



stowa

DE DETECTIE VAN BEVERACTIVITEIT OP BASIS VAN GEUR: EEN HAALBAARHEIDSTUDIE



RAPPORT

2025

31

DE DETECTIE VAN BEVERACTIVITEIT OP BASIS VAN GEUR:
EEN HAALBAARHEIDSTUDIE.

RAPPORT

2025

31

ISBN 978.94.6479.121.1



COLOFON

UITGAVE Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer
Postbus 2180
3800 CD Amersfoort

AUTEURS Ruud Peters (Saxion hogeschool)
Yara Kronshorst (Saxion hogeschool)
Kristel van der Zant (Saxion hogeschool)

BEGELEIDINGSCOMMISSIE
Hanneke Kloosterboer (STOWA / waterschap Aa en Maas)
Oscar van Dam (STOWA)

VORMGEVING Buro Vormvast
STOWA STOWA 2025-31
ISBN 978.94.6479.121.1

Dit project is uitgevoerd binnen het STOWA-Rijkswaterstaat programma Professionaliseren Instandhouding Waterkeringen 4

De inhoud van deze uitgave is met de grootst mogelijke zorg samengesteld. Niettemin aanvaarden de auteurs en de uitgever geen enkele aansprakelijkheid voor mogelijke onjuistheden in de publicatie, of eventuele gevolgen door toepassing van de inhoud ervan.

STOWA spant zich in de rechthebbenden van in de uitgave gebruikte afbeeldingen te respecteren conform het auteursrecht. Indien u desondanks van mening bent dat uw rechten in het geding zijn, dan verzoeken wij u contact met ons op te nemen.

SAMENVATTING

OP HET SPOOR VAN DE BEVER

De overlast van bevers groeit in Nederland. De circa 6 duizend bevers zorgen — naast hun positieve effecten voor de natuur — voor veel problemen in de leefomgeving. Zo veroorzaken de holen die bevers graven schade aan wegen, dijken en andere belangrijke infrastructuur. Dijken zijn aantrekkelijke graaflocaties voor bevers, maar raken verzwakt, met het risico op schade en overstromingen. Om dat gevaar te beperken, is een betere lokalisering van actief bewoonde beverterritoria nodig. Dit rapport is een haalbaarheidsstudie naar de mogelijkheid door middel van hun geur te bepalen waar bevers zich bevinden.

Bevers scheiden castoreum uit, een sterke, muskusachtige geur. In dit onderzoek is castoreum geanalyseerd door middel van een elektronische neus (E-nose) en een combinatie van solid-phase micro extractie (SPME) gaschromatografie (GC) en massaspectrometrie (MS). Dit rapport richt zich op detectie van castoreum en identificatie van haar geurcomponenten met deze SPME-GC/MS-methode).

Uit laboratoriumproeven blijkt dat bevers op deze manier kunnen worden gedetecteerd. De E-nose neemt een uniek geurprofiel waar en met SPME-GC/MS kunnen meer dan dertig componenten van castoreum worden geïdentificeerd. Met beide methoden is zo een geurprofiel van castoreum opgesteld. De toepassing van de E-nose is echter beperkt. En het is nog de vraag of de methode ook in het veld kan worden toegepast. Als de E-nose te ver van het castoreum verwijderd is, of de geur door water verstoord raakt, leidt dat tot minder betrouwbare metingen. Welke gevolgen dat heeft voor de bruikbaarheid van de opsporingsmethode in de natuur is het onderwerp van vervolgonderzoek.

STOWA IN HET KORT

HOE WE WERKEN

STOWA is het kennis- en innovatiecentrum voor regionale waterbeheerders in Nederland; de waterschappen en provincies. We helpen ze met het verkrijgen van nieuwe kennis en inzichten die nodig zijn om de opgaven van de regionale waterbeheerders beter te kunnen uitvoeren. Dat doen we door kennisvragen te formuleren en te selecteren in programmacommissies. We zetten ons onderzoek uit bij een keur aan experts, adviesbureaus, instituten en universiteiten, die we begeleiden tijdens hun werk. We zorgen voor de beschikbaarstelling en verspreiding van de kennis, inzichten en antwoorden aan de gezamenlijke waterbeheerders. We stimuleren de uitwisseling van kennis en ervaringen, via bijeenkomsten, werkgroepen, excursies, conferenties en communities of practice. We werken samen met onder andere ministeries, Rijkswaterstaat, gemeenten, drinkwaterbedrijven.

WAT WE ONDERZOEKEN

Inhoudelijk richt STOWA zich op alle onderdelen van waterbeheer, van waterkering en stedelijk waterbeheer tot waterzuivering en watersystemen. Belangrijke thema's daarbij zijn klimaatadaptatie, waterveiligheid, waterkwaliteit en ecologie, energietransitie en circulaire economie.

De kennisvragen die STOWA beantwoordt liggen meestal op technisch, natuurwetenschappelijk, bestuurlijk-juridisch of sociaalwetenschappelijk gebied. Onze kennis is altijd gericht op de praktijk van regionale waterbeheerders. Dat is waar we voor staan, als Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer.

WIE WE ZIJN

STOWA is als kennisorganisatie onafhankelijk, onpartijdig en transparant. De afnemers van onze kennis moeten erop kunnen vertrouwen dat de inhoud van onze rapporten objectief en representatief is. Alleen zo kan onze kennis worden ingezet voor beter waterbeheer en innovaties die antwoord geven op de uitdagingen van vandaag en morgen. Het is aan regionale waterbeheerders zelf te bepalen hoe ze de kennis van STOWA in de praktijk gebruiken. STOWA kan daarbij een rol spelen als adviseur, maar is geen uitvoerder of regisseur.

STOWA is een stichting die de richtlijnen volgt voor organisaties zonder winstoogmerk (RJ-640). In ons jaarverslag is daarom naast de cijfermatige jaarrekening onder meer ook een directieverslag over de stichting, haar activiteiten en kentallen opgenomen.

DE DETECTIE VAN BEVERACTIVITEIT OP BASIS VAN GEUR: EEN HAALBAARHEIDSSSTUDIE.

INHOUD

	TEN GELEIDE	
	SAMENVATTING	
	STOWA IN HET KORT	
1	INLEIDING	1
2	GEURSIGNALEN EN CASTOREUM	2
3	DETECTIE EN IDENTIFICATIE VAN GEUR	3
3.1	Elektronische neus	3
3.2	Solid-phase micro extractie	4
4	METINGEN MET DE E-NOSE	5
4.1	Materialen	5
4.2	E-nose onderzoek	5
4.2.1	Herhaalbaarheids-, en reproduceerbaarheidsmetingen	5
4.2.2	Onderzoek van variabelen	6
4.2.3	Onderzoek van castoreum	7
4.2.4	Metingen aan grond monsters	9
4.2.5	Onderzoek van katoenen verbandgaas	9

5	METINGEN MET SPME-GC/MS	10
5.1	SPME-GC/MS onderzoek	10
5.1.1	Onderzoek van castoreum	10
5.1.2	Selectie van markercomponenten	11
5.1.3	Ethanol-, en blancometingen	12
5.1.4	Metingen aan grondmonsters	12
5.1.5	Metingen aan katoenen verbandgaas	13
6	DISCUSSIE	14
7	CONCLUSIE	16
8	LITERATUUR	17

1

INLEIDING

Het gaat goed met de bever in Nederland. De natuur in de riviergebieden heeft hier baat bij, de biodiversiteit neemt toe (Jansman et al. 2016). Echter, heeft het ook negatieve gevolgen voor onder andere oevers en dijken. Dijken zijn een aantrekkelijke locatie voor de aanlegging van beverholen. De dijken raken hierdoor verzwakt, wat leidt tot overstromingsrisico's en de kosten van het herstel van beschadigde dijken zijn hoog (Kurstjens & Niewold 2011; Vreugdenhil et al. 2012; Bekker & Dijkstra 2016; Dijkstra & Hollander 2016). Ter voorkoming van de risico's zijn enkele maatregelen mogelijk, zoals het onaantrekkelijk maken van dijken, het snoeien van begroeiing, het storten van stenen, het ingraven van gaas en het uitgraven van bevertunnels. Echter, zijn de huidige maatregelen niet voldoende om de groeiende overlast in te perken. De snelheid van de graaactiviteiten is te hoog om dit bij te houden en dus er zijn nieuwe methoden nodig om de verspreiding van de bever beter in kaart te brengen. Voor de detectie van beveractiviteit kan het castoreum dat zij afscheiden, een sterk geurende stof voor de afbakening van hun territorium, mogelijk gebruikt worden.

Voor de detectie en analyse van geur kan gebruik gemaakt worden van een elektronische neus (E-nose) of solid phase microextractie gecombineerd met gaschromatografie gekoppeld met massaspectrometrie (SPME-GC/MS). In het laatste geval worden monsters genomen met SPME dat componenten uit de lucht verzameld waarna de SPME monsternemer in het laboratorium wordt geanalyseerd met GC/MS (Burger 2004). Dit maakt het detecteren en analyseren van de chemische componenten in een geur mogelijk. Een nieuwe ontwikkeling is de E-nose op basis van carbon nanotubes (Peters 2023a). Bij het blootstellen van deze carbon nanotubes aan een geur geven deze een elektrisch signaal af. Door de signalen van verschillende nanotube sensoren (die verschillend reageren op een geur) te combineren kan een geurprofiel van de geur vastgesteld worden.

In dit onderzoek is bepaald of beide technieken in staat zijn de geur van castoreum te detecteren en te identificeren. Daarvoor is bepaald of met de E-nose een karakteristiek geurprofiel bepaald kan worden en wat de betrouwbaarheid is van dat profiel in termen van herhaalbaarheid, reproduceerbaarheid en de gevoeligheid voor variabelen. Met SPME-GC/MS is bepaald of karakteristieke chemische componenten in de geur kunnen worden geïdentificeerd. Het doel van het onderzoek was te bepalen of de E-nose en SPME-GC/MS geschikte technieken zijn voor de detectie en karakterisering van castoreum.

2

GEURSIGNALEN EN CASTOREUM

Geursignalen die worden afgegeven door dieren om het gedrag van andere dieren te beïnvloeden worden ook wel *semiochemicals* genoemd (Burger 2004; Poirier et al. 2021). Semiochemicals worden in de natuur veel gebruikt om informatie over te brengen tussen dieren of soortgenoten. Het kan informatie bevatten over vaste gegevens (soort, geslacht, groep en individuele identiteit) en variabele gegevens (sociale, reproductieve en gezondheids-status). Castoreum is een voorbeeld van een semiochemical. Bevers gebruiken castoreum om een territorium af te bakenen en daarmee een duidelijk aromatisch signaal af te geven aan soortgenoten (Rosell & Sundsdal 2001). Een bever vormt een verhoging van modder, waarna hij hierop zijn castoreum verspreid, dit word ook wel een *scent mound* genoemd. Deze afscheiding maakt aan soortgenoten duidelijk dat het gebied bezet is en dat deze bever zijn territorium zal verdedigen. Uit de laag moleculaire gewichten van de chemische componenten die gevonden worden in castoreum (molgewicht (MW) <300) blijkt dat het waarschijnlijk niet mogelijk is dat hierin gedetailleerde informatie over het individu kan worden overgebracht (Walbaum & Rosenthal 1927; Sun & Müller-Schwarze 1999). Hierdoor functioneert het castoreum als een algemeen waarschuwingssignaal jegens andere dieren, en minder als communicatief middel tussen soortgenoten.

In 1927 zijn voor het eerst componenten van castoreum geïdentificeerd, zijnde fenolen en neutrale componenten (Walbaum & Rosenthal 1927). Destijds zijn de fenolen o-cresol, o-ethylfenol en p-ethylfenol gevonden. Andere componenten die geïdentificeerd zijn zijn acetofenon, borneol en benzyl alcohol. Eind jaren '40 heeft Lederer nog eens 36 componenten geïdentificeerd (Lederer 1946, 1949; Burger 2004). Door de jaren heen zijn er nog enkele onderzoeken uitgevoerd die chemische componenten van castoreum hebben geïdentificeerd (Valente & Khaleque 1961; Maurer & Ohloff 1976; Müller-Schwarze & Houlihan 1991; Tang et al. 1993, 1995). Zo hebben Schulte et al. in 1995 naast eerder geïdentificeerde fenolen ook enkele zuren, esters en een amines geïdentificeerd (Schulte et al. 1995). Echter in een onderzoek van Tang uit 1996 werden slechts enkele van deze fenolen opnieuw geïdentificeerd. Wel werden er 10 fenolen en 13 neutrale componenten gevonden die niet in eerder onderzoek naar voren zijn gekomen (Tang 1996).

3

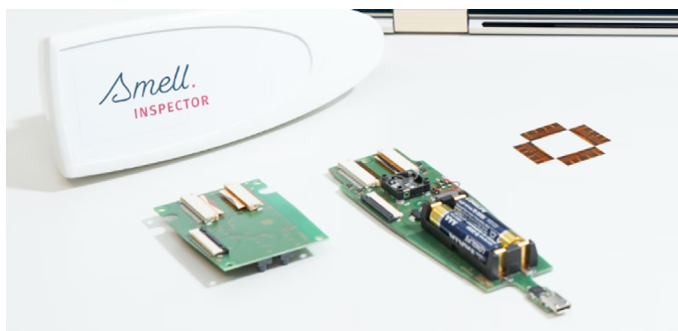
DETECTIE EN IDENTIFICATIE VAN GEUR

3.1 ELEKTRONISCHE NEUS

Een elektronische neus (E-nose) is een meetinstrument dat het reukorgaan van de mens nabootst. Een E-nose bestaat uit twee onderdelen: een gasdetectiesysteem en een informatieverwerkingssysteem. De neus heeft sensoren waarmee de “geur” na blootstelling kan worden geanalyseerd op basis van de interactie van de componenten in het monster met de sensoren. De sensoren geven ieder een respons, een elektrisch signaal, dit wordt omgezet in datapunten. Door verschillende sensoren te combineren wordt op basis van de datapunten een uniek geurprofiel bepaald, een soort “vingerafdruk” van de gemeten geur. Door de jaren heen is de techniek van de E-nose verbeterd (Karakaya et al. 2019; Arshak et al. 2004). Waren dit vroeger grote complexe apparaten met elektrochemische sensoren, tegenwoordig zijn er ook compacte en draagbare versies. Doorgaans worden verschillende elektrochemische sensoren gebruikt in een E-nose om de verschillende soorten componenten in een geur te detecteren. Elke soort sensor heeft daarbij een eigen functie en toepassing. In dit onderzoek is gebruik gemaakt van een draagbare E-nose met moderne carbon nanotube (CNT) sensoren. Dit zijn sensoren die bij blootstelling aan componenten in lucht en/of geur reageren door middel van een verhoogde of verlaagde elektrische weerstand. Deze E-nose heeft in totaal 64 sensoren waarvan er telkens 4 identiek zijn. Dat levert na uitmiddeling dus 16 verschillende signalen op waarmee de geur gekarakteriseerd wordt (Peters 2023a).

De elektronische neus die in dit onderzoek is gebruikt is de Smell Inspector van Smart Nanotubes (<https://smart-nanotubes.com>), zie figuur 1. De Smell Inspector bevat vier chips, elk met 16 onafhankelijke gassensoren, evenals vochtigheids- en temperatuursensoren. Volgens de producent bevatten de sensorelementen nauwkeurig afgestemde carbon nanotubes (CNTs) met een grootte van minder dan 1 vierkante mm elk, waarvoor slechts 1 μ W aan stroom nodig is. De uitleeselektronica, die in de Smell Inspector is ingebouwd, bemonstert elke 1,8 s de verschillende sensoren en registreert de elektrische weerstand van de sensoren. Elke sensor reageert anders wanneer hij wordt blootgesteld aan een enkel gas, wat resulteert in een uniek patroon van elektrische signalen van de sensorarray, vergelijkbaar met een digitale vingerafdruk. De lucht-/gasstroomsnelheid door de Smell Inspector-behuizing en over de sensorchips kan worden aangepast door verschillende ventilatorsnelheden en bereiken van ca. 5-25 ml/min. De Smell Inspector wordt via een USB-verbinding op een pc aangesloten en Smell Annotator-software wordt gebruikt om geuren te detecteren, annoteren en digitaliseren.

Figuur 1 De Smell Inspector, exterieur en interieur. De vier sensorchips zijn te herkennen aan de witte rechthoeken bovenaan de printplaat



3.2 SOLID-PHASE MICRO EXTRACTIE

Solid-phase micro extraction (SPME) is een simpele, relatief goedkope en herbruikbare techniek die gebaseerd is op de adsorptie en desorptie van de componenten in de matrix van een monster. De SPME-monsternemer bestaat uit een naald met een fiber die is voorzien van een coating die de adsorptie van componenten uit het monster mogelijk maakt. Wanneer de fiber wordt blootgesteld aan een monster (meestal water of lucht) dan zullen de analyten in het monsters adsorberen aan de fiber tot er een evenwicht is bereikt. Om vluchtige componenten uit bijvoorbeeld castoreum te adsorberen wordt de fiber in de headspace van het monster gebracht waarbij de vluchtige componenten worden geadsorbeerd. Na een bepaalde tijd, of na het bereiken van een evenwicht wordt de naald uit de headspace verwijderd en wordt het geïnjecteerd in de injectiepoort van een GC-MS. SPME-GC/MS analyse is in onderzoek naar zowel bevers als ook bij andere dieren zoals de apen en leeuwen toegepast om componenten van geuren te kunnen onderzoeken (Soso & Koziel 2017; Kücklich et al. 2017). SPME is in deze onderzoeken toegepast als monsternametechniek om de vluchtige componenten van semiochemicals te bemonsteren en vervolgens te analyseren met GC-MS.

De SPME monsternemers zijn medium polaire divinylbenzeen/carboxen op polydimethylsiloxaanvezels (50/30 μm DVB/CAR/PDMS) afkomstig van Supelco (Supelco, Merck, Germany). Figuur 2 geeft een beeld van een SPME monsternemer.

Figuur 2 Een foto van een SPME monsternemer. De fiber die de componenten uit de lucht opneemt zit in de naald en kan daaruit geschoven worden op de momenten dat een monster wordt verzameld of wordt geanalyseerd



4

METINGEN MET DE E-NOSE

4.1 MATERIALEN

In het onderzoek is gebruik gemaakt van kruidnagels (Verstegen, gekocht bij AH) en een 10% oplossing van castoreum in ethanol die via het internet is gekocht en vrij verkrijgbaar is. (Noord-Amerikaanse bever, *Castor canadensis*).

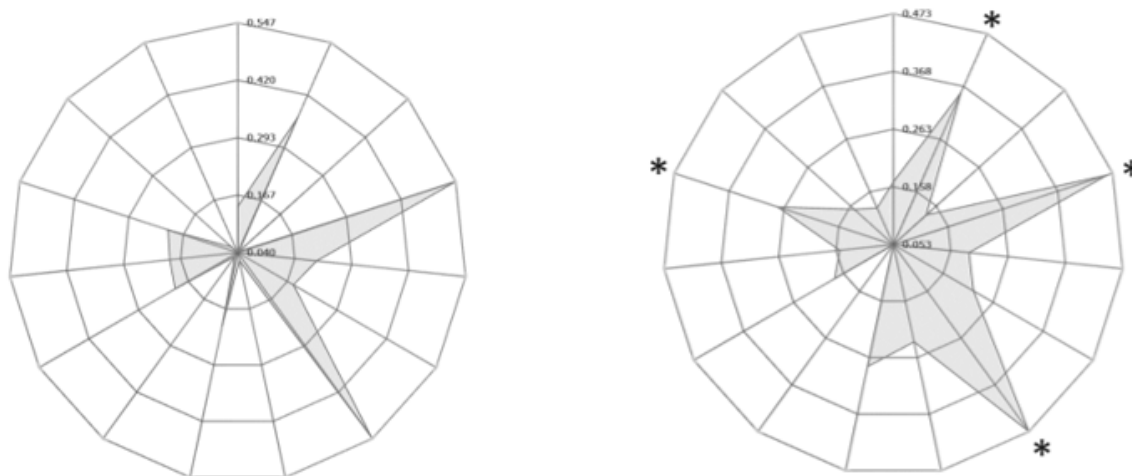
4.2 E-NOSE ONDERZOEK

4.2.1 HERHAALBAARHEIDS-, EN REPRODUCEERBAARHEIDSMETINGEN

De herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid van de E-nose zijn onbekend. Voor het opstellen van een uniek en betrouwbaar geurprofiel voor castoreum is een goede herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid cruciaal. Een meting van castoreum dient op verschillende tijdstippen en dagen, en onder afwisselende omstandigheden dezelfde resultaten te produceren. Omdat de beschikbare hoeveelheid castoreum beperkt is zijn de uitgebreide herhaalbaarheidsmetingen in eerste instantie uitgevoerd met kruidnagels omdat deze net als castoreum een sterke unieke geur hebben, en pas daarna met castoreum zelf.¹

Om een beeld te krijgen van de herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid van de E-nose-technologie zijn zes metingen uitgevoerd aan kruidnagels in één meting (herhaalbaarheid), in metingen verspreid over één dag waarbij de E-nose telkens werd uitgeschakeld (intra-day reproduceerbaarheid), en in metingen verspreid over meerdere dagen (inter-day reproduceerbaarheid). Radar plots van zes metingen per serie metingen zijn vergeleken op visueel niveau, en vervolgens verder geanalyseerd door het gemiddelde, de standaarddeviatie en de correlatie te bepalen. Dit is uitgevoerd aan de hand van de waarden verkrijgbaar uit de radar plots in de Smell Annotator software.

Figuur 3 Radar plots van twee metingen van kruidnagels met de E-nose



1 Hoewel meestal kortweg wordt gesproken over herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid wordt in feite de herhaalbaarheidsafwijking en reproduceerbaarheidsafwijking bedoeld. Een lage herhaalbaarheid wijst dus op een goed herhaalbare meting (<20%) en is een goed resultaat.

Visuele beoordeling van de zes herhaalbaarheidsmetingen maakten duidelijk dat vier sensoren, gemarkeerd met een ster in figuur 1, een duidelijke, terugkerende piek laten zien tijdens alle zes metingen. Dit resulteert in een kenmerkende vorm en de herhaalbaarheid van deze vorm werd bevestigd in verdere metingen en door de gemiddelde correlatiecoëfficiënt van 0,86 bij metingen in één serie. Bij zes metingen verspreid over de dag (intra-day reproduceerbaarheid), en waarbij de E-nose telkens werd uitgeschakeld bedroeg de gemiddelde correlatiecoëfficiënt zelfs 0,96. Tenslotte zijn de resultaten van de metingen over verschillende dagen beoordeeld (inter-day reproduceerbaarheid). Ook deze lieten een goede correlatie zien met een gemiddelde correlatiecoëfficiënt van 0,97. Een overzicht van de gemiddelde herhaalbaarheid en correlatie per meetmethode is weergegeven in tabel 1.

Tabel 1 De gemiddelde herhaalbaarheid en correlatiecoëfficiënt per meetmethode

Methode	Gemiddelde herhaalbaarheid (%)	Gemiddelde correlatiecoëfficiënt
Herhaalde metingen in één serie	23	0,86
Herhaalde metingen op één dag	14	0,96
Herhaalde metingen op meerdere dagen	13	0,97

4.2.2 ONDERZOEK VAN VARIABLEN

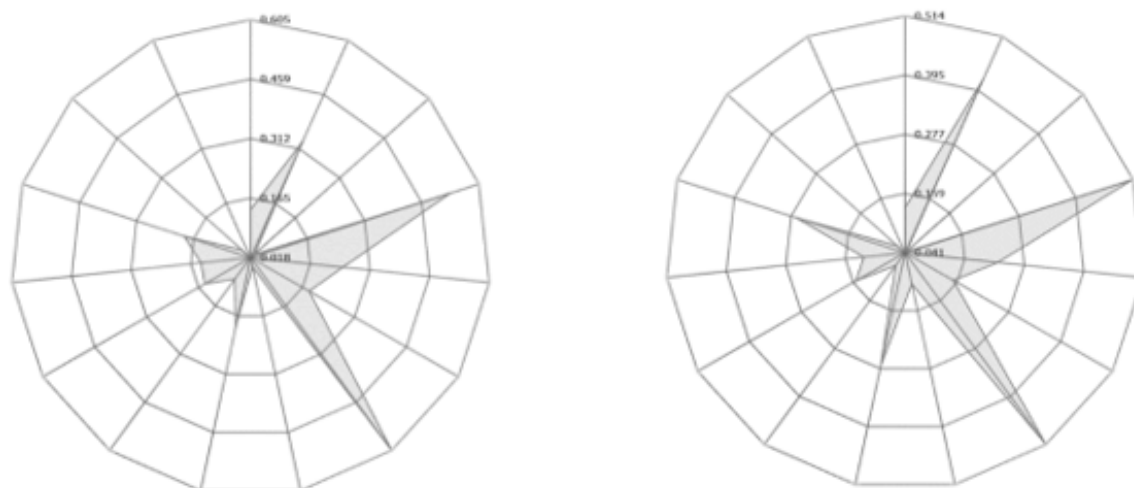
Het is onbekend wat de invloed van omgevingsfactoren en andere variabelen is op de werking van de E-nose. Tijdens metingen in het veld is het nodig dat de resultaten van de E-nose stabiel zijn en dat variabelen weinig tot geen invloed hebben op de betrouwbaarheid. In dit onderzoek zijn vier variabelen onderzocht die mogelijk van invloed zijn op het resultaat. Dit zijn de sterkte van de bron (de massa van het monster dat de geur produceert), de duur van de meting, de afstand tot de bron en de aanwezigheid van water.

Om de invloed van variabelen op de meetresultaten te bepalen zijn er een aantal metingen uitgevoerd. In eerste instantie is de hoeveelheid kruidnagels gevarieerd van 0,1 tot 3 gram om de sterkte van de bron, en dus de geur, variabel te maken. Alle metingen zijn in zesvoud uitgevoerd waarbij de herhaalbaarheid varieerde van 26 tot 41%. Hoewel de herhaalbaarheid daarmee slechter is dan bij de herhaalbaarheidsmetingen is de correlatie van de metingen sterk en varieert van 0,85 tot 0,96 wat weer vergelijkbaar is met de herhaalbaarheidsmetingen. De resultaten zijn samengevat in de tabel hieronder.

Tabel 2 Invloed van de sterkte van de bron op herhaalbaarheid en correlatiecoëfficiënt

Sterkte van de bron	Gemiddelde herhaalbaarheid (%)	Gemiddelde correlatiecoëfficiënt
0,1 g	41	0,96
0,5 g	29	0,85
1 g	32	0,88
3 g	26	0,95

Om de invloed van de duur van een metingen te bepalen zijn metingen uitgevoerd gedurende 3 min zoals bij de bepaling van de herhaalbaarheid en gedurende 5 min. De langere metingen laten vergelijkbare resultaten zien met de metingen gedurende 3 min met een correlatiecoëfficiënt van 0,96. Een vergelijking tussen de radar plots van beide metingen is weergegeven in figuur 4.

Figuur 4 Geurprofiel van kruidnagel gemeten gedurende 3 min (links) en 5 min (rechts)

Ook is er gekeken naar de relatie van de metingen als op meerdere afstanden van 3 tot 25 cm tot de bron wordt gemeten. Bij metingen op een afstand van 3 cm blijken de resultaten vergelijkbaar met de herhaalbaarheidsmetingen en wordt een correlatiecoëfficiënt gevonden van 0,94. Bij metingen op grotere afstanden tot de bron worden echter aanzienlijke slechtere correlaties gevonden die variëren van 0,65 tot 0,19. Deze correlaties zijn weergegeven in de tabel hieronder.

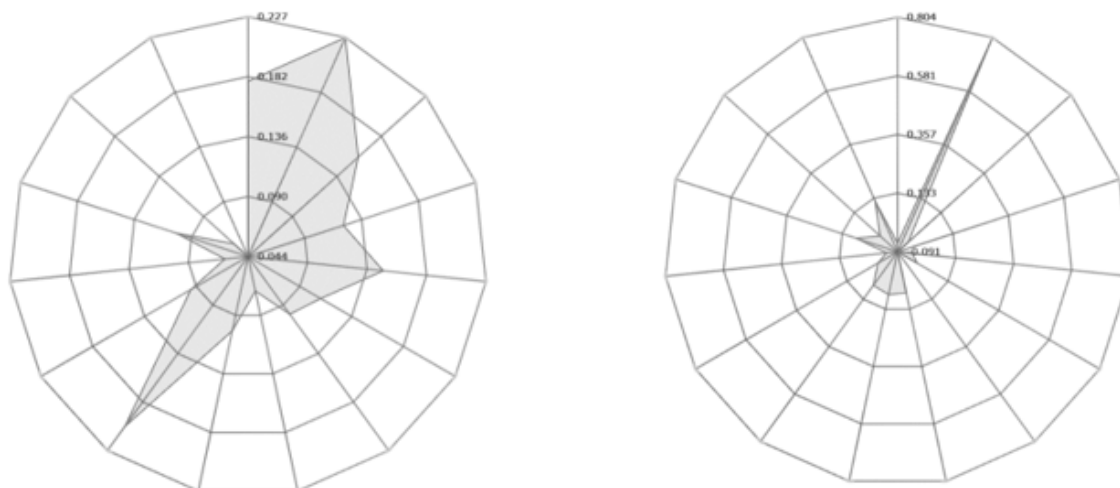
Tabel 2 De gemiddelde herhaalbaarheid en correlatiecoëfficiënt bij verschillende afstanden tot de bron

Afstand tot de bron	Gemiddelde herhaalbaarheid (%)	Gemiddelde correlatiecoëfficiënt
3 cm	15	0,94
5 cm	26	0,65
10 cm	43	0,39
25 cm	63	0,19

Tenslotte is aan de kruidnagels water toegevoegd om het effect hiervan op geurmetingen te kwantificeren. Uit de zes metingen die zijn uitgevoerd op een afstand van 3 cm blijkt dat de herhaalbaarheid dan 50% bedraagt, aanzienlijk hoger dan in de herhaalbaarheidsmetingen zelf. Verder blijkt tussen de metingen nauwelijks sprake te zijn van een correlatie. De gemiddelde correlatiecoëfficiënt bedraagt 0,46.

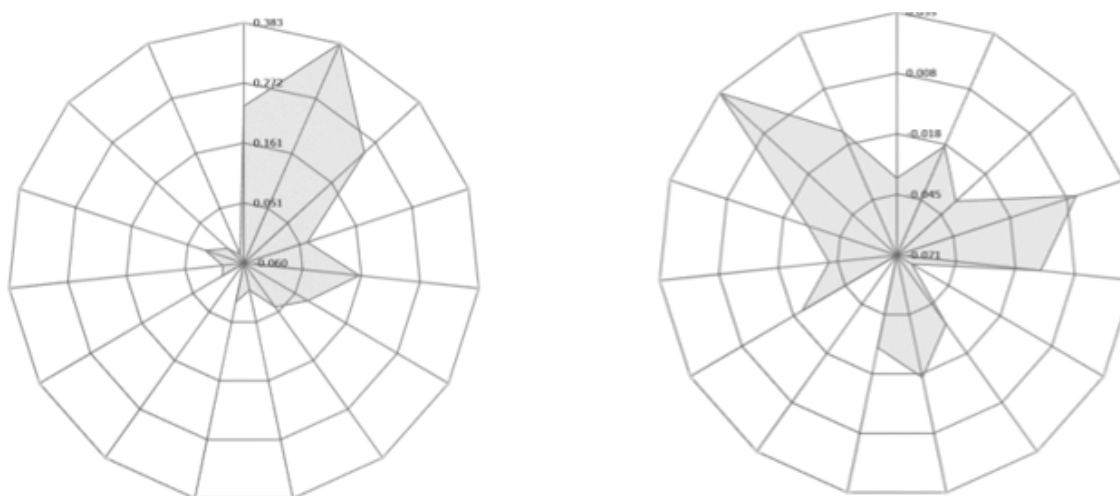
4.2.3 ONDERZOEK VAN CASTOREUM

Na uitvoering van het herhaalbaarheids-, en variabelenonderzoek aan kruidnagels is gestart met metingen aan castoreum. Om de stabiliteit van het signaal te onderzoeken zijn meerdere metingen uitgevoerd waarbij de Smell Inspector telkens is uitgeschakeld en weer ingeschakeld. De 10% castoreum oplossing is hierbij in een headspace vial gebracht en de E-nose is op 3 cm afstand van het monster geplaatst. De meettijd van de individuele metingen bedroeg telkens 3 min en in totaal zijn 12 metingen uitgevoerd aan de 10% castoreum oplossing. Met de data van twaalf metingen is het geurprofiel van castoreum in ethanol opgesteld. Ter vergelijking is met drie metingen het geurprofiel van 70% ethanol opgesteld. Beide geurprofielen zijn zichtbaar in figuur 5.

Figuur 5 Het geurprofiel van 10% castoreum in ethanol (links) en ethanol zelf (rechts)

Het geurprofiel van ethanol laat een zeer sterke respons van sensor twee zien. Deze respons is mogelijk ook zichtbaar in het geurprofiel van de 10% castoreum oplossing. Verder laat sensor dertien een vergelijkbare respons zien in beide profielen. Algemene visuele analyse laat zien dat de twee geurprofielen niet op elkaar lijken wat bevestigd wordt door de lage correlatiecoëfficiënt, 0,63, tussen de twee profielen. Vervolgens is 0,5 ml van een 10%-castoreum oplossing ingedampt om de ethanol te verwijderen en vervolgens geanalyseerd met de E-nose. Een geurprofiel is opgesteld uit een gemiddelde van zes metingen en is weergegeven in figuur 5. Uit een visuele beoordeling blijkt dat dit geurprofiel in grote mate lijkt op het geurprofiel van 10% castoreum in figuur 5. De correlatie tussen het geurprofiel van 10% castoreum en 100% castoreum is 0,80.

Ter controle zijn blancometingen uitgevoerd door een standaard E-nose meting uit te voeren op een headspace vial zonder inhoud. Een gemiddeld geurprofiel is opgesteld uit drie metingen. Deze is ook zichtbaar in figuur 6. Uit analyse blijkt dat het profiel van de drie blanco metingen verschillend zijn, zowel onderling als in vergelijking met de metingen van 10% en 100% castoreum.

Figuur 6 Geurprofielen van 100% castoreum (links) en blancometingen (rechts)

4.2.4 METINGEN AAN GROND MONSTERS

Castoreum wordt door bevers afgezet op modder ('scent mouth') en houtstammen. Daarom is het van belang te bepalen of castoreum op grond gemeten kan worden. Daartoe zijn veldvochtige grondmonsters verzameld van zes verschillende locaties in Deventer en is een deelmonster van 2 gram van de veldvochtige grond gemeten voor en na toevoeging van 10 µl 10%-castoreum. De metingen van castoreum op grond laten zien dat er geen correlatie is tussen de triplometingen van de zes grondmonsters. Net als bij blanco metingen is er telkens een ander geurprofiel zichtbaar wat erop lijkt te duiden dat er geen specifieke geur aanwezig is. De correlatie tussen de metingen van 10% castoreum en de 10% castoreum op grond bedraagt slechts 0,27 wat er ook op lijkt te wijzen dat er inderdaad geen castoreum geur aanwezig is. Dit is waarschijnlijk het gevolg van het feit dat de geurcomponenten door het water in de monsters worden gebonden, of dat andere sterke geurcomponenten in grond de geur van castoreum verdringen.

4.2.5 ONDERZOEK VAN KATOENEN VERBANDGAAS

Om castoreum te kunnen bemonsteren in het veld zijn mogelijk additionele methodes nodig om een monster te kunnen nemen. De leefomgeving van een bever kan bemonsterd worden met katoenen verbandgaas dat vaker voor de bemonstering van geur wordt toegepast (Peters 2023b). Om de toepasbaarheid hiervan te bepalen, zijn E-nose metingen uitgevoerd op blanco katoenen verbandgaas en katoenen verbandgaas gespiked met 10 µl 10% castoreum. De metingen van castoreum op katoengas laten in een analyse zien dat er geen correlatie tussen de triplometingen. Net als bij blanco metingen is er telkens een ander geurprofiel zichtbaar wat erop lijkt te duiden dat er geen specifieke geur aanwezig is. De correlatie tussen de metingen van 10% castoreum en de 10% castoreum op katoenen verbandgaas bedraagt slechts 0,39 wat er ook op lijkt te wijzen dat er inderdaad geen castoreum geur aanwezig is. Dit is waarschijnlijk het gevolg van het feit dat de geur wordt geadsorbeerd door het katoengas, het wordt immers gebruikt om geur te bemonsteren (is adsorberen). In aanvulling hierop dient te worden opgemerkt dat er ook slechts zeer weinig 10% castoreum op het katoenen verbandgaas is aangebracht. Tenslotte wordt katoenen verbandgaas bij de analyse vaak verwarmd om de geur weer vrij te maken. Dat was hier niet het geval, alle metingen zijn bij kamertemperatuur uitgevoerd. Herhaalde metingen waarbij 0,5 ml van de 10% castoreum oplossing op het katoenen verbandgaas is aangebracht laten wel een correlatie zien met een correlatiecoëfficiënt van 0,82.

5

METINGEN MET SPME-GC/MS

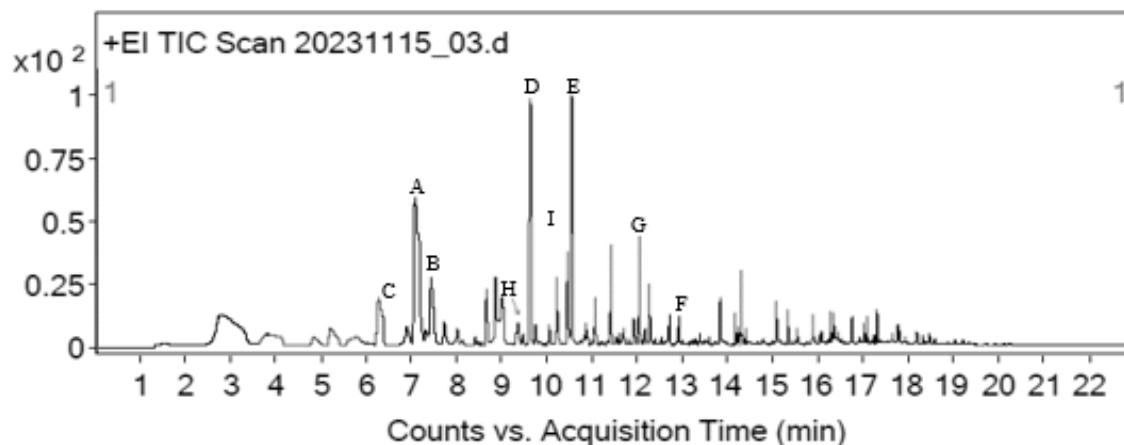
5.1 SPME-GC/MS ONDERZOEK

5.1.1 ONDERZOEK VAN CASTOREUM

De geur van castoreum kan mogelijk worden gekarakteriseerd door de vluchtige componenten die in het materiaal aanwezig zijn. Deze vluchtige componenten kunnen worden bemonsterd met behulp van solid phase microextractie (SPME) en worden geanalyseerd met gaschromatografie gekoppeld met massaspectrometrie (GC/MS). Daarom zijn meerdere SPME-GC/MS metingen uitgevoerd aan 100 µl 10% castoreum in een headspace vial om zo een uniek GC/MS profiel op te stellen voor castoreum. De SPME monsters zijn geanalyseerd met GC/MS op een Agilent 7000 GC/MS Triple Quad-systeem. De analytische kolom is een HP5-MS, 30 m, 0,25 mm binnendiameter, 0,25 µm filmdikte met helium als draaggas bij een debiet van 1,0 ml/min. De SPME fibers is gedurende 5 min gedesorbeerd in de injectiepoort van de GC bij een temperatuur van 250°C. De oventemperatuur is geprogrammeerd van 50°C (1 min) tot 140°C met 10°/min tot 200°C met 15°/min en tot 280°C (5 min) met 20°/min. De totale run time is 23 min. De massaspectrometer is in full scan mode gebruikt met een massabereik van 50-450.

In totaal zijn zes analyses uitgevoerd op zowel de 10% oplossing van castoreum in ethanol als de ingedampde oplossing (100% castoreum). De componenten in het chromatogram van elke analyse werden geïdentificeerd door hun massaspectra te vergelijken met referentiespectra in een NIST massaspectrale bibliotheek en een identificatie werd geaccepteerd als de overeenkomst van de vergeleken spectra beter was dan 80%. In meerdere chromatogrammen van analyses van de 10% castoreum oplossing zijn componenten geïdentificeerd die op basis van identiteit, frequent voorkomen en piekoppervlak, die mogelijk karakteristiek zijn voor castoreum. Een chromatogram van de geur van castoreum is weergegeven in figuur 7. In totaliteit zijn meer dan dertig componenten gevonden die in meer dan één castoreum monster aanwezig waren. Een overzicht van alle geïdentificeerde componenten met een match in de NIST-database boven 80% is weergegeven in tabel 3. Twee van de meest voorkomende componenten zijn 2-ethoxybenzyl alcohol en 4-ethyl-2-methoxyphenol, resp. pieken gemerkt met de letters D en E in het chromatogram in figuur 7.

Figuur 7 Chromatogram van de geur van een 10% castoreum oplossing in ethanol



Tabel 3

Overzicht van componenten geïdentificeerd in de geur van castoreum

Naam component	
Benzyl alcohol	2,6,10,14-tetramethylhexadecane
Dodecanal	Oxime-, methoxy-phenyl-
2-Ethoxybenzyl alcohol	Acetophenone
Trans-9-Hexadecen-1-ol	2-hydroxybenzaldehyde
Decahydro-a,a,4a-trimethyl-8-methylene-2-Napthalenemethanol	1-(2-hydroxy-5-methylphenyl)-ethanone
Methanol, oxo-, benzoate	Salicylaldehyde
1-Octadecanol	Benzoic acid
4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenol	n-hexadecanoic acid
2-ethyl-4-methoxyphenol	2-hydroxypropanoic acid, ethyl ester
4-ethyl-2-methoxyphenol	Esters of benzyl alcohol
2-methylphenol	Esters of benzenepropanoic acid
4-ethylphenol	Esters of benzoic acid
2-ethylphenol	Methylformate
2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-(1-methylpropyl)-phenol	N-Cbz-glycylglycine p-nitrophenyl ester
2-methoxy-5-methylphenol	Esters of 3-(4-Methoxyphenyl)propionic acid
2,6,10-trimethyldodecane	Heptanediamide, N,N'-di-benzoyloxy-
Tetradecane	N6-(4-Methoxybenzoyl)adenosine
4-methyltetradecane	BHT (Butylated hydroxytoluene)

5.1.2 SELECTIE VAN MARKERCOMPONENTEN

Op basis van de instrumentele analyses zijn een aantal markercomponenten geselecteerd, componenten waarvan we denken dat ze karakteristiek zijn voor de geur van castoreum. Bij deze selectie zijn de volgende criteria meegenomen:

1. Karakteristieke identiteit: Een geselecteerde component heeft een identiteit en eigenschappen die logischerwijs te herleiden zijn naar castoreum. Plantmetabolieten, biomarkers, geurstoffen en soortgelijke componenten krijgen daarbij bijzondere aandacht.
2. Herhaalbaarheid: Een geselecteerde component dient representatief te zijn voor castoreum en wordt in minimaal 70% van de monsters aangetroffen.
3. Minimaal piekoppervlak: Een geselecteerde component dient duidelijk zichtbaar te zijn in het chromatogram voor een betrouwbare herkenning en geurprofielanalyse. Componenten met kleine piekoppervlakken die in de ruis liggen worden derhalve niet meegenomen.

Salicylaldehyde (A in het chromatogram in figuur 7) is geselecteerd vanwege het voorkomen in alle chromatogrammen en een duidelijke aanwezigheid in het profiel. Ditzelfde geldt voor 2-ethoxybenzyl alcohol (D), de benzeenpropanoic acid ethyl ester (G) en de benzoic acid, 2-hydroxy ethyl ester (I). Verder zijn acetofenon (B), benzyl alcohol (C) en benzoic acid, ethyl ester (H) bekend als geurstoffen in castoreum. 4-Ethyl-2-methoxyphenol (E) en tetradecane (F) zijn beide goed zichtbaar in alle chromatogrammen en zijn beide bekend als plantmetabolieten. Deze negen componenten zijn geselecteerd als markercomponenten voor castoreum. Het opstellen van het geurprofiel is gedaan aan de hand van de onderlinge verhoudingen tussen de benoemde negen markercomponenten. Hiertoe zijn de chromatogrammen van de analyses geanalyseerd en zijn de onderlinge verhoudingen van de piekoppervlakken van de markercomponenten bepaald. Deze zijn verhoudingen zijn opgenomen in een matrix die is weergegeven in tabel 4.

Tabel 4 Verhoudingsmatrix van de piekoppervlakken van vijf markercomponenten

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
A	-	2,5	11,9	1,4	1,9	32,5	6,7	6,5	5,7
B		-	4,8	0,6	0,8	13,2	2,7	2,6	2,3
C			-	0,1	0,2	2,7	0,6	0,5	0,5
D				-	1,4	23,6	4,8	4,7	4,1
E					-	17,1	3,5	3,4	3,0
F						-	0,2	0,2	0,2
G							-	0,97	0,9
H								-	0,9
I									-

Uit deze matrix zijn vijf opvallende en goed herhaalbare verhoudingen geselecteerd. Dit zijn de verhoudingen aangegeven met dikgedrukte randen in tabel 4. Deze verhoudingen zijn de volgende: Salicylaldehyde – acetofenon (A/B), benzyl alcohol – phenol, 4-ethyl-2-methoxy- (C/E), 2-ethoxybenzyl alcohol – phenol, 4-ethyl-2-methoxy- (D/E), 2-ethoxybenzylalcohol – benzenepropanoic acid, ethyl ester (D/G) en phenol, 4-ethyl-2-methoxy- – benzenepropanoic acid, ethyl ester (E/G). De verhouding A/B is berekend op basis van de gemiddelde piekoppervlaktes van beide componenten in de chromatogrammen en bedraagt 2,8. Dit betekent dat het piekoppervlak van de piek van salicylaldehyde gemiddeld 2,8 keer het piekoppervlak van acetofenon is. In zes individuele castoreum metingen is de gemiddelde verhouding 2,8 met een standaarddeviatie van 0,32. Dit betekent een herhaalbaarheid van 11% wat op een betrouwbare verhouding duidt. Op basis van deze verhouding en standaarddeviatie verwachten we voor volgende metingen van castoreum een A/B verhouding die varieert tussen 2.5 en 3.1. Voor de overige vier componentverhoudingen is hetzelfde proces doorlopen, de resultaten hiervan staan weergegeven in tabel 5.

Tabel 5 Verhoudingen van piekoppervlakken van markercomponenten in de analyse van de geur van castoreum

Verhouding	Gemiddelde verhouding (individuele metingen)	Standaarddeviatie	Herhaalbaarheid (%)	Verwacht bereik
A/B	2,8	0,32	11	2,5 – 3,1
C/E	0,2	0,02	8,7	0,18 – 0,21
D/E	1,5	0,19	13	1,3 – 1,7
D/G	5,1	0,63	13	4,4 – 5,7
E/G	3,3	0,12	3,7	3,1 – 3,4

A: Salicylaldehyde, B: Acetofenon, C: Benzyl alcohol, D: 2-Ethoxybenzyl alcohol, E: Phenol, 4-ethyl-2-methoxy, F: Tetradecane, G: Benzenepropanoic acid, ethyl ester, H: Benzoic acid, ethyl ester, I: Benzoic acid, 2-hydroxy-, ethyl ester.

5.1.3 ETHANOL-, EN BLANCOMETINGEN

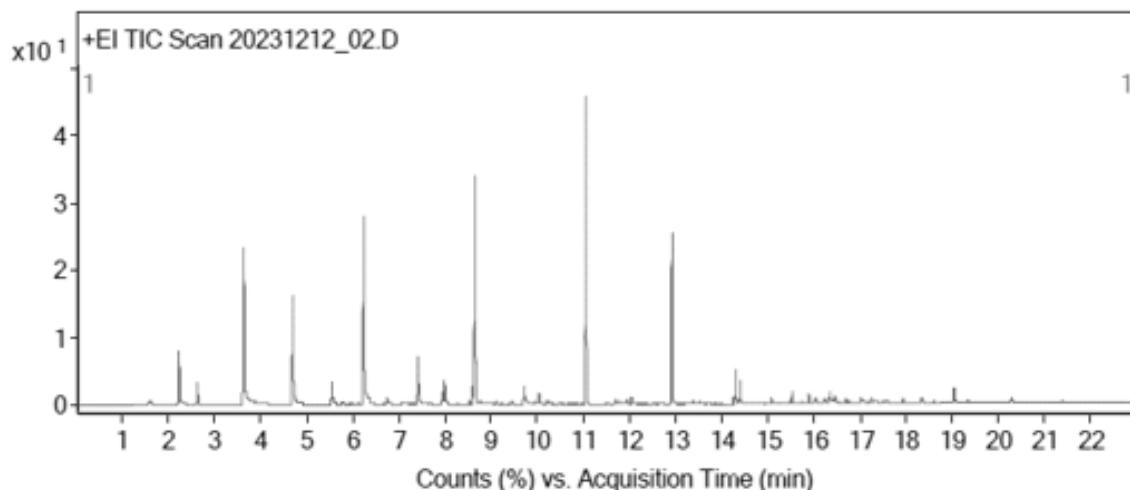
Blanco monsters van een headspace vial en van een headspace vial met 100 µL ethanol zijn eveneens geanalyseerd om te controleren of de geselecteerde markercomponenten daarin niet voorkomen. Dat blijkt inderdaad niet het geval te zijn, de geselecteerde componenten lijken dus karakteristiek voor castoreum.

5.1.4 METINGEN AAN GRONDMONSTERS

Zoals eerder vermeld wordt castoreum door bevers afgezet op modder (grond) en houtstammen. Daarom is het van belang te bepalen of castoreum in grond geanalyseerd kan worden en of vluchtige componenten uit grond niet interfereren met de markercomponenten die geselecteerd zijn voor castoreum. Daartoe zijn veldvochtige grondmonsters verzameld van zes verschillende locaties in Deventer en is een deelmonster van 2 gram van de veldvochtige grond geanalyseerd voor en na toevoeging van 10 µl 10%-castoreum. In de

blanco grond werden diverse componenten aangetroffen maar niet de negen markercomponenten die voor castoreum werden geselecteerd. In de grondmonsters waaraan 10 µl 10% castoreum was toegevoegd werden vijf van de markercomponenten aangetroffen. Dit zijn salicylaldehyde, acetofenon, 2-ethoxybenzyl alcohol, 4-ethyl-2-methoxyfenol en tetradecaan. Een chromatogram van een grondmonster is weergegeven in figuur 8. De grote pieken die hierin zichtbaar zijn, zijn afkomstig van componenten in het grondmonster. De karakteristieke pieken van castoreum zijn daardoor slecht zichtbaar maar worden met gericht zoeken wel gevonden.

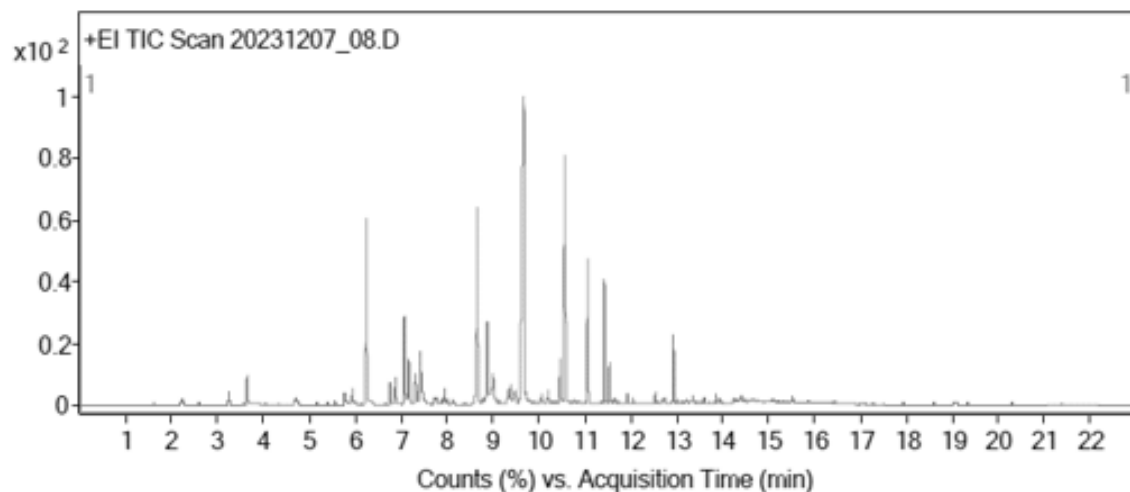
Figuur 8 Chromatogram van een grondmonster met toevoeging van 10% castoreum



5.1.5 METINGEN AAN KATOENEN VERBANDGAAS

Katoenen gaas is mogelijk toepasbaar om lokaal in het veld geurmonsters te verzamelen om deze daarna in het laboratorium te analyseren. Om dit te toetsen zijn zes monsters katoenen verbandgaas in een headspace vial geanalyseerd met SPME-GC/MS. Aan zes andere monsters katoenen verbandgaas is 10 µL van een 10%-castoreum oplossing in ethanol toegevoegd waarna deze eveneens zijn geanalyseerd. Analyse resulteerde in chromatogrammen zoals in figuur 9 waaruit blijkt dat het castoreum profiel op visueel niveau direct herkenbaar is. In de chromatogrammen konden alle negen markercomponenten worden gedetecteerd in de verwachte verhoudingen. Naast de gespikte monsters werd ook blanco katoenen verbandgaas op dezelfde wijze. In de chromatogrammen van de blanco's werden slechts weinig pieken aangetroffen die bovendien niet blijken te interfereren met de markercomponenten van castoreum.

Figuur 9 Een chromatogram van katoenen verbandgaas met een spike van 10% castoreum



6

DISCUSSIE

De E-nose geeft betrouwbare en herhaalbare resultaten indien er dicht boven het monster (<3 cm) wordt gemeten. De meting resulteert in een radar plot die karakteristiek is voor de geur van een component. De variabelen die invloed hebben op E-nose metingen lijken voornamelijk de afstand tot de bron en de aanwezigheid van water te zijn. De E-nose geeft onbetrouwbare resultaten wanneer de afstand tot het monster te groot is (>3cm) of wanneer het monster zich in water bevindt. Een van de oorzaken is mogelijk de zwakke luchtaanzuiging van de E-nose en de oplosbaarheid van de geurcomponenten van castoreum in water. De sterkte van de bron en de duur van de meting lijken geen effect te hebben op de resultaten. Dit betekent dat de E-nose waarschijnlijk slechts beperkt inzetbaar is in praktijkmetingen, in het bijzonder wanneer er geen precieze locatie van het monster bekend is.

Het geurprofiel van castoreum is zowel voor E-nose als voor GC/MS opgesteld. Beide zijn mogelijk inzetbaar. Het E-nose geurprofiel is herkenbaar vanwege de responses van specifieke sensoren. Dit geeft een kenmerkende vorm in een radar plot. Dit profiel kan mogelijk gebruikt worden om een vergelijking te maken met nieuwe monsters. De Smell Annotator software biedt een 'recognize smell'-functie. Deze is echter nog niet uitgevoerd in de herkenning van castoreum. De huidig beschikbare geurdata van castoreum kan hierin toegepast worden. Verder is geen verschil aangetoond in geurdata van de 10% castoreum oplossing en 100%-castoreum (na indampen) wat aangeeft dat de invloed van het oplosmiddel ethanol op de geurprofielen beperkt is.

Castoreum op katoenen verbandgaas grond is niet detecteerbaar met de E-nose, er wordt geen herhaalbaar profiel gevonden in de radar plots. Alleen bij hogere concentraties castoreum op het verbandgaas wordt het profiel van castoreum zichtbaar. Hetzelfde geldt voor grond, ook hierbij werd geen herhaalbaar profiel gevonden of werd een ander profiel gevonden dat waarschijnlijk afkomstig is van componenten uit de grond. Hierbij moeten twee kanttekeningen worden gemaakt. Ten eerste was de spike van 10% castoreum laag (10 µl) waardoor het waarschijnlijk moeilijk is de signalen te detecteren (de detectielimiet van de E-nose ligt rond de 1 ppm in lucht). Ten tweede werd het verbandgaas niet verwarmd (waardoor de geurcomponenten geadsorbeerd bleven) en bevatte de grond water waardoor de geurcomponenten waarschijnlijk in de matrix gebonden bleven.

Met behulp van SPME-GC/MS zijn meer dan dertig componenten in de geur van castoreum geïdentificeerd. In de onderzoeken van Lederer, Valenta en Tang zijn vloeistofextracten van castoreum geanalyseerd met GC/MS en een aantal van de componenten die zij geïdentificeerd hebben blijken ook in dit onderzoek te zijn aangetoond. In dit onderzoek zijn negen markercomponenten voor castoreum geselecteerd en zijn de relatieve verhoudingen van vijf van die componenten bepaald voor de identificatie van castoreum in chromatogrammen. De aanwezigheid van de markercomponenten en de juiste onderlinge piekoppervlakte verhoudingen van vijf van die componenten kunnen gebruikt worden om de aanwezigheid van castoreum te bepalen. De methode is daarom waarschijnlijk geschikt in praktijkmetingen. Een nadeel is wel dat de analyses in het laboratorium uitgevoerd moeten worden. Er is tegen-

woordig echter wel mobiele GC/MS apparatuur beschikbaar waarmee de analyses ook in het veld kunnen worden uitgevoerd.

Het aantonen van castoreum in monsters grond met SPME-GC/MS bleek niet eenvoudig ondanks het feit dat vijf van de markercomponenten konden worden geïdentificeerd. Identificatie is lastig doordat in de grondmonsters ook veel andere componenten aanwezig kunnen zijn. Ook de aanwezigheid van water in deze monsters speelt mogelijk een rol doordat relatief polaire castoreum componenten sterker geadsorbeerd worden. Katoenen verbandgaas is wel een bruikbare monsternamemethode wanneer analyse wordt uitgevoerd met SPME-GC/MS. Dit blijkt uit de succesvolle identificatie van alle markercomponenten wanneer castoreum was gespiked op katoenen verbandgaas. Ook bij een lage spike van 10 µl 10% castoreum blijkt het profiel van castoreum in het chromatogram goed zichtbaar te zijn.

Er zijn nog geen werkelijke monsters uit het veld genomen en geanalyseerd. Dit kan nog verschillen opleveren, bijvoorbeeld omdat het 10% castoreum dat in dit onderzoek is gebruikt afkomstig is van een Noord Amerikaanse bever en dus qua samenstelling kan verschillen met onze inheemse bever. Verder onderzoek zal dit moeten uitwijzen.

7

CONCLUSIE

Geurcomponenten van castoreum kunnen worden gedetecteerd en geïdentificeerd met behulp van E-nose technologie en SPME-GC/MS. Beide technieken maken het mogelijk een geurprofiel op te stellen. Deze profielen kunnen vervolgens gebruikt worden om castoreum te herkennen. Op korte afstanden kan de E-nose op herhaalbare wijze castoreum detecteren. Echter, analyse op grotere afstanden en bij vochtige monsters maken de methode onbruikbaar. Monsterneming met SPME-fibers is een adequate methode voor de adsorptie van componenten. Meer dan dertig componenten zijn geïdentificeerd in de geur van castoreum en negen specifieke componenten en vijf verhoudingen daartussen maken de detectie en identificatie van castoreum mogelijk. Katoenen verbandgaas kan gebruikt worden voor monsterneming en geeft een goed resultaat in de analyse met SPME-GC/MS. In monsters grond blijkt de identificatie van castoreum moeilijker door de aanwezigheid van veel andere componenten in de grond. Op katoenen gaas kan castoreum succesvol worden gedetecteerd. Afsluitend, zijn de resultaten overwegend positief, E-nose technologie en SPME-GC/MS creëren mogelijkheden voor geuridentificatie en kunnen mogelijk toegepast worden in de detectie en identificatie van castoreum. Dit is een eerste, verkennende stap in het onderzoek naar een verbeterde lokalisering van bevers in Nederland.

8

LITERATUUR

- Arshak, K.; Moore, E.G.; Lyons, G.M.; Harris, J.A.; Clifford, S. A review of gas sensors employed in electronic nose applications. *Sensor Review*, **2004**, 24, 181 – 198. <https://doi.org/10.1108/02602280410525977>.
- Bekker, H.; Dijkstra, V. Samenwerken voor een mooie toekomst van de bever - Effectieve bescherming vraagt gecoördineerd bever-management. *Zoogdier*, **2016**, 27, 3.
- Burger, B.V. Mammalian semiochemicals. In: Topics in Current Chemistry; **2004**, 231 – 278. <https://doi.org/10.1007/b98318>.
- Dijkstra, V.; Hollander H. Bevers in regionale watersystemen. Rapport van het bureau van de Zoogdierverseniging, **2016**. 11.
- Jansman, H.A.H.; de Groot, G.A.; Broekmeyer, M.E.A.; Lammertsma, D.R. Status bever in Nederland. Kaders om te komen tot bevermanagement. Rapport Wageningen Universiteit, **2016**, 8 december, Wageningen.
- Karakaya, D.; Ulucan, O.; Turkan, M. Electronic nose and its applications: A survey. *International Journal of Automation and Computing*, **2019**, 17, 179 – 209. <https://doi.org/10.1007/s11633-019-1212-9>.
- Kücklich, M.; Möller, M.; Marcillo, A.; Einspanier, A.; Weiß, B.; Birkemeyer, C.; Widdig, A. Different Methods for Volatile Sampling in Mammals. *PLOS ONE*, **2017**, 12, e0183440. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183440>.
- Kurstjens, G.; Niewold, F. *De verwachte ontwikkelingen van de beverpopulatie in Nederland: Naar een bevermanagement*. Rapport Faunafonds, **2011**, maart. http://www.biesbosch.nu/magazine/PDF_bestanden/Naar%20een%20bevermanagement.pdf.
- Lederer, E. Chemistry and biochemistry of the scent glands of the beaver (Castor Fiber). *Nature*, **1946**, 157, 231 – 232. <https://doi.org/10.1038/157231c0>.
- Lederer, E. Chemistry and biochemistry of some mammalian secretions and excretions. *Journal of the Chemical Society*, **1949**, 2115. <https://doi.org/10.1039/jr9490002115>.
- Maurer, B.; Ohloff, G. Zur Kenntnis der stickstoffhaltigen Inhaltsstoffe von Castoreum. *Helvetica Chimica Acta*, **1976**, 59, 1169 – 1185. <https://doi.org/10.1002/hlca.19760590420>.
- Müller-Schwarze, D.; Houlihan, P.W. Pheromonal activity of single castoreum constituents in beaver *Castor Canadensis*. *Journal of Chemical Ecology*, **1991**, 17, 715 – 734. <https://doi.org/10.1007/bf00994195>.
- Peters, R.; Beijer, N.; Van 't Hul, B.; Bruijns, B.; Munniks, S.; Knotter, J. Evaluation of a commercial electronic nose based on carbon nanotube chemiresistors. *Sensors*, **2023a**, 23, 5302. <https://doi.org/10.3390/s23115302>.

- Peters, R.; Veenstra, R.; Heutinck, K; Baas, A.; Munniks, S.; Knotter, J. Human scent characterization: A review. *Forensic Science International*, **2023b**, 349, 111743. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2023.111743>
- Poirier, A.C.; Waterhouse, J.; Watsa, M.; Erkenwick, G.; Moreira, L.A.A.; Tang, J.; Dunn, J.C.; Melin, A.D.; Smith, A.C. On the trail of primate scent signals: A field analysis of callitrichid scent-gland secretions by portable gas chromatography-mass spectrometry. *American Journal of Primatology*, **2021**, 83. <https://doi.org/10.1002/ajp.23236>.
- Rosell, F.; Sundsdal, L.J. Odorant source used in Eurasian beaver territory marking. *Journal of Chemical Ecology*, **2001**, 27. <https://doi.org/10.1023/a:1013627515232>.
- Schulte, B.A.; Müller-Schwarze, D.; Tang, R.; Webster, F.X. Bioactivity of beaver castoreum constituents using principal components analysis. *Journal of Chemical Ecology*, **1995**, 21, 941 – 957. <https://doi.org/10.1007/bf02033800>.
- Soso, S.B.; Koziel, J.A. Characterizing the scent and chemical composition of Panthera Leo marking fluid using solid-phase microextraction and multidimensional gas chromatography – mass spectrometry-olfactometry. *Scientific Reports*, **2017**, 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04973-2>.
- Sun, L.; Müller-Schwarze, D. Chemical signals in the beaver. In: *Springer eBooks*, **1999**; 281 – 288. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4733-4_23.
- Tang, R.; Webster, F.X.; Müller-Schwarze, D. Phenolic compounds from male castoreum of the North American beaver, *Castor Canadensis*. *Journal of Chemical Ecology*, **1993**, 19, 1491 – 1500. <https://doi.org/10.1007/bf00984892>.
- Tang, R.; Webster, F.X.; Müller-Schwarze, D. Neutral Compounds from male castoreum of North American beaver *Castor Canadensis*. *Journal of Chemical Ecology*, **1995**, 21, 1745 – 1762. <https://doi.org/10.1007/bf02033674>.
- Tang, R. The composition of bioactive castoreum of the North American beaver and the sex pheromone of the Cowpea Weevil. UMI, A Bell & Howell Information Company 300 North Zeeb Road, Ann Arbor MI 48106-1346 USA, **1996**.
- Valenta, Z.; Khaleque, A. The structure of castorammine. *Tetrahedron Letters*, **1959**, 1, 1 – 5. [https://doi.org/10.1016/s0040-4039\(01\)99432-8](https://doi.org/10.1016/s0040-4039(01)99432-8).
- Valenta, Z.; Khaleque, A.; Rashid, M.H. Cis-cyclohexane-1,2-diol in the beaver gland. *Experientia*, **1961**, 17, 130. <https://doi.org/10.1007/bf02160827>.
- Vreugdenhil, S.; Dekker, J.J.A.; Dijkstra, V.D. Groei van de beverpopulatie: Lusten en lasten. *Vakblad Natuur Bos Landschap*, **2012**, 9, 26-29. <https://edepot.wur.nl/247372>
- Walbaum, H.; Rosenthal, A. Odoriferous Substances in Castoreum. *J. Prakt. Chem*, **1927**, 117, 225 – 232. doi: 10.1002/prac.19271170113