerste 3 maanden van het jaar waren de weersomstandigheden slecht (regen en wind) en visuele sporen van muskusrattenaanwezigheid werden vaak niet gevonden tijdens het bemonsteren van de monitoringstrajecten. Voor de trajecten die in het voorjaar werden bemonsterd, zagen de bestrijders vaak al visuele sporen van muskusrattenaanwezigheid tijdens het bemonsteren van de monitoringstrajecten. De weersomstandigheden waren in deze periode zeer gunstig voor visueel speuren.

Na vlak dekkende bemonstering van een deel van de polder en een pauze van 2 maanden om zich te concentreren op vangen, werd de bemonstering per boot voortgezet. In Noord-Holland waren de eDNA-bevattende trajecten die per boot werden bemonsterd, verspreid over het bemonsterde gebied, en opnieuw waren er meer eDNA-positieve trajecten dan verwacht op basis van de vangsten in voorgaande jaren. Het percentage eDNA-bevattende trajecten in het gehele bemonsterde gebied (polder- en gevaren trajecten) in Noord-Holland was 39%.

Vanwege het grote aantal eDNA-bevattende trajecten was de opvolging van trajecten met eDNA volgens de veldrichtlijn beperkt. In plaats daarvan volgden de bestrijders de trajecten op met behulp van een hond en/of door visueel speuren. In NH ten Noorden van Alkmaar zijn in 2022 2.369 vangsten gedaan ten opzichte van 324 in 2021.



Figuur 3 Resultaten steekproef 2022 NH Noord Alkmaar

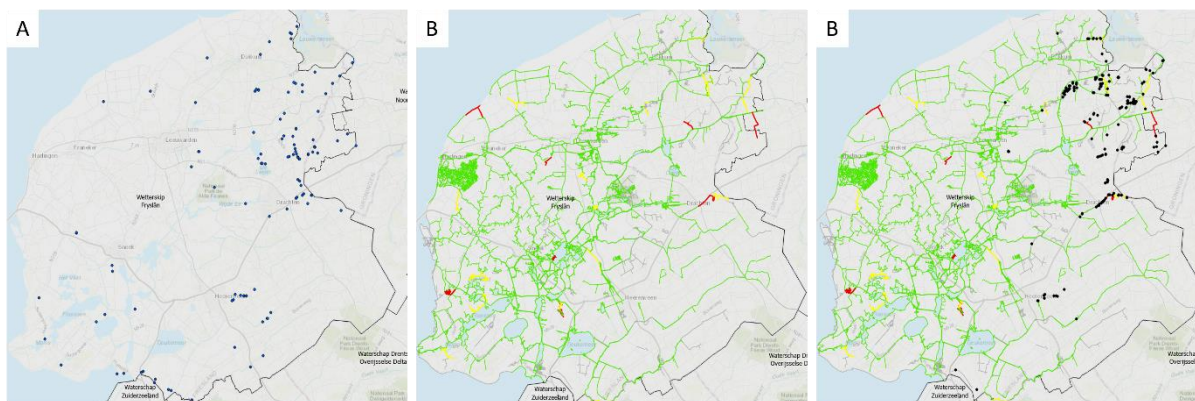
A: 2021 324 vangsten (blauwe stippen)

B: eDNA-resultaten 2022 39% van de trajecten bevatte eDNA+ (rood) of eDNA+/- (geel). Zwarte ring: gebied met 75% eDNA bevattende trajecten (eDNA+ & eDNA+/-)

C: eDNA-resultaten en vangsten van 2022 (2.369, zwarte stippen)

2.2.2 Resultaten opschaling 2022: Wetterskip Fryslân (gebied 8)

In de polder in Wetterskip Fryslân waren geen trajecten met muskusrat eDNA- aangetroffen, wat een extra bevestiging is dat er inderdaad geen muskusratten meer in de polder aanwezig zijn. Na het bemonsteren van de polder zijn we ook overgestapt op het bemonsteren van grotere vaarwegen per boot in Fryslân. Voor Wetterskip Fryslân kwamen de resultaten overeen met de verwachtingen op basis van de vangsten in voorgaande jaren. De meeste eDNA-bevattende trajecten bevonden zich in de buurt van de grenzen van het beheersgebied. Verder landinwaarts werden enkele eDNA-positieve trajecten gevonden. De meeste eDNA- trajecten verder landinwaarts waren eDNA-negatief in de opvolging, waardoor het waarschijnlijk is dat deze werden veroorzaakt door een enkele migrerende muskusrat. Het percentage eDNA bevattende trajecten in Wetterskip Fryslân was 4%.



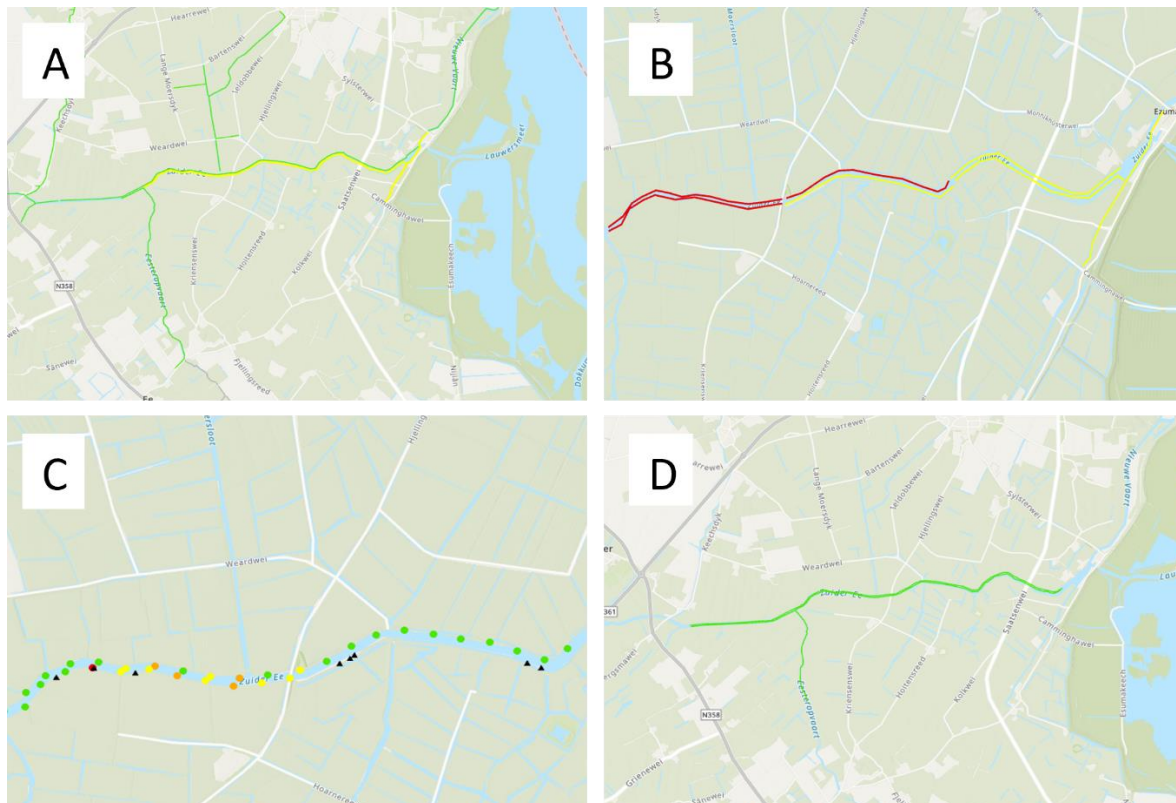
Figuur 4 Resultaten steekproef 2022 Wetterskip Fryslân

A: 2021: 212 vangsten (blauwe stippen)

B: eDNA-resultaten 2022

C: eDNA-resultaten en vangsten (435, zwarte stippen) 2022

Omdat er veel minder eDNA-bevattende trajecten waren in vergelijking met Noord-Holland werd het opvolgen van eDNA+ en eDNA+/- trajecten volgens de veldrichtlijn gedaan in Wetterskip Fryslân. In tabel 2 worden de eDNA-resultaten van de monitoring- en lokalisatie trajecten weergegeven, samen met de bijbehorende vangsten. Figuur 5 toont een voorbeeld van een zwak positief traject met een lage eDNA-concentratie (2,3 pg/l) aan een van de oevers van de rivier de Suderie. Tijdens het bemonsteren zag een bestrijder de aanwezigheid van muskusratten en plaatste klemmen. Om deze reden werden er geen lokalisatie trajecten bemonsterd maar werden er controle trajecten bemonsterd nadat de bestrijder geen sporen van muskusratten meer kon vinden. Bij de eerste controle bevatten een aantal controle trajecten van 1 km nog steeds eDNA en werd puntbemonstering gedaan om de locatie van de bouwen te bepalen. De bestrijders gaven aan dat in grotere waterwegen zoals deze muskusratten moeilijk te vinden kunnen zijn omdat er vaak minimale verstoring van de vegetatie is. Muskusratten kunnen zich gemakkelijker onder of door de vegetatie bewegen, terwijl in kleinere waterwegen verstoring van de vegetatie gemakkelijker te detecteren is. Na de 1^e controle werden nog 8 vangsten gedaan. De laatste controle was negatief voor muskusrat eDNA.



Figuur 5 Tijdljn bemonstering Suderie

Op dezelfde dag van bemonstering van het meetspoor (A) vond een bestrijder, de aanwezigheid van muskusratten. Daarom werden er geen lokalisatietrajecten gedaan en werden de eerste controletrajecten gedaan ~ 4 weken nadat de bestrijder geen visuele tekenen van muskusratten meer zag. De eerste ronde controletrajecten (B) bevatte nog steeds eDNA. Puntbemonstering (C) werd gedaan langs de rode (+) trajecten om bouwen te lokaliseren.

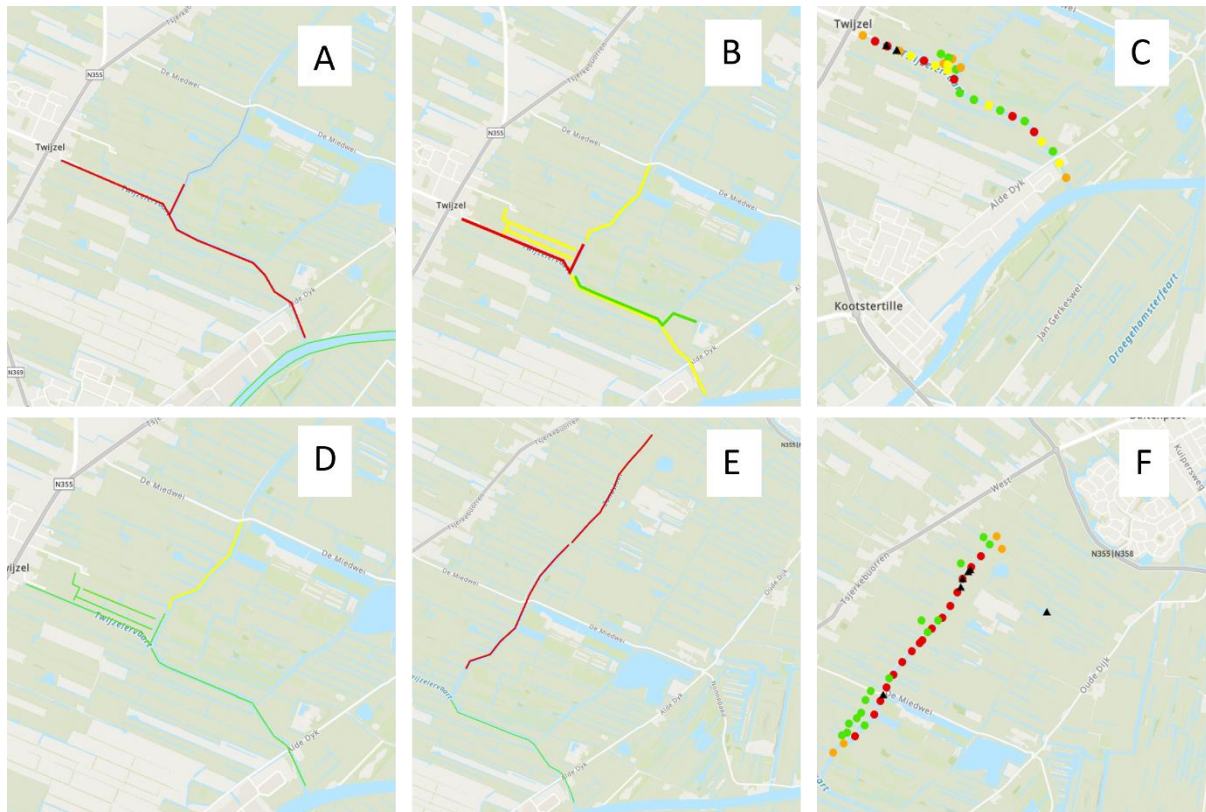
Groene stippen zijn eDNA-, gele stippen eDNA+/-, oranje eDNA+ en rode eDNA++ hoogste concentraties. Na de puntenbemonstering werden nog 8 vangsten gedaan en de laatste controle (D) was negatief voor eDNA. Om te bepalen of er verdrijving plaatsvond, werden ook trajecten buiten het vanggebied bemonsterd (D).

A: Monitoring: 12-04-22, **B:** controle 1: 08-08-2022, **C:** puntmonsters: 01-09-2022, **D:** controle 2 30-10-2022

Vangsten (zwarte driehoeken) Jan-22: 9, maart-22 1, mei-22 (3), juni-22 (2), juli-22 (2), sept-22 (7) okt-22 (1). Vangsten in het rood werden gedaan voordat de bemonstering werd uitgevoerd.

Figuur 6 toont het vervolg van een kanaal (Twizelerfeart), verbonden met een groter kanaal met veel vaarverkeer. 1 km lokalisatie trajecten toonden het hoogste eDNA-sigitaal aan het bovenste deel van het kanaal (Fig. 6B). Er werden puntmonsters genomen om bouwen te lokaliseren, de bestrijders vonden tijdens het nemen van de puntmonsters de bouwen al. De vangsten (zwarte driehoeken) werden gedaan bij puntmonsters met hoge eDNA-concentraties (Fig. 6B). Er waren ook positieve puntmonsters verderop in het kanaal, maar hier werden geen bouwen gevonden. Het is belangrijk op te merken dat wanneer een boot door het grotere verbonden kanaal vaart, water uit de Twizelerfeart wordt getrokken, wat een verschuiving in eDNA-signalen kan veroorzaken. Met dit soort informatie moet dus rekening worden gehouden bij de interpretatie van de resultaten, met name bij puntmonsters. De 1^e controle werd gedaan rond het vangstgebied, en één traject was zwak positief (Fig. 6D). Op verzoek van de bestrijder werden verderop in de sloot die verbonden was met het kanaal nog eens 2 controle trajecten bemonsterd (Fig. 6E). Deze trajecten waren positief voor muskusrat eDNA en er werden puntmonsters genomen om de locatie van de bouwen te bepalen (Fig. 6F). Dit

gebied is een broedgebied voor beschermde vogels die de toegang tijdens bepaalde tijden van het jaar beperkt. De laatste controle was negatief (niet op plaatje). In 2022 werden in het beheergebied van Wetterskip Fryslân 435 vangsten gedaan tegenover 212 in 2021.



Figuur 6 Tijdslijn bemonstering Twizelerfeart

A: monitoring (5-km): 26-04-22, **B:** lokalisatie (1-km): 05-05-2022 **C:** puntmonsters-1: 19-05-2022, **D:** check-1 (1-km): 29-06-2022, **E:** check-2: 1-11-2022, **F:** puntmonsters 2: 21-11-2022

Controle 2 werd nog verder van het oorspronkelijke vangstgebied uitgevoerd, op basis van de inzichten van de velddeskundige (bestrijder).

Vangsten zwarte driehoeken: **Mrt-22 (2) (F, driehoek rechtsboven)**, 22 mei-2 (3) & 22 juni-2 (2) (**C**), 22-okt-22 (3), nov-22 (1), dec-22 (4) (**F**)

In rood vangsten vóór eDNA-bemonstering

2.2.3 Analyse, discussie en conclusies eDNA-resultaten 2022

In beide gebieden werden de meeste vangsten gedaan op eDNA-bevattende trajecten. De tabellen 1 en 2 laten op basis van de resultaten zien hoeveel vangsten er waren. De vangsten werden geteld als correlerend met een traject als de eerste vangst binnen 2 maanden na de bemonstering plaatsvond. Hoe sterk de vangsten overeenkomen met eDNA-bevattende trajecten (eDNA-succes of ES) kan worden berekend met behulp van de volgende vergelijking:

$$ES = \frac{(\text{vangsten eDNA} \div \text{trajecten eDNA})}{(\text{vangsten eDNA negatief} \div \text{trajecteneDNA negatief})} =$$

Voor Wetterskip Fryslân is de ES 259 en voor Noord-Holland is de ES 6. Hieruit blijkt dat de eDNA-methode uiterst succesvol is (259 keer efficiënter) in gebieden met een lage populatie muskusratten, terwijl slechts matig efficiënt (6x) in gebieden met een hogere populatie muskusratten. Er waren vangsten op eDNA-negatieve trajecten, en dit kwam vaker voor in Noord-Holland waar de muskusrattenpopulatie groter is. In Wetterskip Fryslân kennen we de factoren die hebben bijgedragen aan de negatieve eDNA-resultaten. In één geval was de windrichting zodanig dat het water werd teruggeduwd naar de kant waar de muskusratten hun holen hadden, en bemonstering vond plaats in het midden van de waterweg, op het moment dat water uit de aangrenzende polder de watergang in werd gepompt, wat resulteerde in meer verdunning. Deze waterweg was eerder bemonsterd, met verschillende windcondities en was onder deze omstandigheden zwak eDNA-positief. Het werd opnieuw bemonsterd omdat er destijds vangsten waren in duikerafzettingen en we wilden bepalen of het signaal afkomstig was van deze dode muskusratten of dat er nog levende muskusratten aanwezig waren.

Deze en een andere test in NH met bemonstering in het midden van een waterweg en bemonstering van beide oevers hebben geleid tot een vermindering van de breedte voor dubbelzijdige bemonstering van 25 naar 15 m. Een andere factor die hebben die heeft bij kunnen dragen aan een vals negatief resultaat is stroming. Bijvoorbeeld een waterweg met minimale stroming had muskusrattenbouwen op 600 m van waar de bemonstering stopte. Migratie uit nabijgelegen gebieden droeg ook bij aan de vangsten na een negatief eDNA-resultaat. In Noord-Holland speelde migratie uit nabijgelegen gebieden waarschijnlijk een rol bij vangsten op negatieve eDNA- trajecten in de polders. In één geval waren er echter veel vangsten op een negatief eDNA-traject, 34 vangsten in 2022. We weten niet wat de bijdragende factoren waren in deze situatie. De eDNA-concentratie gemeten bij een van de oevers lag onder de detectiegrens van 1 pg/l. Mogelijke oorzaken waren stromingen, zouthoudend grondwater dat infiltreert in het oppervlaktewater en lagen zoet en zout water creëert, de monsters na bemonstering bij warm weer niet koelen en beschermen tegen UV-straling en laboratoriumfouten.

Fryslân eDNA resultaten			Noord-Holland eDNA resultaten		
# 5 km	# 5 + 1 km	# vangst	# 5 km	# 5 + 1 km	# vangst
8	2	14	54	17	64
	0	0		3	2
	5	0		1	0
	(1)	18		(33)	201
22	3	17	64	7	1
	7	0		9	4
	4	0		2	0
	(8)	24		(46)	118
761	0	0	187	0	0
	0	0		0	0
	0	0		0	0
	(761)	7		(187)	100
4	4	8	3	2	9
	0	0		1	0
	0	0		0	0
	0	0		(0)	0
eDNA	34	81	eDNA	121	399
Geen eDNA	761	7	Geen eDNA	187	100

Tabel 1 & 2 eDNA-resultaten en vangsten. De vangsten werden geteld als de 1e vangst binnen 2 maanden na bemonstering was.

Alleen vangsten op bemonsterd traject waren geteld, niet vangsten in nabijgelegen verbonden of aangrenzende waterwegen.

kolom 1 zijn monitoringtrajecten: rood eDNA+, geel eDNA+/-, groen eDNA-

kolom 2 zijn het aantal trajecten van 5 km met een eDNA+ of eDNA+/- of alleen eDNA- tracks van 1 km

Kolom 3 is het totale aantal vangsten op eDNA+, eDNA+/- van eDNA-trajecten.

Grijze cellen betekend dat er niet met eDNA bemonsterd was.

De getallen in de blauwe cellen zijn de totalen van kolom 1 eDNA (+ & +/-)

De resultaten van de eDNA-tests droegen gedeeltelijk bij tot een intensivering van de vangstinspanningen in gebieden die niet met eDNA waren bemonsterd en die in voorgaande jaren een laag aantal vangsten hadden. In Fryslân bijvoorbeeld leidden verhoogde vangsten in kooien in duikers en positieve eDNA trajecten in aangrenzende watergangen tot een intensivering van de vangsten in polders nabij de Oostgrens. Bemonsterde boezemwateren rond deze polder, bevatten muskusrat-eDNA en een aantal hadden muskusrat vangsten. Door toegenomen vangsten in poldergebieden nabij de grens van Wetterskip Fryslân kwam het totaal aantal vangsten uit op 435 ten opzichte van 212 in 2021, een verdubbeling.

In Noord-Holland leidde de onverwacht hoge muskusrattenpopulatie in de bemonsterde polder en andere gebieden tot een sterke toename van de vangsten. Traditioneel speuren in vergelijkbare gebieden buiten het bemonsterde gebied werd geïntensiveerd. Het totaal aantal vangsten in Noord-Holland ten Noorden van Alkmaar in 2022 was 2.369 tegenover 324 in 2021, een verzevenvoudiging. Daarvan waren 831 vangsten in het bemonsterde poldergebied. De belangrijkste conclusies van de opschaling van eDNA-bemonstering is dat eDNA inderdaad kan worden gebruikt om te controleren of

een gebied nog muskusrattenpopulaties heeft, en dat het nauwkeuriger is dan de aanwezigheid alleen te baseren op gevangen muskusratten.

Uit de resultaten blijkt ook dat volledige bemonstering, met name van poldergebieden, geen haalbare aanpak is en ook niet nodig is. Bestrijders in beide gebieden gaven als feedback dat het volledig bemonsteren van polders zeer arbeidsintensief en mentaal uitputtend is. Bij het maken van de trajecten voor eDNA-bemonstering kan geen rekening worden gehouden met kadastrale grenzen, en dit betekent dat hekken en poorten moeten omzeild en geopend worden om toegang te krijgen tot veel kavelsloten.

Hoewel de eDNA-methode niet perfect is, omdat er muskusratten zijn gevangen op eDNA-negatieve trajecten was het nog steeds zeer succesvol in het bepalen van de werkelijke aanwezigheid van muskusratten in een gebied. Het hoger dan verwachte aantal eDNA-bevattende trajecten in Noord-Holland laat zien dat het een nauwkeuriger alternatief kan zijn voor het schatten van de aanwezigheid van muskusratten aan de hand van vangstgegevens. In Fryslân kwamen de eDNA-resultaten wel overeen met de vangstgegevens van de afgelopen jaren, en in dit geval bevestigde het op een andere manier dat de bemonsterde waterwegen inderdaad geen muskusratten meer hadden. De gegevens bevestigden ook dat de methode veel effectiever is in gebieden met een lage populatie in vergelijking met gebieden met een hoge populatie, omdat de muskusrat vangsten sterker overeenkomen met eDNA-bevattende trajecten in het laag populatie gebied in Fryslân in vergelijking met het gebied het hogere populatie gebied in Noord-Holland.

Bij de opvolging met lokalisatie- en controle trajecten is vooral kennis van het gebied, de watergangen van belang en de dieren van belang. Degene die met de computer de trajecten ontwerpt, kan zien waar de watergangen zijn, maar niet of er op dat moment water in de watergangen staat, en of er water in of uit de watergangen wordt gepompt. De bestrijders als veldexperts weten welke watergangen water bevatten op het moment van monsternamen, etc. Ze begrijpen ook het gedrag van muskusratten en hebben kennis van historische aanwezigheid en kunnen dit gebruiken om te bepalen hoe de controle trajecten het beste kunnen worden bemonsterd, zoals weergegeven in figuur 6.

2.3 Semi-willekeurige steekproeven

Bestrijders gaven aan dat vlak-dekkend bemonsteren te arbeidsintensief was en in traditionele bestrijdingsaanpak speuren ze over het algemeen ook niet in gebieden met een lage populatie met volledige dekking. Het resultaat van 2022 gaf ook aan dat vlak-dekkend bemonsteren waarschijnlijk niet nodig is om een goede indicatie te krijgen van de aanwezigheid van muskusratten in een gebied. Om dit te bevestigen is een statistische power analyse toegepast op de eDNA-resultaten van 2021. Op basis hiervan is bepaald dat semi- willekeurige steekproeven kunnen worden gebruikt in plaats van vlak-dekkend bemonsteren.

Om met eDNA te bevestigen dat een gebied geen muskusratten meer heeft met deze semi-willekeurige bemonstering, moeten 80 trajecten worden bemonsterd om 80% zekerheid te verkrijgen. Voor deze aanpak is het totale beheersgebied onderverdeeld in sub-gebieden. De grootte van het deelgebied is niet relevant voor de statistische benadering. Om praktische redenen moeten de bemonsterde gebieden niet zo klein zijn dat het bemonsteren van 80 trajecten een (bijna) vlak-dekkende bemonstering vormt. Omdat het aantal eDNA-positieve (+/- en +) trajecten bepaalt hoe het sub-gebied wordt opgevolgd, worden verschillende groottes van sub-gebieden vooraf gedefinieerd, op basis van hun nabijheid tot gebieden met een hogere populatie en het aantal vangsten in het voorgaande jaar of de voorgaande jaren.

De sub-gebieden zijn onderverdeeld in 3 typen. "Historisch lege" gebieden: gebieden waarin in voorgaande jaren geen of zeer weinig muskusratten gevangen waren, en die niet direct grenzen aan gebieden met hogere populaties muskusratten. "Grensgebieden" zijn gebieden die grenzen aan gebieden die over het algemeen hoge muskusrattenpopulaties hebben en waarin meestal nog steeds vangsten worden gedaan, hoewel niet zo hoog als de gebieden waaraan ze grenzen. "Binnenland" gebieden zijn gebieden die vaak, maar niet noodzakelijkerwijs tussen historisch lege gebieden en grensgebieden liggen. Deze gebieden hebben nog steeds een laag aantal vangsten en grenzen niet direct aan gebieden met een hoge populatiedichtheid. Historisch lege gebieden worden het grootst gemaakt en er worden direct 80 trajecten bemonsterd. Het totale percentage bemonsterde trajecten (van het totaal aantal mogelijke trajecten) is ongeveer 8%. Binnenland gebieden zijn de op een na grootste gebieden en er wordt gestart met 40 trajecten. Als de resultaten aangeven dat het gebied mogelijk leeg is, worden nog eens 40 trajecten bemonsterd. In het geval van gebieden in het binnenland met geen of zeer lage vangsten in het voorgaande jaar, kan men ervoor kiezen om te beginnen met het bemonsteren van 80 trajecten. 80 trajecten in het binnenland vormen gemiddeld 17% van de mogelijke trajecten, dus een reductie van 83%. Grensgebieden zijn het kleinst en de bemonstering wordt gestart met 40 trajecten, 80 bemonsterde trajecten beslaan ongeveer 28% van de mogelijke trajecten, nog steeds een reductie van 72%.

De bemonsteringsmethode is semi-willekeurig omdat waterwegen waarin muskusratten in de voorgaande jaren gevangen waren worden altijd toegevoegd aan de voorstel trajecten. De toevoeging van waterwegen met eerdere vangsten is om rekening te houden met voorkeursgebieden van muskusratten. Zodra er trajecten zijn gemaakt voor deze "voorkeurs" waterwegen, worden de rest van de trajecten zo geplaatst dat er een gelijkmatige verdeling van trajecten over het gebied is. Afhankelijk van de eDNA-benadering is een specifieke vervolgaanpak geformuleerd (tabel 3). Een gebied dat op basis van de eDNA-resultaten als "Vol" wordt aangemerkt, is niet geschikt voor opvolging met eDNA en daarom wordt de traditionele aanpak geadviseerd. Afhankelijk van de populatie kan het enkele jaren duren om de populatie tot een zodanig niveau te brengen dat het geschikt is voor eDNA-monitoring. Tot dan wordt er de traditionele aanpak gehanteerd.

Als een gebied is gecategoriseerd als "Middelvol" wordt het hele gebied opgevolgd met eDNA. Als de verdeling van eDNA-positieve trajecten ongelijk is, kan het sub-gebied verder worden onderverdeeld in sub-sub-gebieden. Voor elk gebied worden extra trajecten bemonsterd, om het totale aantal tracks dat in een sub-sub-gebied is bemonsterd op 40 te krijgen. Als na het onderverdelen van een van de sub-sub-gebieden al als "Vol" kan worden geclassificeerd, bijvoorbeeld als 3 van de 20 trajecten eDNA+ of eDNA+/- zijn, hoeven er geen extra trajecten te worden bemonsterd en kan men meteen naar traditioneel speuren overgaan. Voor elk ander sub-sub-gebied worden extra trajecten bemonsterd, om het totale aantal trajecten dat in een sub-sub-gebied is bemonsterd op 40 te krijgen. Na het bemonsteren van extra trajecten tot een totaal van 40, worden de sub-sub-gebieden opnieuw geclassificeerd en opgevolgd volgens tabel 3. Als een van de sub-sub-gebieden als mogelijk leeg wordt geclassificeerd, worden extra trajecten genomen om het totale aantal op 80 te brengen, op voorwaarde dat 80 trajecten niet vlak dekkend bemonsteren inhoud.

Als een gebied als "leeg" wordt bevestigd met eDNA (bemonstering van 80 tracks), worden er geen verdere bestrijdingsinspanningen, eDNA of traditioneel speuren uitgevoerd voor een specifieke periode. In het geval van een Middelvol classificatie kunnen de volledige sub-sub-gebieden worden bemonsterd met eDNA. De vervolgmogelijkheden in tabel 3 zijn richtlijnen en de daadwerkelijke aanpak wordt in overleg met de een bestrijder bepaald.

Hoe vaak een gebied wordt bemonsterd met eDNA hangt af van het type gebied en de eDNA-resultaten. Een gebied dat is geclassificeerd als "Historisch leeg" en als zodanig is bevestigd door eDNA,

kan eens in de 3-5 jaar worden bemonsterd. Een "Binnenland" gebied wordt elk jaar bemonsterd en een "Grens" gebied om de 0,5-1 jaar. De halfjaarlijkse monitoring voor grensgebieden zijn specifieke waterwegen die bekende migratieroutes zijn waarlangs her-kolonisatie vanuit gebieden met een hogere populatie plaatsvindt. Als er watergangen zijn die hoog populatie gebieden direct verbinden met Historisch lege gebieden, kunnen deze specifieke watergangen ook vaker worden bemonsterd dan de 3-5 jaar die gelden voor de rest van het Historisch lege gebied, zoals polders. Het interval voor bemonstering wordt in overleg met de bestrijders bepaald.

Grootte steekproef	# positieve 5-km trajecten	Gemiddeld # muskusrat [§]	eDNA inzet	eDNA veldrichtlijn	Typering sub-gebied
Hoog					
40	> 6 (>15%)	250	Nee	Traditioneel speuren zonder eDNA	vol
	2 – 6 (5-15%)	117	Ja	Heel sub-gebied eDNA bemonsteren	Middelvol
	0 – 1 (0-5%)	44	n.v.t.	40 extra monsters analyseren	Leeg?*
Laag					
80 (40 + 40)	> 12† (>15%)	200	Nee	Traditioneel speuren/vangen	Vol
	3 – 12 (4-15%)	102	Ja	Heel sub-gebied eDNA bemonsteren	Middelvol
	1 – 2 (1-3%)	31	Ja	Alleen positieve trajecten speuren	Leeg
	0 (0%)	2	Nee	Niet meer speuren	Leeg

Tabel 3 richtlijnen opvolging semi-willekeurige bemonstering

*kan niet gebaseerd zijn op de steekproefgrootte van 40 eDNA 5-km tracks, minimaal 80 trajecten nodig

§ voorbeeld 2.000 km waterwegen, 1% = 0,01 x 400 5 km traject x 2,5 muskusratten/traject (bouw) = 10 muskusratten

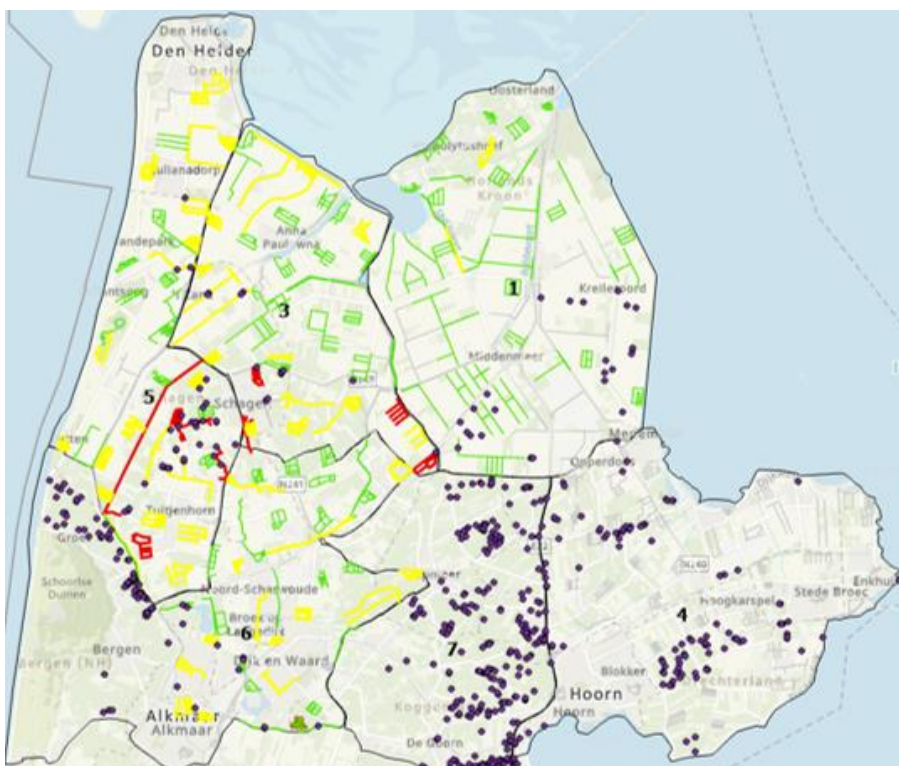
† Zeer onwaarschijnlijk, aangezien max 1 eDNA-traject werd gevonden in de 1^e bemonsteringsronde

2.3.1 Resultaten Semi-willekeurige steekproef 2023: Noord-Holland ten Noorden van Alkmaar Noord-Holland boven Alkmaar (gebied 9) was verdeeld in 6 gebieden (1, 3, 4, 5, 6 en 7) van ongeveer gelijke grootte (gemiddeld 152 km² met gemiddeld 380 mogelijke trajecten in elk gebied). Alle gebieden kunnen worden getypeerd als grensgebieden, op basis van de resultaten van de steekproeven van vorig jaar en de vangstgegevens. Voor de bemonstering werden geen voorstel trajecten getekend in gebieden waar vangstinspanningen aan de gang waren, zoals het linker bovengedeelte van gebied 6. In de gebieden 4 & 7 is geen bemonstering uitgevoerd, omdat deze gebieden nog te veel muskusratten hebben. Alle gebieden werden bemonsterd met ~40 trajecten. Vier gebieden werden in de eerste helft van het jaar volledig bemonsterd door een speciaal opgeleid persoon.

De resultaten van de semi-willekeurige steekproef kwamen overeen met de resultaten van de bemonstering in 2022. In de meeste gebieden waren er meer eDNA-positieve trajecten dan uit de vangstgegevens van voorgaande jaren kan worden afgeleid. De gebieden 3, 5 en 6 kunnen allemaal als Vol worden geclassificeerd, met respectievelijk 52%, 66% en 43% monsters met eDNA (tabel 4). Gebied 1 is geclassificeerd als Middelvol, met 2 zwak positieve trajecten. Slechts 39 monsters hadden uitslagen, vanwege het hoge aantal monsters met inhibitie in dit gebied (10), waarvan 3 nog inhibitie hadden na verdunning. In 2022 waren er veel vangsten in de oevers van een waterweg die negatief testten op muskusratten-eDNA. Ook dit jaar gebeurde dat weer. Alle 4 waterwegen in deze regio die

negatief testten maar muskusratten hadden, liggen op specifieke grondsoorten geclassificeerd als Wieringermeergronden die een specifiek type calciumrijke klei zijn. Het is mogelijk dat er iets in de specifieke samenstelling van deze bodems de qPCR beïnvloedt, hoewel geen van deze monsters inhibitie vertoonden. Van de monsters die wel inhibitie vertoonden, waren ze op 2 na allemaal op calciumrijke bodems, wat niet verwonderlijk is omdat calcium een bekende inhibitor van Taq-polymerase is. Een complicerende factor bij de resultaten van Noord-Holland was dat de monsters soms langer bij 4°C werden bewaard dan de aanbevolen maximale overnachtperiode. Het kwam voor dat monsters pas na 2 dagen op het laboratorium werden afgeleverd. Ook werden monsters in het lab soms te lang in de conserveringsbuffer bewaard. Dit zou kunnen hebben geleid tot degradatie van eDNA. Om eDNA-monitoring succesvol te kunnen implementeren in de Wieringermeer is mogelijk nader onderzoek nodig naar de specifieke oorzaken van de negatieve eDNA-sporen in waterwegen met veel muskusratten. Het is ook belangrijk om de maximale opslagperiode vóór het filteren, bepaald door de laboratoria, niet te overschrijden

Omdat er in bepaalde gebieden nog steeds vangstinspanningen waren, was het niet mogelijk om eDNA-positieve trajecten snel op te volgen met traditionele vangstinspanningen. Toch probeerden de bestrijders wel zoveel mogelijk van de trajecten op te volgen, waarbij ze zich concentreerden op de + trajecten. Tabel 4 toont het aantal eDNA- trajecten en de bijbehorende vangsten. Net als in het voorgaande jaar was er geen opvolging met eDNA, behalve één trajecten in het zuiden van gebied 6 dat positief was, maar opnieuw werd bemonsterd toen bestrijders geen bouwen konden vinden, en negatief was bij de tweede bemonstering, wat aangeeft dat de muskusrat mogelijk was weggetrokken. Vanwege de langere tijd tussen bemonstering en opvolging zijn alle vangsten geteld.



Figuur 7 Resultaten Semi-Willekeurige bemonstering 2023 NH ten Noorden van Alkmaar

Paarse stippen: vangsten

Groene lijnen: muskusrat eDNA-

Gele lijnen: muskusrat eDNA+/-

Rode lijnen: muskusrat eDNA+

totaal percentage eDNA (+ en +/-): 42%

2.3.2 Resultaten Semi-willekeurige bemonstering 2023: Wetterskip Fryslân

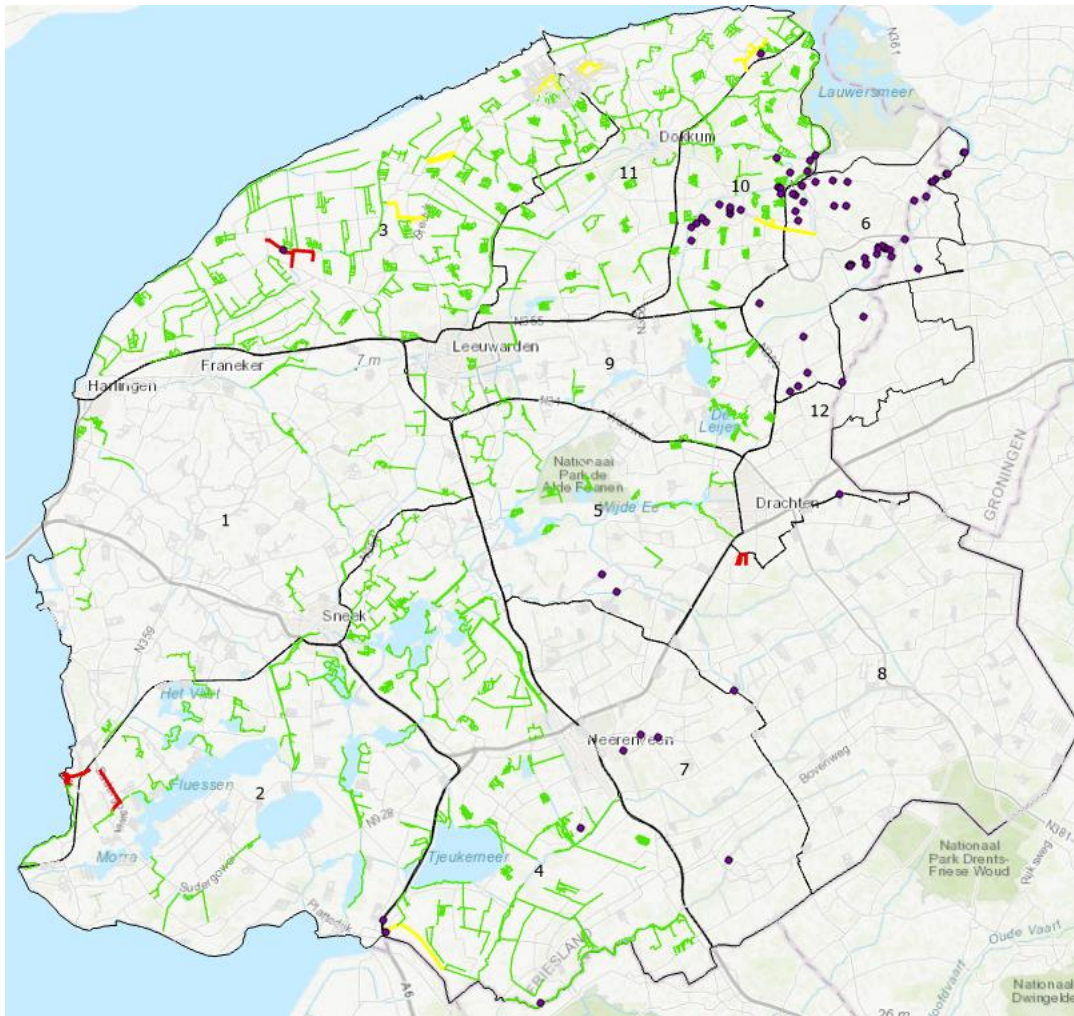
De steekproef in Wetterskip Fryslân werd gestart in twee gebieden met een laag aantal vangsten in voorgaande jaren, gebied 3 in het noorden en gebied 4 in het zuiden, beide historisch lege gebieden. Gebied 3 had 0 vangsten in 2022 en gebied 4 had 2 vangsten. In gebied 3 werd één vangst gedaan op het eDNA+ traject na 1 km lokalisatie trajecten. Deze waterweg bevatte in de winter van 2022 ook eDNA, maar er waren toen geen muskusratten gevangen. Na de vangst werd deze waterweg opnieuw bemonsterd met 1 km lange controle trajecten die aangaven dat er geen muskusratten meer waren in deze vaart. De zwak eDNA-positieve (+/-) trajecten in gebied 3 werden opgevolgd met eDNA, maar de 1 km lokalisatie trajecten waren eDNA-negatief. Na overleg met de bestrijder werd besloten om het gebied rond het eDNA+/- traject in de rechterbovenhoek en eDNA+/- traject in de linkerbovenhoek van gebied 11 te bemonsteren met volledige dekking. Hoewel het gebied met 4 eDNA- trajecten kwalificeert als Middelvol volgens de steekproef richtlijn tabel, is het niet als zodanig geclassificeerd. Dit komt omdat de enkele muskusrat op het eDNA+ spoor gevangen was, en de 3 eDNA+/- trajecten negatief waren in de opvolging met eDNA. Het kan echter ook niet als leeg worden geclassificeerd omdat er nog steeds muskusratten in deze regio zijn, hoewel waarschijnlijk niet genoeg om als middelvol te kwalificeren. Het zal daarom in een jaar opnieuw worden bemonsterd.

Gebied 4 had 1 eDNA +/- traject. De lokalisatie trajecten waren negatief voor muskusrat eDNA. Ter hoogte van dit traject in een ander peilgebied was een muskusrat gevangen in een duikerafzetting. Later waren er ook 2 moeren gevangen in een bouw in waterwegen die verbonden waren met het bemonsterde traject. Door de manier waarop de waterwegen met elkaar verbonden zijn, en de stroming is het zeer waarschijnlijk dat het signaal door deze muskusratten was veroorzaakt. Na bemonstering van controle trajecten rond de vangstlocatie waren er 2 eDNA +/- trajecten en 1 eDNA + traject, en werd een nog een muskusrat gevangen. Hoewel het hele gebied op basis van de resultaten als leeg kan worden geclassificeerd, verdient het zuidwestelijke deel van gebied 4 speciale aandacht, omdat het grenst aan een gebied met een zeer hoge populatie muskusratten. Een andere vangst dieper in het gebied werd ook gedaan in een duikerafzetting. Een mogelijke aanpak voor dit gebied kan zijn jaarlijkse monitoring van de migratieroutes in dit gebied, en gebieden grenzend aan de migratieroutes en 2-3 jaarlijkse monitoring van de rest van het gebied.

In gebied 11 waren 2 van de 40 trajecten +/- voor eDNA. Dit zou het gebied markeren als Middelvol. De opvolging van het meest Oostelijke trajecten was echter negatief. In de buurt van het andere eDNA+/- traject was een muskusrat gevangen in een duikerafzetting, en de controle was negatief na deze vangst, wat aangeeft dat er geen muskusratten in deze waterweg aanwezig zijn. Daarom was besloten dat dit gebied als mogelijk leeg kwalificeert en zullen er in het najaar na de 2e migratieperiode wanneer de waterwegen beter toegankelijk zijn, nog eens 40 trajecten worden bemonsterd.

Gebied 10 had 1 eDNA +/- traject, dat negatief was in de opvolging (er was een vangst verderop in het kanaal), maar had nog steeds veel vangsten in niet-bemonsterde gebieden, en is daarom

geclassificeerd als Middelvol. De andere gebieden hebben nog niet genoeg resultaten om conclusies te trekken. De resultaten van de steekproef van Wetterskip Fryslân komen overeen met de resultaten van 2022. Inhibitie van de PCR kwam niet vaak voor, slechts 3 monsters genomen van waterwegen (gedeeltelijk) op veengronden hadden inhibitie. Voor zowel Wetterskip Fryslân als Noord-Holland werden soms meer dan 40 of 80 traject bemonsterd omdat het lastig bleek om in het veld bij te houden hoeveel trajecten bemonsterd waren. Om deze reden zullen toekomstige bemonsteringsvoorstellen uit precies 40 of 80 trajecten bestaan.



Figuur 8 Resultaten Semi-willekeurige bemonstering 2023 Wetterskip Fryslân

Paarse stippen: vangsten

Groene lijnen: muskusrat eDNA–

Gele lijnen: muskusrat eDNA+/-

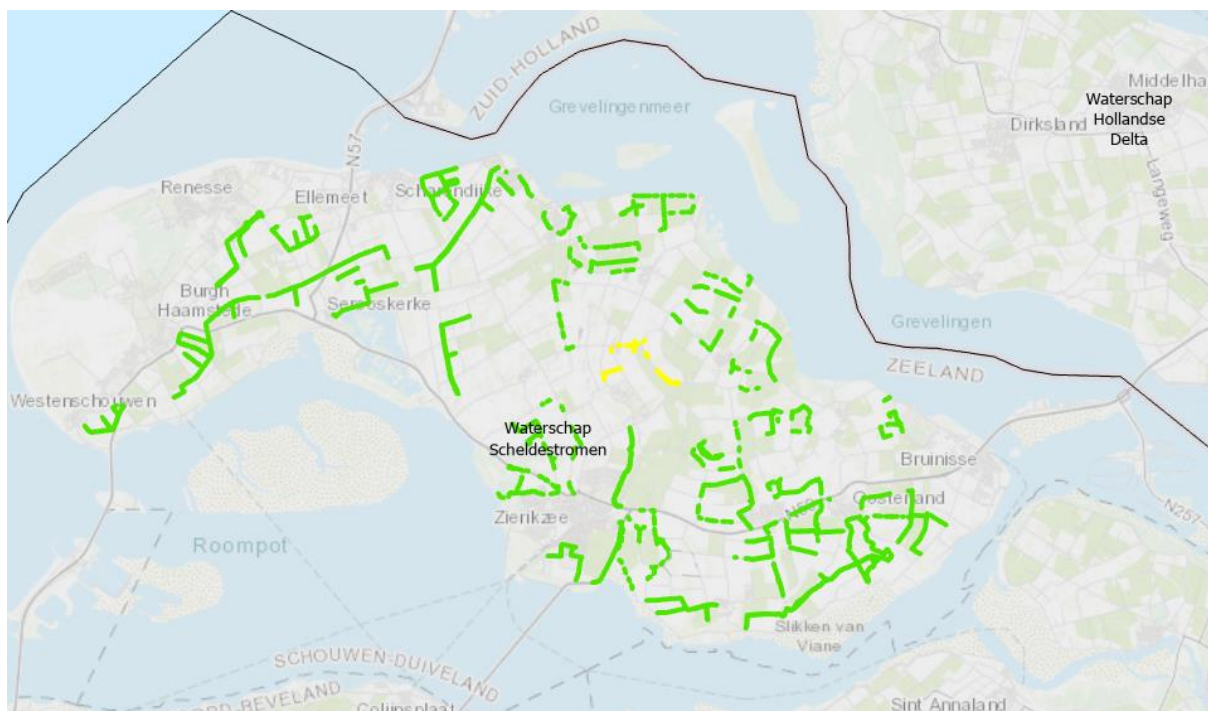
Rode lijnen: muskusrat eDNA+

totaal percentage eDNA (+ en +/-): 3%

2.3.3 Resultaten Semi-willekeurige steekproef 2023: Schouwen-Duiveland

Om de eDNA-methode te verspreiden, is een extra gebied getest, Schouwen-Duiveland. Dit is een eiland in de provincie Zeeland en wordt beheerd door Waterschap Scheldestromen. Het heeft de

afgelopen jaren een zeer laag aantal muskusrattenvangsten gehad en geen vangsten in 2022. Dit maakt het een ideale kandidaat voor monitoring met eDNA. Om de eDNA methode hier te introduceren, werd een steekproef uitgevoerd met 41 monsters. Slechts één van de trajecten was zwak positief (eDNA+/-) voor muskusrat eDNA en werd gevolgd door 12, 1 km trajecten om de muskusrat(en) te lokaliseren. De lokalisatie trajecten waren negatief voor muskusrat eDNA, wat aangeeft dat de muskusrat niet meer aanwezig was op deze locatie. Een bijzondere uitdaging in dit gebied was dat de week voor het bemonsteren grote hoeveelheden water uit de waterwegen werden gepompt, waardoor de waterstanden daalden, en muskusratten zich kunnen gaan verplaatsen. Vegetatie en gewassen belemmerden de bemonstering verder, wat resulteerde in zeer gefragmenteerde trajecten. De resultaten laten zien dat dit gebied geen hoge populatie muskusratten heeft en eDNA kan worden gebruikt om het gebied sneller te monitoren.



Figuur 9 Resultaten Semi-willekeurige bemonstering 2023 Schouwen-Duiveland

Groene lijnen: muskusrat eDNA-

Gele lijn: muskusrat eDNA+/-

sub-gebied NH/ZL*	1	3	4	5	6	7	0*
totaal # bemonsterde trajecten	39	42	N/B	41	42	N/B	41
eDNA trajecten +	0	4	N/B	7	17	N/B	0
eDNA trajecten +/-	2	18	N/B	20	1	N/B	1
totaal trajecten eDNA	2	22	N/B	27	18	N/B	1
% trajecten eDNA	5	52	N/B	66	43	N/B	2
classificatie	≥2 middelv	>6 vol	N/B	>6 vol	>6 vol	N/B	leeg?
vangsten 2022	48	23	536	8	520	1234	0
Totaal vangsten 2023 1^e helft	82	17	216	104	175	468	0
vangsten + & +/- trajecten	0	8	N/B	60	3	N/B	0

vangsten - trajecten	28	0	N/B	4	2	N/B	0
Vangsten niet bemonsterd	54	9	216	40	170	468	0

Tabel 4-a resultaten semi-willekeurige steekproef en vangsten (gebied9) en Zeeland *(sub-gebied 0)

1. Leeg? Betekend dat er nog 40 trajecten bemonsterd moeten worden om leeg te bevestigen.

N/B: niet beschikbaar

sub-gebied WF	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
totaal # bemonsterde trajecten	19	37	90	81	17	N/B	N/B	1	18	39	43	N/B
eDNA trajecten +	1	1	1	0	0	N/B	N/B	1	0	0	0	N/B
eDNA trajecten +/-	0	0	3	1	0	N/B	N/B	0	0	1	2	N/B
totaal trajecten eDNA	1	1	4	1	0	N/B	N/B	1	0	1	2	N/B
% trajecten eDNA	N/B	N/B	4	1	N/B	N/B	N/B	N/B	N/B	3	5	N/B
classificatie	N/B	N/B	≥3 middelvol/ "leeg" ¹	Empty	N/B	N/B	N/B	N/B	N/B	Middelvol ²	≥2 middelvol/leeg?	N/B
vangsten 2022	0	0	0	2	1	202	22	0	3	120	3	82
Totaal vangsten 2023 1 ^e helft	0	0	1	5	2	123	4	0	0	40	1	1
vangsten + & +/- trajecten	0	0	1	2	0	N/B	N/B	0	0	0	0	N/B
vangsten - trajecten	0	0	0	1	0	N/B	N/B	0	0	0	0	N/B
Vangsten niet bemonsterd	0	0	0	2	2	123	4	0	0	40	1	1

Tabel4-b resultaten semi-willekeurige steekproef en vangsten Wetterskip Fryslân (gebied 8)

1. Waarschijnlijk niet middelvol, zie uitleg hoofdtekst gebied 3 Wetterskip Fryslân

2. Gebaseerd op vangsten in niet bemonsterde waterwegen wegens lopende vangstacties.

Leeg? Betekend dat er nog 40 trajecten bemonsterd moeten worden om leeg te bevestigen.

N/B: niet beschikbaar

2.3.4 Discussie en conclusies semi-willekeurige steekproeven

Semi-willekeurige bemonstering met 40-80 trajecten is een goede methode om de werkelijke aanwezigheid van muskusratten in deelgebieden te bepalen. De resultaten in Noord-Holland laten zien dat deelgebieden waar de afgelopen jaren weinig vangsten waren, meer eDNA-bevattende trajecten

hadden dan uit de vangstgegevens kan worden afgeleid. Dit komt overeen met de resultaten van 2022, wat bevestigt dat een steekproef even goed werkt bij het bepalen van de aanwezigheid van muskusratten in een gebied als vlak-dekkend bemonsteren, maar tegen veel lagere kosten.

Hoewel de resultaten van de steekproef in Wetterskip Fryslân in lijn zijn met de vangsten van de afgelopen jaren, waren er in 2022 en 2023 enkele muskusratten-eDNA-trajecten in gebieden zonder vangsten. Een uitdaging in gebieden met een lage populatie is dat de muskusratten meer migrerend kunnen zijn omdat ze blijven zoeken naar een partner. Desondanks zijn de eDNA-resultaten nog steeds nuttig omdat de muskusratten langer in een gebied aanwezig kunnen zijn, en zelfs als ze verder zijn getrokken, kan de methode worden gebruikt als een vroegtijdig waarschuwingssysteem voor herkolonisatie.

Het is belangrijk dat de interpretatie van de resultaten van de steekproef en de daaropvolgende opvolging altijd gebeurt in samenwerking met een velddeskundige (bestrijder). Zo is het 4 muskusratten eDNA bevattende trajecten in gebied 3 in Fryslân misschien niet voldoende om de gebieden te classificeren als een middelvul gebied waarvoor volledige bemonstering vereist is, maar het kan ook niet leeg worden bevestigd. In overleg met de velddeskundige is daarom besloten dat dit gebied over 1 jaar opnieuw bemonsterd moet worden, en dat een klein deelgebied dat deelgebieden 3 en 11 doorkruist met volledige dekking moet worden bemonsterd om te bepalen of de muskusrat(en) in dit gebied gelokaliseerd kunnen worden.

Hoewel eDNA het meest effectief is in gebieden met een lage populatie, en zelfs als een gebied als Vol wordt geclassificeerd door de steekproef, wordt en niet opgevolgd met behulp van eDNA, kunnen de resultaten nog steeds worden gebruikt om de opvolging traditionele methoden te ondersteunen. Er zijn verschillende benaderingen voor traditionele speur- en vang inspanningen, en de resultaten van eDNA-bemonstering kunnen helpen bepalen welke methode het meest geschikt is voor het gebied. Een deelgebied met 8 eDNA-bevattende trajecten kan bijvoorbeeld anders worden beheerd dan een gebied met 20 eDNA-bevattende trajecten.

Naast het bepalen van de deelgebieden en de opvolging van de steekproef, spelen de bestrijders als velddeskundigen ook een belangrijke rol bij het bepalen van de beste tijd en methode voor bemonstering. Seizoenen en weersomstandigheden beïnvloeden wanneer een traject of zelfs gebied kan worden bemonsterd. Watergangen in poldergebieden met bijvoorbeeld landbouw zijn vaak het gemakkelijkst te bemonsteren in de herfst/winter bij gebruik van een quad, omdat er in deze periode geen gewassen zijn. Bemonstering te voet geeft over het algemeen altijd een gemakkelijke toegang tot watergangen in polders, maar tijdens het hoogtij van de zomer kan vegetatie in (kleinere) waterwegen de bemonstering belemmeren. Vegetatie kan ook de bemonstering per boot in de zomer belemmeren, omdat bepaalde waterwegen begroeid zijn met planten, waardoor ze ontoegankelijk zijn met de boot. Dit betekent niet dat er in de zomer geen bemonstering kan plaatsvinden, want er zijn nog voldoende watergangen toegankelijk voor bemonstering.

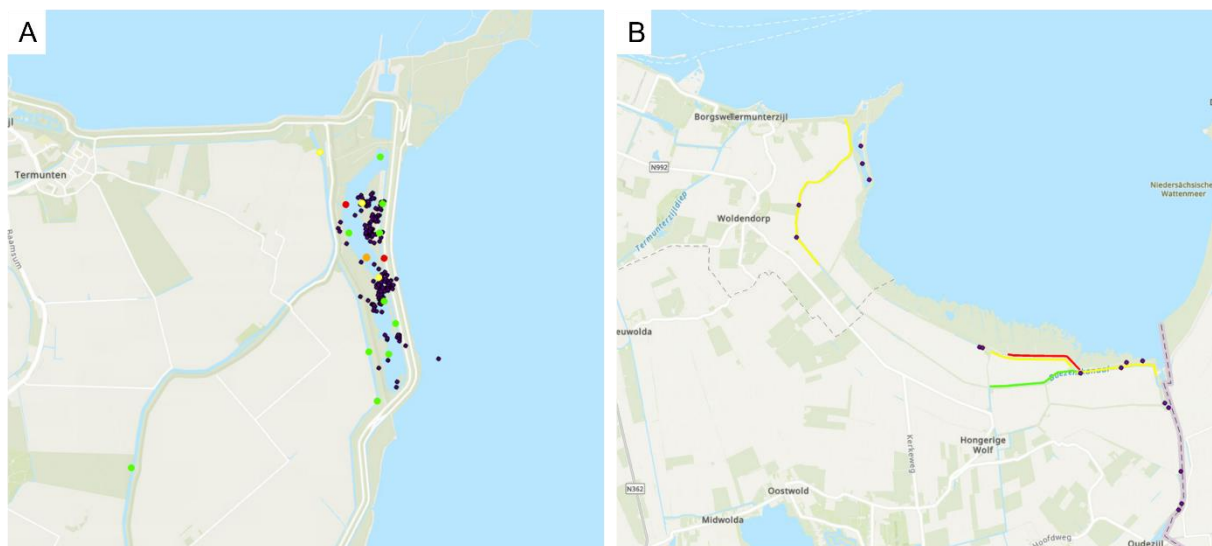
Ook het gedrag van de muskusratten speelt een rol. Muskusratten hebben migratieperiodes in het voorjaar en de vroege herfst. Het is nog niet helemaal duidelijk of de eDNA-bemonstering in deze perioden al dan niet moet worden voortgezet, aangezien er zowel vangsten zijn geweest op trajecten die in deze periode zijn bemonsterd als eDNA-positieve trajecten die negatief waren bij opvolging. Dit gebeurde echter ook buiten de hoofdmigratieperiode. De data die de komende jaren wordt verzameld, kan meer inzicht geven.

Omdat de waterwegen nu semi-willekeurig bemonsterd worden plaats van met volledige dekking, moet er rekening mee worden gehouden dat wanneer eDNA op een bepaald traject wordt gevonden, het mogelijk is dat het signaal afkomstig is van verbonden waterwegen. Dit betekent dat men in de

opvolging mogelijk buiten de bemonsterde waterwegen moet zoeken, vooral wanneer de eDNA-concentratie laag is.

2.4 Beverratten eDNA

Beverratten zijn grotendeels teruggedreven naar de grens met Duitsland. De bemonstering voor beverratten vond daarom voornamelijk plaats in het beheergebied van Hunze & Aa's. In de beginfase van het project zijn verschillende experimenten gedaan naar het vermogen om beverratten eDNA in oppervlaktewater te detecteren. Net als voor muskusratten kunnen beverratten inderdaad worden gedetecteerd met behulp van eDNA. Tijdens het project werd er een experiment uitgevoerd (dat niet gekoppeld was aan of gefinancierd werd door LIFE MICA) naar het migratiegedrag en het leefgebied van beverratten met behulp van GPS-tracking. We hebben hiervan geprofiteerd, door monsters te nemen rond gps-gevolgde beverratten. Dit werd gedaan met behulp van puntmonsters en gepoolde monsters (fig. 10). Hier werden in totaal beverratten gevangen op de trajecten met beverrat eDNA.



Figuur 10 Bemonstering in de buurt van GPS-gezenderde beverrat en omgeving

A: Grijs stippen, coördinaten van GPS gezenderde beverrat 11-01-2022-25-01-2022

Puntmonsters genomen op 01-03-2022: Groen eDNA-, geel eDNA+/-, oranje eDNA+, rood eDNA++.

B: Trajecten bemonsterd op 01-03-2022

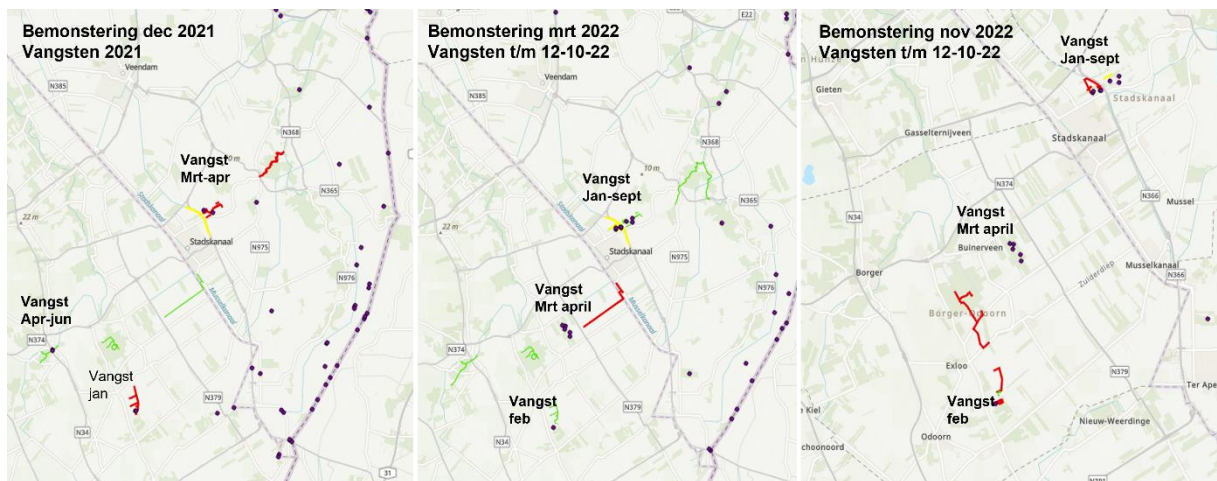
11 Beverrat vangsten op bemonsterde trajecten. Langere tijd tussen bemonstering en vangst dan bij muskusratten door andere vangmethode (levend vangen in kooien).

Uit deze en andere experimenten in en rond beverrat leefgebieden en bouwen vonden we dat puntbemonstering minder toegevoegde waarde heeft bij het lokaliseren van beverrat bouwen in vergelijking met muskusratten. De redenen hiervoor zijn dat beverratten een andere levensstijl hebben dan muskusratten. Muskusratten maken meerdere bouwen in de oevers van hun leefgebied, terwijl beverratten er minder maken. Beverratten brengen ook meer tijd door op het land dan muskusratten.

Trajectbemonstering is wel zeer geschikt voor de detectie van beverratten. Beverrat sporen kunnen erg moeilijk te vinden zijn, vanwege hun "verborgen" levensstijl. De aanwezigheid van bevers kan ook

de aanwezigheid van beverratten maskeren. Bemonstering voor beverrat eDNA kan worden gedaan op dezelfde monsters die worden genomen tijdens de monitoring van muskusratten. Net als voor muskusratten, kan eDNA ook worden gebruikt om gebieden te controleren of alle beverratten gevangen zijn na traditionele vangstinspanningen.

Het is bekend dat beverratten voorkeursgebieden hebben. In het gebied van Hunze en Aa's liggen veel van deze voorkeursgebieden in natuurgebieden. Gezien de hoeveelheid ecologische schade die beverratten kunnen aanrichten, is het belangrijk om beverratten uit deze gebieden te verwijderen (Holm et al 2011). Deze gebieden kunnen worden bemonsterd na vangstinspanningen om ervoor te zorgen dat er geen beverratten achterblijven en kunnen worden gecontroleerd op her-kolonisatie. Figuur 11 geeft de resultaten van de bemonstering in voorkeursgebieden van beverratten. In deze gebieden zijn ook bevers aanwezig en deze kunnen de sporen van beverratten maskeren. De waterwegen in deze gebieden werden gedurende een jaar gemonitord en er werden 3 bemonsteringsrondes uitgevoerd. In de linkerbenedenhoek van figuur 11 (A, B). Is een gebied te zien waar beverratten waren gevangen in januari 2021 en februari 2022 en het daaropvolgende eDNA-resultaat in maart 2022. In november 2022 werden de trajecten in deze regio weer beverrat eDNA+. Dit laat zien hoe de methode kan worden gebruikt om her-kolonisatie van beverratten te monitoren.



Figuur 11 Monitoring van beverrat voorkeurs gebieden.

Monitoring van deze gebieden gedurende een jaar, toont succesvolle verwijdering van beverrat uit een gebied linksonder deel van A en B, en daaropvolgende her-kolonisatie in oktober van hetzelfde gebied in linksonder deel van C. Visueel sporen van beverratten in deze gebieden wordt moeilijker gemaakt door de aanwezigheid van bevers.

2.5 Testen buiten Nederland

Om de methode te demonstreren in de beheergebieden van de andere deelnemers binnen LIFE MICA, zijn er ook experimenten gedaan in de Vlaanderen en Duitsland. De gebieden waarin bemonsterd was staan beschreven in 1.3.4 en 1.3.5

2.5.1 Vlaanderen

Om te bepalen of de eDNA-methode zoals ontwikkeld voor Nederland ook in andere LIFE MICA-gebieden kan worden toegepast, werd in 2 gebieden in Vlaanderen bemonstering uitgevoerd. Hoogstraten (gebied 7) werd gekozen als een gebied dat "Historisch leeg" is, en Galmaarden (gebied 6) werd gekozen als een "grensgebied" omdat het de afgelopen jaren te maken heeft met een toestroom van muskusratten uit Wallonië via de rivier de Mark. Beide gebieden waren te klein om steekproeven met 40 trajecten uit te voeren, omdat dit zou resulteren in een vlak dekkende

bemonstering. Het Hoogstraten-gebied werd bemonsterd met 13 trajecten en het Galmaarden-gebied werd bemonsterd met 11 trajecten. De monsters werden getest op muskusrat en beverrat eDNA. Alle 13 monsters genomen in Hoogstraten waren negatief voor zowel muskusrat als beverrat eDNA. De monsters uit Galmaarden daarentegen hadden muskusrat-eDNA in 10 van de 11 monsters, met in sommige gevallen hoge eDNA-concentraties. In de monsters uit Galmaarden werd ook geen beverrat eDNA aangetroffen. De eDNA-resultaten kwamen overeen met de waarnemingen van de bestrijders. De bemonsterde waterwegen in Galmaarden zijn voornamelijk beken met een sterkere stroming dan de meeste waterwegen die in Nederland zijn bemonsterd. Het feit dat de eDNA-resultaten overeenkomen met de waarnemingen van Belgische veldexperts is daarom zeer nuttig, omdat het aantoont dat de methode ook werkt in waterwegen met sterkere stromingen. De Vlaamse Milieumaatschappij (VMM) heeft interesse getoond in de aankoop van autosamplers om de methode verder te implementeren in hun beheergebieden.

2.5.2 Duitsland

In Duitsland werd het Asschauteiche-gebied (gebied 2) bestaande uit visvijvers en een smal deel van de rivier de Asschau bemonsterd op eDNA. In dit gebied zijn nog steeds beverratten aanwezig, maar er zijn de afgelopen jaren geen muskusratten gevangen. Vier monsters; 3 in de vijvers en 1 in de rivier werden genomen met de autosampler op de op afstand bestuurbare boot. Alle monsters waren negatief voor muskusrat eDNA en 2 bevatten beverrat eDNA. Deze resultaten bevestigen de vangstresultaten en waarnemingen in dit gebied, er zijn geen muskusratten aanwezig, maar er zijn nog wel beverratten in dit gebied. Er is interesse om eDNA in Duitsland te implementeren, maar er zijn geen korte termijn plannen geformuleerd.

2.5.3 Denemarken

Op verzoek van het Deense milieubeschermingsagentschap (MST) werd een proefexperiment uitgevoerd in het zuiden van Denemarken, nabij de grens met Duitsland. In tegenstelling tot Nederland en Duitsland heeft Denemarken geen grote populatie muskusratten. De grens met Duitsland vormt daarmee een risicogebied voor kolonisatie. Een verschil in de grens tussen Denemarken en Duitsland ten opzichte van Nederland en Duitsland is echter dat de waterwegen voornamelijk parallel lopen aan de grens tussen Denemarken en Duitsland, met minder waterwegen die direct de grens oversteken zoals in de grensgebieden tussen Nederland en Duitsland het geval is.

Voor dit experiment werd een veld kit met daarin een autosampler, filterstation + verbruiksartikelen en monstercontainers met conserveermiddel voor de filters door de UvA naar Denemarken gestuurd. De watermonsters werden gefilterd in een Deens lab en de filters in het conserveermiddel werden voor analyse naar het UvA-lab gestuurd.

In de rivier Vidå en de Rudbøl Sø aan de Duitse grens werden trajectmonsters genomen. In het zuidelijke deel van Denemarken werden ook verschillende puntmonsters van 500 ml genomen die op dezelfde manier werden verwerkt als de trajectmonsters. Op sommige locaties was er een bekende aanwezigheid van beverratten.

Slechts 1 van de 18 monsters bevatte een significante hoeveelheid muskusratten-eDNA, wat aangeeft dat de bemonsterde waterwegen geen gevestigde populatie muskusratten hebben. Alle monsters met bekende beverrat aanwezigheid testten positief op beverrat eDNA.

Het Deense agentschap voor milieubescherming heeft interesse getoond in de autosampler en eDNA-methode.

3. Ontwikkelde hulpmiddelen

Bij het ontwikkelen van de veld aanpak bleek al snel dat er specifieke bemonsteringsinstrumenten nodig waren. De meeste bemonsteringsinstrumenten voor eDNA zijn gericht op bemonstering voor ecologische tests, waarvoor over het algemeen puntmonsters van grote hoeveelheden water nodig zijn. Onze aanpak is daarentegen gebaseerd op gepoolde bemonstering van trajecten tussen 3-5 km. Om het bemonsteren te vergemakkelijken, werden voor en tijdens het project verschillende tools ontwikkeld.

3.1 Autosampler

Om het gepoold bemonsteren van waterwegen langs 3- 5 km lange trajecten te vergemakkelijken, was een geautomatiseerd bemonsteringsapparaat nodig. Aan het begin van het project bestond er geen apparaat dat voldeed aan de specifieke eisen van gepoolde bemonstering van veel verschillende soorten waterwegen. De bemonsteringsapparatuur die er wel was, was afgestemd op de traditionele bemonsteringsmethode en was te groot en te zwaar voor ons doel. Het ontwerp en de productie van de autosampler werd niet gefinancierd door LIFE MICA.

Het prototype van de autosampler had de grootte van een aktetas en werd in het veld getest door trappers. Veldtests resulteerden in de volgende vereisten: het moest klein en licht genoeg zijn om in een rugzak te worden gedragen voor bemonstering te voet of vanuit een drone. Het moest ook robuust en gebruiksvriendelijk zijn omdat het wordt gebruikt in veldsituaties.

De bètaversie (momenteel gebruikt) is ontwikkeld op basis van de eerder genoemde feedback van de trappers (figuur 12). Verschillende trajecten, 5 km, 2,5 km en 1 km kunnen worden geselecteerd waarover 500 ml water wordt verzameld. De 5-km-instelling wordt gebruikt voor het bewaken van waterwegen en de kortere lengtes voor vervolgtrajecten of andere specifieke toepassingen. Het formaat van het apparaat is 18x15x8 cm, klein genoeg om in een rugzak of op een op afstand bestuurbare kleine boot te passen. Het scherm is zowel bij veel licht als in het donker zichtbaar en de knoppen zijn ook verlicht om de zichtbaarheid in het donker te vergroten. De autosampler is regenwaterbestendig. Aan de siliconen slang in het water is een gesinterd filter bevestigd om verstopping van de buizen door plantmateriaal te voorkomen. De autosampler filtert het eDNA niet uit het water, dit en de verdere analyses worden in een lab gedaan.

Tussen de bemonsteringstrajecten door wordt de slang geleegd van oppervlaktewater en wordt de hele slang 1 tot 2 keer gespoeld (afhankelijk van de lengte van de buis) met schoon leidingwater. Vervolgens wordt een lege fles bevestigd voor het bemonsteren van het volgende monster. We hebben geen contaminatie tussen trajecten gevonden en het volledig legen en doorspoelen van de buizen is daarom voldoende. De autosampler heeft twee hoofdmodi, automatisch welke wordt gebruikt voor bemonstering vanaf een boot (figuur 13 C) of een op afstand bestuurbare boot (figuur 13 B), en handmatig die wordt gebruikt voor bemonstering te voet of vanaf een quad (figuur 13 A). In de automatische modus neemt het elke 25 m een watermonster. De maximale snelheid van de boot tijdens het bemonsteren is 8 km/u. Voor bemonstering in handmatige modus wordt om de 100 m een monster genomen, het eindvolume is nog steeds 500 ml. Handmatige bemonstering kan worden gedaan met behulp van een in de hand te houden knop, zodat de autosampler in een rugzak kan worden bewaard. Een geluid wordt gegeven wanneer 100 m van het vorige bemonsteringspunt is

bereikt, zodat de persoon die de monsters neemt weet wanneer een monster genomen moet worden. Een ander geluid wordt ook gegeven wanneer de geselecteerde afstand is bereikt.

Een belangrijk aspect van de autosampler is dat het nauwkeurig de GPS-coördinaten van de bemonsterde trajecten registreert, zodat als muskusrat eDNA wordt gedetecteerd, de daadwerkelijk genomen route kan worden gevolgd. Het is mogelijk om te schakelen tussen automatische en handmatige bemonstering en vice versa op hetzelfde GPS-logbestand voor trajecten die met beide methoden moeten worden bemonsterd. De naam van het logbestand wordt zowel gegeven als QR-code voor het scannen in een app via een mobiele telefoon, als met tekst.

Momenteel wordt de autosampler gebruikt voor bemonstering van, boot, quad, te voet en vanaf een op afstand bestuurbare kleine boot. De autosampler is ook voorbereid voor afstandsbediening en bediening vanuit een vliegende drone.



Figuur 12 De eDNA autosampler

3.2 Op afstand bestuurbare boot

In sommige situaties, zoals bemonstering in stedelijke gebieden of vijvers die niet vanaf de oever kunnen worden bemonsterd, kan een op afstand bestuurbare boot worden gebruikt (figuur 13 B). De voor dit project ontwikkelde op afstand bestuurbare boot is een aangepaste karper voerboot, waarin de autosampler geplaatst kan worden. Voor bemonstering vanaf de op afstand bestuurbare boot moet de autosampler op de automatische modus worden gezet en moet een kortere bemonsteringsbuis worden gebruikt, die aan de achterkant van de boot in het water wordt gelaten. De maximale snelheid van de op afstand bestuurbare boot is 7,2 km/u en de maximale afstand die kan worden bemonsterd is ongeveer 10 km op een volle accu. Er is geen camera op de boot, dus de besturing is op zicht, waardoor het praktische bereik wordt teruggebracht tot 100 -150 m.

3.3 Handmatige bemonstering

Handmatige bemonstering gebeurt met behulp van een telescoopstok met ringen waar de slang van de autosampler doorheen wordt geplaatst. Boven het gesinterde filter is een vlotter geplaatst om te voorkomen dat het filter te diep zakt en sediment opzuigt. Voor handmatige bemonstering moet de autosampler in de handmatige modus worden gezet.

De telescoopstok kan ook worden gebruikt voor het nemen van puntmonsters. In dit geval wordt een buis van 50 ml op een metalen houder geplaatst aan een kort touwtje aan het einde van de staaf (figuur 13 D). 25 ml van het bemonsterde water wordt toegevoegd aan een gecodeerde buis met 25 ml conserveermiddel.



Figuur 13 Bemonsteringsmethoden:

A: Bemonstering van quad met autosampler ingesteld op handmatige modus

B: Bemonstering van op afstand bestuurbare boot, autosampler ingesteld op automatische modus

C: Bemonstering vanaf boot, autosampler ingesteld op automatische modus

D: Puntmonsters nemen, Autosampler niet gebruikt

3.4 eDNA-app

Om de voorgestelde bemonsteringstrajecten te tonen en de sample- en autosamplercodes te registreren, is een speciale app nodig. In de periode 2019- medio 2022 werd gebruik gemaakt van een app genaamd de coypu-app, ontwikkeld door het bedrijf Python United. Deze app was geschikt voor het samplen van kleine hoeveelheden tracks, maar had bepaalde beperkingen bij het opschalen naar een groot aantal samples.

Om een groot aantal voorgestelde bemonsteringstrajecten te kunnen tonen en de codes te registreren en de resultaten van de lab-analyse te tonen, ontwikkelde Wetterskip Fryslân een app in de ArcGIS online omgeving, die toegankelijk is voor de mensen in het veld via de ESRI Field maps app. Het voordeel van deze app is dat het een zeer nauwkeurige GPS-lokalisatie heeft en dat het eenvoudig is

om nieuwe tracks aan de apps toe te voegen via de ArcGIS pro portal-functie. De ArcGIS online omgeving en Field map app worden door veel organisaties wereldwijd gebruikt waardoor de app eenvoudig overdraagbaar is.

Verdere ontwikkeling van deze app zal zich richten op geautomatiseerde toevoeging van de lab-resultaten aan de database, optimalisatie en mogelijke toevoeging van het weergeven van testresultaten van andere dieren zoals beverrat en bever. Het is de bedoeling om op termijn een landelijke app te hebben waar alle waterschappen gebruik van kunnen maken.

4. Inschatting besparing eDNA aanpak

Op basis van de ervaringen opgedaan in het muskusrat eDNA project, is er een overzicht opgesteld dat een uitkijk moet bieden op de te verwachten kosten en besparingen wanneer de muskusrat eDNA aanpak in heel Nederland geïmplementeerd is. Voor de tussenliggende fase, die waarschijnlijk minimaal 5-7 jaar zal bedragen, is het gezegd dat "de kost voor de baat uitgaat" van toepassing. Maar omdat er zoveel onberekenbare regionale verschillen zijn, is een kostenraming maken voor deze periode ondoenlijk.

In deze samenvatting zullen een aantal van de belangrijkste getallen en zaken worden genoemd die uit de kostenuitkijk naar voren zijn gekomen. De hele kostenuitkijk is als Excel spreadsheet beschikbaar.

Voorwaarde: De eDNA aanpak kan uitsluitend functioneel ingezet worden daar waar een muskusrat beheerseenheid de Frisse methode heeft geadopteerd.

Daarnaast is het goed nogmaals te memoreren dat de eDNA methode alleen effect heeft op het muskusrat *monitoren en speuren, niet op het vangen*. Bij juiste toepassing is er sprake van een multipliereffect met een enorme kostenbesparing.

Per jaar zijn de verwachte eDNA aanpak kosten:

– Muskusratbestrijding	€5,0 M
– Waterlaboratoria	€1,7 M
– eDNA kennisgroep	€0,3 M
– <u>Algeheel databeheer</u>	<u>€0,5 M</u>
Totaal	€7.5 M

De geschatte jaarlijkse kosten voor muskusratbeheer:

– Huidige totale kosten traditioneel bestrijden	€35,0 M	
– Geschatte algehele overhead	€ 5,3 M	(~15% van totaal)
– Geschatte kosten traditioneel vangen	€8,9 M	(~30% van totaal - overhead)
– Geschatte kosten vangen met Frisse aanpak	€1,7 M	(~19% van traditioneel)
– Huidige kosten traditioneel monitoren en speuren	€20,8 M	(~70% van totaal - overhead)
– Verwachte kosten Frisse monitoren en speuren	€9,5 M	(~46% van traditioneel)
– Verwachte kosten Frisse & eDNA aanpak & data	€7,5 M	(~36% van traditioneel)

Hierbij is uitgegaan dat heel Nederland zich in dezelfde situatie bevindt waarin Friesland nu zit met betrekking tot lage muskusrat aanwezigheid.

Uiteraard zal bij dalende kosten als gevolg van dalende benodigde veld inzet de overhead mee dalen. Wanneer we die daling conservatief op 40% inschatten, dan komen de overheadkosten op 2,1 M€ uit.

De totale kosten zouden dan optellen tot ~€11,3 M (overhead €2,1 M + monitoren & speuren & databeheer €7,5 M + vangen €1,7 M), wat neerkomt op een besparing van ~68%. Er is een document beschikbaar; Beschrijving eDNA in muskusratbeheer algemeen, waar de kosten inschatting uitgebreider wordt besproken.

Gegeven dat het op dit moment onmogelijk is om alle kosten nauwkeurig in te schatten, zullen de totale kosten zeker nog toenemen, maar zelfs wanneer er 50% onvoorziene kosten (+ € 5,7 M= €17 M) worden opgevoerd, is de besparing aanzienlijk (~50%).

Het is hoe dan ook duidelijk dat de combinatie van de Frisse methode en de eDNA aanpak belangrijke kostenreductie zal opleveren voor het muskusrat beheer in Nederland. Gezien de grote bedragen die hier jaarlijks mee gemoeid zijn lijkt het verstandig om de uitrol van beide methoden over Nederland de groots mogelijke voorrang te geven.

5. Discussie en conclusies

De resultaten laten duidelijk zien dat de eDNA-aanpak werkt en dat het grootste voordeel ligt in gebieden die al een lage populatie muskusratten hebben. Het is daarom aan te raden om de populatie zoveel mogelijk te verminderen met behulp van traditionele trackingmethoden zoals de coöperatieve aanpak, voordat eDNA wordt geïmplementeerd. Deze aanpak leidt tot de hoogste kostenreductie en maakt het streven van de waterschappen om de muskusrattenpopulatie terug te drijven naar de grenzen efficiënter.

Naast het monitoren van gebieden met de semi-gerandomiseerde aanpak, kan eDNA ook worden gebruikt om een gebied te controleren na intensieve vangstinspanningen, wanneer er geen visuele sporen meer zichtbaar zijn. Het bijkomende voordeel in deze situatie is dat sommige muskusratten en beverrat zeer weinig sporen achterlaten, eDNA kan dus een extra bevestiging zijn dat alle muskusratten uit de waterwegen zijn verwijderd en her-populatie door dieren die anders werden gemist, voorkomen. In sommige gevallen kan een regio die te klein is voor semi-willekeurige bemonstering een lage populatie muskusratten hebben en dus in aanmerking komen voor eDNA-bemonstering. In deze gevallen kan met behulp van eDNA een bemonstering met 20 sporen worden uitgevoerd om bevestiging te krijgen van de lage muskusrattenpopulatie. Semi-willekeurige bemonstering kan worden uitgevoerd zodra omliggende gebieden ook een lage populatie hebben, en kan dus aan dit gebied worden toegevoegd om een groot deelgebied te creëren dat geschikt is voor semi-willekeurige bemonstering.

Zoals vermeld in het hoofdstuk over semi-willekeurige bemonstering, kunnen verschillende waterwegen en gebieden verschillende benaderingen vereisen, zoals bemonsteringsperioden en -intervallen. Het advies van de bestrijders is om na de voorjaars- en najaarstrekperiodes de waterwegen te bemonsteren die als trekroutes dienen, en tijdens de trekperiode de bemonstering volledig naar de polders te verleggen. Dit komt omdat tijdens de migratie een positief monster in deze waterwegen bij de follow-up vaak negatief is, omdat de muskusrat(ten) dan verder zijn getrokken. Voor trekroutes kan het bemonsteringsinterval van trekroutes korter zijn dan voor poldergebieden. Dit kan bijvoorbeeld betekenen dat de polders in een historisch leeg deelgebied elke 3-5 jaar worden gemonitord, terwijl de trekroutes vaker worden bemonsterd, bijvoorbeeld elke 1-2 jaar. Het aanbevolen interval voor de bemonstering van het binnenland en de grensgebieden is elk jaar, en 2x per jaar voor de belangrijkste migratieroutes in grensgebieden. Het exacte interval wordt altijd in samenwerking met de bestrijders bepaald.

Een zeer belangrijk aspect van het succes van dit project was de samenwerking tussen wetenschappers, veldexperts (trappers), laboratoriumpersoneel, ingenieurs en GIS-experts. Er is een groot aantal variabelen in het veld, wat betekent dat veldkennis cruciaal is, evenals een flexibele mindset van de wetenschappers. Bij de ontwikkeling van deze methode hebben we er daarom voor gekozen om niet rigide een vooraf bepaalde experimentele opzet te handhaven, maar ervoor te kiezen om ons voortdurend aan te passen aan de feedback die we kregen van de mensen in het veld. Op deze manier zijn we erin geslaagd om de Semi-gerandomiseerde steekproefbenadering relatief gestandaardiseerd te maken. Het opvolgen van de resultaten van semi-gerandomiseerde steekproeven vereist echter altijd veldkennis, evenals het bepalen van de beste tijd van het jaar om specifieke deelgebieden/trajecten voor de semi-willekeurige aanpak te bemonsteren. Het is ook belangrijk om in gedachten te houden dat eDNA een methode is om de aanwezigheid van muskusratten en beverrat te detecteren, het vangt ze niet. Er zullen altijd professionele bestrijders nodig zijn om de dieren te vangen. De eDNA-methode kan hen helpen de tijd die ze besteden aan het speuren te verminderen en hen in staat te stellen hun vangstspanningen te concentreren.

6. Toekomst en aanbevelingen

Het doel is om de eDNA-methode uiteindelijk landelijk toe te passen als alle beheersgebieden hun muskusrattenpopulaties voldoende hebben verminderd. Om deze implementatie te begeleiden zal een landelijke eDNA kennisgroep worden opgericht om de implementatie te begeleiden. De eDNA-kennisgroep zal in eerste instantie bestaan uit een eDNA-adviseur en een trapper en zal waar nodig worden uitgebreid met experts op het gebied van bijvoorbeeld datamanagement. Het is vooral belangrijk dat er sprake is van inter-organisatorische samenwerking, om te voorkomen dat elke organisatie op eigen houtje een volledig afzonderlijke implementatie aangaat. Tegelijkertijd is het belangrijk dat er rekening wordt gehouden met de specifieke uitdagingen die elke regio kan hebben en dat kennis wordt gedeeld tussen organisaties, zodat de implementatie kan worden geoptimaliseerd.

Hoewel deze aanpak is ontwikkeld voor muskusratten en beverrat, is deze niet beperkt tot deze soorten. Omdat aan de basis van deze aanpak ligt de bemonstering van 500 ml oppervlaktewater over trajecten van 3-5 km, kunnen deze monsters ook worden getest op andere invasieve soorten, zoals de zes invasieve rivierkreeften op de zwarte lijst van de EU. Een generieke qPCR-test (die de aanwezigheid van rivierkreeften aantoont) die in multiplex met de muskusrat qPCR kan worden gebruikt, werd ontwikkeld door de Universiteit van Amsterdam. Als er rivierkreeft eDNA in de monsters aanwezig is, kan men vervolgens de soort-specifieke qPCR-tests uitvoeren.

In regio's in Nederland waar ze overstromingspreventie infrastructuur kunnen beschadigen, zijn bevers, ondanks dat ze een beschermd soort zijn, ook niet gewenst. In sommige situaties zijn bevers ook moeilijk te detecteren en daarom was er ook een qPCR-test voor bevers ontwikkeld. In de meeste gevallen zal de bever uit het kwetsbare gebied worden verwijderd en elders worden vrijgelaten.

Deze methode is ontwikkeld voor invasieve soorten, maar kan ook worden gebruikt voor beschermd/zeldzame soorten. De test voor invasieve soorten zorgt voor een grotere mate van onzekerheid over de aanwezigheid, dan standaard is voor eDNA-tests voor beschermd soorten zoals de grote modderkruiper (*Misgurnus fossilis*). De acceptatie van grotere onzekerheid was om de kosten van de methode te verlagen. De grotere mate van onzekerheid wordt weerspiegeld in het lagere monstervolume en het feit dat slechts 2 replicaties worden gebruikt in de qPCR. Om de methode toe te passen op zeldzame/beschermd soorten moet meer onderzoek worden gedaan naar de

gevoeligheid ten opzichte van de standaardtests voor de soort, om te bepalen of de oppervlaktewatermonsters van 500 ml geschikt zijn om deze soorten te detecteren.

Het verbreden van de reikwijdte van deze eDNA-methode past in een trend om te verschuiven van alleen het vertrouwen op traditionele visuele detectiemethoden naar het gebruik van moleculaire technieken zoals qPCR en DNA-metabarcoding. Hoewel deze methoden afhankelijk zijn van analyse in laboratoria, zal veldkennis belangrijk blijven, bij het gebruik van de resultaten om op te treden tegen invasieve soorten, maar bijvoorbeeld ook bij het bepalen wanneer welk gebied voor welke soort moet worden bemonsterd. Als de waterschappen er inderdaad in slagen muskusratten en beverratten terug te drijven naar de grens met Duitsland, kunnen de professionele bestrijders door hun uitgebreide veldkennis worden ingezet om verschillende invasieve soorten te beheren en beschermde soorten te monitoren. Het is belangrijk om een professionele vangorganisatie in stand te houden, omdat de algemene veldkennis en specifieke muskusratten- en beverrat-vangkennis niet verloren mogen gaan en moeten worden overgedragen aan nieuwe bestrijders.

Dit is vooral belangrijk omdat Duitsland, in tegenstelling tot België en Nederland, geen professionele vangorganisatie heeft en voornamelijk afhankelijk is van jagers om invasieve soorten te beheren. In sommige regio's is er een goede samenwerking tussen de Nederlandse waterschappen en hun Duitse tegenhangers, en de Nederlandse bestrijders werken ook over de grenzen heen. Als Duitsland echter blijft vertrouwen op jagers die per gevangen dier worden betaald, is het zeer onwaarschijnlijk dat ze hetzelfde succes zullen hebben in het beheer van muskusratten en beverratten als de Belgen en Nederlanders.

Deze eDNA-methode heeft zich succesvol bewezen in het monitoren van voornamelijk gebieden met een lage populatie. Om de scope van implementatie te verbreden is het interessant om te bepalen of eDNA ook gebruikt kan worden om de belangrijkste migratieroutes van beverratten en muskusratten te bepalen, en deze te monitoren. Het bepalen van migratieroutes, en het monitoren van deze waterwegen, is een andere benadering om te bepalen of een gebied vrij is van muskusratten en of beverratten. Aan de basis van een dergelijke implementatie zal nog steeds eDNA-analyse liggen, maar de daadwerkelijke uitvoering met betrekking tot bemonsteringstijd, bemonsteringsinterval etc. kan anders zijn.

Een belangrijk aspect van de aanpak is het gebruik van de eDNA-app voor voorsteltrajecten, het koppelen van monstercodes aan de tracks, het rapporteren van resultaten aan de trappers en de algehele gegevensregistratie. Verdere optimalisatie van de app wordt gepland door het (semi)automatisch invoegen van lab resultaten en het scoren op basis van het gemeten eDNA. De ideale situatie zou een landelijke app zijn, waarbij bestrijders van alle Waterschappen toegang hebben tot dezelfde app en kunnen zien wat de resultaten zijn over hun beheergrenzen heen, en volledig geautomatiseerde invoer van lab resultaten in de database. Er is ook interesse om de app ook uit te breiden om de resultaten van eDNA-analyse van andere soorten te tonen.

Momenteel kan het oppervlaktewatermonster getest worden op zowel muskusrat als beverratten maar dit is nog niet multiplex gedaan. Een waarschijnlijke optimalisatie voor de methode is dus multiplexing (het analyseren van muskusrat en beverratten in dezelfde PCR-reactie). Het laboratoriumprotocol is gebaseerd op de standaard voor eDNA-analyse, die is gebaseerd op fenolchloroformextractie, omdat dit resulteert in de hoogste DNA-opbrengst. Veel laboratoria geven er echter de voorkeur aan deze methode niet te gebruiken vanwege de toxiciteit van zowel fenol als chloroform. Met steeds betere commerciële DNA-analysekits is het mogelijk om over te schakelen op een isolatiemethode zonder deze chemicaliën.

Omdat het de bedoeling is om de methode landelijk te implementeren, is het raadzaam om uiteindelijk de verwerking te centraliseren en een robot in te zetten om de eDNA-zuivering uit te voeren. Hoewel nationale btw-regels een belemmering kunnen vormen voor centralisatie, zal het voordeel ruimschoots opwegen tegen de obstakels en wordt in de komende jaren een nationaal Nederlands eDNA-laboratorium verwacht, dat het succes van de eDNA-resultaten van dit LIFE MICA-project verveelvoudigt.

Dankbetuigingen

We willen in het bijzonder de volgende personen bedanken voor hun advies en bijdrages:

Dolinda Annema, Hans Bargerbos, Abel de Boer, Siebe Dol, Antienes Knol, Niels Koetsier, Bart Konijn, Hans Konijn, Lou Mol, Coos Ootes, Tijs van Roon, Flora Rosenbrand, Marc Rothengatter, Maarten Tuijl, Angelique Vollenbroek, Martin Wesseling, Tjeerd Weijers, Yvonne Wiersma

De volgende personen bedanken voor het bemonsteren en andere bijdrages:

Arnaud Bakker, Willie van den Berg, Rens Bonouvrie, Patrick Boogaart, Jur Dekker, Koen Deurlo, Jan Dijkma, Simon Dijkstra, Henk Flikkema, Hans Giskes, Marleen van de Griend, Gerrit Jan Herrema, Jaap Hiemstra, Fokke Jonkman, Ruud Kleinman, Hans de Kok, Peter Koning, Douwe Klompmaker, Pascal van der Linden, Wiktor Maciejewski, Rob van der Meer, Steven Meereboer, Andras Mirck, Max Neefjes, Eelco Nijboer, Flora Rosenbrand, Michelle Scholten, Richard Stocker, Peter Tesselaar, Linda Tiggelman, Jaap Vermaas, Margreet van Willegen, Runa Wils, Robbert Wirtz, Gerrit Worm.

7. Referenties

LIFE MICA website: [Lifemica.nl](http://lifemica.nl)

Heeres & Struijf 2016, *Muskusratten bouwen in oevers*, DOI:[10.13140/RG.2.2.14008.65282](https://doi.org/10.13140/RG.2.2.14008.65282)

Guerry O. Holm, Jr., Elaine Evers, Charles E. Sasser, The Nutria in Louisiana: A Current and Historical Perspective, [LPBF-LSU-Nutria-FINAL-11-22-11.pdf \(scienceforourcoast.org\)](https://www.scienceforourcoast.org/LPBF-LSU-Nutria-FINAL-11-22-11.pdf)