

Tussenrapportage: Onderzoek naar afbraak van eDNA van vleermuizen.

Datura Environmental Solutions



Colofon

Titel	Tussenrapportage: Onderzoek naar afbraak van eDNA van vleermuizen.
Tekst, foto's en samenstelling	K. van Bochove
In opdracht van	Rijksdienst voor Ondernemend Nederland
Naam opdrachtgever	Daniëlle Bankert
Rapportnummer	RA24245
Datum oplevering rapport	10-06-2025
Aantal pagina's	27
Wijze van citeren	van Bochove, K. 2025. Tussenrapportage: Onderzoek naar afbraak van eDNA van vleermuizen. Rapport RA24071, Datura, Wageningen.
Hoofdanalist	M. den Breejen

Datura Environmental Solutions

Gevestigd te:

Agro Business Park 10
6708 PW Wageningen
Nederland

Contactpersoon:

Kees van Bochove
06-29455328
www.datura.nl
kees.vanbochove@datura.nl

Inhoudsopgave

Samenvatting	4
1. Inleiding	6
1.1 Aanleiding	6
1.2 Onderzoeksvragen	7
2. Methode	8
2.1 Praktijkstudie panden	8
2.1.1 Opzet onderzoek panden	8
2.1.2 eDNA bemonstering van panden	10
2.2.3 eDNA analyse panden	10
2.2.4 Data-analyse panden	11
2.2 Afbraakexperiment kasten	12
2.2.1 Opzet kastenexperiment	12
2.2.2 eDNA bemonstering van kasten	13
2.2.3 eDNA analyse kasten	14
2.2.4 Data-analyse kasten	15
3. Resultaten	15
3.1 Panden onderzoek	15
3.2 Vleermuiskasten	21
4. Discussie	22
6. Conclusies	27
7. Advies	29

Samenvatting

Het Nationaal Isolatieprogramma wil 2,5 miljoen woningen isoleren voor 2030. Om verblijfplaatsen van vleermuizen effectief te kunnen beschermen is het van belang om verblijfplaatsen van vleermuizen te kunnen opsporen. Traditioneel vleermuisonderzoek is arbeidsintensief en seizoensgebonden. Met eDNA-onderzoek kunnen vleermuizen opgespoord worden via bemonstering van in- en uitvliegopeningen. Eerste studies tonen aan dat deze methode mogelijk net zo betrouwbaar of zelfs beter is dan het gangbare protocolonderzoek. Momenteel is nog onduidelijk hoelang eDNA detecteerbaar blijft en of het betrouwbaar gebruikt kan worden om vleermuizen tijdens de winterrust op te sporen. In deze studie is onderzocht in welke mate eDNA van vleermuizen in de winter gedetecteerd kan worden. Tevens wordt onderzocht hoe snel eDNA afbreekt en welke factoren de afbraaksnelheid beïnvloeden. De resultaten van het winteronderzoek worden gedeeld in deze tussenrapportage. Nader onderzoek met betrekking tot de afbraaksnelheid zal onderdeel zijn van de eindrapportage.

Bij 110 verblijfplaatsen van gewone dwergvleermuis, ruige dwergvleermuis, laatvlieger en rosse vleermuis en 42 controle locaties zijn eDNA-monsters genomen. Dit betreft deels zomer, kraam- en paarverblijven die bemonsterd zijn door van Bochove *et al.* 2024b in juni en september 2024 en deels locaties die in deze studie bemonsterd zijn in december 2024, februari 2025 en eind maart/begin april 2025. De eDNA-concentratie verschilde niet significant tussen kraam- zomer-, paar- en winterverblijven als er vleermuizen aanwezig waren op moment van bemonsteren. Bij kraamverblijven werd op alle momenten in het jaar gemiddeld evenveel eDNA gedetecteerd. Bij zomer- en paarverblijven werd een gemiddeld lagere eDNA-concentratie gemeten op het moment dat er waarschijnlijk geen of minder activiteit van vleermuizen was. De detectiekans met qPCR varieerde sterk door het jaar als er drempelwaarden toegepast worden. Daarentegen, bij het toepassen van 2 replica's, zonder aanvullende drempelwaardes (waarbij een monster positief gescoord wordt als minimaal 1 replica positief resultaat geeft) konden kraam-, zomer-, en paarverblijven in de winter aangetoond worden bij respectievelijk 100%, 79% en 88% van de locaties. Het toepassen van drempelwaardes reduceert het aantal vals positieve waarnemingen op controlelocaties (van 7% zonder drempelwaarde, naar 0% met drempelwaarde). Bij verblijfplaatsen werd gemiddeld 1,5 soort per locatie gedetecteerd met metabarcoding. In 8 gevallen werd een soort gemist. In 3 van de 8 gevallen dat een soort gemist werd kon dit verklaard worden omdat op de betreffende locatie niet alle uitvliegopeningen bemonsterd konden worden. Het bemonsteren van alle uitvliegopeningen is dus essentieel.

Om de afbraaksnelheid, en milieufactoren die de afbraaksnelheid beïnvloeden te bepalen is een experiment met vleermuiskasten opgezet. Er zijn 54 vleermuiskasten, waarin vleermuizen aanwezig waren in 2024, verwijderd en vervangen door nieuwe kasten. De kasten zijn onder gecontroleerde omstandigheden geplaatst in tuinen, een loods en laboratoriumruimte, waarbij vervolgens een tijdreeks eDNA metingen uitgevoerd zal worden. Bij de aanvang is met metabarcoding bepaald van welke soorten er eDNA op de kasten aanwezig was. Nog niet van alle kasten beschikken we op het moment van schrijven over de monitoringsgegevens, maar zover bekend, kwamen de resultaten van de metabarcoding goed overeen met de gegevens uit de monitoring. In het vervolg van het project wordt de afbraak gemonitord met behulp van qPCR. De resultaten hiervan volgen in de eindrapportage.

Op basis van de uitkomsten van het afbraakexperiment in combinatie met de resultaten van de bemonsteringen bij panden zal een definitief advies opgesteld worden. Het voorlopig advies in deze tussenrapportage is om eDNA sponsmethode jaarrond in te zetten om vleermuizen in de spouw op te sporen. Voorwaarden om jaarrond betrouwbaar te kunnen meten met de sponsmethode zijn dat alle potentiële uitvliegopeningen bemonsterd worden, een analyse positief gescoord wordt als minimaal 1 van de 2 qPCR replica's positieve uitslag geeft en er geen aanvullende drempelwaarde gehanteerd wordt (toepassen van een PCR protocol met minimaal 55 cycli).

1. Inleiding

1.1 Aanleiding

Het Nationaal Isolatieprogramma streeft ernaar 2,5 miljoen woningen te isoleren tegen 2030. Een veel toegepaste maatregel is het na-isoleren van de spouw. Bij na-isolatie van de spouw moet rekening gehouden worden met vleermuizen vanwege hun beschermde status. Vleermuizen zijn actief in de nacht en maken gebruik van een netwerk van verblijfplaatsen waarbij ze regelmatig van locatie wisselen. Als gevolg daarvan is het lastig om de aanwezigheid van vleermuizen vast te stellen. Het vleermuisprotocol 2021 (hierna, protocolonderzoek) schrijft voor hoe onderzoek naar deze dieren uitgevoerd dient te worden. Protocolonderzoek is echter arbeidsintensief, seizoensgebonden en moeilijk schaalbaar. Bovendien kunnen vleermuizen in de winterrust periode moeilijk opgespoord worden en natuurvrij maken is tijdens de winterrust niet effectief omdat dieren minder actief zijn. Woningen kunnen daardoor in de winter niet geïsoleerd worden.

In plaats van verblijfplaatsen van vleermuizen vast te stellen op basis van hun gedrag, zijn er het afgelopen jaar enkele onderzoeken uitgevoerd waarbij eDNA gebruikt is om (recente) aanwezigheid van vleermuizen op te sporen (van Bochove *et al.* 2024a & 2024b, Team stadnatuur Arcadis, 2024). Wanneer achtergebleven DNA-moleculen (in cellen, of extracellulair) worden bemonsterd, kan dit aantonen dat vleermuizen op die locatie aanwezig zijn geweest. De initiële onderzoeken in de zomerperiode tonen aan dat bemonsteringsmethoden voor het verzamelen van eDNA rond in- en uitvliegopeningen naar de spouw net zo goed, of zelfs beter, de aanwezigheid van dwergvleermuizen kunnen aantonen in vergelijking met protocolonderzoek (van Bochove *et al.* 2024b).

De hoeveelheid eDNA die gemeten wordt in een monster is een functie van de snelheid (hoeveelheid per tijdseenheid) waarmee eDNA afgezet wordt op het pand, de snelheid waarmee het eDNA afbreekt en de effectiviteit waarmee het eDNA bemonsterd en gedetecteerd wordt. De hoeveelheid eDNA dat per tijdseenheid afgezet is mogelijk verschillend per vleermuissoort. De afbraaksnelheid is mogelijk afhankelijk van milieu variabelen. Er is alleen anekdotische kennis beschikbaar met betrekking tot de afbraaksnelheid van eDNA van vleermuizen op panden. Van Bochove *et al.* (2024a) troffen in december eDNA aan bij kraamkolonies van meervleermuizen, hetgeen een indicatie is dat eDNA bij kraamkolonies enkele maanden detecteerbaar blijft. Lankveld *et al.* (2024) hebben onderzoek gedaan bij drie zomerverblijfplaatsen van gewone dwergvleermuis die natuurvrij gemaakt zijn, door met een roller rond de uitvliegopeningen te bemonsteren. Twee verblijfplaatsen werden 9 maanden na het natuurvrij maken bemonsterd, en één verblijfplaats werd 13 maanden na natuurvrij maken bemonsterd. Bij alle drie verblijfplaatsen werd eDNA vastgesteld. Kanttekening daarbij is dat er anekdotische waarnemingen zijn dat vleermuizen zelfs tot jaren na ontoegankelijk maken van verblijfplaatsen terug blijven komen, en daarbij het gebouw aantikken. Via deze aanpak valt dus niet met 100% zekerheid vast te stellen of er in de tussenliggende tijd geen eDNA afgegeven is aan het bemonsterde oppervlak. Deze anekdotische waarnemingen duiden er op dat eDNA van vleermuizen onder geschikte omstandigheden enkele maanden detecteerbaar blijft. Maar gedegen onderbouwing is tot op heden niet geleverd. Verder is onbekend in hoeverre de afbraaksnelheid beïnvloed wordt door (a)biotische factoren. Hierdoor is de interpretatie van de aan- of afwezigheid van vleermuizen op basis van eDNA momenteel nog niet volledig mogelijk.

De huidige onderzoeksrapporten bieden wel vertrouwen dat met eDNA vastgesteld kan worden of er vleermuizen aanwezig zijn op moment van bemonstering. Verblijfplaatsen van vleermuizen zijn echter het hele jaar door beschermd, ook als er op moment van bemonstering of werkzaamheden geen vleermuizen aanwezig zijn. Dit roept de vraag op of eDNA gedurende een heel jaar detecteerbaar blijft, ook wanneer vleermuizen de bemonsterde locatie op een ander moment in het jaar gebruiken. Ook is nog onduidelijk of de techniek kan worden toegepast om overwinterende vleermuizen vast te stellen. In de winter is vermoedelijk minder activiteit bij in- en uitvliegopeningen, en het is nog niet onderzocht of de hoeveelheid eDNA bij winterverblijven voldoende groot is om betrouwbare detectie te kunnen realiseren. Afbraak van eDNA wordt voor een belangrijk deel gestuurd door micro-organismen zoals schimmels en bacteriën die het DNA afbreken (Levy-booth et al., 2007). Microbiële activiteit wordt onder andere beïnvloed door de temperatuur en vochtigheid. Zo vonden Naef et al. (2023) dat DNA in vleermuiskeutels sneller afbreekt bij hogere temperatuur en vochtige omstandigheden. Daarnaast spelen ook fysische factoren een rol zoals bestraling door UV-licht (Barnes et al., 2014; Levy-booth et al., 2007), wat voornamelijk bepaald wordt door de mate waarin er sprake is van direct inval van zonlicht.

Rijksdienst voor Ondernemend Nederland (RVO) heeft gevraagd om onderzoek te doen naar de afbraak van eDNA van vleermuizen. Het doel is het vaststellen van het verval van eDNA bij in- en uitvliegopeningen bij verblijfplaatsen van gebouw-bewonende vleermuissoorten. Daarmee moet inzichtelijk worden wat de afwezigheid van vleermuis eDNA bij een invliegopening betekent, specifiek gericht op gebruik tijdens het afgelopen jaar. Daarbij wordt ook onderzocht wat de invloed van tijd en (a)biotische factoren is op de snelheid van eDNA verval. In het onderzoek worden de jaarlijkse actieve en (relatief) inactieve periodes van gewone dwergvleermuis (en in mindere mate van ruige dwergvleermuis, laatvlieger en rosse vleermuis) separaat onderzocht, alsook de relatie van eDNA verval ten opzichte van tijd en (a)biotische factoren voor zowel verblijfplaatsen met lage als hoge aantallen vleermuizen van diverse soorten. Van Bochove *et al.* (2024b) vonden dat de drempelwaarde die gekozen wordt, om te bepalen of op basis van een qPCR-analyse een monster positief of negatief gescoord wordt, effect heeft op de detectiekans. In deze studie wordt nader onderzocht welke drempelwaarde optimaal is met het oog op maximaliseren van de detectiekans, en minimaliseren van vals positieve detecties. Op basis van het uitgevoerde onderzoek en de verkregen data wordt een advies gegeven over de toepassingsmogelijkheden van eDNA onderzoek.

1.2 Onderzoeksvragen

1. Hoe lang is eDNA materiaal traceerbaar bij in-/uitvliegopeningen bij de verschillende verblijfplaatsen van gebouw-bewonende vleermuissoorten?
 - 1a. Kan tijdens de gehele winterrustperiode de aan- of afwezigheid van verblijfplaatsen van vleermuizen in gebouwen worden bepaald?
 - 1b. Tot hoe lang terug kan een vleermuis aan- of afwezig zijn geweest bij aan- of afwezigheid van eDNA?
2. Wat is het effect van tijd in relatie tot (a)biotische variabelen, en het aantal vleermuizen binnen een verblijfplaats op het verval van DNA-materiaal bij in- /uitvliegopeningen?

3. Kan bij vastgestelde afwezigheid van eDNA van vleermuizen worden geconcludeerd dat vleermuizen het afgelopen jaar geen gebruik hebben gemaakt van de in-/uitvliegopening?
4. Kan de techniek de gehele winterrustperiode worden toegepast voor het vaststellen van aan- of afwezigheid van verblijfplaatsen van overwinterende dieren?

In deze tussenrapportage worden voorlopige antwoorden geformuleerd op deelvraag 1a en 4.

1.3 Projectstructuur

Dit project bestaat uit drie onderdelen:

1. Verzamelen van eDNA monsters bij panden in de winterperiode, en een ronde bemonsteringen in juli bij winterverblijfplaatsen. Focus hierbij is op gewone en ruige dwergvleermuis, en in mindere mate laatvlieger en rosse vleermuis (beantwoording vraag 1a en 4).
2. Een kastenexperiment waarin afbraaksnelheid van eDNA bepaald wordt onder uiteenlopende omstandigheden: temperatuur, oriëntatie, directe instraling zon, vochtigheid (beantwoording vraag 1A, 2, 3, en in mindere mate ook 1B en 4).
3. Tijdreeks van bemonsteringen bij uitvliegopeningen van een kraamkolonie laatvliegers, met een bemonstering in maart (voordat de kraamkolonie terug is), april, juli (beantwoording vraag 1a en 1b).

In deze tussenrapportage ligt de focus op de inzetbaarheid van eDNA in de winterperiode (projectonderdeel 1) en worden de eerste resultaten van het kastenexperiment gepresenteerd (projectonderdeel 2).

2. Methode

2.1 Praktijkstudie panden

2.1.1 Opzet onderzoek panden

Er zijn eDNA monsters bij woningen genomen in de periode december 2024-maart 2025. Daarnaast zijn gegevens gebruikt van bemonsteringen die uitgevoerd zijn in de periode juni-september 2024 afkomstig uit van Bochove *et al.* 2024b. In bijlagen 1 is een overzicht van bemonsterde locaties opgenomen. Uit privacy overwegingen worden adressen niet getoond. In tabel 1 is een samenvatting van de monsterlocaties opgenomen. Figuur 1 geeft een impressie van de ruimtelijke spreiding van de monsterlocaties. Dit betreft unieke locaties (dus elke locaties is eenmaal bemonsterd), met 2 uitzonderingen. Dit betreft 2 woningen met een verblijfplaats van rosse vleermuis in Steenwijk, die zowel op 17 september 2024 als op 1 april 2025 bemonsterd zijn. Alle verzamelde monsters zijn opgenomen in deze rapportage.

Tabel 1. Overzicht van monsters die verzameld zijn.

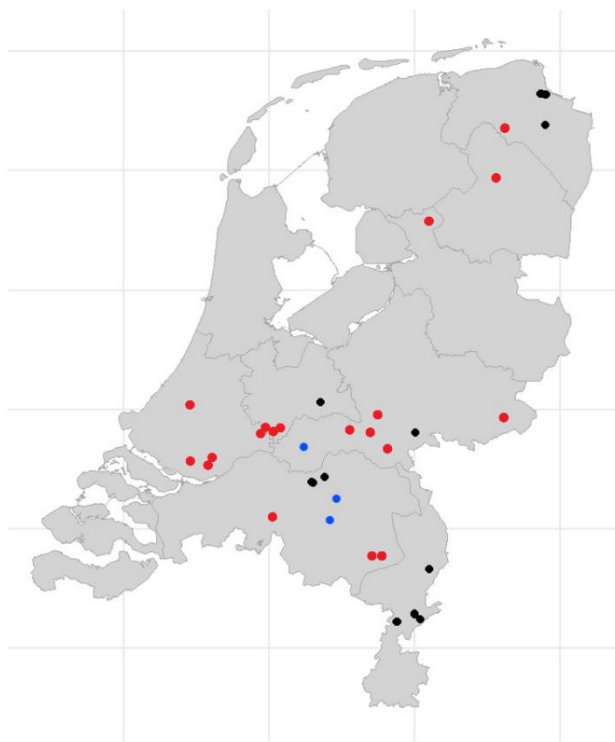
Periode bemonstering	controle	kraam	paar	paar & zomer	winter	zomer	totaal
juni 2024	4	3	2	4		9	22
september 2024	8	4	3	1		8	24
december 2024	10	4	7		6	9	36
februari 2025	10	8	5		5	7	35
eind maart- begin april 2025	10	7	5		5	8	35
totaal	42	26	22	5	16	41	152

De monsters zijn genomen bij verblijfplaatsen van gewone dwergvleermuis, ruige dwergvleermuis, rosse vleermuis en laatvlieger. Daarbij is bemonsterd bij kraamverblijven, zomerverblijven, paarverblijven en winterverblijven. De functie is vastgesteld ofwel door middel van protocolonderzoek, of door regelmatig bezoek van vrijwilligers. Voor het inschatten van de functie is afgegaan op de expertise van de ecooloog die het protocolonderzoek uitgevoerd heeft. Hier lijkt vooral de grootte van verblijfplaatsen leidend te zijn bij het bepalen van de functie. De grootte van verblijfplaatsen is door de ecooloog geschat op basis van een moment opname in de ochtend- of avondschemering. In deze dataset blijken alle verblijfplaatsen met 3 of minder dieren die vastgesteld zijn in de zomer, gelabeld te zijn als zomerverblijfplaats. Grotere groepen dieren die in de zomer gevonden worden, blijken in deze dataset gelabeld te zijn als kraamverblijf.

Het bleek lastig te zijn om aan winterverblijfplaatsen te komen in panden die zonder hoogwerker te bemonsteren zijn. Daarom heeft de bemonstering van winterverblijven zich gefocust op flatgebouwen in Tilburg die als massawinterverblijf gebruikt worden door gewone dwergvleermuis. De vleermuizen houden zich hier op in open dilatatievoegen. Met een zaklamp is in de voeg gekeken of er dieren aanwezig waren. Alleen dilatatievoegen waar zichtbaar dieren aanwezig waren zijn bemonsterd. In dit onderzoek hebben we alleen toestemming kunnen krijgen voor het bemonsteren van panden met overwinterende gewone dwergvleermuizen. Dit heeft voornamelijk te maken met het feit dat er van andere soorten vrijwel geen winterverblijven in een spouw bekend zijn.

Van 3 locaties in Haren en 3 locaties in Assen (bemonsterd op 26 maart 2025) ontbreken nog de gegevens van het protocolonderzoek. Deze locaties zijn daarom in de data-analyses ten behoeve van de tussenrapportage buiten beschouwing gelaten, en zullen in de eindrapportage volledig gemaakt worden.

Naast verblijfplaatsen zijn er ook controle locaties bemonsterd. In bijlagen 2 is een overzicht opgenomen van de bemonsterde controle locaties. Bij controle locaties zijn gevels (bijvoorbeeld een rand onder een dakgoot of langs een kozijn) bemonsterd waar geen potentiële uitvliegopeningen aanwezig waren. Dit betrof 34 panden en 8 schuren of elektriciteitsgebouwtjes. Bij 23 controle locaties is een gevel bemonsterd van een flat of woonblok waar een verblijfplaats vastgesteld is, maar waarbij er geen uitvliegopening in de bemonsterde muur aanwezig is.



Figuur 1. Kaart waarop de locaties waar onderzoek plaats gevonden heeft weergegeven zijn. De volgende kleurcodering is gebruikt: Zwart: locaties bemonsterd in juni 2024. Blauw: locaties bemonsterd in september 2024. Rood: bemonsterd in december – april 2025.

2.1.2 eDNA bemonstering van panden

Ten behoeve van eerdere studies (waaronder van Bochove et al. 2024a, 2024b) is reeds een veldprotocol ontwikkeld voor het verzamelen van sponsmonsters bij panden (zie bijlagen 3). Middels dit protocol worden alleen invliegopeningen in en direct rond de gevel bemonsterd. De bemonstering is bij grondgebonden woningen op adresniveau uitgevoerd. Bij appartementen complexen is per 25 strekkende meter één monster genomen. In het kort is de methode als volgt te omschrijven. Met behulp van een kleine spons (die bevochtigd is met conserverende buffer) is eDNA rond uitvliegopeningen verzameld en direct in het veld geconserveerd in een pot met 40 mL conserverende buffer. Bij aankomst in het laboratorium zijn de monsters opgeslagen bij 4°C. Sponsmonsters zijn met een telescoopstok, of met behulp van een ladder of hoogwerker verzameld. Met de spons zijn alle potentiële uitvliegopeningen bemonsterd zoals dilatatievoegen, open stootvoegen en de ruimte onder kantpannen. Daarbij wordt met de spons echt in de uitvliegopeningen geveegd, om zodoende zoveel mogelijk te voorkomen dat er eDNA bemonsterd wordt dat op de buitenmuur aanwezig is. Na de bemonstering is het eDNA geconserveerd door de spons over te brengen naar de pot met conserveringsbuffer. Figuur 2 geeft een impressie van de werkwijze in het veld. Bij het bemonsteren van de massawinterverblijven van gewone dwergvleermuis is afgeweken van het protocol, en is steeds één monster per dilatatievoeg (per verdieping) genomen omdat het praktischer was om per verdieping te bemonsteren. Deze keuze is gemaakt omdat de verschillende galerijen alleen via het trappenhuis of lift te bereiken waren, en het de monsternemers (met het oog op contaminatie) onwenselijk leek om met de monsterstok en daarop de spons naar binnen te gaan.



Figuur 2. eDNA monsternamen met behulp van een spons. Hierbij wordt de spons gemonteerd op een telescoopstok.

2.2.3 eDNA analyse panden

De eDNA analyses zijn uitgevoerd in de laboratoriumfaciliteiten van Datura. Dit laboratorium is speciaal voor eDNA onderzoek ingericht. In het laboratorium is de gehele pot met 40 mL conserveringsbuffer (lysis buffer) in de oven gezet om het eDNA op de spons in oplossing te brengen. Vervolgens is het eDNA uit 2 mL conservering vloeistof gezuiverd en geconcentreerd en geëluëerd in 150 µL low TE buffer.

Vervolgens zijn alle eDNA monsters geanalyseerd door middel van een qPCR-test. Met behulp van deze qPCR-test is vastgesteld of er eDNA van vleermuizen in het monster aanwezig is. Deze test maakt geen onderscheid tussen soorten. De qPCRs zijn uitgevoerd met 55 PCR cycli. Als er geen drempelwaarde gehanteerd wordt op de ct-waarde dan kan het toegepaste assay 1 molecuul per PCR reactie detecteren. Per qPCR reactie wordt 3 µL sample getest. De qPCRs in de studie van van Bochove et al. (20024b) zijn uitgevoerd met 12 PCR replica's. Dit betreffen technische replica's waarin bij elke replica een deel uit het monster genomen is, waarop een qPCR-test uitgevoerd is.

Uit een eerdere studie bleek het testen met twaalf replica's tot overgevoeligheid te leiden (van Bochove *et al.* 2024b). De qPCRs in deze studie zijn daarom uitgevoerd met 2 PCR replica's. Er is geen interne controle aan de conserveringsbuffer toegevoegd. De extractie efficiëntie is in deze studie dus niet stelselmatig getest. Uitgaande van een extractie efficiëntie van 100% resulteert de hier beschreven aanpak (2 qPCR replics's die met 55 PCR cycli geamplificeerd worden) in een detectielimiet van 500 eDNA moleculen per spons. Met andere woorden, als er minder dan 500 eDNA moleculen op de spons aanwezig zijn, neemt de kans sterk toe dat er geen amplificatie in de PCR waargenomen wordt.

Bij het uitvoeren van de extracties en PCR's zijn negatieve controles uitgevoerd, waarbij respectievelijk DNA-vrije lysis buffer en low TE buffer gebruikt zijn. Zodoende kon vastgesteld worden of er sprake is van contaminaties tijdens het uitvoeren van de DNA-extractie en PCR.

Met behulp van metabarcoding is de soortsaamenstelling bepaald in alle monsters waarin minimaal één van de twee replica's positief was (met uitzondering van 2 monsters, die zullen toegevoegd worden bij de eindrapportage). Van de monsters uit eerder onderzoek (van Bochove *et al.* 2024) is alleen metabarcoding resultaat positief beschouwd als minimaal 50% (6 van de 12) van de replica's positief resultaat gaven.

2.2.4 Data-analyse panden

eDNA concentratie per type verblijfplaats bij aanwezigheid van dieren

Onderzocht is of de eDNA concentratie per functie verschilt op moment dat er dieren aanwezig zijn (zoals vastgesteld door middel van protocolonderzoek). Hiervoor is gebruik gemaakt van de volgende data:

- Kraamverblijven, bemonsterd in juni/juli 2024 (n=3)
- Zomerverblijven, bemonsterd in juni/juli 2024 (n=13)
- Paarverblijven, bemonsterd in september 2024 (n=4)
- Winterverblijven, bemonsterd in december 2024/februari 2025 (n=11)

Met behulp van een Kruskal-Wallis test is vastgesteld of er statistisch significante verschillen in eDNA concentraties gemeten zijn tussen de verschillende type verblijfplaatsen.

eDNA concentraties per functie door het jaar heen

De eDNA concentratie is gemeten bij verblijfplaatsen met verschillende functies, op diverse momenten in het jaar. Dit betreffen steeds andere locaties. Om een beeld te krijgen van eventuele afbraak is de eDNA concentratie door het jaar heen uitgezet tegen de tijd. In deze analyse is geen drempelwaarde toegepast op de aan- of afwezigheid van eDNA. Alleen monsters waar in het geheel geen eDNA gemeten werd zijn als 0 opgenomen in deze data-analyse. Met behulp van lineaire en kwadratische regressie is gekeken of er sprake is van statistisch significante toe- of afname in de eDNA concentratie gedurende het jaar.

Detectiekans door het jaar heen

Om een beeld te krijgen van de algemene detectiekans van vleermuizen door het jaar heen is voor elk type verblijfplaats per maand de fractie locaties berekend waar eDNA gedetecteerd werd. Dit is ook gedaan voor de controle locaties. Deze analyse is gedaan met behulp van de resultaten van

qPCR-analyses waarmee alle soorten gedetecteerd kunnen worden, maar geen onderscheid tussen soorten gemaakt kan worden. Voor het bepalen van de aan- of afwezigheid heeft een drempelwaarde invloed op de detectiekans (Van Bochove *et al.* 2024b). Om inzicht te krijgen in de mate waarin de drempelwaarde de detectiekans beïnvloed zijn de uitkomsten van 4 niveaus met elkaar vergeleken:

- *Geen drempelwaarde.* Locatie wordt positief gescoord als in één van de PCR replica's eDNA gedetecteerd wordt, onafhankelijk van de DNA concentratie of ct-waarde. Bij de data afkomstig uit Van Bochove *et al.* 2024b gaat dit om 12 replica's; in huidige studie 2 replica's.
- *Drempelwaarde A: Minimaal 50% van de PCR replica's positief.* Locaties worden positief gescoord als in één van de PCR replica's eDNA gedetecteerd wordt, onafhankelijk van de DNA concentratie of ct-waarde. Bij de data afkomstig uit Van Bochove *et al.* 2024b gaat dit om 6 van de 12 replica's; in huidige studie minimaal 1 van de 2 replica's. In de huidige studie zijn PCR's uitgevoerd met 2 replica's en is er dus feitelijk geen verschil tussen "geen drempelwaarde" en "minimaal 50% van de replica's positief".
- *Drempelwaarde B: Minimaal 50% van de PCR replica's positief & minimaal 18,6 eDNA moleculen / mL conserveringsbuffer.* Dit staat in de analyse van Datura gelijk aan een maximale ct-waarde van 40. Deze drempelwaarde is gehanteerd in de data-analyses die uitgevoerd zijn in van Bochove *et al.* 2024b.
- *Drempelwaarde C: Minimaal 50% van de PCR replica's positief & een maximale ct-waarde van 37.* Deze drempelwaarde wordt gehanteerd in de studie van Arcadis, 2024 (validatiestudie van Arcadis en Unitura). Dit komt in de analyse van Datura globaal overeen met een concentratie van circa 246 moleculen / mL conserveringsbuffer.

Soortsamenstelling

De data is schematisch inzichtelijk gemaakt waarbij onderscheid gemaakt is per periode van bemonsteren, per soort en per functie. Een soort is hierbij aanwezig gescoord als minimaal 6 van de 12 of 1 van de 2 replica's positieve uitslag gaf (minimaal 50% van de replica's positief). Er is geen drempelwaarde gehanteerd op de ct-waarde of eDNA concentratie.

2.2 Afbraakexperiment kasten

2.2.1 Opzet kastenexperiment

Het kastenexperiment bestaat uit 54 kasten die bewoond zijn geweest door vleermuizen en 6 controle kasten (nieuw uit de verpakking). Deze kasten zijn verwijderd van de plek waar ze hingen, en er is direct een nieuwe kast voor in de plaats gehangen. Een globaal overzicht van de herkomst van de kasten, het type kast, en de waargenomen soorten in deze kasten is opgenomen in tabel 3. Een gedetailleerd overzicht van de kasten en de "behandeling" is opgenomen in bijlagen 5.

Deze kasten zijn op 4 locaties buiten, in een loods en in het laboratorium van Datura geplaatst om gedurende een periode de afbraak van eDNA te volgen. Op elk van deze locaties is ook een controle kast geplaatst. De kasten zijn deels in de zon en deels in de schaduw gehangen. Bovendien is gevarieerd in de oriëntatie (noord, oost, zuid, west). Zodoende is gepoogd variatie te realiseren in de temperatuur, vochtigheid, oriëntatie mate van directe zoninstraling. De kasten zijn voorzien van temperatuur en vochtigheid sensoren. Details van de locatie en positionering van de kasten in het experiment is opgenomen in bijlagen 4. De kasten zijn met gaas ontoegankelijk gemaakt voor vleermuizen.

Tabel 2. Overzicht van de herkomst van de kasten, het type kast en de vleermuissoorten die in 2024 vastgesteld zijn bij visuele controles van de kasten. Een deel van de monitoringsgegevens van Lonnekerberg zijn nog niet beschikbaar ten tijde van het opstellen van deze tussenrapportage. Bekend is dat vale- en bosvleermuis gebruik maken van kasten bij Lonnekerberg, maar het is niet zeker of daar ook sprake van is in de kasten die gebruikt zijn in dit experiment gezien slechts een deel van de kasten bij Lonnekerberg zijn gebruikt voor het experiment.

		Vale vleermuis	Farjestaart	Rosse vleermuis	Gewone dwergvleermuis	Ruige dwergvleermuis	Bosvleermuis	Gewone grootvleermuis
	Type kast (aantal)							
Boxtel	Platte vivara (4x)						X	
Den Bosch	Platte vivara (4x)						X	
Lonnekerberg	Schwegler rond 2FN (12x) & 2FS rond deur (7x)	?	X				X	?
Nuland	Platte schwegler 1FF (7x)					X		X
Wamberg	Platte schwegler 1FF (20x)				X	X	X	X
Controles	Platte vivara (2x) & Schwegler rond 3FN (4x)							

De kasten zijn bij aanvang van het experiment bemonsterd. Deze bemonstering heeft twee doelen. Enerzijds bepalen we op basis van deze monsters van welke soorten er eDNA op de kasten aanwezig is. In het vervolg van het project zullen deze monsters gebruikt worden als nulmeting om de afbraak over tijd te volgen.

2.2.2 eDNA bemonstering van kasten

De kasten zijn bemonsterd met dezelfde monstermaterialen waarmee ook bemonsteringen bij panden uitgevoerd worden. Dit houdt in dat de bemonsteringen uitgevoerd zijn met een vochtige spons van circa 4 cm breed. De kasten van het type Vivara, schwegler 1FF (beide platte kasten) en Schwegler 2FN en 3FN (ronde kasten) zijn ingedeeld in 4 verticale stroken, die elk iets breder zijn dan de spons. Bij elke bemonstering wordt één strook bemonsterd, waardoor elke kast dus 4X bemonsterd kan worden (nulmeting en 3 herhaalmetingen). Bij de kasten van het type 2FS wordt de bemonstering gedaan op de deur van de kast. Bij 5 van deze deuren was een structuur op de kast gemonteerd is (zie afbeelding 3). Deze structuur bestaat uit 4 niveaus. Bij elke ronde bemonsteringen is één niveau bemonsterd (1x de ruimte tussen de deur en de houten opbouw en 3x de ruimte tussen de plateaus van de structuur). Bij 2 van de 2FS kasten was er geen structuur op de deur gemonteerd, en is de deur zelf in 4 verticale stroken opgedeeld. Elke te bemonsteren strook/ niveau is 5X bestreken met de ene kant van de spons, en 5X met de andere kant van de spons. Vervolgens is de spons met daarop het eDNA overgebracht naar een potje met conserveringsbuffer. De positie in de kast die bemonsterd wordt is steeds random bepaald, zodat bij de data-analyse eventueel gecorrigeerd kan worden, als mocht blijken dat de hoeveelheid eDNA in alle kasten van een bepaald type samenhangt met de positie.



Afbeelding 3. Impressie van de kasten die gebruikt worden voor het afbraakexperiment. Linksboven: Schwegler 3FN (lijkt zeer sterk op 2FN). Rechtsboven: Schwegler 1FF. Linksonder: deur van 2FS kast zonder houten structuur. Rechtsonder: deur van Schwegler 2FS met houten structuur.

2.2.3 eDNA analyse kasten

In het laboratorium van Datura is met eDNA metabarcoding de soortsaamenstelling bepaald van de monsters die verzameld zijn bij aanvang van het experiment, op de kasten die in het verleden bewoond zijn geweest. De resultaten van de metabarcoding analyse worden gepresenteerd in dit rapport. In het vervolg van het project zal met soort-specifieke qPCRs onderzocht worden hoe snel

eDNA afbreekt onder verschillende omstandigheden. Daarbij zullen per kast qPCRs uitgevoerd worden voor soorten die de kast bewoond hebben, zoals vastgesteld op basis van visuele monitoring aangevuld met soorten waarvan eDNA aangetroffen is door middel van de eDNA metabarcoding analyse. In het vervolg van de studie zullen de resultaten van de qPCR-analyses van de controle kasten gebruikt worden om vast te stellen of (en zo ja in welke mate) er kruiscontaminatie ontstaat als gevolg van de opzet van het experiment.

2.2.4 Data-analyse kasten

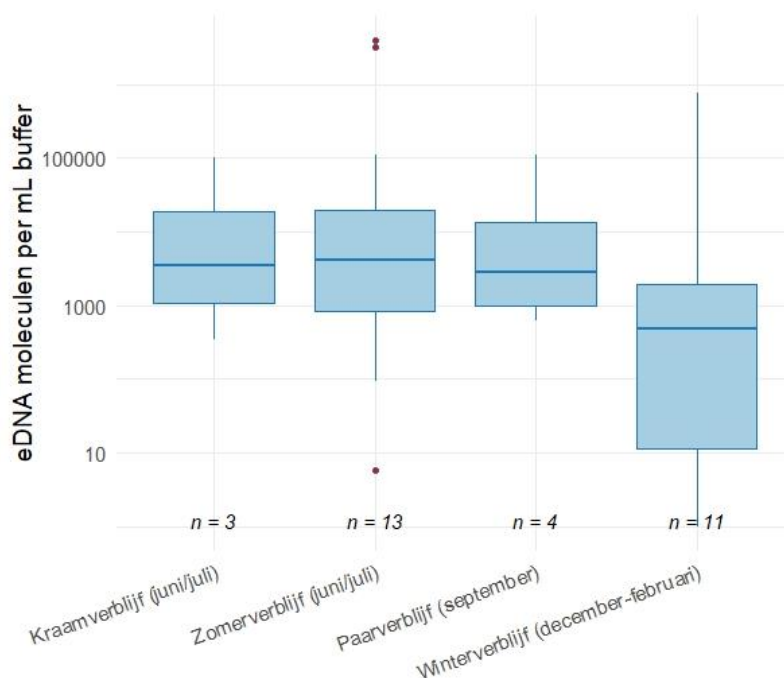
In deze tussenrapportage is enkel vastgesteld van welke soorten er eDNA aanwezig is op de kasten, en hoe zich dat verhoudt tot de monitoringsgegevens die beschikbaar zijn uit de visuele inspecties.

3. Resultaten

3.1 Panden onderzoek

eDNA concentratie per type verblijfplaats bij aanwezigheid van dieren

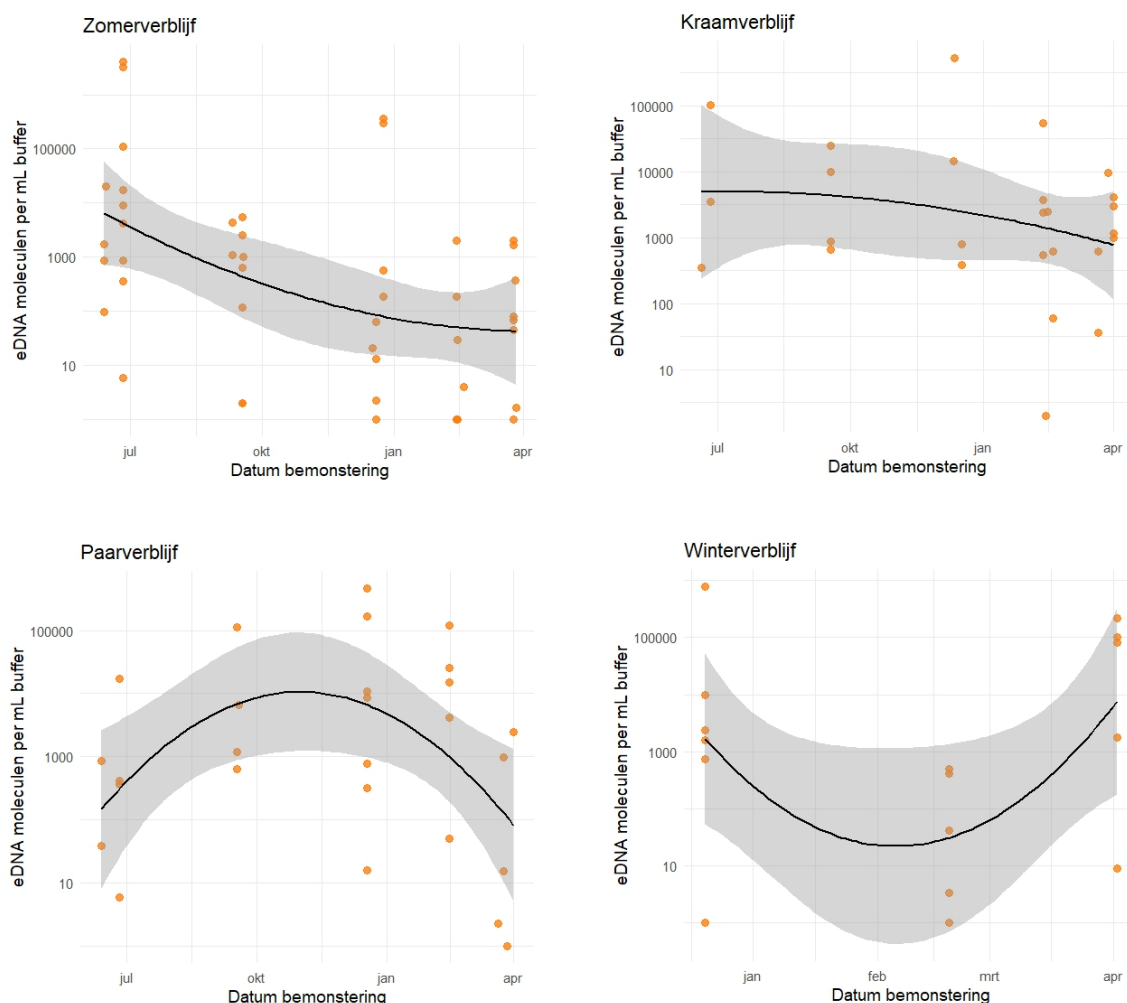
De eDNA concentratie bij verblijfplaatsen die bemonsterd zijn in de periode dat er naar alle waarschijnlijkheid dieren aanwezig zijn verschilt niet significant per functie en of grootte van de verblijfplaats, zie figuur 4 (Kruskal-Wallis chi-squared = 3,978, df = 3, p-value = 0.264). De spreiding in concentratie eDNA bij winterverblijven was relatief groter en lijkt iets lager te zijn dan bij andere type verblijfplaatsen. Dit verschil was echter niet statistisch significant.



Figuur 4. Relatie tussen eDNA concentratie en functie (en grootte) van verblijfplaatsen.

eDNA concentraties per functie door het jaar heen

De eDNA concentratie bij zomerverblijven toont een statistisch significante negatieve trend over tijd (zie figuur 5). De concentratie was het hoogst in de zomer, om vervolgens over de tijd af te nemen (Kwadratische regressie; Adjusted R-squared: 0,196; F-statistic: 6,48; p-waarde=0,003). Ook de eDNA concentratie bij paarverblijven toont een statistisch significante trend over tijd. De concentratie nam toe in de paarperiode, om vervolgens in de winterperiode weer af te nemen (Kwadratische regressie; Adjusted R-squared: 0,173; F-statistic: 3,71; p-waarde=0,039). De eDNA concentratie bij kraamverblijven toont geen statistisch significante trend over tijd (lineaire regressie: Adjusted R-squared: 0,066; F-waarde = 1,695; p-waarde=0,205). Bij de winterverblijfplaatsen in de winter lijkt er sprake te zijn van een trend (lagere eDNA concentratie in februari dan in december en april). Deze trend is in echter niet statistisch significant (Adjusted R-squared: -0,009; F-waarde = 0,88; p-waarde=0,427).



Figuur 5. De eDNA concentratie van verschillende type verblijfplaatsen uitgezet tegen de tijd. Het grijze gebied geeft de 95% betrouwbaarheidsinterval rondom het gemiddelde weer. Met andere woorden, het gemiddelde ligt met 95% in het grijze gebied. Alleen de grafieken van de paar- en zomerverblijven laten een statistisch significante trend zien. Voor de duidelijkheid, dit betreft geen tijdreeksen, maar steeds andere verblijfplaatsen.

Detectiekans door het jaar heen

De resultaten van de qPCR-analyses bij panden zijn weergegeven in figuur 6. Bij kraamverblijven blijft het eDNA het gehele jaar goed detecteerbaar en wordt de detectie nauwelijks beïnvloed door het toepassen van drempelwaardes. Bij kleinere verblijfplaatsen is de detectiekans het grootste in de periode dat dieren daadwerkelijk aanwezig zijn. Bij kleinere verblijfplaatsen verandert de detecteerbaarheid door het jaar, en wordt de detecteerbaarheid ook sterk beïnvloed door de keuze om wel of geen drempelwaarde te hanteren. Met name bij kleine zomerverblijfplaatsen is de detecteerbaarheid in de winterperiode lager dan in het najaar, de zomer en het voorjaar. Bij zomerverblijven blijkt de detectiekans in december zelfs 55% lager te zijn bij het toepassen van drempelwaarde C ten opzichte van het niet toepassen van een drempelwaarde.

Controles

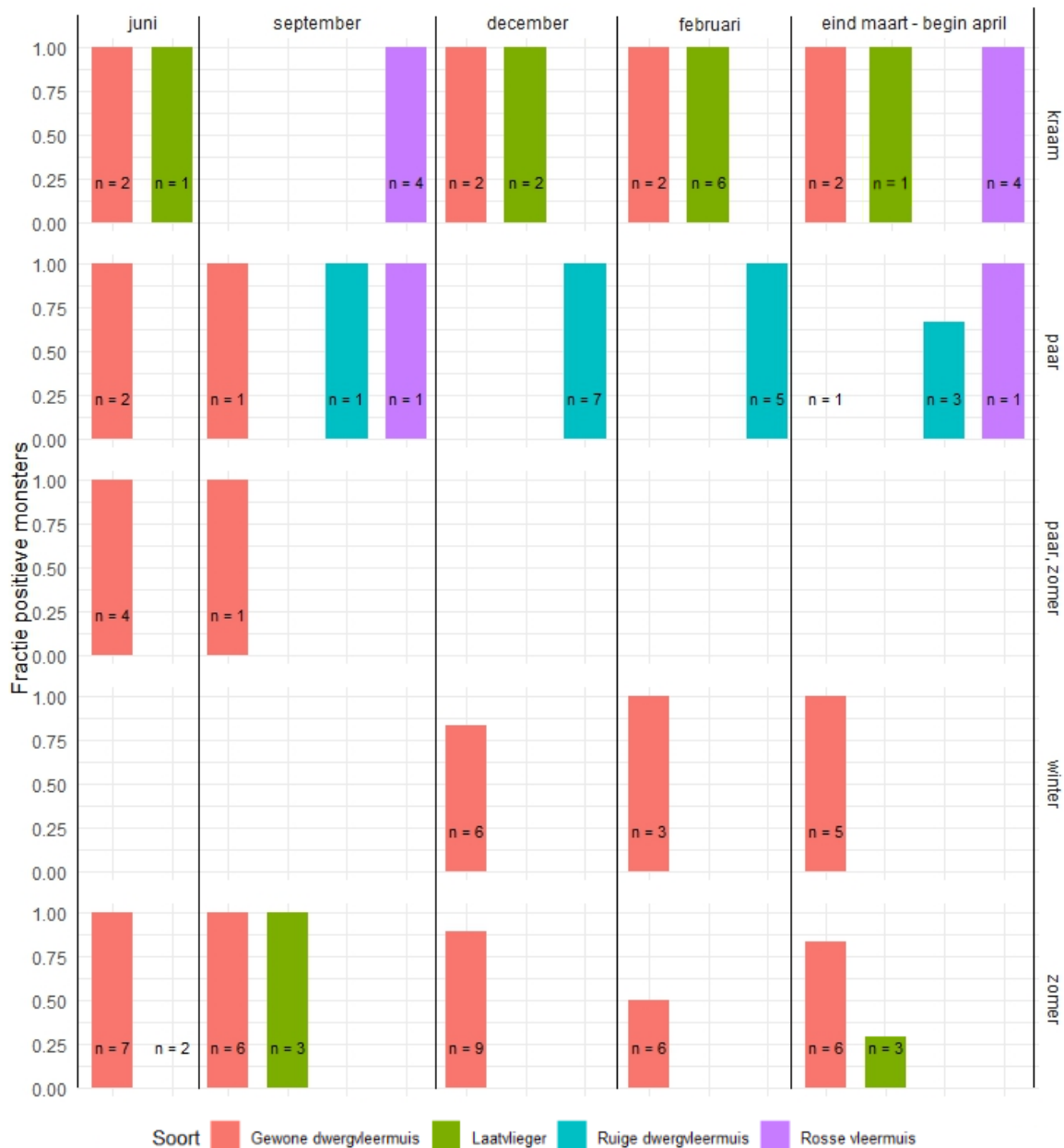
In de controles werden lage concentraties eDNA gedetecteerd als de qPCR-analyse uitgevoerd wordt met 12 replica's en de analyse als positief beschouwd wordt bij één positieve replica, zelfs op appartement complexen waar geen verblijfplaatsen aanwezig zijn. Bij het toepassen een drempelwaarde waarbij minimaal 50% van de PCR replica's positief dient te zijn (drempelwaarde A, of geen drempelwaarde als 2 PCR replica's toegepast worden) geven 3 van de 42 controles positief resultaat. Bij de twee 2 controles die met drempelwaarde A in september positief scoorde was een vleermuisverblijfplaats aanwezig in de direct aangrenzende woning (dus hetzelfde woonblok). Het controle monster dat in december positief scoorde met drempelwaarde A betreft een stuk muur zonder invliegopeningen van een flat waarin een massawinterverblijf van gewone dwergvleermuis aanwezig is. In de controles die verzameld zijn in februari – april is geheel geen eDNA aangetroffen.



Figuur 6. Van links naar rechts: Geen drempelwaarde, drempelwaarde A, B en C. Weergaven van de fractie van locaties waar eDNA gedetecteerd werd, gegeven de aanwezigheid van een verblijfplaats met een bepaalde functie. Voor overzichtelijkheid van het figuur zijn 5 locaties die zowel als zomerverblijf en paarverblijf gebruikt worden niet weergegeven. De verschillende kleuren geven de mate van strengheid weer van de toegepaste drempelwaarde. Voor de duidelijkheid, dit betreft geen tijdreeksen, maar steeds andere verblijfplaatsen. Een locatie die door gewone dwergvleermuis als kraamverblijf en door laatvlieger als zomerverblijf gebruikt wordt is voor de overzichtelijkheid weergegeven als kraamverblijf.

Metabarcoding analyse

Bij verblijfplaatsen die gevonden zijn met protocolonderzoek of door vrijwilligers gemonitord worden is met de eDNA metabarcoding analyse gemiddeld 1,5 soorten per pand gedetecteerd (gemiddelde exclusief de controles). Een totaal overzicht van de resultaten van de metabarcoding analyse in vergelijking tot protocolonderzoek en gegevens van vrijwilligers is opgenomen in bijlagen 1. In figuur 7 is weergegeven in welke fractie van de monsters de soort (zoals vastgesteld met bat-detector onderzoek) ook aangetoond werd door middel van eDNA.



Figuur 7. Weergaven van de fractie van locaties waar eDNA gedetecteerd werd van een bepaalde soort, gegeven de aanwezigheid van een verblijfplaats van de betreffende soort. Als de qPCR analyse negatief was werd er ook geen metabarcoding uitgevoerd, en werd het monster voor de betreffende soort in deze figuur negatief gescoord. Hierbij werd drempelwaarde A gehanteerd (minimaal 50% van de qPCR replica's moest positief resultaat geven voor een positieve score van het monster).

Soortsamenstelling bij panden

Gewone dwergvleermuis- Bij 61 van de 68 bemonsterde verblijfplaatsen van gewone dwergvleermuis werd eDNA gedetecteerd (90%). In alle gevallen werd met metabarcoding de aanwezigheid van eDNA van gewone dwergvleermuis bevestigd (op 3 locaties na, waarvan de metabarcoding analyse nog uitgevoerd moet worden). Daarnaast werd eDNA van gewone dwergvleermuis aangetroffen bij 26 locaties waar bij protocolonderzoek of onderzoek door vrijwilligers geen gewone dwergvleermuis geregistreerd werden.

Ruige dwergvleermuis- Deze soort werd bij 15 van de 16 (94%) locaties aangetroffen. Een paarverblijfplaats die bemonsterd werd in maart werd gemist. De veldmedewerker heeft een notitie gemaakt dat de locatie lastig te bemonsteren was vanaf de grond. Wel werd op deze locatie eDNA van gewone dwergvleermuis gedetecteerd. Op 20 locaties waar protocolonderzoek en/ of vrijwilligers geen verblijfplaatsen van ruige dwergvleermuis vaststelde werd wel eDNA van ruige dwergvleermuis vastgesteld.

Laatvlieger- Bij 4 van de 18 locaties waar laatvlieger vastgesteld werd, is geen eDNA van laatvlieger gedetecteerd. Op deze locaties werd echter wel eDNA van gewone en/of ruige dwergvleermuis gedetecteerd. In alle gevallen werden laatvlieger in – of uitvliegend waargenomen. Het betrof 2 zomerverblijven die in 2023 vastgesteld werden en die gemist werden met een eDNA bemonstering in 2024. De andere twee locaties betroffen zomerverblijfplaatsen die in 2024 vastgesteld werden met protocolonderzoek er werden gemist bij een bemonstering eind maart. Bij één van deze locaties werd door de veldmedewerker genoteerd dat de locatie “lastig te bemonsteren was als gevolg van dichtsmeren van de pannen met ruw cement”. Tenslotte werd op 9 locaties eDNA van laatvlieger gedetecteerd, waar deze soort met protocolonderzoek niet gedetecteerd werd.

Rosse vleermuis- Bij alle 10 bemonsterde verblijfplaatsen van rosse vleermuis werd de soort ook daadwerkelijk aangetoond. Daarnaast werd eDNA van rosse vleermuis aangetroffen op 3 locaties waar protocolonderzoek verblijfplaatsen van andere soorten aantrof (laatvlieger 2x, gewone dwergvleermuis 1x).

Overige soorten

Naast de genoemde soorten werd eenmalig eDNA gedetecteerd van Kuhls dwergvleermuis, baardvleermuis, tweekleurige vleermuis en meervleermuis. Bij alle 4 waarnemingen betreft het zeer lage concentraties eDNA.

Lastige omstandigheden bij bemonsteren

In tabel 3 is een overzicht opgenomen van 4 locaties waar niet alle uitvliegopeningen bemonsterd konden worden. In 2 twee gevallen werd er een soort gemist met eDNA die met protocolonderzoek wel aangetroffen werd, en in één geval werd er helemaal geen eDNA gedetecteerd.

Tabel 3. Overzicht van 4 locaties waar geen volledige bemonstering uitgevoerd is.

Type verblijfplaats	qPCR reps positief	Metabarcoding	Oorzaak onvolledige bemonstering
Zomerverblijf laatvlieger Bemonsterd in maart	2/2	laatvlieger, gewone dwergvleermuis	Moeite met bemonsteren, niet alle uitvliegopeningen bereikbaar voor de stok
Paarverblijf ruige dwergvleermuis Bemonsterd in maart	1/2	gewone dwergvleermuis	Moeite met bemonsteren, pannen achter een betonlaag, niet goed bereikbaar vanaf de grond
Zomerverblijf gewone dwergvleermuis Bemonsterd in december	0/2		Niet volledig kunnen bemonsteren in verband met toegang
Kraamverblijfplaats gewone dwergvleermuis/laatvlieger bemonsterd in maart	2/2	gewone dwergvleermuis	Moeite met bemonsteren, pannen achter een betonlaag, niet goed bereikbaar vanaf de grond

3.2 Vleermuiskasten

Op alle kasten is eDNA van vleermuizen aangetroffen. Dit betrof eDNA van gewone dwergvleermuis, ruige dwergvleermuis, rosse vleermuis, gewone grootvleermuis, franjestaart en vale vleermuis (zie bijlagen 4 voor een gedetailleerd overzicht). Voor zover de gegevens beschikbaar waren werd met uitzondering van één kast, in alle kasten tenminste de soorten aangetroffen die ook vastgesteld zijn aan de hand van visuele inspecties die gedaan zijn in 2024. De uitzondering betreft een kast afkomstig van Nuland, 's- Hertogenbosch, waar op 6 mei 2024 een gewone grootoorvleermuis vastgesteld werd. Op 31 januari 2025 werd deze kast bemonsterd, en er werd uitsluitend eDNA van rosse vleermuis aangetroffen (een soort die met de visuele inspecties niet in deze kast gezien werd, wel in andere kasten uit dezelfde omgeving). Naast de soorten die aangetroffen werden middels de inspecties, werd er vaak ook eDNA gevonden van andere soorten. Er werd in de kasten alleen eDNA aangetroffen van soorten waarvan het bekend is dat ze gebruik maken van de kasten in de betreffende omgeving.

4. Discussie

Drempelwaardes

Drempelwaarde C: Minimaal 50% van de PCR replica's positief & een maximale ct-waarde van 37.

De laagste detectiekans wordt gerealiseerd bij het toepassen van drempelwaarde C. Met het qPCR-assay van Datura staat dat ongeveer gelijk aan een detectie van 246 moleculen per mL conserveringsbuffer. De drempelwaarde C zoals toegepast door Datura is mogelijk niet geheel vergelijkbaar met andere studies omdat de laboratoriumprocedure verschilt. Bij het toepassen van deze drempelwaarde C realiseren Arcadis en Unitura (2024) in de zomer een positieve detectie bij 15 van de 19 zomerverblijfplaatsen (79%) van voornamelijk gewone dwergvleermuis. Het toepassing van deze drempelwaarde bij zomerverblijven die in juni bemonsterd zijn resulteert in deze studie in positieve detectie bij 8 van de 9 zomerverblijven (90%). Het toepassen drempelwaarde C op metingen bij paarverblijven in de zomer, en zomerverblijfplaatsen in de winter en vroege voorjaar resulteert in deze studie echter in een veel lager percentage positieve detecties (33-40% positieve detecties). Het aannemelijk maken van afwezigheid is dus voor paarverblijven in de zomer, en zomerverblijfplaatsen in de winter niet mogelijk bij het hanteren van drempelwaarde C. Het jaarrond inzetten van eDNA methode waarbij drempelwaarde C gehanteerd wordt leidt dus tot het structureel missen van verblijfplaatsen. Daar staat tegenover dat bij het hanteren drempelwaarde C alleen eDNA gedetecteerd wordt bij verblijfplaatsen, en bij geen van de controle locaties. Als er eDNA gedetecteerd wordt bij toepassen van drempelwaarde C dan is het zeer aannemelijk dat er sprake is van de daadwerkelijke verblijfplaats. Om de vergelijkbaarheid tussen laboratoria in de toekomst te verbeteren is het zinvol om in deze drempelwaarde en de uitkomsten van analyses in toekomst te rapporteren in aantallen eDNA moleculen / mL conserveringsbuffer omdat deze eenheid beter te vergelijken valt omdat deze niet afhankelijk is van de efficiency van het toegepaste qPCR-assay.

Drempelwaarde B: Minimaal 50% van de PCR replica's positief & minimaal 18,6 eDNA moleculen / mL conserveringsbuffer.

Drempelwaarde B is toegepast door van Bochove *et al.* 2024b en staat ongeveer gelijk aan de ct-waarde van maximaal 40. Drempelwaarde B resulteert in hogere detectiekansen dan wanneer een curve alleen positief gescoord wordt bij een ct-waarde kleiner dan 37 (drempelwaarde C). Dit geldt met name in de periode van het jaar dat vleermuizen niet, of minder gebruik maken van de uitvliegopening. Bij het toepassen van drempelwaarde B wordt geen eDNA gedetecteerd in de controles. Drempelwaarde B is daarmee een betrouwbaardere drempelwaarde dan drempelwaarde C. Met andere woorden, als er een drempelwaarde gebruikt wordt, dan kan het beste drempelwaarde B toegepast worden.

Drempelwaarde A: Minimaal 50% van de PCR replica's positief / geen drempelwaarde

Het toepassen van geen drempelwaarde bij 2 replica's of het toepassen van drempelwaarde van minimaal 50% positieve replica's indien er 4 of meer replica's toegepast worden (drempelwaarde A) geeft een hoge detectiekans. Ook geeft deze aanpak een vermindering van het optreden van vals positieve waarnemingen ten opzichte van een aanpak waarmee 12 PCR replica's toegepast worden en een monster positief gescoord wordt als één van deze replica's een positieve uitslag geeft. Het is daarmee de aanbevolen methode.

Als de qPCR uitgevoerd wordt met 2 replica's dan komt een drempelwaarde van minimaal 50% van de PCR replica's positief (drempelwaarde A) overeen met het toepassen van geen drempelwaarde. Het toepassen van drempelwaarde A heeft dus alleen meerwaarde als er meer dan 2 replica's toegepast worden zoals door van Bochove *et al.* 2024b. Het toepassen van meer dan 2 replica's resulteert echter niet in meer positieve detecties bij verblijfplaatsen. Alleen bij controle locaties wordt bij toepassen van meer dan 2 replica's extra positieve detectie gerealiseerd. Dit is echter onwenselijk, dus het toepassen van meer dan 2 replica's heeft geen toegevoegde waarde. Als het doel is om afwezigheid van vleermuizen aan te tonen dan is het uitvoeren van een qPCR met 2 replica's, zonder een drempelwaarde toe te passen, dus de meest optimale keuze.

De test zoals deze uitgevoerd is in deze studie resulteert in een detectielimiet van 500 eDNA moleculen per spons. Deze waarde is gebaseerd op de aanname dat er sprake is van een extractie efficiëntie van 100%. In de praktijk zal dit niet het geval zijn, en zal de detectielimiet dus hoger zijn. Het verdient de aanbeveling om de detectielimiet in de toekomst nauwkeuriger te bepalen op basis van een rendementscontrole. Dit is mogelijk door exogeen DNA toe te voegen aan de conserveringsbuffer en deze te kwantificeren met behulp van qPCR.

In deze studie resulteerde drempelwaarde A / geen drempelwaarde bij 2 replica's in "vals positief" resultaat bij 3 van 42 controle locaties (7%). Dit betrof twee rijtjeswoningen waarbij een verblijfplaats aanwezig was in een direct aangrenzende woning (bemonstering in juni) en een muur van een flat waarin een massawinterverblijfplaats aanwezig is (bemonstering in december). De verwachting was dat in de zomer de kans op vals positieven iets groter is, echter werden "vals positieven" ook in de zomer alleen waargenomen op 2 locaties waar in het betreffende woonblok een verblijfplaats aanwezig was. Het is dus zeer discutabel of de "vals positieve" waarnemingen echt als vals positief beschouwd moeten. Immers, bij alle 3 vals positieve locaties werd het betreffende pand of woonblok gebruikt als verblijfplaats door vleermuizen. Woonblokken, appartementencomplexen en objecten die niet door vleermuizen gebruikt worden als verblijfplaats resulteerde in geen enkel geval in vals positieve waarneming.

De "vals positieve" waarnemingen kunnen mogelijk verklaard worden door afgifte van eDNA als gevolg van zwermactiviteit. Dat zou ook kunnen verklaren waarom controles in de zomerperiode op 2 locaties "vals positief" resultaat gaven. In de winterperiode vindt er minder zwermactiviteit plaats waardoor de kans mogelijk kleiner is dat er eDNA gedetecteerd wordt op andere plekken dan in de uitvliegopeningen. De enige locatie waar in de winter eDNA in de controle gedetecteerd werd was bij een massawinterverblijf waarbij bekend is dat er in de winter gezwermd wordt.

Detecteerbaarheid van eDNA gedurende het seizoen

Bij alle kraamverblijven van gewone dwergvleermuis, laatvlieger en rosse vleermuis werd eDNA gedetecteerd, ongeacht in welke periode van het jaar bemonsterd werd. Bij kraamverblijven werd het hele jaar gemiddeld dezelfde eDNA concentratie gemeten, terwijl bij paar- en zomerverblijven (voornamelijk van gewone en ruige dwergvleermuis) buiten de paartijd en zomerperiode respectievelijk gemiddeld lagere eDNA concentraties gemeten worden. Dat kan niet verklaard worden door een verschillende uitgangskoncentratie, gezien bij (kleine) zomerverblijven en (grote) kraamverblijven gemiddeld evenveel eDNA gemeten werd op moment dat er dieren aanwezig zijn. De meest plausibele verklaring lijkt te zijn dat de kraamverblijfplaatsen ook buiten de kraamperiode bezocht worden door vleermuizen, waardoor de hoeveelheid eDNA gedurende het hele jaar op peil blijft.

Indien geen drempelwaarde gehanteerd wordt (of drempelwaarde A als 4 of meer qPCR replica's toegepast worden) zijn verblijfplaatsen ook goed te detecteren op momenten in het jaar dat er vermoedelijk geen of minder activiteit is. Er zijn relatief veel zomerverblijfplaatsen gemist in februari. Bij twee van de drie gemiste verblijfplaatsen betreft dit een waarneming van zwermende dieren rond het gebouw, maar werden tijdens het uitgevoerde protocolonderzoek geen aantikkende en uit- of invliegende dieren vastgesteld. Mogelijk is hier foerageergedrag aangezien voor zwermgedrag. In 3 gevallen waarbij een verblijfplaats van de betreffende soort geen eDNA gedetecteerd werd in december (1 locatie) en maart (2 locaties) kan dit verklaard worden doordat slechts een deel van de potentiële uitvliegopeningen bemonsterd kon worden. Desondanks kon in de winter bij 19 van de 24 zomerverblijven (79%) in minimaal 1 van de 2 qPCR replica's eDNA van vleermuizen gedetecteerd worden. Ook kon in de winter bij 15 van de 17 paarverblijven (88%), 19 van de 19 kraamverblijven (100%) en 15 van de 16 (93%) winterverblijven in minimaal 1 van de 2 qPCR replica's eDNA van vleermuizen gedetecteerd worden. Een qPCR met 2 replica's, zonder aanvullende drempelwaarde geeft in combinatie met de sponsmethode dus goede resultaten, ook als op dat moment geen dieren aanwezig zijn. Om paarverblijven in de zomerperiode, en zomerverblijven in de winterperiode te kunnen detecteren is het essentieel om geen aanvullende drempelwaarde te hanteren. Bij toepassen van aanvullende drempelwaardes neemt de kans toe dat er verblijfplaatsen gemist worden als er op moment van bemonsteren geen activiteit is bij de verblijfplaats. Hierbij dient wel opgemerkt te worden dat met de spons in de uitvliegopeningen bemonsterd werd. In deze studie is niet onderzocht of eDNA rondom uitvliegopeningen dat bemonsterd kan worden met een roller even snel afbreekt, en of met een roller even hoge jaarronde detectiekansen gerealiseerd kunnen worden. Ook is mogelijk dat met een roller andere hoeveelheden eDNA bemonsterd worden dan met een spons gezien met de spons in de uitvliegopeningen openingen bemonsterd wordt, en met een roller rondom de uitvliegopeningen. Ook is onduidelijk of de kans op vals positieve monsters bij een sponsbemonstering even groot is als bij de rollermethode. Nader onderzoek kan hier meer duidelijkheid in geven.

Het is onbekend wanneer het eDNA dat gedetecteerd wordt in de winter afgegeven is. Het in de winter gedetecteerde eDNA zou eDNA kunnen betreffen dat eerder in het seizoen afgegeven is. Als dit het geval is, dan kan op basis van aanwezigheid van eDNA in de winter niet geconcludeerd worden dat er sprake is van aanwezigheid van overwinterende dieren. Het zou echter ook kunnen dat bij verblijfplaatsen die op basis van protocolonderzoek gelabeld zijn als kraam, zomer- en paarverblijfplaats ook in de winter eDNA afgegeven wordt door vleermuizen. In dat geval wordt er bij deze verblijfplaatsen dus geen eDNA gedetecteerd dat eerder in het seizoen afgegeven is, maar eDNA dat recent afgegeven is. De voorlopige hypothese is dat het eDNA dat in de winter gedetecteerd wordt een combinatie is van eDNA dat eerder afgegeven is, en eDNA dat gedurende de winter (incidenteel) afgegeven wordt. De studie naar afbraaksnelheid van eDNA op kasten kan hier extra duidelijkheid over verschaffen.

In deze studie zijn voornamelijk verblijfplaatsen van gewone dwergvleermuis (n=68) en in mindere mate van ruige dwergvleermuis (n=16), laatvlieger (n=18) en rosse vleermuis (n=10) onderzocht. De data in deze studie laat voor laatvlieger, ruige dwergvleermuis en rosse vleermuis vergelijkbare trends zien als voor gewone dwergvleermuis. Conclusies die getrokken kunnen worden op basis van deze studie hebben echter voornamelijk betrekking op gewone dwergvleermuis. Van soorten als tweekleurige vleermuis en meervleermuis is bekend dat ze uit kunnen vliegen bij de nok, en de nok is in deze studie niet bemonsterd. Het is daarmee nog onzeker of het bemonsteringsprotocol dat in deze studie toegepast is ook effectief is voor tweekleurige vleermuis en meervleermuis. Op basis van deze studie kan dus niet vastgesteld worden of de detecteerbaarheid door het jaar heen

van gewone dwergvleermuis hetzelfde is als bij tweekleurige vleermuis, meervleermuis en andere in deze studie niet of minder goed onderzochte soorten.

Onderzoek bij winterverblijven

Bij flats die door gewone dwergvleermuis als massawinterverblijf in gebruik zijn werd per monster steeds één dilatatievoeg bemonsterd. Niet bij alle dilatatievoegen werd echter eDNA gedetecteerd, ondanks dat er (diep in de voeg) een dier zichtbaar was. Mogelijk is in de betreffende dilatatievoeg weinig eDNA afgegeven doordat het dier in winterrust is. Het zou echter ook kunnen dat het dier van elders naar het punt gekropen is waar het zat tijdens de bemonstering, en dat de bemonsterde voeg niet als invliegopening gebruikt is. Het steeds bemonsteren van één dilatatievoeg leidde tot veel spreiding in eDNA concentratie tussen de monsters, en in sommige monsters werd zelfs geen eDNA gedetecteerd. Hieruit kan geconcludeerd worden dat als het doel is om afwezigheid van vleermuizen in een pand aan te tonen, het van belang is dat alle potentiële uitvliegopeningen bemonsterd worden. Ondanks dat steeds maar één dilatatievoeg per monster bestreken werd, is toch in 88% van de monsters eDNA gedetecteerd als drempelwaarde A/ geen drempelwaarde gehanteerd werd. Het is dus aannemelijk dat als alle potentiële uitvliegopeningen bemonsterd worden, een voldoende hoge detectiekans gerealiseerd kan worden om in de winter afwezigheid van overwinterende gewone dwergvleermuizen met voldoende betrouwbaarheid aannemelijk te maken.

Bij winterverblijven van gewone dwergvleermuis is dermate weinig eDNA aanwezig dat in de winter geen drempelwaarde gehanteerd moet worden om aan- of afwezigheid aan te tonen. De kans dat er in de winter eDNA gedetecteerd wordt afkomstig van vleermuizen die in de omgeving vliegen is klein. In deze studie werd bij het toepassen van geen drempelwaarde/ drempelwaarde A slechts in 1 van de 30 controles die in de winter verzameld werden eDNA gedetecteerd. Dit betrof bovendien een monster van een muur van een pand waarin een massawinterverblijf huist.

Onvolledige bemonsteringen

Er zijn 4 locaties bemonsterd waar slechts een deel van de uitvliegopeningen bemonsterd konden worden. In 2 twee gevallen werd er een soort gemist met eDNA die met protocolonderzoek wel aangetroffen werd, en in één geval werd er helemaal geen eDNA gedetecteerd. Hieruit volgt dat het essentieel is om alle potentiële uitvliegopeningen te bemonsteren. Oorzaak dat niet alle uitvliegopeningen bemonsterd konden was in drie gevallen dat de uitvliegopeningen zich onder een hoek bevonden die niet vanaf de grond te bemonsteren was, bijvoorbeeld omdat er cement voor de kantpannen gesmeerd was. De uitvliegopening was daardoor niet goed vanaf de grond te bemonsteren met een telescoopstok. In deze gevallen zou een hoogwerker of lange ladder uitkomst kunnen bieden. In het vierde geval was de bewoner niet thuis en kon niet achter het huis bemonsterd worden.

Kuhls dwergvleermuis

Een bijzondere waarneming betrof de detectie van eDNA van Kuhls dwergvleermuis bij een woning in de Hoekse Waard. Kuhls dwergvleermuis verschilt genetisch dermate sterk van andere soorten dat het vrijwel uitgesloten is dat dit een sequencing fout betreft. Bouillard *et al.* (2020) beschrijven waarnemingen in Brussel en op waarnemingen.be is een goedgekeurde waarneming ingevoerd in 2019 net over de Nederlandse grens bij Brugge. Deze zuidelijke soort breid zich laatste jaren sterk uit naar het noorden (Bouillard *et al.* 2020). Het is dus niet onaannemelijk dat Kuhls dwergvleermuis Nederland bereikt heeft.

Kastenexperiment

Er is eDNA aangetroffen op de kasten die opgenomen zijn in het afbraakexperiment. De soortsaamenstelling kwam goed overeen met de verwachting. We verwachten dat de resultaten van de soort-specifieke qPCRs inzicht gaan geven in de afbraaksnelheid, en de factoren die de afbraaksnelheid beïnvloeden. De uitkomsten van het afbraakexperiment zullen gepresenteerd worden in de eindrapportage.

6. Conclusies

6.1 Voorlopige conclusies onderzoeksvragen

Kan de techniek de gehele winterrustperiode worden toegepast voor het vaststellen van aan- of afwezigheid van verblijfplaatsen van overwinterende dieren?

Bij winterverblijfplaatsen van gewone dwergvleermuis kan met de sponsmethode in de winter met voldoende zekerheid eDNA aangetoond worden, om bij afwezigheid van eDNA in de winter te concluderen dat overwinterende gewone dwergvleermuis waarschijnlijk afwezig zijn. Dit geldt alleen als er geen drempelwaarde, of bij 4 of meer PCR replica's drempelwaarde A toegepast wordt. Vanwege gebrek aan data kunnen er geen conclusies getrokken met betrekking tot de detecteerbaarheid van andere overwinterende soorten.

Kan tijdens de gehele winterrustperiode de aan- of afwezigheid van verblijfplaatsen van vleermuizen in gebouwen worden bepaald?

Bij het in de winter toepassen van een sponsbemonstering waarbij in de uitvliegopening bemonsterd werd, konden zomerverblijven, paarverblijven en kraamverblijven gedetecteerd worden bij respectievelijk 79%, 88% en 100% van de locaties, mits de qPCR uitgevoerd wordt met 2 replica's, zonder een aanvullende drempelwaarde toe te passen (qPCR uitvoeren met 55 cycli). De bemonsteringen zijn voornamelijk uitgevoerd bij verblijfplaatsen van gewone dwergvleermuis. Voor gewone dwergvleermuis kan de conclusie getrokken worden dat de eDNA sponsmethode een effectieve methode is om jaarrond aan- of afwezigheid te bepalen. Als er wel een drempelwaarde gehanteerd wordt is de kans groot dat zomerverblijven in de winter, en paarverblijven in de zomer gemist worden.

6.2 Overige conclusies

- De kans op vals positieve waarnemingen is in de winter zeer klein (alleen bij één muur van een massawinterverblijf werd eDNA gedetecteerd in een controle bij het toepassen van drempelwaarde A). De verwachting is dat in de zomer de kans op vals positieven iets groter is bij het toepassen van drempelwaarde A, echter werden "vals positieve" ook in de zomer alleen waargenomen op 2 locaties waar in het betreffende woonblok een verblijfplaats aanwezig was. Het is dus zeer discutabel of deze waarnemingen echt als vals positief beschouwd moeten worden.
- De eDNA concentratie bij kraamverblijven is het hele jaar min of meer gelijk (geen statistisch significante trend door het jaar).
- De eDNA concentratie bij zomerverblijven en paarverblijven is lager in de periode van het jaar dat er vermoedelijk geen of weinig activiteit is.

- Het niet bemonsteren van alle uitvliegopeningen leidt tot vals negatieve waarnemingen waardoor de eDNA sponsmethode niet voldoende zekerheid biedt. Het is dus essentieel dat alle uitvliegopeningen bemonsterd worden die toegang bieden tot de spouw.
- Op de kasten is eDNA van diverse soorten vleermuizen gedetecteerd. We verwachten dus een goede uitgangspositie te hebben om de afbraaksnelheid te kunnen bepalen. Resultaten en conclusies met betrekking tot de afbraaksnelheid, en de invloed van milieuparameters op de afbraak volgen in de eindrapportage.

7. Advies

- In het kader van na-isolatie projecten is het voorlopig advies in deze tussenrapportage om de eDNA sponsmethode jaarrond in te zetten om vleermuizen in de spouw op te sporen, mits de analyse positief gescoord wordt als minimaal 1 van de 2 qPCR replica's positieve uitslag geeft en er geen aanvullende drempelwaarde gehanteerd wordt. Op basis van dit onderzoek is het aannemelijk geworden dat als er wel drempelwaardes gehanteerd wordt de kans groot is dat zomerverblijven in de winter, en paarverblijven in de zomer, gemist worden. Op basis van de uitkomsten van het afbraakexperiment in combinatie met de resultaten van de bemonsteringen bij panden zal dit voorlopige advies verder aangescherpt worden.
- Systematische registratie van de bemonsterde openingen is belangrijk in verband met de kwaliteitswaarborging. Het is advies om een registratie optie beschikbaar te maken in de registratieapplicatie. Als (in het veld) blijkt dat niet alle potentiële uitvliegopeningen bemonsterd kunnen worden dan is het advies om dit te noteren. In dat geval kan afwezigheid van vleermuizen of vleermuissoorten niet betrouwbaar vastgesteld worden. Het is van belang om in veldprotocollen op te nemen dat een monster niet geldig is als niet alle uitvliegopeningen bemonsterd kunnen worden. In situaties waar de uitvliegopeningen moeilijk te bereiken zijn vanaf de grond, kan een hoogwerker soms uitkomst bieden.
- Als andere monstermethodes toegepast worden zoals het verzamelen van eDNA rond uitvliegopeningen met een roller (in plaats van met een spons in de uitvliegopening) dan is het van belang om te valideren of dit resulteert in even hoge jaarronde detectiekans als met de sponsmethode. In dit rapport zijn voorlopige conclusies getrokken met betrekking tot het jaarrond bemonsteren met behulp van de sponsmethode. Afwijkingen van deze methode, bijvoorbeeld door een roller te gebruiken, kunnen tot andere resultaten leiden. We adviseren om de jaarronde effectiviteit van andere monstermethodes te valideren middels een vergelijkbare aanpak als in deze studie, of door een ringtest te organiseren waarbij de effectiviteit van verschillende monstermethodes op verschillende momenten in het jaar met elkaar vergeleken wordt.
- Ten behoeve van het vaststellen of vleermuisvoorzieningen in gebruik zijn door vleermuizen kan het relevant zijn om de kans op vals positieve waarnemingen verder te minimaliseren. Bij het toepassen van de sponsmethode adviseren we in dergelijke situatie om drempelwaarde B te gebruiken (minimaal 18,6 moleculen per mL conserveringsbuffer, uitgaande dat de spons geconserveerd wordt in 40 mL conserveringsbuffer). Vals positieve waarnemingen lijken alleen te ontstaan in de buurt van verblijfplaatsen, mogelijk als gevolg van zwermgedrag. De kans hierop lijkt <7% te zijn. Bij het bepalen van drempelwaarde B is niet gecorrigeerd voor de extractie efficiëntie omdat die niet gemeten is in deze studie. Als er wel een correctie voor de extractie efficiëntie toegepast wordt zal deze drempelwaarde vermoedelijk iets hoger komen te liggen. Bij deze aanpak is de kans groter dat er geen eDNA gedetecteerd wordt als er geen activiteit is op moment van bemonstering. Als dergelijke drempelwaarde toegepast wordt is het advies om meerdere momenten in het jaar te bemonsteren, om zodoende de detectiekans te vergroten. Daarbij kan gedacht worden aan een monster in de kraamperiode (tussen 1 mei en 31 juli) en een monster in de paarperiode (tussen 1 september en 30 november).
- Een drempelwaarde op basis van ct-waarde is moeilijk te standaardiseren tussen laboratoria omdat verschillende extractieprocedures en qPCR assays toegepast worden.

Als gevolg daarvan kan de ct-waarde verschillen bij dezelfde concentratie eDNA in de conserveringsbuffer. Om de gevoeligheid van metingen te kunnen vergelijken tussen laboratoria heeft het meerwaarde om met behulp van een interne controle (die toegevoegd wordt aan de conserveringsbuffer) de extractie efficiëntie te bepalen.

- De adviezen in deze tussenrapportage zijn gebaseerd op onderzoek bij verblijfplaatsen van gewone dwergvleermuis, en in mindere mate ruige dwergvleermuis, laatvlieger en rosse vleermuis. Het verdient de aanbeveling om dit onderzoek uit te breiden met metingen bij verblijfplaatsen van andere gebouw bewonende vleermuissoorten. Het huidige bemonsteringsprotocol richt zich op de gevel. Er zijn echter verblijfplaatsen van tweekleurige vleermuis en meervleermuis bekend waar dieren via de nokpannen uitvliegen. We adviseren te onderzoeken of vleermuizen bij deze verblijfplaatsen gebruik maken van de spouw, en of het huidige protocol afdoende is om deze soorten te detecteren. Indien nodig kan onderzocht worden of het mogelijk is om een betrouwbaar protocol te ontwikkelen waarbij ook het dak bemonsterd wordt.

8. Dankwoord

We danken een ieder die een bijdrage geleverd heeft aan dit project. Speciale dank aan alle bewoners die toestemming gegeven hebben voor de bemonstering van hun woning. De volgende woningcorporatie hebben medewerking verleend: Kleurrijk Wonen (Roland Kuijpers), Bergopwaarts (Frank Maréchal) en HW Wonen (Saskia Maijer). Diverse organisaties hebben data van protocolonderzoeken ter beschikking gesteld: Blom Ecologie (Taric Schrader), Bureau Viridis (Lisa ter Burg), Zoogdiervereniging (Erik Korsten). Tenslotte danken we de deelnemers aan de klankbordgroep voor de waardevolle feedback gedurende dit onderzoek.

9. Literatuur

- van Bochove, K., Wellens-Roemaat, S. 2024a. Detecteren van vleermuizen in de spouw door middel van eDNA, een pilotstudie in Dokkum. Rapport RA23242, Datura, Wageningen.
- van Bochove, K., Twisk, P., Driessen, C., Menger, N. 2024b. Rapportage validatie vleermuisonderzoek aan de hand van sporen in en rond spouwmuren. Rapport RA24071, Datura, Wageningen.
- Bouillard, N., & Dekeukeleire, D. 2020. Kuhls dwergvleermuis bezoekt Brussel. Natuurpunt.be.
- Lankveld, W. 2024. De houdbaarheid van vleermuizen-eDNA bij verblijven in spouwmuren. Arcadis, Arnhem.
- Team stadnatuur Arcadis. 2024. eDNA als methode voor het detecteren van vleermuisverblijven. Arcadis, Arnhem.
- Vleermuisvakberaad Netwerk Groene Bureaus, Zoogdiervereniging en Gegevensautoriteit Natuur (2021). Vleermuisprotocol 2021.

Bijlagen 1. Overzicht van alle bemonsterde panden met een verblijfplaats inclusief resultaten van de eDNA qPCR en metabarcoding analyse. GD = Gewone dwergvleermuis. RD = Ruige dwergvleermuis. KD = Kuhls dwergvleermuis. LV = Laatzvlieger. RV = Rosse vleermuis. TV = Tweekleurige vleermuis. BV = Baardvleermuis. MV = Meervleermuis. Bij een deel van de locaties opgenomen hoeveel dieren er waargenomen zijn. Locaties waarbij dit nog niet achterhaalt is, is alleen een indicatie opgenomen of het een grote of kleine verblijfplaats betreft. De exacte aantallen van deze locaties worden opgenomen in de eindrapportage.

Plaats	Onderzoek	Gedrag	functie	aantal dieren waargenomen / indicatie grootte	soorten bat-detectie	datum eDNA bemonstering	eDNA moleculen / mL conserveringsbuffer	positieve qPCR replica's	Soorten metabarcoding
Delfzijl	protocol '24	uitvliegen & aantikken	paar	3	GD	2024-06-13	12/12	39	RD, GD
Delfzijl	protocol '24	invliegen	paar, zomer	1	GD	2024-06-13	12/12	854	RD, GD
Delfzijl	protocol '24	invliegen & uitsvliegen	zomer	1	GD	2024-06-13	12/12	94	GD
Delfzijl	protocol '24	invliegen & uitsvliegen	zomer	1	GD	2024-06-13	12/12	1693	GD
Delfzijl	protocol '24	invliegen	zomer	1	GD	2024-06-14	12/12	20051	GD
Vierbes	protocol '23	uitsvliegend	kraam	1	GD	2024-06-20	12/12	345	GD
Posterholt	protocol '23	uitsvliegend	kraam	20	GD	2024-06-26	12/12	3522	GD
Sint Odiliënberg	protocol '23	uitsvliegend	kraam	20	LV	2024-06-26	12/12	103191	LV, GD
Baarlo	protocol '24	baltsend	paar	1	GD	2024-06-26	12/12	417	GD
Baarlo	protocol '23	baltsend	paar, zomer	1	GD	2024-06-26	12/12	17292	GD
Posterholt	protocol '23	baltsend	paar, zomer	1	GD	2024-06-26	10/12	6	GD
Sint Odiliënberg	protocol '23	baltsend	paar, zomer	1	GD	2024-06-26	12/12	357	GD, BV
Echt	protocol '23	aantikken	zomer	1	GD	2024-06-26	12/12	4052906	GD
Echt	protocol '23	aantikkend	zomer	1	GD	2024-06-26	12/12	109359	GD
Echt	protocol '23	uitsvliegend	zomer	1	GD	2024-06-26	12/12	4165	GD
Echt	protocol '23	uitsvliegend	zomer	1	GD	2024-06-26	12/12	3239708	GD
Echt	protocol '23	uitsvliegend	zomer	1	LV	2024-06-26	12/12	8939	RD, GD
Sint Odiliënberg	protocol '23	invliegend	zomer	3	LV	2024-06-26	12/12	851	GD
Leerdam	protocol '23	onbekend	zomer	1	GD, LV	2024-09-10	12/12	1073	LV, RV, RD, GD
Leerdam	protocol '23		zomer	1	GD	2024-09-10	12/12	4410	GD
Steenwijk	vrijwilligers '24	uitsvliegend	kraam		RV	2024-09-17	11/12	879	RV
Steenwijk	vrijwilligers '24	uitsvliegend	kraam		RV	2024-09-17	12/12	9979	RV
Steenwijk	vrijwilligers '24	uitsvliegend	kraam		RV	2024-09-17	12/12	659	RV
Steenwijk	vrijwilligers '24	uitsvliegend	kraam		RV	2024-09-17	12/12	24914	RV
Schijndel	protocol '24	territoriaal gedrag	paar	1	GD	2024-09-17	12/12	1183	GD
Steenwijk	vrijwilligers '24	uitsvliegend	paar		RV	2024-09-17	12/12	112223	RV, RD
Schijndel	protocol '24	territoriaal gedrag	paar, zomer	1	GD	2024-09-17	12/12	628	GD
Schijndel	protocol '24	uitsvliegend	zomer	2	LV	2024-09-17	9/12	2	LV, RV, RD, GD
Schijndel	protocol '24	uitsvliegend	zomer	1	LV	2024-09-17	12/12	5552	LV, RD, GD, TV
Schijndel	protocol '24	invliegend	zomer	1	GD	2024-09-17	12/12	2523	GD
Sint-Oedenrode	protocol '24	invliegend	zomer	1	GD	2024-09-17	12/12	2	GD
Sint-Oedenrode	protocol '24	invliegend	zomer	2	GD	2024-09-17	12/12	116	LV, GD
Leerdam	protocol '24	?	paar	1	RD	2024-09-18	12/12	6611	RD, GD
Leerdam	protocol '23	?	zomer	1	GD	2024-09-18	12/12	995	GD
Leerdam	Protocol '24	in- en uitsvliegend	kraam		GD	2024-12-11	2/2	14485	GD
Wageningen	Vrijwilligers '24	in- en uitsvliegend	kraam		GD	2024-12-12	2/2	519299	GD
Liessel	Protocol '24	in- en uitsvliegend	kraam	groot	LV	2024-12-17	2/2	388	LV, RD, GD
Liessel	Protocol '24	in- en uitsvliegend	kraam	groot	LV	2024-12-17	1/2	802	LV, RD, GD
Asten	Protocol '24	in- en uitsvliegend	zomer	klein	GD	2024-12-17	2/2	21	GD
Strijen	Protocol '24	roepend	paar	klein	RD	2024-12-18	2/2	16	RD, GD
Strijen	Protocol '24	in- en uitsvliegend	paar	klein	RD	2024-12-18	2/2	10843	RD, GD
Mookhoek	Protocol '24	in- en uitsvliegend	paar	klein	RD	2024-12-18	2/2	320	KD, RD, GD
Mookhoek	Protocol '24	ter plaatse	paar	klein	RD	2024-12-18	2/2	774	RD, GD
Mookhoek	Protocol '24	in- en uitsvliegend	paar	klein	RD	2024-12-18	2/2	169146	RD, GD
Mookhoek	Protocol '24	in- en uitsvliegend	paar	klein	RD	2024-12-18	2/2	8746	RD, GD
Mookhoek	Protocol '24	in- en uitsvliegend	paar	klein	RD	2024-12-18	2/2	461421	RD, GD
Deurne	Protocol '24	in- en uitsvliegend	zomer	klein	GD	2024-12-19	1/2	2	LV, RD, GD
Deurne	Protocol '24	in- en uitsvliegend	zomer	klein	GD	2024-12-19	2/2	0	
Deurne	Protocol '24	in- en uitsvliegend	zomer	klein	GD	2024-12-19	2/2	62	LV, GD
Deurne	Protocol '24	in- en uitsvliegend	zomer	klein	GD	2024-12-19	1/2	13	LV, RD, GD
Tilburg	Visuele inspectie	ter plaatse	winter	klein	GD	2024-12-20	0/2	0	
Tilburg	Visuele inspectie	ter plaatse	winter	klein	GD	2024-12-20	2/2	9834	GD
Tilburg	Visuele inspectie	ter plaatse	winter	klein	GD	2024-12-20	2/2	741	GD

Plaats	Onderzoek	Gedrag	functie	aantal dieren waargenomen / indicatie grootte	soorten btdetector	datum eDNA bemonstering	eDNA moleculen / mL conserveringsbuffer	positieve qPCR replica's	Soorten metabarcoding
Tilburg	Visuele inspectie	ter plaatse	winter	klein	GD	2024-12-20	2/2	1560	GD
Tilburg	Visuele inspectie	ter plaatse	winter	klein	GD	2024-12-20	2/2	2347	GD
Tilburg	Visuele inspectie	ter plaatse	winter	klein	GD	2024-12-20	2/2	777633	GD
Leerdam	Protocol '24	in- en uitvliegend	zomer	klein	GD	2024-12-24	2/2	570	GD
Leerdam	Protocol '24	in- en uitvliegend	zomer	klein	GD	2024-12-24	2/2	304352	GD
Leerdam	Protocol '24	in- en uitvliegend	zomer	klein	GD	2024-12-24	2/2	364446	GD
Leerdam	Protocol '24	in- en uitvliegend	zomer	klein	GD	2024-12-24	2/2	188	GD
Wageningen	Vrijwilligers '24	in- en uitvliegend	kraam	groot	LV	2025-02-11	2/2	543	LV, GD
Wageningen	Vrijwilligers '24	in- en uitvliegend	kraam	groot	LV	2025-02-11	2/2	2380	LV
Wageningen	Vrijwilligers '24	in- en uitvliegend	kraam	groot	LV	2025-02-11	2/2	3756	LV
Wageningen	Vrijwilligers '24	in- en uitvliegend	kraam	groot	LV	2025-02-11	2/2	54000	LV
Arkel	Protocol '24	zwermend	kraam	groot	GD	2025-02-13	1/2	2	LV, GD
Leerdam	Protocol '23	?	zomer	klein	GD	2025-02-13	2/2	184	LV, GD
Leerdam	Protocol '23	zwermend	zomer	klein	GD	2025-02-13	0/2	0	
Leerdam	Protocol '23	zwermend	zomer	klein	GD	2025-02-13	0/2	0	
Leerdam	Protocol '23	zwermend	zomer	klein	GD	2025-02-13	2/2	1995	LV, RD, GD
Numansdorp	Protocol '24	uitvliegend	zomer	klein	GD	2025-02-14	0/2	0	
Numansdorp	Protocol '24	uitvliegend	zomer	klein	GD	2025-02-14	2/2	29	LV, RD, GD
Numansdorp	Protocol '24	roepend	paar	klein	RD	2025-02-14	2/2	15160	RD, GD
Numansdorp	Protocol '24	roepend	paar	klein	RD	2025-02-14	2/2	25747	RD, GD
Numansdorp	Protocol '24	in- en uitvliegend	paar	klein	RD	2025-02-14	2/2	119262	RD
Puttershoek	Protocol '24	roepend	paar	klein	RD	2025-02-14	2/2	50	RD, GD
Numansdorp	Protocol '24	invliegend	paar	klein	RD	2025-02-14	2/2	4130	RD, GD
Lichtenvoorde	Vrijwilligers '24	uitvliegend	kraam	groot	GD	2025-02-14	2/2	2442	GD
Leerdam	Protocol '23	in- en uitvliegend	kraam	groot	LV	2025-02-18	2/2	60	LV, GD
Leerdam	Protocol '23	in- en uitvliegend	kraam	groot	LV	2025-02-18	2/2	618	LV
Leerdam	Protocol '23	uitvliegend	zomer	klein	GD	2025-02-18	2/2	4	
Tilburg	Visuele inspectie	ter plaatse	winter	10	GD	2025-02-19	2/2	416	GD
Tilburg	Visuele inspectie	ter plaatse	winter	1	GD	2025-02-19	2/2	486	GD
Tilburg	Visuele inspectie	ter plaatse	winter	1	GD	2025-02-19	1/2	0	-
Tilburg	Visuele inspectie	ter plaatse	winter	1	GD	2025-02-19	1/2	3	-
Tilburg	Visuele inspectie	ter plaatse	winter	2	GD	2025-02-19	1/2	41	GD
Hoornaar	Protocol '24	in- en uitvliegend	kraam/ zomer	groot	GD/ LV	2025-03-21	2/2	37	GD
Giessenburg	Protocol '24	in- en uitvliegend	paar	klein	RD	2025-03-21	1/2	2	GD
Erichem	Protocol '24	in- en uitvliegend	kraam	groot	GD	2025-03-21	2/2	613	GD
Giessenburg	Protocol '24	roepend	paar	klein	RD	2025-03-25	2/2	15	RD, GD
Giessenburg	Protocol '24	roepend	paar	klein	RD	2025-03-25	2/2	980	RD, GD
Spijk	Protocol '24	invliegend	zomer	klein	GD	2025-03-25	2/2	1629	RD, GD
Spijk	Protocol '24	uitvliegend/ zwermend	zomer	klein	LV	2025-03-25	2/2	80	RD, GD
Arkel	Protocol '24	zwermend	zomer	klein	GD	2025-03-25	2/2	67	RD, GD
Arkel	Protocol '24	zwermend	zomer	klein	GD	2025-03-25	2/2	45	RD, GD
Arkel	Protocol '24	invliegend	zomer	klein	GD	2025-03-25	0/2	0	
Avezaath	Protocol '24	in- en uitvliegend	zomer	klein	GD	2025-03-25	2/2	2003	LV, RD, GD, MV
Haren	Protocol '24	in- en uitvliegend	zomer	klein	LV	2025-03-26	2/2	375	GD
Haren	Protocol '24	?	?	klein	?	2025-03-26	2/2	220765	RD, GD
Haren	Protocol '24	?	?	klein	?	2025-03-26	0/2	0	
Haren	Protocol '24	?	?	klein	?	2025-03-26	2/2	2673	RD
Assen	Protocol '24	?	?	klein	?	2025-03-26	0/2	0	
Assen	Protocol '24	?	?	klein	?	2025-03-26	2/2	773	GD
Assen	Protocol '24	?	?	klein	?	2025-03-26	1/2	10	RV, RD, GD
Nijmegen	Protocol '24	in- en uitvliegend	paar	klein	GD	2025-03-27	0/2	0	
Avezaath	Protocol '24	in- en uitvliegend	zomer	klein	GD	2025-03-27	1/2	2	GD
Boskoop	Protocol '24	in- en uitvliegend	kraam	groot	LV	2025-03-28	2/2	9563	LV, GD
Steenwijk	Vrijwilligers '24	uitvliegend	kraam	groot	RV	2025-04-01	2/2	4148	RV
Steenwijk	Vrijwilligers '24	uitvliegend	kraam	groot	RV	2025-04-01	2/2	3003	RV
Steenwijk	Vrijwilligers '24	uitvliegend	kraam	groot	RV	2025-04-01	2/2	997	RV
Steenwijk	Vrijwilligers '24	uitvliegend	paar	klein	RV	2025-04-01	2/2	2474	RV, RD
Steenwijk	Vrijwilligers '24	uitvliegend	kraam	groot	RV	2025-04-01	2/2	1154	RV, RD
Tilburg	Protocol '24	ter plaatse	1	klein	GD	2025-04-02	2/2	9	GD
Tilburg	Protocol '24	ter plaatse	1	klein	GD	2025-04-02	2/2	216063	GD
Tilburg	Protocol '24	ter plaatse	2	klein	GD	2025-04-02	2/2	100824	GD
Tilburg	Protocol '24	ter plaatse	2	klein	GD	2025-04-02	2/2	1783	GD
Tilburg	Protocol '24	ter plaatse	1	klein	GD	2025-04-02	2/2	80597	GD

Bijlagen 2. Overzicht van alle bemonsterde panden inclusief resultaten van de eDNA qPCR en metabarcoding analyse. GD = Gewone dwergvleermuis. RD = Ruige dwergvleermuis. RV = Rosse vleermuis.

Plaats	Omschrijving	Verblijfplaats bekend in complex of woonblok?	datum eDNA bemonstering	eDNA moleculen / mL conserveringsbuffer	positieve qPCR replica's	Soorten metabarcoding
Den Bosch	Ontoegankelijk appartementcomplex	Nee	2024-06-18	1/12	3	
Den Bosch	Ontoegankelijk appartementcomplex	Nee	2024-06-18	0/12	0	
Den Bosch	Ontoegankelijk appartementcomplex	Nee	2024-06-19	4/12	17	
Den Bosch	Ontoegankelijk appartementcomplex	Nee	2024-06-19	3/12	23	
Schijndel	Tussenwoning zonder invliegopening in de bemonsterde muur	Ja	2024-09-17	0/12	0	
Schijndel	Tussenwoning zonder invliegopening in de bemonsterde muur	Ja	2024-09-17	0/12	0	
Schijndel	Tussenwoning zonder invliegopening in de bemonsterde muur	Ja	2024-09-17	12/12	10	RV, RD
Schijndel	Tussenwoning zonder invliegopening in de bemonsterde muur	Ja	2024-09-17	0/12	0	
Schijndel	Tussenwoning zonder invliegopening in de bemonsterde muur	Ja	2024-09-17	0/12	0	
Sint-Oedenrode	Tussenwoning zonder invliegopening in de bemonsterde muur	Ja	2024-09-17	2/12	9	
Sint-Oedenrode	Tussenwoning zonder invliegopening in de bemonsterde muur	Ja	2024-09-17	11/12	1	RV, RD
Sint-Oedenrode	Tussenwoning zonder invliegopening in de bemonsterde muur	Ja	2024-09-17	4/12	0	
Liessel	Ontoegankelijke muur bij kraamverblijf	Ja	2024-12-17	0/2	0	
Tilburg	Ontoegankelijke muur van massawinterverblijf	Ja	2024-12-20	1/2	12	RV, GD
Tilburg	Dichtgekitte dilatatievoeg in flat met massawinterverblijf	Ja	2024-12-20	0/2	0	
Leerdam	Appartementen waar alleen kopgevels toegankelijk zijn.	Ja	2024-12-24	0/2	0	
Leerdam	Appartementen waar alleen kopgevels toegankelijk zijn.	Ja	2024-12-24	0/2	0	
Druten	Ontoegankelijke woning	Nee	2024-12-30	0/2	0	
Druten	Ontoegankelijke woning	Nee	2024-12-30	0/2	0	
Wageningen	Ontoegankelijke muur flat	Ja	2024-12-30	0/2	0	
Wageningen	Ontoegankelijke muur van kantoorgebouw	Nee	2024-12-30	0/2	0	
Wageningen	Ontoegankelijke muur van kantoorgebouw	Nee	2024-12-30	0/2	0	
Numansdorp	Ontoegankelijke muur bij paarverblijf	Ja	2025-02-14	0/2	0	
Leerdam	Appartementen waar alleen kopgevels toegankelijk zijn.	Ja	2025-02-18	0/2	0	
Leerdam	Appartementen waar alleen kopgevels toegankelijk zijn.	Ja	2025-02-18	0/2	0	
Leerdam	Appartementen waar alleen kopgevels toegankelijk zijn.	Ja	2025-02-18	0/2	0	
Leerdam	Appartementen waar alleen kopgevels toegankelijk zijn.	Ja	2025-02-18	0/2	0	
Tilburg	Ontoegankelijke muur van massawinterverblijf	Ja	2025-02-19	0/2	0	
Druten	Tuinhuis	Nee	2025-02-21	0/2	0	
Wageningen	Fietsenhok	Nee	2025-02-21	0/2	0	
Wageningen	Ontoegankelijke muur van kantoorgebouw	Nee	2025-02-21	0/2	0	
Wageningen	Fietsenhok	Nee	2025-02-21	0/2	0	
Leerdam	Appartementen waar alleen kopgevels toegankelijk zijn.	Ja	2025-03-28	0/2	0	
Leerdam	Appartementen waar alleen kopgevels toegankelijk zijn.	Ja	2025-03-28	0/2	0	
Leerdam	Appartementen waar alleen kopgevels toegankelijk zijn.	Ja	2025-03-28	0/2	0	
Wageningen	Fietsenhok	Nee	2025-04-04	0/2	0	
Wageningen	Ontoegankelijke muur van kantoorgebouw	Nee	2025-04-04	0/2	0	
Wageningen	Ontoegankelijke muur van kantoorgebouw	Nee	2025-04-04	0/2	0	
Wageningen	Fietsenhok	Nee	2025-04-04	0/2	0	
Wageningen	Fietsenhok	Nee	2025-04-04	0/2	0	
Wageningen	Electriciteitsgebouw	Nee	2025-04-04	0/2	0	
Wageningen	Electriciteitsgebouw	Nee	2025-04-04	0/2	0	

Protocol eDNA onderzoek bij panden met behulp van sponsmonsters

Het doel van het protocol is om vast te stellen of er wel of geen eDNA van vleermuizen aanwezig is bij openingen die toegang bieden tot potentiële vleermuisverblijfplaatsen in panden.

De sample kit bevat:

- 2 paar handschoenen
- Tweezijdige spons van 7 cm² of groter, op een steel. Bij voorkeur niet te dik, zodat de spons in open stootvoegen kan bemonsteren.
- Monsterpot met DNA conserveringsvloeistof (bijvoorbeeld CTAB-oplossing, Longmire's oplossing)

Let op: sampling kit pas in het veld open maken i.v.m. contaminatierisico!

Overige benodigdheden:

- Telescoopstok van minimaal 12 meter.
- Eventueel ladder of hoogwerker

Voorbereiding

1. Controleer de hoogte van het pand. Dit is van belang om vast te kunnen stellen of een ladder of hoogwerker nodig is om alle potentiële toegangsmogelijkheden voor vleermuizen te bemonsteren. In beginsel is een hoogwerker alleen nodig bij panden die hoger zijn dan 9 meter. Een ladder kan meerwaarde hebben om toegang te krijgen tot platte daken.

Bemonstering

2. Noteer het monsternummer, en leg vast bij welk adres/ deel van de woning het monster verzameld is.
3. De werkwijze hangt af van het type woning:
 - a. Bij een grondgebonden woning: verzamel in beginsel één monster per adres.
 - b. Bij een appartementencomplexen (<9 meter hoog)
 - i. Verzamel minimaal één monster per gevel.
 - ii. Verzamel minimaal één monster genomen te worden per 25 meter muurlengte.
 - c. Bij een appartementencomplexen (>9 meter hoog):
 - i. Verzamel minimaal één monster per gevel.
 - ii. Neem minimaal één monster voor elke 9 meter in de hoogte en 25 meter in de breedte.
4. Giet de monstervloeistof in de pot.
5. Dip de spons in de pot met vloeistof zodat deze vochtig is.
6. Monteer de spons op een telescoopstok. Zorg ervoor dat de spons niet in aanraking kan komen met de grond of andere objecten om vervuiling te voorkomen.
7. Verzamel submonsters door alle potentiële uitvliegopeningen (minimaal 8 mm breed) te bestrijken met de spons. Het is essentieel dat ALLE potentiële uitvliegopeningen bemonsterd worden. Als niet alle uitvliegopeningen bemonsterd kunnen worden dan dient dit genoteerd te worden. Afwezigheid van vleermuizen kan in dat geval niet betrouwbaar vastgesteld worden. Controleer de aanwezigheid van:
 - Open stootvoegen gevels
 - Open stootvoegen schoorsteen die grenst aan de gevel
 - Loodslabben die grenzen aan de gevel

- Speet onder vensterbank
- Spleten naast kozijnen en lateien
- Open ventilatievoegen
- Open of kapotte dilatatievoegen
- Openingen door beschadigingen metselwerk
- Trimrand (dakrand bij plat dak)
- Onder overige gevelpannen (nokpan hier niet vergeten!)
- Gevelbekleding zoals boeiborden
- Spleet tussen gevel en windveer of waterbord
- Spleten bij balkons
- Spleten beschadiging van verdiepingsvloer/ betonband
- Beschadigingen achter regenpijp

Als niet alle potentiële toegangsoeningen bemonsterd worden, dan kan de afwezigheid van vleermuizen niet betrouwbaar vastgesteld worden, en is de uitslag dus ongeldig.

8. Als alle toegangsoeningen bestreken zijn dan moeten schone handschoentjes aangetrokken worden. Raak met één handschoen niets aan, behalve de spons. Draai met deze schone handschoen de spons van de steel en deponeer deze in de monsterpot. Als toch andere materialen aangeraakt worden met deze handschoen, en dan er vervuiling optreden wat kan resulteren is vals positief signaal.

Bewaren van de monsters

9. De monsters dienen dezelfde dag verstuurd te worden bijvoorbeeld via reguliere post. Lukt dat niet, dan dient het monster opgeslagen te worden in de koelkast.
10. Lange termijn opslag (vanaf 2 weken) dient te gebeuren bij -20 °C tot -80 °C. Hou er echter rekening mee dat er verlies van DNA kan optreden bij het bevriezen en ontdooien van DNA.

Laboratoriumanalyse

11. In het laboratorium wordt een eDNA extractie uitgevoerd die geschikt is om eDNA te extraheren uit de toegepaste DNA conserveringsvloeistof.

Detectie van eDNA dient plaats te vinden door middel van PCR. Dit kan gerealiseerd worden via een qPCR of metabarcoding aanpak. Als dit via qPCR-analyse gebeurt dan dient getest te zijn of het toegepaste assay alle in Nederland voorkomende vleermuissoorten gevoelig kan detecteren. Indien metabarcoding toegepast wordt dan dienen primers gebruikt te worden die eDNA van zoogdieren of specifiekere vleermuizen amplificeren. Bij toepassen van metabarcoding dient van alle Nederlandse soorten een sequentie opgenomen te zijn in de DNA referentie database.

Bijlagen 4. Overzicht van de metabarcoding resultaten per kast, en vergelijking met monitoringsgegevens. Ontbrekende gegevens zijn aangegeven met “-”. Deze gegevens worden aangevuld bij de eindrapportage.

Afkoms	Datum verwijderen van kast	Laatste datum in 2024 dat betreffende soort waargenomen is in de kast					Aangetroffen met eDNA metabarcoding				
		Vale vleermuis	Ruige vleermuis	Ruige dwergvleermuis	Gewone dwergvleermuis	Gewone grootvleermuis	Vale vleermuis	Ruige vleermuis	Ruige dwergvleermuis	Gewone dwergvleermuis	Gewone grootvleermuis
Boxtel	1-8-2024					1-8	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
Boxtel	1-8-2024					1-8	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
Boxtel	1-8-2024					1-8	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
Boxtel	1-8-2024					1-8	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
s-Hertogenbosch	1-8-2024					1-8	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
s-Hertogenbosch	1-8-2024					1-8	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
s-Hertogenbosch	1-8-2024					1-8	-	-	-	-	-
s-Hertogenbosch	1-8-2024					1-8	-	-	-	-	-
Wamberg, 's-Hertogenbosch	24-12-2024				23-9		0,00	0,00	0,00	0,90	0,10
Wamberg, 's-Hertogenbosch	24-12-2024			13-12	28-9		0,00	0,00	0,57	0,41	0,02
Wamberg, 's-Hertogenbosch	17-12-2024			13-12	23-9		0,00	0,00	0,13	0,87	0,00
Wamberg, 's-Hertogenbosch	17-12-2024			13-12	28-9		0,00	0,00	0,82	0,18	0,00
Wamberg, 's-Hertogenbosch	17-12-2024			18-11	23-9		0,00	0,00	0,00	1,00	0,00
Wamberg, 's-Hertogenbosch	17-12-2024			30-11	17-10		0,00	0,00	0,05	0,95	0,00
Wamberg, 's-Hertogenbosch	17-12-2024				16-9		0,00	0,00	0,02	0,98	0,00
Wamberg, 's-Hertogenbosch	17-12-2024				9-9		0,00	0,00	0,01	0,99	0,00
Wamberg, 's-Hertogenbosch	17-12-2024				14-10		0,00	0,00	0,00	1,00	0,00
Wamberg, 's-Hertogenbosch	17-12-2024				23-9		0,00	0,00	0,00	1,00	0,00
Wamberg, 's-Hertogenbosch	17-12-2024					25-11	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
Wamberg, 's-Hertogenbosch	24-12-2024				4-11		0,00	0,00	0,00	1,00	0,00
Wamberg, 's-Hertogenbosch	17-12-2024				13-9	22-3	0,00	0,00	0,03	0,59	0,39
Wamberg, 's-Hertogenbosch	24-12-2024				23-9		0,00	0,00	0,01	0,99	0,00
Wamberg, 's-Hertogenbosch	24-12-2024			1-3	27-10		0,00	0,00	0,10	0,90	0,00
Wamberg, 's-Hertogenbosch	24-12-2024			23-11	13-9		0,00	0,00	0,08	0,92	0,00
Wamberg, 's-Hertogenbosch	24-12-2024				23-9		0,00	0,00	0,12	0,88	0,00
Wamberg, 's-Hertogenbosch	24-12-2024			27-10	18-11	26-8	0,00	0,00	0,54	0,46	0,00
Wamberg, 's-Hertogenbosch	24-12-2024			13-12	23-9		0,00	0,00	0,95	0,05	0,00
Wamberg, 's-Hertogenbosch	24-12-2024			3-11	17-10		0,00	0,00	0,02	0,98	0,00
Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024					16-12	0,00	0,00	0,02	0,25	0,73
Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024	-	-	-	-	-	0,00	0,44	0,00	0,14	0,42
Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024					16-12	0,00	0,02	0,00	0,00	0,98
Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024					16-12	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024					16-12	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024		16-12				0,00	0,84	0,00	0,00	0,16
Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024	-	-	-	-	-	0,74	0,00	0,01	0,01	0,13
Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024	-	-	-	-	-	0,88	0,00	0,12	0,00	0,00
Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024	-	-	-	-	-	0,00	0,04	0,00	0,00	0,96
Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024	-	-	-	-	-	0,00	0,84	0,00	0,00	0,16
Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024	-	-	-	-	-	0,00	0,99	0,00	0,00	0,01
Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024	-	-	-	-	-	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024	-	-	-	-	-	0,00	0,10	0,02	0,26	0,62
Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024	-	-	-	-	-	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024	-	-	-	-	-	0,00	0,16	0,00	0,00	0,84
Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024	-	-	-	-	-	0,00	0,00	0,03	0,04	0,93
Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024	-	-	-	-	-	0,00	0,00	0,00	0,00	0,73
Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024	-	-	-	-	-	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024	-	-	-	-	-	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
Nuland, 's-Hertogenbosch	13-2-2025	-	-	-	-	-	0,00	0,00	0,03	0,00	0,97
Nuland, 's-Hertogenbosch	13-2-2025					12-6	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
Nuland, 's-Hertogenbosch	13-2-2025			20-12		11-10	0,00	0,00	0,86	0,00	0,14
Nuland, 's-Hertogenbosch	13-2-2025			29-11		16-8	0,00	0,00	0,58	0,00	0,42
Nuland, 's-Hertogenbosch	31-1-2025			8-11			0,00	0,00	0,77	0,00	0,23
Nuland, 's-Hertogenbosch	31-1-2025	-	-	-	-	-	0,00	0,00	0,91	0,00	0,09
Nuland, 's-Hertogenbosch	31-1-2025					6-5	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00

Bijlagen 5. Overzicht van de kasten en verwachte milieumomstandigheden. Meeste regen valt in Nederland richting het noorden en oosten. Kasten die richting het noorden en oosten hangen zijn daarom gescoord als vochtig, evenals kasten die opgehangen worden in een vochtige beschaduwde plek tussen struikgewas. Aanwezigheid van direct zonlicht is ingeschat op basis van beschaduwing en kompasoriëntatie.

Kast type	Afkomst	Positie	Plaats	Orientatie	Vocht	Temperatuur
schwegler plat 1FF	Wamberg	Zon	Doornenburg	Noord	Vochtig	Gem
schwegler rond 2FN	Lonnekerberg	Zon	Doornenburg	Noord	Vochtig	Gem
schwegler rond 2FS deurtje	Lonnekerberg	Zon	Doornenburg	Oost	Vochtig	Warm
schwegler plat 1FF	Wamberg	Zon	Doornenburg	Oost	Vochtig	Warm
schwegler rond 2FN	Lonnekerberg	Zon	Doornenburg	West	Droog	Warm
schwegler rond 2FN	Lonnekerberg	Zon	Doornenburg	West	Droog	Warm
schwegler rond 2FN	Lonnekerberg	Zon	Doornenburg	Zuid	Droog	Warm
schwegler plat 1FF	Wamberg	Schaduw	Doornenburg	Noord	Vochtig	Koud
schwegler plat 1FF	Wamberg	Schaduw	Doornenburg	Oost	Vochtig	Koud
schwegler plat 1FF	Wamberg	Schaduw	Doornenburg	West	Vochtig	Koud
schwegler plat 1FF	Wamberg	Schaduw	Doornenburg	Zuid	Vochtig	Koud
schwegler rond 2FN	Lonnekerberg	Schaduw	Lab Wageningen	Nvt	Droog	Warm
schwegler rond 3FN	Waveka nieuw (controle)	Schaduw	Lab Wageningen	Nvt	Droog	Warm
schwegler rond 2FN	Lonnekerberg	Schaduw	Loods Wageningen	Nvt	Vochtig	Gem
plat Vivara kast 7	Boxtel	Halfschaduw	Boxtel	West	Droog	Gem
plat Vivara kast 3	Boxtel	Halfschaduw	Boxtel	Oost	Vochtig	Gem
plat Vivara kast 5	Boxtel	Halfschaduw	Boxtel	Noord	Vochtig	Gem
plat Vivara kast 2	Boxtel	Halfschaduw	Boxtel	Zuid	Droog	Gem
plat Vivara	Waveka nieuw (controle)	Halfschaduw	Boxtel			
plat Vivara DB kast 1	Den Bosch	Zon	Den Bosch	Oost	Vochtig	Warm
plat Vivara DB kast 3	Den Bosch	Zon	Den Bosch	West	Droog	Warm
plat Vivara	Waveka nieuw (controle)		Den Bosch			
schwegler plat 1FF	Wamberg	Zon	Doornenburg	Noord	Vochtig	Gem
schwegler plat 1FF	Wamberg	Zon	Doornenburg	Oost	Vochtig	Warm
schwegler plat 1FF	Wamberg	Zon	Doornenburg	West	Droog	Warm
schwegler plat 1FF	Wamberg	Zon	Doornenburg	Zuid	Droog	Warm
schwegler rond 2FN	Lonnekerberg	Zon	Doornenburg	Zuid	Droog	Warm
schwegler rond 2FN	Lonnekerberg	Schaduw	Doornenburg	Noord	Vochtig	Koud
schwegler rond 2FS deurtje	Lonnekerberg	Schaduw	Doornenburg	Oost	Vochtig	Koud
schwegler rond 2FS deurtje	Lonnekerberg	Schaduw	Doornenburg	West	Vochtig	Koud
schwegler plat 1FF	Wamberg	Schaduw	Doornenburg	Zuid	Vochtig	Koud
plat Vivara DB kast 2	Den Bosch	Zon	Den Bosch	Oost	Vochtig	Warm
plat Vivara DB kast 4	Den Bosch	Zon	Den Bosch	West	Droog	Warm
schwegler plat 1FF	Wamberg	Zon	Doornenburg	West	Droog	Warm
schwegler rond 2FS deurtje	Lonnekerberg	Zon	Doornenburg	Zuid	Droog	Warm
schwegler plat 1FF	Wamberg	Zon	Doornenburg	Zuid	Droog	Warm
schwegler plat 1FF	Wamberg	Schaduw	Doornenburg	Noord	Vochtig	Koud
schwegler rond 2FN	Lonnekerberg	Schaduw	Doornenburg	Noord	Vochtig	Koud
schwegler plat 1FF	Wamberg	Schaduw	Doornenburg	Oost	Vochtig	Koud
schwegler plat 1FF	Wamberg	Schaduw	Doornenburg	Zuid	Vochtig	Koud
schwegler plat 1FF	Nuland	Schaduw	Lab Wageningen	Nvt	Droog	Warm

schwegler plat 1FF	Nuland	Schaduw	Lab Wageningen	Nvt	Droog	Warm
schwegler plat 1FF	Nuland	Schaduw	Loods Wageningen	Nvt	Vochtig	Gem
schwegler rond 2FS deurtje	Lonnekerberg	Zon	Doornenburg	Noord	Vochtig	Gem
schwegler rond 2FN	Lonnekerberg	Zon	Doornenburg	Oost	Vochtig	Warm
schwegler plat 1FF	Wamberg	Zon	Doornenburg	West	Droog	Warm
schwegler rond 2FS deurtje	Lonnekerberg	Zon	Doornenburg	West	Droog	Warm
schwegler plat 1FF	Wamberg	Zon	Doornenburg	Zuid	Droog	Warm
schwegler rond 2FN	Lonnekerberg	Zon	Doornenburg	Zuid	Droog	Warm
schwegler rond 3FN	Waveka nieuw (controle)	Zon	Doornenburg	Zuid	Droog	Warm
schwegler plat 1FF	Wamberg	Schaduw	Doornenburg	Noord	Vochtig	Koud
schwegler rond 2FN	Lonnekerberg	Schaduw	Doornenburg	Noord	Vochtig	Koud
schwegler rond 2FS deurtje	Lonnekerberg	Schaduw	Doornenburg	Oost	Vochtig	Koud
schwegler plat 1FF	Wamberg	Schaduw	Doornenburg	West	Vochtig	Koud
schwegler rond 3FN	Waveka nieuw (controle)	Schaduw	Doornenburg	Zuid	Vochtig	Koud
schwegler plat 1FF	Nuland	Schaduw	Lab Wageningen	Nvt	Droog	Warm
schwegler plat 1FF	Nuland	Schaduw	Lab Wageningen	Nvt	Droog	Warm
schwegler plat 1FF	Nuland	Schaduw	Loods Wageningen	Nvt	Vochtig	Gem
schwegler plat 1FF	Nuland	Schaduw	Loods Wageningen	Nvt	Vochtig	Gem
schwegler rond 3FN	Waveka nieuw (controle)		Loods Wageningen	Nvt	Vochtig	Gem