



De meest ideale markeringsmethodes voor *Anguis fragilis* bij vangen-merken- terugvangen-onderzoek

“Methodes voor het identificeren van Hazelwormen (*Anguis fragilis*)”

Bastiaan van der Meulen
Toegepaste Biologie
MAJOR: Dier
29-11-2017
Quirine Hakkaart

Afstudeerwerkstuk

Bastiaan van der Meulen

De meest ideale markeringsmethodes voor *Anguis fragilis* bij vangen-merken-terugvangen-onderzoek

“Methodes voor het identificeren van Hazelwormen (Anguis fragilis)”

Bastiaan van der Meulen

Amsterdam 29-11-2017

Aeres Hogeschool Almere

Stadhuisplein 40, 1315 XA Almere, Nederland



Voorwoord

Ter afsluiting van de HBO studie Toegepaste Biologie op Aeres Hogeschool Almere dient een scriptie te worden geschreven. Ik, Bastiaan van der Meulen een student Toegepast Biologie, kan met genoegen het voorwoord schrijven voor de scriptie “De meest ideale markeringsmethode voor de *Anguis Fragilis* bij Vangen-Merken-Terugvangen-onderzoek” als beginstuk van mijn afstudeerwerkstuk.

Tijdens de laatste stage kwam ik voor het eerst in contact met de *Anguis fragilis* in de natuurgebieden ten zuiden van Hilversum. Daar is de inspiratie opgedaan voor het onderwerp van deze scriptie vanwege onderzoek dat werd gedaan naar de *A. fragilis* waarbij een invasieve markeringsmethode is gebruikt. De methode was niet zonder risico en er was behoefte naar een beter alternatief.

De opdracht komt vanuit Wageningen Environmental Research (Alterra). Met als doelgroep de onderzoekers die onderzoek gaan verrichten naar de *A. fragilis*. De scriptie is geschreven aan het Aeres College te Almere.

Met dank aan Quirine Hakkaart voor het begeleiding bij het opstellen van het onderzoek en dank aan Edgar van der Grift voor de kans die is gekregen bij deze opdracht. Verder worden de medestudenten die hebben geholpen met de geleverde feedback.

Inhoud

Voorwoord	3
Samenvatting.....	6
Summary	7
1 Inleiding	8
2 Materiaal en methode:.....	11
2.1 Wat zijn de criteria waarop de methodes worden beoordeeld?	11
2.2 Welke markeringsmethodes zijn bekend bij andere diersoorten die van toepassing kunnen zijn op <i>A. fragilis</i> ?.....	11
2.3 Welke ontwikkelingen zijn gedaan in hardware en software die ondersteunend zijn bij het markeren en de identificeren van <i>A. fragilis</i> ?	12
2.4 Hoe scoren de bruikbare methodes op de criteria?	12
2.5 Eindresultaat	13
3 Resultaten.....	14
3.1 Wat zijn de beoordelingscriteria voor markeringsmethodes van wilde dieren?	14
3.2 Welke markeringsmethodes zijn bekend bij andere reptielen die van toepassing kunnen zijn op <i>A. fragilis</i> ?.....	16
3.2.1 Passive integrated transponder (PIT)-tag.....	16
3.2.2 Vriesmerken	17
3.2.3 Brandmerken.....	18
3.2.4 Tatoeëren	18
3.2.5 Schubknippen	19
3.2.6 Patronenherkenning.....	19
3.3 Welke ontwikkelingen zijn gedaan in hardware en software die ondersteunend zijn bij het markeren en de identificeren van <i>A. fragilis</i> ?	19
3.3.1 PIT-tags	20
3.3.2 Vriesmerken	20
3.3.3 Brandmerken.....	20
3.3.4 Tatoeëren	20
3.3.5 Schubknippen	21
3.3.6 Patroonherkenning.....	21
3.4 Hoe scoren de bruikbare methodes op de criteria?	22
3.4.1 Passive integrated transponder (PIT)-tag.....	22
3.4.2 Brandmerken.....	23
3.4.3 Vriesmerken	24
3.4.4 Tatoeëren	25
3.4.5 Schubknippen	26

3.4.6 Patroonherkenning.....	27
4 Discussie	28
4.1 Evaluatie onderzoeksmethode.....	28
4.2 Discussie resultaten.....	29
5 Conclusie & aanbeveling	32
5.1 Antwoord op de deelvragen.....	32
5.2 Antwoord op de hoofdvraag	32
Literatuur.....	34
Bijlage I: Beoordelingstabel van Beausoleil et al. (2004)	38

Samenvatting

Door de versnippering van natuurgebieden in Nederland raken populaties van dieren ontkoppeld, met als gevolg dat genetische variaties kan afnemen en de populatie verzwakt. De *Anguis fragilis* (Hazelworm) is een dier dat zich moeilijk verplaatst en kan gevoelig zijn voor de effecten van versnippering. Om te controleren of de populatie zich in stand houdt ten opzichte van de versnippering moeten de populaties worden gemonitord.

Door de verborgen levensstijl van de *A. fragilis* is vangen-merken-terugvangen een geschikte methode om hazelwormen te monitoren en een accurate populatieschatting te maken. Voor het uitvoeren van de schatting dienen de dieren individueel geïdentificeerd te worden om dubbele tellingen te voorkomen. Markeringen op de dieren, natuurlijk of onnatuurlijk, kunnen hiervoor worden gebruikt. Voordat een methode bruikbaar wordt geacht, moeten de methodes worden beoordeeld aan de hand van bepaalde criteria. Via een literatuuronderzoek zijn verschillende markeringsmethodes beoordeeld en scores gegeven op de bruikbaarheid op de *A. fragilis*. Hieruit is het gebruik van de patroonherkenning van de *A. fragilis* als meest ideale markering naar voren gekomen, waarbij de lichaamseigen patronen op de onderkaakschubben, keelschubben en/of kopschubben worden gebruikt voor identificatie. Als tweede worden de brandmerkjes als meest ideaal bevonden. De bevindingen worden ondersteunt door het aantal onderzoeken dat gebruikt maakt van deze methodiek op de *A. fragilis*.

Bij onderzoeken waarbij patroonherkenning is gebruikt wordt er bij geen van de onderzoeken een andere methode toegepast om uit te sluiten dat er alsnog mogelijk een ander individu is gevangen. Er wordt geadviseerd om de methode nogmaals te testen met behulp van brandmerkjes. Daarnaast wordt geadviseerd om verschillende lichaampatronen te gebruiken bij veldonderzoek naar de *A. fragilis* om te voorkomen dat littekens, die kunnen ontstaan bij het vechten of paren, niet de identificatie belemmeren.

Summary

Populations of animals in the Netherlands get disconnected due to fragmentation of nature reserves. As a result, the genetic diversity could decline and weaken the population. The *A. fragilis* (Slow-worm) is an animal that finds it difficult in relocating itself and is possibly sensitive for the effects of fragmentation. To check whether the population maintains themselves in relation to fragmentation, populations must be monitored.

Because of the hidden lifestyle of the *A. fragilis*, capture-mark-recapture is a suitable method for monitoring and makes an accurate population estimate. To use this method the animals should be identified individually to avoid double counts. Markings on the animals, natural or unnatural, can be used for this purpose. Before a method is considered usable, the methods must be assessed based on certain criteria. Various marking methods were evaluated and scores were given on the usability for *A. fragilis* through a literature review. The outcome was that the use of the body pattern recognition of the *A. fragilis* is the most ideal marking, whereby the body's own patterns on the mandible scales, throat scales and/or head scales are used for identification. The second-best method appeared to be hotbranding. These findings are supported by the number of studies that use this methodology on the *A. fragilis*.

In studies in where body pattern recognition is used, no other method is used in any of the studies to exclude the possibility that another individual may have been caught. It is recommended to test the method again using branding. In addition, it is recommended to use different body patterns in field research on the *A. fragilis* to prevent that scarring, which can occur when fighting or mating, won't hinder the identification.

1 Inleiding

Versnippering is een fenomeen in Nederland waardoor natuurgebieden niet meer met elkaar in verbinding staan (Van der Grift et al., 2003). Van der Grift et al. (2003) meldt dat steeds meer infrastructuur door natuurgebieden lopen, raken de leefgebieden voor dierlijke populaties ontkoppeld waardoor de leefomgeving verkleind wordt. Gevolgen hiervan zijn dat populaties van elkaar geïsoleerd raken en genetische variatie kan afnemen (Hendriks et al., 1999; Pelk et al., 2000). Vooral dieren die minder mobiel zijn en gevoelig zijn voor isolatie en versnippering kunnen hier onder lijden (Van Delft et al., 2012; Doorn, 2016).

Eén van deze minder mobiele diersoorten in Nederland is de *Anguis fragilis* (Linne, 1758), beter bekend als de hazelworm (Van Delft, 2012). De *A. fragilis* is een levendbarend reptiel zonder poten uit de familie *Anguillidae* (Smith, 1990; Patterson, 1990; Platenberg & Griffiths, 1999; Speybroeck et al., 2016). De *A. fragilis* lijkt op een slang door het ontbreken van poten en de soortgelijk voorbeweging van een slang (Van Delft et al., 2012). Echter, er zijn verschillende eigenschappen die het dier onderscheid van slangen (Van Delft et al., 2012). *A. fragilis* kan de ogen sluiten; kan zijn staart afwerpen; heeft een langere staart dan een slang en is minder flexibel dan slangen (Van Delft et al., 2012). Ondanks dat het dier lijkt op een slang is de *A. fragilis* een stuk minder wendbaar/mobiel (Van Delft et al., 2012). Het dier komt verspreid voor in Europa tot op een hoogte van 2400 meter (Goverse et al., 2010; Van Delft et al., 2012). De *A. fragilis* is voornamelijk te vinden onder mossen en stronken, tussen gras, heide en het loof van de bossen waar het dier tunnels graaft en leeft in bestaande tunnelnetwerken van muizen (Smith, 1990; Riddell, 1996; Van Delft et al., 2012; Speybroeck et al., 2016). De *A. fragilis* warmt zich doorgaans niet op in direct zonlicht, maar reguleert zijn lichaamstemperatuur onder objecten of vegetatie die warmte vasthouden (Patterson, 1990; Meek, 2005). Onderzoek naar de verplaatsing van de *A. fragilis* laten zien dat vrouwtjes ongeveer 19 meter verplaatsten in 30 dagen tijd, en mannetjes 48 meter van mannetjes gedaan in 30 dagen tijd (Haley, 2014). Het is onwaarschijnlijk dat de *A. fragilis* zich ongeveer tussen de 500-1000 meter per jaar kan verplaatsen (Goverse et al., 2010; Van Delft et al., 2012). De *A. fragilis* kan zich moeilijker voortbewegen over wegen en plaatsen zonder vegetatie (Van Delft et al., 2012), omdat ze dan kwetsbaar zijn voor predatie van bijvoorbeeld roofvogels, katten, honden en vossen, maar op de paden ook voor fietsers en auto's doordat ze dan lijken op een stok (Van Delft et al., 2012).

Omdat het dier niet snel verplaatst, kan de *A. fragilis* gevoelig zijn versnippering (Goverse et al., 2010; Van Delft et al., 2012; Haley, 2014). Om te controleren of de *A. fragilis* populaties lijden onder de versnippering en te controleren of de populaties vitaal blijven is het belangrijk dat de populaties worden gemonitord over meerdere jaren (Van Delft et al., 2012; Doorn, 2016). Echter is het monitoren van de *A. fragilis* lastig door zijn verborgen levensstijl (Ferreiro & Galán, 2004). Om de *A. fragilis* te monitoren moeten kunstmatige objecten worden geplaatst om de bevindingen te optimaliseren. Bij een drie jarig onderzoek, in zuid Engeland, is 99% (N=286) onder kunstmatige bedekking gevonden (Reading, 1997). Deze methode is goed toepasbaar om *A. fragilis* te inventariseren, maar voor een accurate populatie schatting te maken, en te zien hoe de populatie zich in stand houdt is meer informatie nodig (Patterson et al., 1992; Doorn, 2016).

Er zijn meerdere methodes om een populatie schatting te maken door bijvoorbeeld de populatie te tellen of een steekproef te doen ("Populatiegrootte", z.d.). Vangen-merken-terugvangen is een methode die gebruik maakt van individuele identificatie (Schmidt et al., 2017). De individuele

identificatie voorkomt dubbele tellingen waardoor er met een formule een accurate schatting is te maken over de populatiegrootte (Goverse et al., 2010; Van Delft et al., 2012; Nichols, 1992; Beausoleil et al., 2004; Bruinderink et al., 2013; La Haye & Müskens, 2016). Methodes voor individuele identificatie zijn niet nieuw: er zijn verschillende methodes bekend en getest (Nichols, 1992; Riddell, 1996; Beausoleil et al., 2004; Silvy et al., 2012; La Haye & Müskens, 2016). De methodes voor het markeren van dieren zijn onder te verdelen in twee groepen, invasief en non-invasief (Riddell, 1996; Beausoleil et al., 2004; Mellor et al., 2004; Silvy et al., 2012).

- Invasieve handelingen zijn handelingen waarbij het lichaam wordt binnen gedrongen met een apparaat of voorwerp, zoals PIT-tags, waarbij een transponder wordt ingebracht via een injectie (Beausoleil et al., 2004; La Haye & Müskens, 2016). De voordelen hiervan zijn dat het dier met permanente markering te allen tijde succesvol wordt geïdentificeerd, en er verder geen herhaling van andere handelingen hoeft plaats te vinden (Beausoleil et al., 2004; Sacchi et al., 2010; Petit, et al., 2012). Aan de andere kant kan, wanneer verkeerd uitgevoerd, kan de handeling leiden tot infectie of immobiliteit en sterfte (Smyth et al., 2013). Bij de *A. fragilis* zijn in een onderzoek brandmerkjes gebruikt als markering, waarbij littekens worden gemaakt met behulp van een heet voorwerp (Ferreiro & Galán, 2004).
- Non-invasieve methodes zijn handelingen waarbij natuurlijke herkenningspunten worden gebruikt voor identificatie of een onnatuurlijk herkenningspunt wordt aangebracht zonder de huid te breken (Beausoleil et al., 2004; Sacchi et al., 2010; Silvy et al., 2012). Een voorbeeld hiervan zijn de kopschubben bij adders als herkenningspunt (Lenders, 2010) en is ook al gebruikt bij de *A. fragilis* (Smith, 1990). Het gevaar bij deze methodes is dat het dier de natuurlijke markering verliest door verwonding of onnatuurlijke markering verliest door vervaging of slijtage (Beausoleil et al., 2004).

Voor het kiezen van een methode bij Vangen-Merken-Terugvangen-onderzoek zijn afwegingen te maken. Naast ethische verantwoordelijkheid van de onderzoeker zijn er mogelijke bijkomende effecten van de methode op het dier en/of op het onderzoek (Mellor et al., 2004; Beausoleil et al., 2004; Silvy et al., 2012). De ideale methode voldoet aan de volgende criteria (Lewke & Stroud, 1974; Ferner, 1979; Nietfeld et al., 1994; Reaser, 1995).

Een ideale markering moet:

- het dier zo min mogelijk pijn en/of stress bezorgen;
- het dier identificeren als een individu, indien gewenst;
- eenvoudig toepasbaar zijn in zowel het laboratorium als in het veld;
- gemakkelijk en niet dubbel te lezen of te observeren zijn;
- betrouwbaar zijn gedurende de duur van het onderzoek;
- kosten efficiënt zijn;
- geschikt zijn voor dieren van verschillende groottes;
- de materialen moeten gemakkelijk zijn te verkrijgen en te gebruiken.

Een ideale markering mag niet:

- een oorzaak zijn van overlijden;
- sub-letale effecten hebben op de conditie, bijvoorbeeld verminderde groei of reproductief vermogen;
- het gedrag beïnvloeden van gemarkeerde individuen;
- het gedrag beïnvloeden van andere dieren tegenover het gemarkeerde individu;
- de toekomstige waarschijnlijkheid beïnvloeden van het vastleggen van gemerkte individuen ten opzichte van ongemarkeerde individuen.

Zeer waarschijnlijk is er geen enkele methode die aan al deze criteria voldoet (Beausoleil et al., 2004). De eerste eis “het dier zo min mogelijk stress bezorgen” wordt bijvoorbeeld nagenoeg nooit behaald bij het vangen en het hanteren van wilde dieren (Cabanac & Cabanac, 2000). Verschillende methodes hebben verschillende handelingen waarbij stress en pijn op andere niveaus wordt ervaren (Beausoleil et al., 2004; Mellor et al., 2004).

Dit onderzoek beoogt de volgende vraag te beantwoorden: Welke markeringsmethodes zijn gedurende meerjarig onderzoek geschikt bij Vangen-Merken-Terugvangen-onderzoek naar de *A. fragilis* en voldoen het meest aan de opgestelde criteria voor de ideale markering?

Om de hoofdvraag te beantwoorden zijn de volgende deelvragen opgesteld:

- Wat zijn de criteria waarop de methodes worden beoordeeld?
- Welke markeringsmethodes zijn bekend bij andere reptielen die van toepassing kunnen zijn op *A. fragilis*?
- Welke ontwikkelingen zijn gedaan in hardware en software die ondersteunend zijn bij het markeren en de identificeren van *A. fragilis*?
- Hoe scoren de bruikbare methodes op de criteria?

Hypothese:

Er wordt verwacht dat door technologische ontwikkelingen methodes minder stressvol en/of handeling intensief zijn geworden. Verwacht wordt dat één van de doorgaans gebruikte methodes naar voren komt als beste getest, brandmerkjes of foto-identificatie.

Uit deze scriptie komt een advies. Dit advies dient als gids voor onderzoekers om te helpen bij het zoeken naar een passende identificatiemethode. Er wordt een advies gegeven over verschillende methodes die gebruikt kunnen worden om hazelwormen te identificeren. Met deze methodes kan een accurate populatie schatting van de *A. fragilis*.

In hoofdstuk 2 wordt besproken hoe de deelvragen worden beantwoord en is een vooruitzicht te vinden naar het eindresultaat. In hoofdstuk 3 zijn de resultaten per deelvraag weer gegeven. In hoofdstuk 4 worden de resultaten bediscussieerd. In het laatste hoofdstuk staat de conclusie en het antwoordt op de hoofdvraag weer gegeven met een aanbeveling voor verder onderzoek.

2 Materiaal en methode:

In dit hoofdstuk is beschreven hoe het onderzoek is verricht dat leidt tot het beantwoorden van de deelvragen. De antwoorden op de deelvragen leiden tot een antwoord op de hoofdvraag.

Op google scholar is gezocht naar onderzoeken waar identificatiemethodes zijn toegepast op hazelwormen en andere gelijksoortige dieren, zoals slangen en hagedissen. Engelse termen zoals Slow-worm, individual, identification, marking, capture-mark-recapture, methods, *Anguis fragilis*, reptiles, snakes, lizards, invasive, non-invasive zijn in combinatie gebruikt. De gevonden informatie is beoordeeld op relevantie door de samenvatting te lezen. Informatie is relevant wanneer:

- Het gaat over markeringsmethodes die gebruikt worden op soortgelijke dieren als de *A. fragilis* (slangen, hagedissen);
- Het artikel gaat om onderzoek waarbij Vangen-Merken-Terugvangen wordt toegepast op soortgelijke diersoorten (slangen, hagedissen);
- Het artikel informatie bevat over technische innovatie in hardware of software die zijn gebruikt bij markeringsmethodes;
- Er criteria en/of reviews worden geleverd over een, of verschillende markeringsmethodes, invasief of non-invasief.

De relevante informatie is vrij vertaald naar het Nederlands. Indien nodig zijn woorden nader verklaard in de tekst als de term niet kan worden vertaald. De genoemde zoektermen zijn ook gebruikt in het Nederlands en het Duits, behalve de zoekterm slow-worm. Hiervoor zijn de zoektermen hazelworm (Nederlands) en Blindschleiche (Duits) gebruikt. Wanneer een artikel relevante informatie bevat is er verder gezocht in het artikel door met ctrl + F-zoekfunctie te zoeken naar de eerdergenoemde termen. Relevante informatie is opgeslagen in een bronnen matrix gemaakt in Microsoft Word.

2.1 Wat zijn de criteria waarop de methodes worden beoordeeld?

Het bepalen van de voor- en nadelen is gedaan door de methodes te beoordelen op verschillende onderdelen. De criteria is overgenomen uit de literatuur (Beausoleil et al., 2004; Mellor et al., 2004) en Mellor et al. (2004). Beide hebben een boek geschreven waarin markering methodes worden beoordeeld waarbij er gebruik is gemaakt van een literatuur onderzoek. De beoordelingscriteria zijn, indien nodig, aangepast naar bruikbaarheid op de *A. fragilis* (Riddell, 1996; Beausoleil et al., 2004; Sacchi et al., 2010; Winne et al., 2006; Doorn, 2016).

2.2 Welke markeringsmethodes zijn bekend bij andere diersoorten die van toepassing kunnen zijn op *A. fragilis*?

Er is gezocht naar verschillende markeringsmethodes bij soortgelijke dieren, zoals hagedissen en slangen. Markeringsmethodes die voor komen in Vangen-merken-terugvangen-onderzoek zijn beoordeeld op de methode, en fysieke overeenkomsten met de *A. fragilis*, bijvoorbeeld kopschub herkenning bij adders (*Vipera berus*) (Lenders, 2000). Methodes die merken maken op de huid, maar nog nooit zijn geprobeerd op reptielen worden niet verder onderzocht (Smith, 1990; Riddell, 1996; Beausoleil et al., 2004; Lenders, 2000; Doorn, 2016; La Haye & Müskens, 2016).

De toepasbaarheid van markeringsmethodes op de *A. fragilis* is beoordeeld door de fysieke eigenschappen van de *A. fragilis* en eigenschappen van de methode. Anne Riddell (1996) heeft vergelijkbaar werk verricht. Op een dezelfde methode zijn de markeringsmethodes beoordeeld op bruikbaarheid (Riddell, 1996; Beausoleil et al., 2004; Doorn, 2016). Afgekeurde methodes zijn niet mee

genomen in verdere beoordeling. Voor methodes die nog niet zijn geprobeerd/ gebruikt op de *A. fragilis* is de aanname gedaan dat de methode werkt.

2.3 Welke ontwikkelingen zijn gedaan in hardware en software die ondersteunend zijn bij het markeren en de identificeren van *A. fragilis*?

Er is gezocht naar apparatuur voor invasieve handelingen en naar software die Vangen-Merken-Terugvangen-onderzoek ondersteunen (Sacchi et al., 2010; La Haye & Müskens, 2016). De technologie is beoordeeld op bruikbaarheid voor het toepassen op de *A. fragilis*. Daarnaast is gekeken of het Vangen-Merken-Terugvangen-onderzoek ondersteunt door processen te versnellen en/of het handelingen gemakkelijker maakt.

2.4 Hoe scoren de bruikbare methodes op de criteria?

In het boek *Methods for marking New Zealand wildlife: amphibians, reptiles and marine mammal's* door Beausoleil et al. (2004) is gebruik gemaakt van een tabel om de verschillende methodes tegenover elkaar uit te zetten. Het graderen is simpel gehouden door gebruik te maken van woorden zoals, makkelijk, ingewikkeld, moeilijk, en laag, gemiddeld, hoog (Figuur 1). Op een soortgelijke wijze zullen de factoren worden gecodeerd voor dit onderzoek. De tabellen in de boeken van Beausoleil et al. (2004) zijn gebruikt als basis voor de gradaties, en vervolgens aangepast aan de hand van de gevonden literatuur (Bijlage I). Om op een waarde uit te komen is de beoordeling vertaald naar een numerieke scores van 1 tot en met 5. De scores hebben de volgende betekenis:

1. Zeer negatief
2. Negatief
3. Neutraal
4. Positief
5. Zeer positief

Bijvoorbeeld: In figuur 1 zijn applicatie snelheid, complexiteit en kosten tegenover elkaar uit gezet. Bij applicatie snelheid krijgt 'fast' (snel) een waardering van 4, en 'slow' (langzaam) een waardering van 2. Mocht een methode worden beoordeeld met 'erg snel' scoort deze een 5, en een 'Erg langzaam' scoort een 1. Bij complexiteit en kosten zal 'High'(hoog) een waardering krijgen van 2 en 'Low' (laag) een waardering van 4. Bij gebrek aan literatuur om een nieuw oordeel te geven over een methode wordt de beoordeling van Beausoleil et al. (2004) aangehouden.

METHOD	SPEED OF APPLICATION	COMPLEXITY	COST
Hot brands	Fast	Low-Intermediate, depending on heat source and amount of hair	Low
Freeze brands	Slow-Intermediate, depending on species	Intermediate-High, depending on method	Intermediate
Chemical brands	Slow-Intermediate, depending on method	Intermediate-High, depending on method	Intermediate
Tattoos	Slow	Intermediate	Intermediate
Passive Integrated Transponders	Intermediate-Fast	High	High
Visible Implant Fluorescent Elastomer tags	Intermediate	Intermediate	Low
Tissue removal	Fast	Low	Low
Vital stains	Intermediate	Intermediate	Intermediate-High, depending on stain and recovery method
Natural marking identification	Slow-Fast	High	Low-Intermediate, depending on equipment

Figuur 1: Beoordelingstabel door Beausoleil et al. (2004)

Uit het beoordelen van alle methodes komen scores naar voren. Deze scores met bijbehorende methodes zijn gerangschikt. Hieruit komt naar voren welke methode over het algemeen het meeste voldoet aan de omschrijving van een ideale markeringsmethode en van toepassing is voor het identificeren van een hazelworm.

2.5 Eindresultaat

De scores van op de beoordelingscriteria zijn in een tabel gezet. Aan de hand van de tabel kan men zien hoe een methode scoort op verschillende beoordelingscriteria. Komt de meest ideale markeringsmethode voor Vangen-Merken-Terugvangen-onderzoek (Tabel 1).

Tabel 1: Voorbeeld eindresultaat

Methode	Applicatie snelheid	Complexiteit applicatie	Kosten	Korte-termijn stress	Score
<i>Natuurlijke kenmerken</i>	2	2	3	3	10
<i>PIT-tag</i>	3	2	2	1	8
<i>Tatoeëren</i>	1	1	1	1	4
<i>Brandmerken</i>	2	1	1	1	5

3 Resultaten

In dit hoofdstuk worden de resultaten besproken. In 3.1 is de deelvraag “Wat zijn de beoordelingscriteria voor markeringsmethode van wilde dieren?” beantwoord, in 3.2 de deelvraag “Welke markeringsmethodes zijn bekend bij andere reptielen die van toepassing kunnen zijn op de *A. fragilis*”, in 3.3 de deelvraag “Welke ontwikkelingen zijn gedaan in hardware en software die ondersteunend zijn bij het markeren en de identificeren van *A. fragilis*?” en in 3.4 is de deelvraag “Hoe scoren de bruikbare methodes op de criteria?”.

3.1 Wat zijn de beoordelingscriteria voor markeringsmethodes van wilde dieren?

Voor het bepalen welke methode het meest ideaal is, moet eerst worden vastgesteld waarop de methodes worden beoordeeld. De criteria waaraan een ideale markering moet voldoen zijn door Beausoleil et al. (2004) en Mellor et al. (2004) vertaald naar beoordelingscriteria waarop een beoordeling kan worden gegeven, zoals hoog of laag, snel of langzaam.

Deze beoordelingscriteria zijn niet geheel toepasselijk op de *A. fragilis*. Een beoordelingspunt genaamd ‘zichtbaarheid’ wordt beoordeeld op de mogelijkheid om onder andere het dier te identificeren op afstand. Om dit beoordelingscriterium toepasbaar te maken voor de *A. fragilis* is ‘zichtbaarheid’ is aangepast en veranderd in ‘herkenbaarheid van de markering’ omdat de *A. fragilis* moet altijd worden gevangen voor identificatie door zijn verborgen levensstijl (Smith, 1990; Riddell, 1996; Platenberg, 1999; Doorn, 2016; Schmidt, 2017)

Beausoleil et al. (2004) en Mellor et al. (2004) hebben de volgende beoordelingscriteria gebruikt:

- **Snelheid uitvoeren handeling(en)**
De snelheid waarmee de handeling wordt uitgevoerd heeft invloed op het welzijn van het dier. Des te langer het dier moet worden gehanteerd, des te meer de kans op hoge niveaus aan stress het dier ondervindt.
- **Complexiteit aanbrengen markering**
De complexiteit geeft aan hoe moeilijk of gemakkelijk het aanbrengen van een markering is. Een complexe methode verhoogd de kans op het verkeerd aanbrengen van de markering, wat het risico op schade, infectie en sterfte verhoogd. Daarnaast ontstaat de kans dat de markering later niet is terug te herkennen na het verkeerd aanbrengen van een markering. Gemakkelijke methodes verlagen de kans op infectie, sterfte en verkeerd aanbrengen van markering.
- **Kosten**
Onder de kosten worden de financiële kosten verstaan, die worden gemaakt voor de benodigde apparatuur voor het uitvoeren van de methode. Hierbij wordt er globaal gekeken naar de kosten. Sommige methodes hebben kosten per individu, waarbij andere methodes een algehele grotere meedraag voor de aanschaf van de benodigde apparatuur.
- **Korte-termijn stress**
Hiermee wordt de hoeveelheid stress bedoeld die wordt veroorzaakt bij een dier, door het uitvoeren/ aanbrengen van de markering. Gekeken wordt naar het in bedwang houden van het dier en de manier van aanbrengen van de markering.
- **Invloed van onderzoeker**
Bij deze beoordeling wordt de invloed van de onderzoeker bedoeld tijdens het markeren. De manier hoe een dier moet worden gehanteerd, in combinatie met het succesvol uitvoeren van de methode. Hierbij kan men denken aan de diepte van een invasieve handeling of de hitte van een brandmerk. Eveneens is de ervaring en training van de onderzoeker hier van belang.

- **Herkenbaarheid van de markering**

Met de herkenbaarheid van de markering wordt de mate waarin de markering is te herkennen én goed is af te lezen voor een onderzoeker bedoeld. Markeringen dienen op een later tijdstip leesbaar te zijn voor de onderzoeker om het dier juist te identificeren.

3.2 Welke markeringsmethodes zijn bekend bij andere reptielen die van toepassing kunnen zijn op *A. fragilis*?

In dit deelhoofdstuk is te vinden welke markeringsmethodes worden gebruikt voor Vangen-Merken-Terugvangen onderzoek bij andere diersoorten die mogelijk bruikbaar zijn voor *A. fragilis*.

Gezien reptielen een andere huidstructuur hebben dan andere diersoorten zijn alleen methodes waarvan in de literatuur is bewezen dat ze bruikbaar zijn op reptielen in acht genomen (Beausoleil et al., 2004; Mellor et al., 2004; Silvy et al., 2012). Van deze methodes is gekeken of ze mogelijk zijn op de *A. fragilis*. Omdat de *A. fragilis* geen poten heeft en ondergronds leeft, vallen bij voorbaat methodes af die van toepassing zijn op extremiteiten, zoals teenknippen, en methodes met betrekking op het aanbrengen van externe voorwerpen, zoals labels of kralen (figuur 2) (Riddell, 1996).



Figuur 2: Op de *Anolis* (*Anolis olssoni*) zijn de kralen met dun draad in het spierweefsel genaaid. Via verschillende kleuren combinaties zijn dieren te identificeren (foto copyright: Michele Johnson). Door de ondergrondse levensstijl van de *A. fragilis* is deze me

De hieronder opgenoemde methodes zijn in het verleden gebruikt voor het markeren van slangen, krokodillen en hagedissen, maar ook op de *A. fragilis* zelf. Methodes die alleen zijn gebruikt op de schilden van schilpadden zijn ook niet mee genomen vanwege de afwezigheid van een schild bij de *A. fragilis* (Beausoleil et al., 2004; Mellor et al., 2004; Silvy et al., 2012).

De methodes staan omschreven met resultaten vanuit andere onderzoeken als vergelijkingsmateriaal. Aan het einde van de methode is de boordeling te zien of de methode wordt gezien als mogelijk bruikbaar voor de *A. fragilis*.

3.2.1 Passive integrated transponder (PIT)-tag

PIT-tags zijn kleine transponders die met behulp van een injectienaald worden in gebracht onder de huid van een proefdier (Beausoleil et al., 2004). De transponder is opgebouwd uit elektromagnetische spoel en een speciaal ontworpen chip. De transponder zendt een uniek alfanumeriek analoog-signaal uit wanneer deze wordt geactiveerd door een zogenaamde 'reader' (apparaat gebruikt om het serienummer af te lezen van de PIT-tag) die elektromagnetische energie ontleent (Silvy et al., 2012).

PIT-tags worden gebruikt bij verschillende diersoorten zoals huisdieren zoals katten en honden, maar ook eekhoorns, vissen, slangen hagedissen en reptielen (Beausoleil et al., 2004) De PIT-tags zijn te verkrijgen in verschillende maten, vanaf 32mm naar 7mm met een diameter van 1.5mm tot 1mm (figuur 3) (Northwest Fisheries science Center, z.d.; Le Galliard et al., 2011). De PIT-tags hebben het

voordeel dat ze, wanneer goed geplaatst, gedurende de rest van het leven van het dier blijven (Silvy et al., 2012). Maar Gemanoo & Williams (1993) hebben waargenomen dat dieren de tag kunnen verliezen doordat de huid te strak is en de tag door de huid breekt, of de tag verloren gaat bij het vechten tussen de mannetjes van luipaardleguanen (*Gambelia sila*). In hetzelfde onderzoek zijn er tags in de buikholte ingebracht waarvan bij 7.4% van de tags waarschijnlijk via de ingang naar buiten zijn gedrukt. In het de gehele studie is 4% van alles tags verloren gegaan of werkte later niet meer. Zo genaamde miniatuurtransponders (6mm bij 1 mm) zijn nog kleiner normale PIT-tags en zijn gebruikt door Le Galliard et al. (2011) op levendbarende hagedissen (*Zootoca vivipara*) waarbij de tag is geplaatst in de buikholte.



Figuur 3: Verschillende maten van PIT-tags

Bij kraaghagedissen zijn in de losse huidvlak in het nek gedeelte PIT-tags succesvol gebruikt (Griffiths & Christian, 1996). Keck (1994) heeft succesvol PIT-tags ingebracht bij 7 dagen oude kousbandslangen (*Thamnophis marcianus*). De jongen hadden ongeveer een gewicht van 2,5 gram en waren en zijn tussen de 15cm en 20cm lang (Keck, 1994; z.j.). Deze tags zijn ingebracht op verschillende plaatsten zoals de buikholte en vlak achter de cloaca. Bij 3 van de 12 jongen is schade ontstaan van de injectie zelf, bij de rest zijn geen schade of verdere nadelige effecten bevonden op de groei en bewegingsvrijheid (Keck, 1994). Andere successen bij slangen zijn met ratelslangen (*Jemison et al., 1995*), en waterslangen (*Nerodia sipedon*) (Brown and Weatherhead, 1999).

3.2.2 Vriesmerken

Bij onderzoek naar slangen en alligators is in het verleden gebruik gemaakt van het vriesmerken van de proefdieren (Lewke & Stroud, 1974; Nietfeld, Barret & Silvy, 1994). Bij vriesmerken wordt een metaal voorwerp in stikstof of droogijs met 99% alcohol of in vloeibare stikstof gekoeld (Beausoleil et al., 2004; Mellor et al., 2004; Silvy et al., 2012). De merken worden gekocht of zijn zelf gemaakt door de onderzoekers. De vormen en maten zijn afhankelijk van de persoonlijke keuzen van de onderzoeker en het te markeren dier. Zo wordt een bijvoorbeeld een koper- of ijzerdraad, van gewenste dikte, gebogen naar de gewenste markering, meestal numeriek (figuur 4)



Figuur 4: Merkjes gebruikt bij het aanbrengen van vriesmerken.

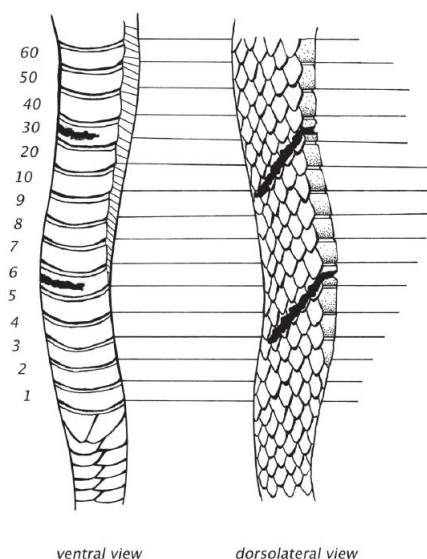
Met stikstof wordt een temperatuur behaald van ongeveer -150 graden Celsius. Het droogijs met alcohol behaalt een temperatuur van ongeveer -115 graden Celsius (L&H Branding Irons, Z.d.). Na dat de merken 20 tot 30 minuten zijn gekoeld wordt een markering in de huid gevrozen. De beste markeringen zijn behaald wanneer het merkje tussen de 20 en 30 seconden op de huid werd gedrukt (Lewke & Stroud, 1974). Als de markering juist is uitgevoerd wordt de epidermis tijdelijk bevroren waardoor de pigment makende huidcellen kapot gaan. Hierdoor blijft de markering wit (bij zoogdieren

groeit op de plek wit haar terug). Wanneer goed uitgevoerd, leidt vriesmerken niet tot infectie. Maar als de huid te lang wordt bevroren ontstaat er korstvorming. De cellen worden dan vernieuwd met werkende melanocyten waardoor de markering moeilijk te onderscheiden valt (Silvy et al., 2012). Een voordeel is dat er, wanneer goed uitgevoerd, geen wond ontstaat en er geen infectiegevaar optreedt (Silvy et al., 2012). Deze methode heeft echter veel nadelen. Lewke en Stroud (1974) hebben de methode getest op Stierslangen (*Pituophis melanoleucus*) en Westerse ratelslangen (*Crotalus oreganus*). Door de markering gingen de dieren 3 weken naar het plaatsten van de markering vervellen (Lewke & Stroud, 1974). Na de vervelling is het zichtbaar of de markering succesvol is geweest (Beausoleil et al., 2004; Silvy et al., 2012).

3.2.3 Brandmerken

Bij brandmerken wordt met behulp van een verhit voorwerp een markering in de huid van een dier gebrand. De materialen die worden gebruikt voor deze methode zijn variërend. Zo is er gebruik gemaakt van verhitte naalden (Weary, 1969), weerstanddraden verhit door gasbranders (Clark, 1971) of via een soldeerbout (Ehmann, 2000).

Met de brandnaald kunnen verschillende markeringen worden gemaakt op het dier (Weary, 1969). Deze naald maakt het mogelijk om zelf de markering te kiezen, met meer nauwkeurigheid (figuur 5)



Figuur 5: Een schematische weergave van de gebruikte markeringen door Winne et al. (2006)

Het litteken dat ontstaat is af te lezen door onderzoekers als een dier opnieuw gevangen wordt (Beausoleil et al., 2004; Mellor et al., 2004). Tijdens het markeren wordt het markeermerkje of apparaat op de schubben geplaatst en daar lang genoeg gehouden om een markering te maken maar niet zo lang dat de onderhuid wordt gepenetreerd (Beausoleil et al., 2004; Winne et al., 2006; Silvy et al., 2012). Benodigde tijd voor het plaatsen van de markering is afhankelijk van de temperatuur van het gebruikte apparaat, maar een indicatie voor het aantal seconden wordt in werken van Beausoleil et al. (2004), Winne et al. (2006) en Silvy et al. (2012) niet gegeven. Een voordeel is dat de wonden, als goed geplaatst, direct zijn dicht geschoeid (Beausoleil et al., 2004; Winne et al., 2006; Silvy et al., 2012).

3.2.4 Tatoeëren

Bij het tatoeëren wordt inkt met behulp van een elektrisch tatoeëerapparaat, roteertang, of een met inkt gevulde injectiespuit de huid in gebracht. Deze methode zorgt voor een markering die meerdere jaren meegaat bij reptielen, en door Woodbury (1956) permanent werd bevonden bij slangen. De soort

en de frequentie waarin het dier vervelt, bepaalt hoe lang de markering zichtbaar blijft (Beausoleil et al., 2004). Er zijn meerdere onderzoeken gedaan met deze methode in het verleden waarbij een tatoeëerapparaat is aangedreven door een accu mee werd genomen naar het onderzoeksgebied (Woodbury, 1956). Verschillende soorten inkt zijn te gebruiken, van 'normale' zwarte inkt naar UV-inkt (Petit et al., 2012).

Een probleem kan zijn dat bij het gebruiken van een elektrische naald de apparatuur moeilijk mee te nemen is (Beausoleil et al., 2004). Dit is te verhelpen door het gebruik van injectienaalden (Woodbury, 1956). Voordelen zijn dat de markering vrijwel geen invloed heeft op het gedrag van de dieren en het lijkt erop dat ze niet sneller worden opgemerkt door roofdieren (Silvy et al., 2012; Petit et al., 2012). Het aanbrengen van tatoeages is succesvol gedaan bij slangen (Woodbury, 1956) en bij hagedissen (Petit et al., 2012).

3.2.5 Schubknippen

Bij schubknippen wordt een aantal schubben verwijderd met behulp van een scherp voorwerp. De methode wordt gebruikt bij verschillende reptielsoorten, zoals slangen en groene leguanen (Rodda et al., 1988; Beausoleil et al., 2004; Mellor et al., 2004). De markeren zorgt voor een permanent litteken dat over de jaren heen vervaagt. Het knippen van de schubben wordt doorgaans gedaan met een scherpe schaar (Beausoleil et al., 2004; Vanek, 2016). Deze methode is succesvol gebruikt op verschillende reptielsoorten waarvan de schubben groot genoeg zijn. Bij kleinere schubben is het moeilijk om een nette markering te maken doordat de schubben te dicht op elkaar liggen (Patterson, 1992; Beausoleil et al., 2004).

3.2.6 Patronenherkenning

Bij deze methode wordt gezocht naar een uniek lichaampatroon om zo het dier te kunnen identificeren (Beausoleil et al., 2004). De patronen zijn diereigen eigenschappen waarbij geen verdere ingreep van de mens vereist is (Lenders, 2000; Beausoleil et al., 2004; Mellor et al., 2004). De methodiek wordt reeds gebruikt bij andere reptielen waarbij wordt gekeken naar verschillende lichaamsdelen met een uniek patroon, zoals op de kopschubben bij adders (Lenders, 2000). Deze patronen worden nagetekend of gefotografeerd en handmatige vergeleken voor identificatie (Riddell, 1996; Beausoleil et al., 2004; Doorn, 2016). Bij de *A. fragilis* is deze methode succesvol toegepast door de patronen op de kop, keel en kaakschubben te fotograferen of na te tekenen (Riddell, 1996; Smith, 1990; Doorn, 2016; Schmidt et al., 2017). Smith (1990) meldt dat de methode werkt over meer dan vijf jaar. Grote voordelen van deze markeringsmethode is dat er niets wordt aangebracht bij het dier (Doorn, 2016). Het nadeel van de methode is dat tijdens vervelling de patronen moeilijk afleesbaar kunnen zijn bij reptielen door het vervagen van de huid (Riddell, 1996; Smith, 1990; Doorn, 2016; Schmidt et al., 2017). Daarnaast is het vergelijken van foto's arbeidsintensief, zeker met een grote dataset (Sacchi et al., 2010).

3.3 Welke ontwikkelingen zijn gedaan in hardware en software die ondersteunend zijn bij het markeren en de identificeren van *A. fragilis*?

In dit hoofdstuk is gezocht naar technologische ontwikkeling die een positieve bijdrage leveren aan markeringsmethodes. Hierbij is te denken aan software, hardware en materialen die ervoor kunnen zorgen dat methodes sneller worden gezet, betrouwbaarder zijn en/of minder stressvol zijn voor het dier.

3.3.1 PIT-tags

De technologische vooruitgang zorgt ervoor dat PIT-tags steeds kleiner kunnen worden en een lagere kans om niet goed te functioneren. Dit heeft als gevolg dat het inbrengen van de tag minder stressvol wordt voor dieren en het implantaat minder impact heeft op de bewegingsvrijheid van het dier, en er een verlaagde kans is op het verliezen van de tag. Le Galliard et al. (2011) heeft succesvol 'miniatur-tags' bij levendbarende hagedissen (*Zootoca vivipara*) ingebracht zonder dat de dieren sterven. Verder is de techniek niet veranderd.

3.3.2 Vriesmerken

De literatuur laat niet veel zien over nieuwe technieken rondom vriesmerken. De zoektocht eindigt bij de boeken van Silvy et al. (2012) en Beausoleil et al. (2004) en Mellor et al. (2004). Alle drie de bronnen verwijzen naar het onderzoek van Lewke & Stroud uit 1976.

De hedendaagse gebruiken van vriesmerken zijn vooral te vinden bij vee, waarbij de dezelfde oude methodes zijn gebruikt.

3.3.3 Brandmerken

In het verleden zijn dieren gebrandmerkt door een merk te verhitten met behulp van een kolenpit of een brander. Vandaag de dag is medische apparatuur te verkrijgen in klein formaat. Winne et al. (2006) maakt gebruik van medische apparatuur om de brandmerkjes te maken. Het apparaat is ongeveer van even groot als een pen (figuur 6) en is makkelijk mee te nemen in het veld. Aan het einde van het apparaat zijn twee hitte geleidende draden die gebruikt kunnen worden voor het maken van een brandmerk.



Figuur 6: Het aanbrengen van brandmerkjes door Winne et al. (2006) met behulp van medische apparatuur

3.3.4 Tatoeëren

De vooruitgang in het tatoeëren is te vinden in de speciaal voor dieren ontwikkelde apparatuur. Er zijn machines te vinden die zijn ontwikkeld om muizen, ratten, maar ook reptielen te tatoeëren (AIMS-website, z.d.). De naalden worden ontwikkeld om zo min mogelijk pijn en stress te geven aan het dier.

3.3.5 Schubknippen

Voor het schubknippen zijn geen innovaties gevonden. De methodiek is over de jaren heen niet veranderd en wordt doorgaans gebruik gemaakt van scherpe schaartjes voor het uitvoeren van de methodes (Vanek, 2016).



Figuur 7: Te zien is het schubknippen bij een haakneusslang (*Heterodon platirhinos*). De ventrale schubben worden hier geknipt (Vanek, 2016)

3.3.6 Patroonherkenning

Voor het vast leggen van schubpatronen zijn een aantal dingen die kunnen helpen. Scherpe foto's van de patronen zorgen voor een betere vergelijking (Doorn, 2016). Camera's zijn van groot belang bij patroonherkenning. Het is van belang dat het geheel van een patroon duidelijk en helder in beeld wordt gebracht. Het was reeds al mogelijk om een goede camera mee te nemen het veld in voor scherpe macrofoto's. Nu de technologie vooruit gaat krijgen mobiele toestellen camera's die tot op 4k resolutie foto's kunnen maken. Doordat de camera op de mobiel dermate vooruit gaat worden deze toestellen bruikbaar voor veldonderzoek. Ze zijn makkelijk mee te nemen en maken scherpe foto's.

Naast de ontwikkelingen in camera's is er nu software te vinden die patronen herkent. Interactive individual identification system (IIS) is een computerprogramma dat patronen zoekt op foto's en vergelijkt en zoek gaat naar de grootste overeenkomst tussen de foto's. Sacchi et al. (2010) heeft het programma getest op *Podarcis muralis* (muurhagedis) en *Lacerta bilineata* (Westelijke smaragdhagedis) in een dataset met 1047 foto's. Op alle foto's moeten per foto een gebied worden gemarkeerd om te vergelijken met andere foto's. Eenmaal aangegeven wat moet worden vergeleken, gaat het programma op zoek naar overeenkomsten in de patronen. Vervolgens wordt een top 50 foto's gemaakt, met op de eerste plaats de grootste overeenkomst en op plaats 50 de minst grootte overeenkomst. Een top 5 wordt weergegeven met foto's die de grootste overeenkomst hebben volgens het programma. Het is dan aan de onderzoeker om te bevestigen of op de foto hetzelfde individu wordt weer gegeven. In het onderzoek van Sacchi et al. (2010) is er een slagingsratio gemeten van 98% waarbij de juiste foto op de eerste plaats is weergegeven. Daarnaast is bij 96% de juiste foto gevonden in de top 5 (Sacchi et al., 2010).

3.4 Hoe scoren de bruikbare methodes op de criteria?

In dit hoofdstuk worden de methodes beoordeeld. Dit is gedaan aan de hand van de gevonden literatuur. Als basis van de beoordelingen is de beoordeling van Beausoleil et al. (2004) gebruikt (bijlage I) en vervolgens aangepast met door de bevindingen in de gevonden literatuur over de methodes en de *A. fragilis*.

3.4.1 Passive integrated transponder (PIT)-tag

Snelheid uitvoeren handelingen

Score: 3

De injectienaald prikt door de huid heen en de PIT-tags wordt geïnjecteerd. De applicatie is te volbrengen in een paar seconden, maar wordt de tag ingebracht in de buikholte kan de handeling langer duren (Beausoleil et al., 2004; Le Galliard et al., 2011).

Complexiteit aanbrengen markering

Score: 2

Het inbrengen van een PIT-tag is beoordeeld tot moeilijk (Beausoleil et al., 2004). Dit komt door de mogelijk schade die de onderzoeker aanbrengt bij het inbrengen van de naald. Wanneer de tag niet juist wordt toegepast kan het dier enige tijd na inbrengen overlijden waarbij het soms niet duidelijk is waarom (Beausoleil et al., 2004). Het inbrengen van de tag onderhuids heeft minder risico dan het inbrengen in de buikholte, echter kan bij beide methodes veel schade ontstaan (Beausoleil et al., 2004; La Galliard et al., 2011)

Kosten

Score: 2

Een PIT-tag kost tussen de €1,50 en €2,50 per tag bij aankoop van grote aantallen (Beausoleil et al., 2004; Winne et al., 2006).

Korte-termijn stres

Score: 2

Voor het inbrengen van een PIT-tag moet het dier in bedwang worden gehouden als de naald wordt ingebracht. Dit heeft te maken met de pijn reactie van het dier. Hanteren/bedwingen, pijn en infectierisico (Beausoleil et al., 2004).

Invloed van onderzoeker

Score: 1

Afhankelijk van de locatie waar de tag wordt gezet zal het dier meer of minder pijn ervaren. Wanneer de PIT-tag in de buikholte wordt geplaatst is de invloed van de onderzoeker erg groot (Beausoleil et al., 2004).

Herkenbaarheid

Score: 5

De PIT-tag wordt onderhuids ingebracht, dicht zorgt ervoor dat de merk niet zichtbaar is. Maar de tags zijn wel goed af te lezen via de reader, een daarmee goed betrouwbaar (Beausoleil et al., 2004; Mellor et al., 2004; Silvy et al., 2012).

3.4.2 Brandmerken

Snelheid uitvoeren handelingen

Score: 4

Doordat de merkjes met een hoge temperatuur worden aangebracht gaat het markeren erg snel. Hitchmough et al. (2012) plaatste de markering in minder dan een seconden. Deze tijd kan variëren wat komt door verschillende temperaturen van de bruikbare apparaten voor het aanbrengen van de brandmerkjes (Ferreiro & Galán, 2004; Beausoleil et al., 2004; Winne et al., 2006). Er worden doorgaans meerdere merkjes aangebracht waardoor de methode wat langer kan duren (Winne et al., 2006; Hitchmough et al., 2012)

Complexiteit aanbrengen markering

Score: 4

De temperatuur van het gebruikte apparaat bepaald de complexiteit van de methode, lagere temperaturen (373 graden Celsius) maken de methode controleerbaarder maar gaat minder snel (Beausoleil et al., 2004; Winne et al., 2006).

Kosten

Score:4

De materialen die bruikbaar zijn voor deze methode zijn te verkrijgen voor ongeveer \$25,- (Winne et al., 2006) Het aantal dieren dat ermee kan worden gemarkeerd neemt het op tegen de kosten van PIT-tags volgens Winne et al. (2006). De apparatuur is ook zelf te maken, zo heeft Hitchmough et al. (2012) bij een Mag™ zaklamp de lamp verwisseld door een nichroomweerstandsdraad om de markering te plaatsten.

Korte-termijn stress

Score: 3

De dieren moeten in bedwang worden gehouden om de markering goed te plaatsten. De markering doet pijn en zal het dieren laten reageren (Beausoleil et al., 2004). De snelheid waarmee de markering wordt geplaatst maakt het minder stressvol (Winne et al., 2006).

Invloed van onderzoeker

Score: 2

Het dier moet in bedwang worden gehouden tijdens het aanbrengen van de pijnlijke markering die meerdere keren wordt herhaald (Beausoleil et al., 2004; Winne et al., 2006; Hitchmough et al., 2012). Wanneer goed uitgevoerd is de verwonding minimaal (Winne et al., 2006)

Herkenbaarheid

Score: 4

De merkjes zullen over de jaren heen vervagen, maar niet zodanig dat de dieren niet meer te identificeren zijn (Beausoleil et al., 2004; Mellor et al., 2004; Winne et al., 2006).

3.4.3 Vriesmerken

Applicatie snelheid

Score: 1

De merkjes moeten 20 tot 30 minuten worden gekoeld, vervolgens 20 tot 30 seconden uit de huid worden gedrukt (Beausoleil et al., 2004).

Complexiteit applicatie

Score: 3

Het aanbrengen van het vriesmerk wordt lastig gemaakt door de tijd nodig om het merkje goed te zetten (Patterson, 1992). Vriesmerken is pijnlijk en het dier reageert hierop door te spartellen (Lewke & Stroud, 1974)

Kosten

Score: 3

Afhankelijk van de middelen gebruikt (Beausoleil et al., 2004).

Korte-termijn stress

Score: 3

Het hanteren en de langer durende pijn, maar er ontstaat geen wond (Lewke & Stroud, 1974; Beausoleil et al., 2004)

Invloed van onderzoeker

Score: 1

Het dier moet gedurende 20 tot 30 seconden stil worden gehouden om de markering goed te plaatsten, daarnaast is het dier lang in gevangenschap door de lange preparatie tijd (Beausoleil et al., 2004)

Herkenbaarheid

Score: 4

Afhankelijk van de locatie en de pigment kleur van het dier (Beausoleil et al., 2004). Bij donkere dieren is het goed afleesbaar (Lewke & Stroud, 1974).

3.4.4 Tatoeëren

Snelheid uitvoeren handelingen

Score: 3

Afhankelijk van de methode die wordt toegepast, en de materialen, zal het aanbrengen langer of korter duren (Beausoleil et al., 2004). Bij het gebruik van een tatoeëermachine zal de preparatie tijd langer zijn (Beausoleil et al., 2004)

Complexiteit aanbrengen markering

Score: 2

De naald moet op de juiste manier worden afgesteld/ingebracht zodat deze niet te diep en niet te ondiep wordt ingebracht. Er zijn trainingen te volgen voordat men deze methode probeert (AIMS-website, z.d.).

Met het gebruik van een injectienaald moet men meerdere plekken injecteren met daarmee meerdere plekken die schade kunnen toe dienen (Beausoleil et al., 2004).

Kosten

Score: 3

Bij het gebruik van een elektrische naald lopen de kosten hoog op, tot voorbij de \$2000,- voor apparatuur geschikt voor proefdieren (AIMS-website, z.d.). Echter wanneer er wordt gekozen voor injectienaald of een roteertang blijven de kosten laag (Beausoleil et al., 2004).

Korte-termijn stress

Score: 2

Het hanteren en de pijnlijke toepassing van de markering geven veel stress (Beausoleil et al., 2004). De naalden worden herhaalt geïnjecteerd bij het tatoeëren (Woodbury, 1956; Beausoleil et al., 2004)

Invloed van onderzoeker

Score: 2

De locatie van de tatoeage, het hanteren, de ervaring van de onderzoeker, en de diepte van de naald hebben invloed van de onderzoeker op het dier waardoor in de invloed groot wordt (Beausoleil et al., 2004).

Herkenbaarheid

Score: 3

Hoe herkenbaar de tatoeage wordt is afhankelijk van de kleur inkt en de pigmentatie van het dier (Beausoleil et al., 2004). Het gebruik van zwarte inkt op een donkere huid maakt de markering moeilijk afleesbaar (Patterson, 1996). De UV-inkt gebruikt door Petit et al. (2012) kan hier de oplossing voor zijn.

3.4.5 Schubknippen

Applicatie snelheid

Score: 4

De handeling kan snel worden uitgevoerd met behulp van scherp materiaal (Beausoleil et al., 2004).

Complexiteit applicatie

Score: 2

Doordat de schubben klein zijn is de applicatie moeilijk te volbrengen (Patterson, 1992) .

Kosten

Score: 4

Kosten zijn gebaseerd op het gebruik van nagelschaartjes bij de schubknippen (Rodda, 1988) of andere scherpe scharen (Beausoleil et al., 2004).

Korte-termijn stress

Score: 2

De dieren moeten in bedwang worden gehouden terwijl er meerdere schubben worden verwijderd (Patterson, 1992; Beausoleil et al., 2004; Silvy et al., 2012).

Invloed van onderzoeker

Score: 2

Het dier moet goed in bedwang worden gehouden voor deze methode (Beausoleil et al., 2004).

Herkenbaarheid

Score: 2

Afhankelijk van de methode en locatie op het lichaam en grootte en hoeveelheid van de verwijderde schubben (Beausoleil et al., 2004).

3.4.6 Patroonherkenning

Snelheid uitvoeren handelingen

Score: 4

De snelheid waarmee een de juiste foto is gemaakt is afhankelijk van de onderzoeker en de te fotograferen patronen (Beausoleil et al., 2004). Doordat dieren goed zijn te hanteren voor foto's kunnen deze snel worden gemaakt (Doorn, 2016).

Complexiteit aanbrengen markering

Score: 4

De patronen dienen goed scherp op beeld te staan (Doorn, 2016)

Kosten

Score: 3

Afhankelijk van de gebruikte materialen (Beausoleil et al., 2004).

Korte-termijn stress

Score: 4

Afhankelijk van hoe het dier moet worden gehanteerd, maar de dieren zijn goed te hanteren (Beausoleil et al., 2004; Doorn, 2016).

Invloed van onderzoeker

Score: 3

Het hanteren van het dier, maar afhankelijk van de te fotograferen patronen (Beausoleil et al., 2004).

Herkenbaarheid

Score: 5

Afhankelijk van de lichaamsspatronen en de locatie van de patronen (Beausoleil et al., 2004). De patronen zijn gemakkelijk te vinden en te onderscheiden bij de verschillende individuen (Smith, 1990)

4 Discussie

Dit hoofdstuk worden de bevindingen uit de resultaten besproken en kritisch benaderd. Per deelvraag worden resultaten besproken. Aan het einde van het hoofdstuk wordt de hoofdvraag “Welke markeringsmethodes zijn gedurende meerjarig onderzoek geschikt bij Vangen-Merken-Terugvangen-onderzoek naar de *A. fragilis* en voldoen het meest aan de opgestelde criteria voor de ideale markering?” beantwoord.

4.1 Evaluatie onderzoeksmethode

Dit onderzoek is gedaan op basis van een literatuurstudie. Een probleem waar tegen aan wordt gelopen er doorgaans geen studies worden gedaan naar methodes voor het aanbrengen van markeringen.

De beoordelingscriteria in dit onderzoek zijn gebaseerd op de beoordelingscriteria opgesteld door Beausoleil et al. (20014) en Mellor et al. (2004). Echter zijn er meerdere beoordelingscriteria te bedenken, zoals welzijn van het dier, betrouwbaarheid en duurzaamheid van de markering. Het is moeilijk om dit uit literatuur te halen. Markeringsmethoden die zijn aangeduid als permanent geven geen garantie permanent te zijn (Beausoleil et al., 2004; Mellor et al., 2004). De betrouwbaarheid moet worden getest per diersoort en kan alleen worden getest door de markering uit te voeren en het dier, op een later tijdstip, opnieuw te vangen (Beausoleil et al., 2004; Mellor et al., 2004; Silvy et al., 2012).

Studies naar de effecten op het welzijn van de wilde proefdieren door de markeringsmethodes zijn schaars. Baker & Johanos (2002) geven hier voor een aantal redenen:

- Het is moeilijk de sub-lethale effecten te vast te stellen.
- Logistieke en financiële beperkingen.
- Het ontbreken van toepasselijke controlegroepen van dieren.
- Het is niet mogelijk/moeilijk om de controlegroepen te monitoren/lokalisieren door het ontbreken van een markering.

Naast de boven genoemde gebreken in de literatuur is er geen duidelijke informatie te vinden over de kosten die zijn gemaakt tijdens het de onderzoeken, en de aanschaf kosten van de methodiek. Voor de beoordelingscriteria ‘Kosten’ zal een markt onderzoek moeten worden gedaan om uit te sluiten of een methode daad werkelijk duur of goedkoop is. Deze gebreken over missende literatuur gelden eveneens voor de resterende beoordelingscriteria.

Door het gebrek aan literatuur rondom het welzijn van de *A. fragilis* na het toepassen van verschillende methodes kan de welzijn van het dier niet worden mee genomen in de beoordeling. De effecten van de markeringsmethode zullen door de onderzoeker zelfstandig moeten worden beoordeeld.

De methodes gevonden zijn vooral omschreven in andere literatuur. Er is een kans dat methodes niet zijn mee genomen doordat er niet in andere talen is gezocht naast Engels, Duits en Nederlands. Daarnaast zijn er andere methodes die niet worden omschreven doordat ze, naar eigen inzicht, niet mogelijk zijn op de *A. fragilis*. Het is mogelijk dat er nieuwe methodes zijn ontwikkeld maar niet gevonden, veel methodes zijn gehaald uit literatuur voor 2012. De methodes die bruikbaar kunnen zijn op de *A. fragilis* moeten worden getest op het dier zelf, en er moet een methodiek worden ontwikkeld waar op het lichaam de markering wordt aangebracht.

De innovaties die worden gedaan rondom markeringstechnieken en methodes zijn te vinden bij de verkopers en bij de onderzoekers. De innovaties kunnen worden gemist doordat er specifieke namen

voor een bepaald apparaat, zoals de miniatuur-tag (Le Galliard et al., 2011). Niet voor alle methodes zijn er ontwikkelingen gedaan.

4.2 Discussie resultaten

De onderstaande tabel laat een overzicht zien met scores die zijn toegekend aan de markeringsmethodes.

Tabel 2: Overzicht scores van de verschillende methodes

Methode	Applicatie snelheid	Complexiteit applicatie	Kosten	Korte termijn stres	Invloed van onderzoeker	Herkenbaarheid	Eindscore
Lichaamspatronen	4	4	3	4	3	5	23
Brandmerken	4	4	4	3	2	4	21
Schubknippen	4	2	4	2	2	2	16
PIT-tag	3	2	2	2	1	5	15
Vriesmerken	1	3	3	3	1	4	15
Tatoeëren	3	2	3	2	2	3	15

Uit de resultaten komt naar voren dat patroonherkenning de meest ideale manier is om de *A. fragilis* te identificeren. Een nadeel van het gebruiken van foto's van patroonherkenning is dat de onderzoeker bij een grote dataset veel foto's moet vergelijken (Doorn, 2016). Dit kan I3S programma verhelpen door de foto's te vergelijken en aan te geven om welk individu het gaat (Sacchi et al., 2011). Wat het identificeren van lichaamspatronen misschien minder aantrekkelijk maakt, is dat de onderzoeken niet direct kan zien of het individu al bekend is of niet. Daarvoor zal de onderzoeker handmatig foto's moeten vergelijken in het veld, of een laptop met I3S het veld in meenemen. Verder kan worden gediscussieerd dat patroonherkenning niet kan worden bevestigd als werkende methode doordat er geen onderzoek is gedaan waarbij twee verschillende markeringsmethodes zijn gecombineerd. Dit wil zeggen dat er niet is gecontroleerd of er individuen zijn met dezelfde lichaamspatronen (Beausoleil et al., 2004; Silvy et al., 2012).

Als twee na meest ideale markering staan de brandmerkjes. De markeringen zijn snel aan te brengen en goed te herkennen (Winne et al., 2006). Brandmerkjes lijken over de jaren te vervagen, maar de individuen blijven ondanks dat herkenbaar (Ferreiro & Galán, 2004). De methode is vaker gebruikt op slangen dan op hagedissen (Beausoleil et al., 2004; Silvy et al., 2012).

Op de derde plaats staat schubknippen. Doordat bij het verwijderen van huidweefsel een open wond achterlaat, is er een groot risico op infectie. Om deze reden is geadviseerd om naar alternatieve markeringsmethodes te kijken en niet geschikt beoogd voor de *A. fragilis* (Silvy et al., 2012). Daarnaast meldt Patterson (1992) dat deze methode niet geschikt op de *O. grande* vanwege zijn kleine schubben. De schubben komen overeen met de schubben van de *A. fragilis* (figuur 8). Gezien het negatief advies door Silvy et al. (2012) en Patterson (1992) wordt deze methode afgeraden om te gebruiken op de *A. fragilis*.

Op de vierde plaats komt de PIT-tag methode. Een ander voordeel wat niet in de criteria naar voren komt is dat de dieren een code mee krijgen waardoor ze makkelijker in het bestand te vinden zijn. Daarnaast is gelijk te zien, mits de tag niet wordt verloren, of het gaat om een nieuw individu. Met veel

voordelen heeft de PIT-tags meer risico voor infectie en verlies van tag (Keck, 1994; Beausoleil et al., 2004). Daarnaast moest er rekening worden gehouden dat de tags kunnen worden verloren (Germanoo & Williams, 1993). Er wordt daarom ook geadviseerd om onderzoek te doen in het lab voordat het in het veld wordt toegepast (Le Galliard et al., 2011).

In de literatuur is te zien dat voornamelijk succes is behaald met het toedienen van de PIT-tags bij slangen en grotere hagedissen met 'losse huid'. Volgens Patterson (1996) moeten PIT-tags niet worden toegepast op kleine reptielen, zoals de Nieuw-Zeelandse skink (*Oligosoma grande*). Dit reptiel heeft een kop-staart lichaamslengte van ongeveer 25 centimeter (Grand and Otago skinks, z.d.) die overeenkomt met de totale lichaamslengte van 30cm van de *A. fragilis* (Van Delft et al., 2012). Naast de lichaamslengte hebben de dieren een overeenkomende huid (figuur 8). Echter lijkt de methode reeds te zijn veranderd en er nieuwe technieken mogelijk zijn voor kleine tags (Le Galliard et al., 2011). Er moet worden gezocht naar de locatie bij de *A. fragilis* waar de tags moeten worden geplaatst. Le Galliard *et al.* (2011) melden dat meer onderzoek nodig is voordat deze methode wordt toegepast op veldonderzoek.



Figuur 8: Links *O. grande*, en rechts *A. fragilis*. Op de foto's zijn duidelijk de gladde huid te zien van de twee reptielsoorten

Op de vijfde plaats staat vriesmerken. Patterson (1992) meldt dat doordat het niet mogelijk is om direct na plaatsen is te controleren of de markering succesvol is geplaatst, de apparatuur onpraktisch en duur is de methode minder geschikt voor het markeren van reptielen. Daarnaast is er weinig literatuur te vinden op de methode (Beausoleil et al., 2004). Er wordt alleen verwezen naar het onderzoek van Lewke & Stroud (1974) (Beausoleil et al., 2004; Silvy et al., 2014). Dit doet vermoeden dat de methode reeds achterhaald is en er dus betere alternatieven te vinden zijn. Daarmee krijgt het vriesmerken een negatieve beoordeling en niet aangeraden voor de *A. fragilis*.

Als laatste komt tatoeëren. Afhankelijk van de methode die er wordt gebruikt kan de score worden aangepast. Woodbury (1951) maakte cijfer combinaties op ratelslangen. De methodiek gebruikt door Petit et al. (2012) is jammer genoeg niet te vinden doordat er geen toegang is verkregen tot het volledige artikel. Patterson (1992) vindt de methode niet toepasbaar op de *O. grande* (Skink) door de donkere kleur van het dier. De UV-inkt gebruikt door Petit et al. (2012) zal dit probleem voor de *A. fragilis* verhelpen. De methode biedt mogelijkheden voor de *A. fragilis*. Maar door de lage score wordt de methode niet geadviseerd om uit te voeren op de *A. fragilis*.

Ondanks de kritiek op de methodiek op het onderzoek worden de bevindingen in de scores ondersteund door de literatuur. Het gebruiken van patroonherkenning is de meest voorkomende manier voor identificatie in de onderzoeken naar de *A. fragilis* (Smith, 1990, Riddell, 1996; Plantenberg, 1999; Doorn, 2016; Schmidt, 2017). Voor brandmerkjes methode geldt dat er één onderzoek is gevonden waarbij deze methodiek is gebruikt op de *A. fragilis* (Ferreiro & Galán, 2004) Voor de andere methodes geldt dat niet.

De bevindingen in dit onderzoek kunnen ook worden gebruikt als gids voor andere reptielsoorten met overkomende eigenschappen van de *A. fragilis*. De methodes dienen echter ten alle tijden te worden getest voordat ze worden gebruikt in een onderzoek.

De bevindingen volgens de hypothese dat de reeds gebruikte methodes naar voren komen als meest ideale markeringsmethode voor de *A. fragilis*.

5 Conclusie & aanbeveling

Aan het begin van het onderzoek is de hoofdvraag gesteld: Welke markeringsmethodes zijn gedurende meerjarig onderzoek geschikt bij Vangen-Merken-Terugvangen-onderzoek naar de *A. fragilis* en voldoen het meest aan de opgestelde criteria voor de ideale markering?

Om de hoofdvraag te beantwoorden zijn de volgende deelvragen opgesteld:

- Wat zijn de criteria waarop de methodes worden beoordeeld?
- Welke markeringsmethodes zijn bekend bij andere reptielen die van toepassing kunnen zijn op *A. fragilis*?
- Welke ontwikkelingen zijn gedaan in hardware en software die ondersteunend zijn bij het markeren en de identificeren van *A. fragilis*?
- Hoe scoren de bruikbare methodes op de criteria?

5.1 Antwoord op de deelvragen

De criteria waarop de methodes worden beoordeeld zijn Beausoleil et al. (2004) en Mellor et al. (2004) hebben de volgende beoordelingscriteria gebruikt:

- Snelheid uitvoeren handeling(en)
- Complexiteit aanbrengen markering
- Kosten
- Korte-termijn stress
- Invloed van onderzoeker
- Herkenbaarheid van de markering

De methode die, na de discussie, overblijven om toepasbaar te kunnen zijn voor identificatie voor de *A. fragilis* zijn patroonherkenning, brandmerkjes en PIT-tags. Bij PIT-tags moet meer onderzoek worden gedaan voordat ze in gebruik worden genomen.

De ontwikkelingen die zijn te vinden die ondersteunend zijn markeren en het identificeren van de *A. fragilis* zijn I3S en de hedendaagse camera's. Daarnaast zijn er nieuwe apparaten te vinden die ondersteunend zijn bij het zetten van brandmerkjes via het gebruik van medische apparatuur. Verder worden de PIT-tags steeds kleiner en bieden mogelijkheden, echter dienen deze verder te worden bekeken.

Patroonherkenning scoort het hoogst, gevolgd door brandmerkjes methode. PIT-tags komt op de vierde plaatst, maar bied mogelijkheden.

5.2 Antwoord op de hoofdvraag

Het antwoord op de hoofdvraag "Welke markeringsmethodes zijn gedurende meerjarig onderzoek geschikt bij Vangen-Merken-Terugvangen-onderzoek naar de *A. fragilis* en voldoen het meest aan de opgestelde criteria voor de ideale markering?" is patroonherkenning. Er is een duidelijk voorkeur te vinden in het gebruik van lichaamsspatronen. Smith (1990) had al vroeg aangegeven dat de methode over meer dan vijf jaren te gebruiken is. Merendeel van de onderzoeken naar de *A. fragilis* maakt dan ook gebruik van deze methodiek (Smith, 1990; Riddell, 1996; Platenberg & Griffiths, 1999; Silvy et al., 2012; Haley, 2014; Doorn, 2016; Schmidt, 2017). Stumpel (1985) en Ferreira & Galán (2004) zijn de twee gevonden onderzoeken naar de *A. fragilis* waarbij gebruik is gemaakt van brandmerkjes in plaatst van de patronen op de kop van het dier, waarbij Ferreira & Galán (2004) gebruik maakten van de methode opgesteld door Stumpel (1985).

Doordat de huid niet wordt gebroken is er geen kans van infectie en sterfte bij patroonherkenning. Daarnaast is de methode goedkoop doordat er foto's worden gebruikt. Het handmatig vergelijken van de foto's is arbeidsintensief, zeker bij een grote dataset. Maar I3S kan dit probleem verhelpen als het werkt op de *A. fragilis* (Sacchi et al., 2010).

Door de bovengenoemde reden wordt aanbevolen om patroonherkenning te gebruiken voor het individueel identificeren van de *A. fragilis* met het gebruik van I3S als ondersteuning. Voordat I3S in de praktijk wordt gebruikt dient een methode te worden ontwikkeld hoe te foto's worden gemaakt en verwerkt.

Literatuur

- Agasyan, A., Avci, A., Tuniyev, B., Isailovic, J. C., Lymberakis, P., Andrén, C., Cogalniceanu, D., Wilkinson, J., & Ananjeva, N. (2009). *Anguis fragilis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2009: e.T157249A5060016. <http://www.iucnredlist.org/details/157249/1> Geraadpleegd op 25-03-2018
- AIMS™ - Identification Solutions for Scientists Worldwide (z.d.) <https://animalid.com/> Geraadpleegd op 25-03-2018
- Beausoleil, N. J., Mellor, D. J., & Stafford, K. J. (2004). *Methods for marking New Zealand wildlife: amphibians, reptiles and marine mammals*. Department of Conservation.
- Brekelmans, F., Engels, B., Brandjes, J. (2016). Voor altijd groen: Veldgids wilde planten en dieren in de Gemeente Zeist (Veldgids) Zeist: Gemeente Zeist
- Bruinderink, G. G., Dekker, J., & Cornelissen, P. (2013). Uit de wetenschap: Hoe tel je wilde hoefdieren?. *Vakblad Natuur Bos Landschap*, 10(3), 14-16.
- Biological Questions, z.j., Northwest Fisheries Science Center, geraadpleegd op 06-03-2018, <https://www.nwfsc.noaa.gov/research/divisions/fe/instream/cb-biological-questions.cfm>
- Cabanac, A., & Cabanac, M. (2000). Heart rate response to gentle handling of frog and lizard. *Behavioural Processes*, 52(2), 89-95.
- CLARK, D. R., JR. 1971. Branding as a marking technique for amphibians and reptiles. *Copeia* 1971:148–151.
- Doorn, L. (2016). Photo-ID: Een nieuwe monitoringsmethode voor de Hazelworm. *Natuur.focus*, 15(4), 188-189.
- EHMANN, H. 2000. Microbranding: a low impact permanent marking technique for small reptiles and frogs as an alternative to toe clipping. *ANZCCART News* 13:6–7.
- Ferner, J.W. (1979). A review of marking techniques for amphibians and reptiles. *Herpetological Circular* 9: 1–42.
- Ferreiro, R., & Galán, P. (2004). Reproductive ecology of the slow worm (*Anguis fragilis*) in the northwest Iberian Peninsula. *Animal Biology*, 54(4), 353-371.
- Germano, D.J.; Williams, D.F. 1993: Field evaluation of using Passive Integrated Transponder (PIT) tags to permanently mark lizards. *Herpetological Review* 24: 54–56.
- Department of conservation (z.d.) Grand and Otago skinks <http://www.doc.govt.nz/nature/native-animals/reptiles-and-frogs/lizards/skinks/grand-and-otago-skinks/> Geraadpleegd op 30-03-2018
- GREVEN, H., HEILIGTAG, S., & STEVENS, M. (2006). Die Blindschleiche (*Anguis fragilis*) im FFH-Gebiet »Knechtstedenener Wald «(Niederrheinische Bucht). *Zeitschrift für Feldherpetologie*, 13, 1-14.
- Goverse, E., Janssen I., Kranenbarg, J., & Richard Struijk, R., Jelger Herder, J., Tamira Hankman, T., Kris Joosten, K. (2010). Schubben & Slijm: Nieuwsbrief. (No. 4) RAVON
- Grand and Otago Skinks (z.d.), <http://www.doc.govt.nz/nature/native-animals/reptiles-and-frogs/lizards/skinks/grand-and-otago-skinks/> Geraadpleegd op 01-04-2018

- Gvoždík, V., Benkovský, N., Crottini, A., Bellati, A., Moravec, J., Romano, A., & Jandzik, D. (2013). An ancient lineage of slow worms, genus *Anguis* (Squamata: Anguidae), survived in the Italian Peninsula. *Molecular phylogenetics and evolution*, 69(3), 1077-1092.
- Hitchmough, R., Neilson, K., Goddard, K., Goold, M., Gartrell, B., Cockburn, S., & Ling, N. (2012). Assessment of microbranding as an alternative marking technique for long-term identification of New Zealand lizards. *New Zealand Journal of Ecology*, 151-156.
- Haley, T. (2014). A metapopulation of the lizard *Anguis fragilis* (Squamata: Anguidae) on a local scale in Dorset, Great Britain, as indicated by spatial distribution and movement. *Phyllomedusa: Journal of Herpetology*, 13(2), 91-98.
- Keck, M. B. (1994). Test for detrimental effects of PIT tags in neonatal snakes. *Copeia*, 1994(1), 226-228.
- La Haye, M., & Müskens, G. (2016). Monitoring van de eikelmuis in het Savelsbos in 2016. Rapport 2016.29. Zoogdiervereniging, Nijmegen.
- Le Galliard, J. F., Paquet, M., Pantelic, Z., & Perret, S. (2011). Effects of miniature transponders on physiological stress, locomotor activity, growth and survival in small lizards. *Amphibia-Reptilia*, 32(2), 177-183.
- Lenders, T. (2000). Patronen van kopschilden als individuele herkenning bij de adder. Merkmethode bij de herpetofauna. *RAVON*, 3(1), 13-18.
- Linne, C. von, (1758). *Systema natura per regna tria natura, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Tomus I. Editio decima, reformata. Laurentii Salvii, Holmia. Lipsia,: Sumptibus Guilielmi Engelmann,.
- Lewke, R.R. & Stroud, R.K. (1974). Freeze branding as a method of marking snakes. *Copeia* 1974: 997–1000.
- L&H Branding Irons (z.d.) Instructions. <http://lhbrandingirons.com/content/L-H%20Freeze%20Instructions.pdf> Geraadpleegd op 22-02-2018
- Meek R. (2005). Null models and the thermal biology of the Anguid Lizard *Anguis fragilis*; evidence for thermoregulation? *Amphibia-Reptilia* 26: 445-450.
- Mellor, D. J., Beausoleil, N. J., & Stafford, K. J. (2004). *Marking amphibians, reptiles and marine mammals: animal welfare, practicalities and public perceptions in New Zealand*. Wellington: Department of Conservation.
- Nietfeld, M.T.; Barrett, M.W.; Silvy, N. (1994). Wildlife marking techniques. Pp. 140–168 in Bookhout, T.A. (Ed.): *Research and management techniques for wildlife and habitats*. The Wildlife Society, Bethesda, Maryland.
- Nichols, J. D. (1992). Capture-recapture models. *BioScience*, 42(2), 94-102.
- Patterson, J.W. (1990). Field body temperatures of the lizard *Anguis fragilis*. *Amphibia-Reptilia* 11: 295-299.
- Patterson, G.B. (1992). Development of Otago skink and grand skink population census and

monitoring techniques. *Science and Research Internal Report 133*. Department of Conservation, Wellington, New Zealand.

Petit, S., Waudby, H. P., Walker, A. T., Zanker, R., & Rau, G. (2012). A non-mutilating method for marking small wild mammals and reptiles. *Australian Journal of Zoology*, 60(1), 64-71.

Platenberg, R. J., & Griffiths, R. A. (1999). Translocation of slow-worms (*Anguis fragilis*) as a mitigation strategy: a case study from south-east England. *Biological Conservation*, 90(2), 125-132.

Populatiegrootte: hoe kom je die te weten? (2003-30-03), <https://dier-en-natuur.infonu.nl/biologie/112981-populatiegrootte-hoe-kom-je-die-te-weten.html> Geraadpleegd op 08-03-2018.

Reading, C.J., 1997. A proposed standard method for surveying reptiles on dry lowland heath. *Journal of Applied Ecology*, 34 (4), 1057–1069.

Reaser, J. (1995). Marking amphibians by toe-clipping: a response to Halliday. *Froglog*. Newsletter of the World Conservation Union (IUCN), Species Survival Commission (SSC) Declining Amphibian Populations Task Force (DAPTF) 12.

Riddell, A. (1996). Monitoring slow-worms and common lizards, with special reference to refugia materials, refugia occupancy and individual identification. *English Nature Science*, 27: 46-60

Rodda, G.H.; Bock, B.C.; Burghardt, G.M.; Rand, A.S. 1988: Techniques for identifying individual lizards at a distance reveal influences of handling. *Copeia* 1988: 905–913.

Sacchi, R., Scali, S., Pellitteri-Rosa, D., Pupin, F., Gentili, A., Tettamanti, S., & Fasola, M. (2010). Photographic identification in reptiles: a matter of scales. *Amphibia-Reptilia*, 31(4), 489-502

Silvy, N.J., Lopez, R.R., Peterson, M.J., 2012. Techniques for marking wildlife. In: Silvy, N.J. (Ed.), *The Wildlife Techniques Manual Research*, seventh ed. The Johns Hopkins University Press, Maryland, pp. 230e257.

Speybroeck, J., Beukema, W., Bok, B., and Van Der Voort, J. (2016). *Field Guide to the Amphibians and Reptiles of Britain and Europe*. British Wildlife Field Guides.

Schmidt, B. R., Meier, A., Sutherland, C., & Royle, J. A. (2017). Spatial capture–recapture analysis of artificial cover board survey data reveals small scale spatial variation in slow-worm *Anguis fragilis* density. *Royal Society open science*, 4(9), 170374.

Smyth, B., & Nebel, S. (2013). Passive integrated transponder (PIT) tags in the study of animal movement. *Nature Education Knowledge*, 4(3), 3.

Smith, N. D. (1990). *The ecology of the slow-worm (Anguis fragilis L.) in southern England* (Doctoral dissertation, University of Southampton).

Van Delft, J., Spitzen-van der Sluijs, A., & Raymond Creemers, R. (2012). *De hazelworm in Noord-Brabant, levenswijze en beheer*. (Brochure) Nijmegen: RAVON

Vanek, J. (2016) *Habitat Use by the Eastern Hognose Snake on a Barrier Beach*. Geraadpleegd van <https://experiment.com/projects/spatial-ecology-of-eastern-hognose-snakes-on-a-barrier-island/results>

Van der Grift, E. A., Pouwels, R., & Reijnen, R. (2003). *Meerjarenprogramma Ontsnippering: knelpuntenanalyse* (No. 768). Alterra.

Weary, G.C. 1969: An improved method of marking snakes. *Copeia* 1969: 854–855.

Woodbury, A. 1956. Uses of marking animals in ecological studies: Marking amphibians and reptiles. *Ecology* 37:670–674.

TABLE 5. PERMANENT IDENTIFICATION METHODS¹.

METHOD	SPEED OF APPLICATION	COMPLEXITY	COST
Hot brands	Fast	Low-Intermediate, depending on heat source and amount of hair	Low
Freeze brands	Slow-Intermediate, depending on species	Intermediate-High, depending on method	Intermediate
Chemical brands	Slow-Intermediate, depending on method	Intermediate-High, depending on method	Intermediate
Tattoos	Slow	Intermediate	Intermediate
Passive Integrated Transponders	Intermediate-Fast	High	High
Visible Implant Fluorescent Elastomer tags	Intermediate	Intermediate	Low
Tissue removal	Fast	Low	Low
Vital stains	Intermediate	Intermediate	Intermediate-High, depending on stain and recovery method
Natural marking identification	Slow-Fast	High	Low-Intermediate, depending on equipment

Bijlage I: Beoordelingstabel van Beausoleil et al. (2004)

SHORT-TERM STRESS	INFLUENCE OF OPERATOR	VISIBILITY	APPROPRIATE SPECIES
Intermediate-High: handling, pain, infection risk	Very High: application duration, temperature of branding iron	Intermediate-High, depending on location, size, success of brand	Terrestrial mammals, pinnipeds, reptiles
Intermediate: handling, delayed pain, infection risk	Very High: application duration, temperature of branding iron	Intermediate-High, depending on location, size, success of brand	Terrestrial mammals, pinnipeds, small cetaceans, reptiles, amphibians
Intermediate: handling, skin irritation, infection risk	High: application duration, chemical	Intermediate-High, depending on location, size of brand	Terrestrial mammals, amphibians
Intermediate-High: handling, pain, infection risk	High: location and depth of ink application	Low	Terrestrial mammals, pinnipeds, reptiles, amphibians
Intermediate-High: handling, pain, infection risk	Intermediate-High: location and depth of transponder	Not visible	Terrestrial mammals, pinnipeds, birds, reptiles, amphibians, fish, invertebrates
Intermediate-High: handling, pain, infection risk	Very High: location and depth of elastomer implantation	Intermediate, depending on location and depth of implant	Larval and transparent-skinned amphibians, fish
High: handling, pain, infection risk	Low	Low-Intermediate, depending on method	Reptiles, amphibians, some terrestrial mammals and pinnipeds
Low-High, depending on method of administration and data recovery	Low	Low-Intermediate, depending on method, species, visibility of targeted structure	Terrestrial and marine mammals, larval amphibians
Low-Intermediate, depending on handling required	Very high	Low-High, depending on marks, size of animal	Any animal with stable, distinguishing natural markings