

Eindrapportage: Onderzoek naar afbraak van eDNA van vleermuizen.

Datura Environmental Solutions



Colofon

Titel	Concept Eindrapportage: Onderzoek naar afbraak van eDNA van vleermuizen.
Tekst, foto's en samenstelling	K. van Bochove & J. Dekker
In opdracht van	Rijksdienst voor Ondernemend Nederland
Naam opdrachtgever	Daniëlle Bankert
Rapportnummer	RA24245
Datum oplevering rapport	15-01-2026
Aantal pagina's	49
Wijze van citeren	van Bochove, K, Dekker, J. 2026. Eindrapportage: Onderzoek naar afbraak van eDNA van vleermuizen. Rapport RA24245, 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	5
1. Inleiding	7
1.1 Aanleiding	7
1.2 Onderzoeksvragen	9
1.3 Projectstructuur	9
2. Methode	10
2.1 Praktijkstudie panden	10
2.1.1 Opzet onderzoek panden	10
2.1.2 eDNA bemonstering van panden	12
2.2.4 Data-analyse panden	14
2.2 Afbraakexperiment kasten	16
2.2.1 Opzet kastenexperiment	16
2.2.2 eDNA bemonstering van kasten	17
2.2.3 Milieuparameters	19
2.2.4 Bepalen soortsaamenstelling per kast en qPCR-analyse	19
2.2.5 Data-analyse kasten	20
2.3 Kraamverblijf laatvliegers	21
2.3.1 Opzet onderzoek	21
2.3.2 Laboratoriumanalyse	21
2.3.3 Data-analyse	21
2.4 Analyse houdbaarheid eDNA	22
3. Resultaten	23
3.1 Praktijkstudie panden	23
3.2 Afbraakexperiment kasten	31
3.3 Kraamverblijf laatvliegers	34
3.4 Analyse houdbaarheid eDNA	36
4. Discussie	38
5. Conclusies	45
5.1 Conclusies onderzoeksvragen	45
5.2 Overige conclusies	46
6. Advies	47
7. Dankwoord	49
8. Literatuur	49

Bijlage 1. Overzicht van bemonsterde panden.....	50
Bijlage 2. Controle locaties	53
Bijlage 3. Bemonsteringsprotocol eDNA sponsmonsters	54
Bijlage 4. Overzicht kasten.....	56
Bijlage 5. Overzicht en indeling van kasten	57
Bijlage 6. Resultaten afbraaksnelheid eDNA in kasten	59
Bijlage 7. Gemeten concentraties in de kasten, per soort.	60

Samenvatting

Aanleiding

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. Het is echter nog onduidelijk wat het betekent als bij een eenmalige bemonstering wel of geen eDNA aangetroffen wordt. Het is onbekend 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. Ook wordt onderzocht hoe snel eDNA afbreekt en welke factoren de afbraaksnelheid beïnvloeden.

Metingen bij panden

In deze studie zijn eDNA sponsonsters verzameld bij 111 verblijfplaatsen van gewone dwergvleermuis, ruige dwergvleermuis, laatvlieger en rosse vleermuis en 42 controle locaties. De monsters zijn verzameld in december 2024, februari-april 2025 en juli 2025. Voor de data-analyse is ook data gebruikt van 46 zomer, kraam- en paarverblijven die bemonsterd zijn door van Bochove *et al.* 2024b in juni en september 2024. De verschillende type verblijfplaatsen zijn op verschillende momenten in het jaar bemonsterd om na te gaan of eDNA het hele jaar gedetecteerd kan worden. Er is geen statistisch significant effect gevonden van het aantal dieren de functie van de verblijfplaats op de eDNA concentratie. Wel is er een effect van de tijd gevonden op de eDNA concentratie, met een geschatte halfwaardetijd van 34 dagen. Dat houdt in dat het eDNA in gemiddeld 256 dagen afbreekt. Afhankelijk van de initiële concentratie kan het eDNA langer of korter dan 256 dagen detecteerbaar blijven.

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) resulteerde in een hogere detectiekans. In de winter werd eDNA aangetoond bij kraam-, zomer-, en paarverblijven 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). Met eDNA metabarcoding werd bij 8 van de 111 monsters 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.

Kastenexperiment

Om de afbraaksnelheid, en milieufactoren die de afbraaksnelheid beïnvloeden te bepalen is een experiment met vleermuiskasten uitgevoerd. 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 is. Bij elke meting is een ander deel van de uitvliegopening bemonsterd. In het eerst verzamelde monster is met eDNA metabarcoding bepaald van welke soorten er eDNA op de kasten aanwezig was. Met soort-specifieke qPCR analyse

is vervolgens op vier momenten door te tijd de eDNA concentratie bepaald op steeds een ander deel van de invliegopening (grosfweg periode december 2024-oktober 2025). Over tijd is een afname van eDNA vastgesteld, met een geschatte halfwaardetijd van 200 dagen. Dit resulteert in een gemiddelde afbraaktijd van ongeveer 4 jaar. Er zijn op de kasten geen effecten gevonden van temperatuur, vochtigheid, oriëntatie en mate van directe lichtinval op de afbraaksnelheid van eDNA.

Experiment bij laatvliegerkolonie

Er is op 3 momenten eDNA bemonsterd bij een laatvlieger kraamkolonie waarbij het aantal uitvliegende dieren geregistreerd worden met behulp van sensoren. Bij deze kraamkolonie zijn dieren aanwezig tussen april en november. Vastgesteld is dat aan het einde van de winterperiode, net voordat de laatvliegers terugkwamen, nog steeds eDNA gedetecteerd kan worden. Met behulp van een accumulatie–afbraakmodel is halfwaardetijd van 65 dagen vastgesteld bij deze verblijfplaats. Dit model is gebaseerd op slechts 9 datapunten, en de verkregen halfwaardetijd moet dus als een grove indicatie gezien worden.

Synthese

Op basis van de verkregen halfwaardetijden van eDNA schatten we dat eDNA gemiddeld tussen de 256 dagen en 4 jaar detecteerbaar blijft. Uitgaande van 256 (zoals geschat op basis van het pandenonderzoek) dan betekent dit dat bij zomerverblijfplaatsen waar weinig eDNA afgezet is verblijfplaatsen gemist worden in de winter. Deze uitkomsten worden bevestigd door het feit dat in de zomer bij 100% van de zomerverblijfplaatsen eDNA aangetroffen werd, terwijl in de winter bij 80% van de zomerverblijfplaatsen (van met name gewone dwergvleermuis) eDNA aangetroffen. Bij kraamverblijven werd zowel in de zomer als winter op alle locaties eDNA aangetoond. Op basis van deze uitkomsten adviseren wij om de 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 en dat er gevoelig genoeg gemeten wordt. Bij de methode zoals toegepast in deze studie wordt een eDNA 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). Tenslotte adviseren we om de detectiekans van andere soorten dan gewone dwergvleermuis nader te onderzoeken, met name in de winterperiode als eDNA gedegradeerd kan zijn.

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. Dit vraagt meer planning en langere doorlooptijd voor spouwmuurisolatie.

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 bij een uitvliegopeningen is afhankelijk van 4 factoren:

1. De hoeveelheid eDNA dat afgezet wordt;
2. De snelheid waarmee het eDNA afbreekt;
3. De effectiviteit waarmee het eDNA bemonsterd wordt;
4. De gevoeligheid van de laboratoriumprocedure.

De hoeveelheid eDNA dat per tijdseenheid wordt afgezet is mogelijk verschillend per vleermuissoort (bijvoorbeeld grootte van de soort, of gedrag dat de soort vertoont) en de intensiviteit waarmee een verblijfplaats gebruikt wordt. 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. De afbraak van eDNA vindt plaats via exponentiële afbraak (Lamb *et al.* 2022). Afbraaksnelheid kan uitgedrukt worden als een exponentiële afbraakconstante. Dergelijke afbraakconstante is weinig intuïtief (die betreft in feite een lineaire afbraakconstante die van toepassing op log getransformeerde data). De halfwaardetijd daarentegen geeft een intuïtiever beeld van de afbraaksnelheid. De halfwaardetijd is de tijd dat de helft van het aanwezige eDNA afbreekt. In dit onderzoek wordt de afbraak van eDNA daarom primair uitgedrukt in een halfwaardetijd. Vervolgens kan op basis van de initiële eDNA concentratie en de halfwaardetijd berekend worden hoelang het duurt totdat eDNA niet langer detecteerbaar is. 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.

Extreem lage concentraties eDNA van vleermuizen kunnen ook aanwezig zijn op locaties waar geen verblijfplaatsen aanwezig zijn (2024b). Om deze reden kan het meerwaarde hebben om een drempelwaarde te hanteren (eDNA concentratie onder deze drempel wordt niet als positief beschouwd). 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?

1.3 Projectstructuur

Dit project bestaat uit drie onderdelen:

1. **Praktijkstudie panden.** Verzamelen van eDNA monsters bij panden met een kraam, zomer, paar- of winterverblijfplaats 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. **Afbraakexperiment kasten.** 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. **Kraamverblijf laatvliegers.** Tijdreeks van bemonsteringen bij uitvliegopeningen van een kraamkolonie laatvliegers, met een bemonstering in maart (voordat de kraamkolonie terug was), april en augustus (beantwoording vraag 1a en 1b).

2. Methode

2.1 Praktijkstudie panden

2.1.1 Opzet onderzoek panden

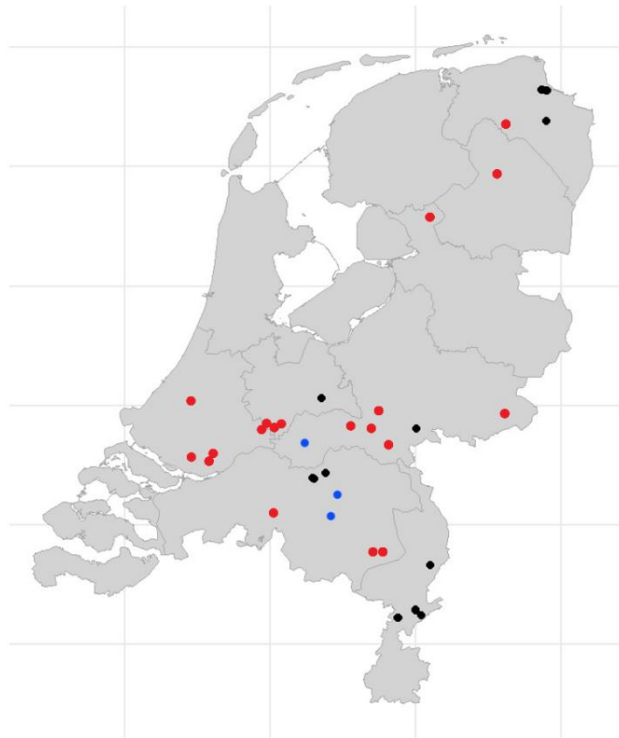
Er zijn eDNA monsters bij woningen genomen in de periode december 2024-maart 2025 en juli 2025. Daarnaast zijn gegevens gebruikt van bemonsteringen die uitgevoerd zijn in de periode juni-september 2024, afkomstig uit van Bochove *et al.* 2024b. In bijlage 1 is een overzicht van bemonsterde locaties opgenomen. Uit privacyoverwegingen 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.

Tabel 1. Overzicht van monsters die verzameld zijn. Per periode is weergegeven hoeveel monsters er verzameld zijn per type verblijfplaats.

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	7	5		5	8	35
Eind maart - begin april 2025	10	7	5		5	8	35
Juli 2025					5		5
Totaal	42	25	22	5	21	42	157

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 het aantal dieren dat gebruik maakt van de verblijfplaats leidend te zijn bij het bepalen van de functie. Het aantal dieren dat gebruik maakt van de verblijfplaats 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. De verblijfplaatsen zijn slechts eenmaal bemonsterd, met de volgende uitzonderingen: Twee verblijfplaatsen van rosse vleermuis zijn zowel in september 2024 als april 2025 bemonsterd. Ook zijn vijf locatie binnen een massawinterverblijf van gewone dwergvleermuis (zie volgende alinea) zowel in april als juli 2025 bemonsterd.

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 bevinden zich daar 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. Het aantal zichtbaar aanwezige dieren is genoteerd. In dit onderzoek hebben we alleen toestemming van woningeigenaren 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. De dilatatievoegen bij een massawinterverblijf van gewone dwergvleermuis die op 2 april 2025 bemonsterd werden, zijn op 23 juli 2025 nogmaals bemonsterd. De bemonstering in april en juli zijn uitgevoerd bij dezelfde dilatatievoegen.



Figuur 1. Locaties waar verblijfplaatsen van vleermuizen bemonsterd zijn. De volgende kleurcodering is gebruikt: Zwart: locaties bemonsterd in juni 2024. Blauw: locaties bemonsterd in september 2024. Rood: bemonsterd in december – juli 2025.

Naast verblijfplaatsen zijn er ook controle locaties bemonsterd. In bijlage 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.

2.1.2 eDNA bemonstering van panden

Ten behoeve van eerdere studies (waaronder van Bochove et al. 2024a, 2024b) is een veldprotocol ontwikkeld voor het verzamelen van sponsmonsters bij panden (zie bijlage 3). Middels dit protocol worden alleen invliegopeningen in en direct rond de gevel bemonsterd. De bemonstering is bij grondgebonden woningen op adresniveau uitgevoerd. Bij appartementencomplexen 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 door het trappenhuis te verplaatsen.



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

De eDNA analyses zijn uitgevoerd in de laboratoriumfaciliteiten van Datura. Dit laboratorium is speciaal voor eDNA onderzoek ingericht. Dit houdt in dat er in diverse gescheiden ruimtes gewerkt wordt.

1. Een DNA vrije ruimte waarin monsterkits samengesteld worden, en reagentia bereid worden. Deze ruimte is voorzien van overdruk doormiddel van HEPA-gefilterde lucht.
2. Een ruimte waarin eDNA extractie plaatsvinden. Deze ruimte is voorzien van overdruk doormiddel van HEPA-gefilterde lucht.
3. Een ruimte waar positieve controles en standaarden toegevoegd worden aan PCR platen. In deze ruimte wordt ook gewerkt met keutels van vleermuizen. Deze ruimte is voorzien van onderdruk, om eventuele aerosolen met DNA in de lucht direct naar buiten af te voeren.
4. Tenslotte een PCR-ruimte waar qPCRs en andere post-PCR werkzaamheden uitgevoerd worden. Ook deze ruimte is voorzien van onderdruk, om eventuele aerosolen met DNA in de lucht direct naar buiten af te voeren.

Er wordt een uni-directionele workflow gehanteerd, dat wil zeggen dat materialen uit een hoger laboratorium nooit terug mogen naar een schoner laboratorium (dus nooit van 3 naar 2, of 2 naar 1). Op deze manier kan zeer schoon gewerkt worden. Daardoor kan *Datura* veel gevoeliger en daarmee betrouwbaarder lage eDNA concentraties detecteren dan standaard microbiologie laboratoria.

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 μ L 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 μ L 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. Van de monsters uit eerder onderzoek (van Bochove *et al.* 2024) is alleen metabarcoding toegepast op monsters als minimaal 50% (6 van de 12) van de replica's positief resultaat gaven. Gewone dwergvleermuis en ruige dwergvleermuis zijn behouden als er minimaal 10 reads behaald werden, en deze soorten minimaal 1% van de vleermuis reads uitmaken. Overige soorten zijn aanwezig gescoord als er minimaal 10 reads behaald werden en minimaal 0,01% van de reads afkomstig was van de betreffende soort. De keus om gevoeliger te meten bij verblijfplaatsen van zeldzamere soorten is gemaakt omdat uit de resultaten blijkt dat verblijfplaatsen van laatvlieger in veel gevallen slechts een klein % van de reads afkomstig was van laatvlieger.

2.2.4 Data-analyse panden

Algemeen

Alle data-analyses werden uitgevoerd in R (versie 4.5.1; R Core Team).

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 concentratie bij winterverblijven

De dilatatievoegen bij een massawinterverblijf van gewone dwergvleermuis die zowel in april als juli 2025 bemonsterd zijn, zijn in de data-analyse apart bekeken. Omdat dezelfde locaties tweemaal bemonsterd werden zijn deze resultaten niet meegenomen in de analyses in de volgende paragrafen, gezien de gebruikte statistische toetsen onafhankelijke waarnemingen vereisen. Om te toetsen of de DNA-concentraties in juli lager waren dan in april, werd een eenzijdige Wilcoxon Signed-Rank Test voor gepaarde waarnemingen uitgevoerd. Deze niet-parametrische test is geschikt voor kleine datasets.

De metingen bij de winterverblijven die gedaan zijn in december en februari zijn niet bij deze analyse betrokken, omdat de monsters die verzameld zijn in die periode (eenmalig) bij andere dilatatievoegen verzameld zijn.

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. Voor elke subset van de data (winterverblijven, zomerverblijven, kraamverblijven, paarverblijven) is de validiteit van de toegepaste regressie vastgesteld door te testen of de residuen een normale verdeling volgen (QQ-plot/ Shapiro-Wilk normality test), de residuen onafhankelijk zijn (Durbin-Watson test) en de residuen constant zijn (studentized Breusch-Pagan test). Bij de winterverblijven is uitsluitend gebruik gemaakt van de metingen in de winter, omdat de metingen in de zomer bij dezelfde verblijfplaatsen uitgevoerd zijn, en deze waarnemingen dus niet onafhankelijk zijn.

Modelering van de hoeveelheid eDNA

Robuuste lineaire regressie is gebruikt om te analyseren of, en in welke mate, de gemeten concentratie beïnvloed werd door het aantal dieren dat gebruik maakt van de verblijfplaats, het

geschatte aantal dagen sinds de verblijfplaats voor het laatst door vleermuizen gebruikt is, en het type verblijfplaats (kraam, zomer, kraam, winterverblijf). Het aantal dieren is geschat op basis van het onderliggende veldonderzoek en betreft tellingen voornamelijk tellingen van aantal uitvliegende of invliegende dieren. Bij winterverblijven is het aantal aangehouden dat visueel overwinterend waargenomen kon worden. Het aantal dagen sinds de verblijfplaats voor het laatst gebruikt is betreft een schatting op basis van de functie van de verblijfplaats zoals deze is vastgesteld door de veldonderzoeker. Voor kraam- en zomerverblijven die bemonsterd zijn in juni is de tijd sinds laatste gebruik op 0 dagen gesteld. Voor kraam- en zomerverblijven die bemonsterd zijn na 31 juli is de tijd in dagen gesteld op het aantal dagen tussen 15 juli en de monsterdatum. Voor paarverblijven is de datum van laatste gebruik gesteld op 31 oktober.

Voor deze data-analyse is gebruik gemaakt van 99 locaties. In beginsel gebruik gemaakt van alle data die verzameld is bij de panden, met een aantal uitzonderingen. Van tien bemonsterde verblijfplaatsen van rosse vleermuis waren geen gegevens van recente uitvliegtellingen beschikbaar, en zijn daarom niet meegenomen in deze data-analyse. Eén van de aannames die gedaan wordt door de toegepaste regressiemethode is dat alle waarnemingen onafhankelijk zijn. Detecties bij winterverblijven in de zomer zijn daarom verwijderd, omdat deze locaties ook in de winter bemonsterd werden waardoor de waarnemingen niet onafhankelijk zijn. Ook zijn twee datapunten verwijderd van verblijfplaatsen van rosse vleermuis die in april 2025 bemonsterd zijn, omdat dezelfde locaties ook in september bemonsterd werden.

De eDNA concentraties zijn log-getransformeerd. Dit maakt het mogelijk om het afbraakproces in de tijd te modelleren volgens een exponentiële afbraak. De robuuste lineaire regressieanalyse werd uitgevoerd met de Huber M-schatter (`rlm()` uit het MASS-pakket). Voor dit model is gekozen omdat de residuen van een klassieke lineaire regressie niet normaal verdeeld waren en enkele datapunten een sterke invloed hadden op het model, zelfs na logaritmische of kwadratische transformatie van de data. Kraamverblijf is als referentie categorie gebruikt. In feite toetst het model dus of de concentratie eDNA bij zomerverblijven significant anders is dan de eDNA concentratie bij kraamverblijven, paarverblijven en/of winterverblijven. Voor het statistisch toetsen van de parameters zijn heteroscedasticiteit-consistente (HC3) standaardfouten gebruikt, welke verkregen zijn via het sandwich-pakket. Op basis hiervan werden z-waarden en bijbehorende p-waarden berekend (`coefTest`, `lmtest`-package).

De afbraaksnelheid van eDNA door de tijd werd afgeleid uit de regressiecoëfficiënt van het geschatte aantal dagen sinds vleermuizen voor het laatst aanwezig waren. Onder het model:

$$\log(DNA) = \beta_0 + \beta_1 \cdot t(dagen) + \dots$$

is β_1 de exponentiële afbraakconstante. Dergelijke afbraakconstante is weinig intuïtief (die betreft in feite een lineaire afbraakconstante die van toepassing op log getransformeerde data). De halfwaardetijd daarentegen geeft een intuïtiever beeld van de afbraaksnelheid. De halfwaardetijd (in dagen) van eDNA werd vervolgens als volgt berekend:

$$T_{1/2} = \frac{\ln(2)}{-\beta_1}$$

Het betrouwbaarheidsinterval (95%) werd afgeleid op basis van de robuuste standaardfouten van β .

Effect van drempelwaardes

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 PCRs 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 bijlage 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 bijlage 4. De kasten zijn met gas ontoegankelijk gemaakt voor vleermuizen.

Met behulp van soort-specifieke qPCR is op 4 momenten (ruwweg van januari-oktober 2025) gemeten hoeveel eDNA er van elke vleermuissoort aanwezig is. 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.

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 rapportage. 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.

	Type kast (aantal)	Vale vleermuis	Fransjeestaart	Rosse vleermuis	Gewone dwergvleermuis	Ruige dwergvleermuis	Gewone grootoorvleermuis	Bosvleermuis
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
Controles	Platte vivara (2x) & Schwegler rond 3FN (4x)							X

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 is random één strook bemonsterd, waardoor elke kast dus 4X bemonsterd is (nulmeting en 3 herhaalmetingen). Elke bemonstering is uitgevoerd met tussenpozen van gemiddeld 12 weken. 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 figuur 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 volgorde waarin de stroken bemonsterd zijn is random bepaald.



Figuur 3. Impressie van de kasten die gebruikt zijn voor het afbraakexperiment. Linksboven: Schwegler 3FN (lijkt zeer sterk op 2FN). Rechtsboven: Vivera. Links midden: deur van 2FS kast zonder houten structuur. Rechts midden: deur van Schwegler 2FS met houten structuur. Links- en rechtsonder: Schwegler 1FF (met houten achterkant).

2.2.3 Milieuparameters

De kasten zijn in verschillende oriëntaties opgehangen. De oriëntatie is genoteerd. De temperatuur en vochtigheid zijn gemeten met sensoren van het type Easylog-EL-2. De mate van directe lichtinval (UV-licht) is geschat op basis van de locatie (zon, halfschaduw, schaduw, binnen), de oriëntatie en het type kast. Per locatie, oriëntatie en type kast is een score toegekend (zie tabel 3.). Een schatting voor de mate van directe lichtinval is berekend door de drie scores met elkaar te vermenigvuldigen. Tenslotte is de berekende mate van lichtinval genormaliseerd in een score op een schaal van 1-10. De berekende mate van lichtinval per kast is opgenomen in bijlage 5

Tabel 3. Scores die toegekend zijn per factor die de mate van directe lichtinval bepalen.

Locatie	Score
Zon	10
Halfschaduw	6,66
Schaduw	3,33
Binnen	0
Oriëntatie	Score
Noord	3,33
Oost	6,66
Zuid	10
West	6,66
Type kast	Score
Deurtje Schwegler 2FS zonder houten opbouw	10
Deurtje Schwegler 2FS met houten opbouw.	10
schwegler 2FN	6,66
Platte kasten schwegler 1FF	3,33
Vivara kast	3,33

2.2.4 Bepalen soortsamenstelling per kast en qPCR-analyse

Eerst is per kast vastgesteld van welke soorten er potentieel eDNA op de kasten aanwezig is. Hiervoor is (indien beschikbaar) gebruik gemaakt van monitoringsgegevens die verzameld zijn via visuele kastcontroles voorgaand aan het experiment. Ook is een metabarcoding analyse uitgevoerd op de monsters die in de eerste bemonsteringsronde verzameld zijn. Sequenties met minder dan 10 reads zijn verwijderd. Ook zijn vleermuissoorten verwijderd die minder dan 1% van de reads van vleermuizen innamen. De eDNA metabarcodinganalyses zoals hier toegepast geven inzicht in de soortsamenstelling, maar zijn niet geschikt om te gebruiken voor de bepaling van de hoeveelheid eDNA. Voor bepalen van de eDNA concentratie per soort is daarom gebruik gemaakt van qPCR-analyse. De soort-specifieke qPCR zijn uitgevoerd voor elke soort die op basis van monitoringgegevens gebruik gemaakt heeft van de kast, plus soorten die met behulp van de metabarcoding vastgesteld zijn. Er zijn soort-specifieke qPCRs uitgevoerd voor gewone dwergvleermuis, ruige dwergvleermuis, gewone grootoorvleermuis, vale vleermuis, franjestaart en rosse vleermuis. Op de monsters afkomstig van de controle kasten is de eDNA concentratie van alle soorten gemeten.

2.2.5 Data-analyse kasten

De data-analyse werd uitgevoerd in R (versie 4.5.1; R Core Team). Het regressiemodel is berekend met de library "lmerTest" (Kuznetzova et al., 2017) en de regressiefunctie lmer uit die library. De bootstrap-bepaling van het betrouwbaarheidsinterval van de halfwaardetijd is uitgevoerd met de functie "bootMer" in lme4. Figuren van de resultaten zijn gemaakt met de library "ggeffects" en "ggplot2".

Omdat DNA-concentraties vaak sterk kunnen variëren en soms op nul uitkomen, zijn de concentraties eerst omgezet met een logaritme. Deze omzetting maakt de gegevens minder scheef verdeeld en zorgt ervoor dat ook nulmetingen op een betrouwbare manier meegenomen kunnen worden. Daarnaast volgt meestal een exponentieel patroon: het neemt eerst snel af en daarna steeds langzamer. Door met logaritmen te werken wordt dit patroon rechtlijnig, waardoor we het goed kunnen analyseren. De gebruikte omzetting is het natuurlijk logaritme van de gemeten concentratie + c (de helft van de detectielimiet):

$$\ln(\text{gemeten concentratie} + c)$$

Dit is een algemeen gebruikte conversiewijze. We hebben als detectielimiet 500 eDNA moleculen/spons genomen.

Vervolgens is onderzocht of er een patroon zit in de verandering van de eDNA-concentratie door de tijd. Dat is gedaan met een statistisch model dat rekening houdt met twee belangrijke factoren. Ten eerste soortverschillen: verschillende soorten kunnen van nature meer of minder DNA in de kast achterlaten. Ten tweede de kasten: de kasten kunnen hebben verschillend in gebruik door de vleermuizen, en de mate waarin eDNA kan achterblijven (glad versus ruw).

Om hier rekening mee te houden is een zogenoemd mixed model gebruikt, dat de algemene trend van concentratie eDNA door de tijd berekent en verschillen tussen soorten en locaties corrigeert. Met dit model is de snelheid bepaald waarmee de DNA-concentratie afneemt. Dit is de helling van het effect van de tijd op de concentratie. Deze snelheid is de afbraaksnelheid of decay rate. Omdat het DNA in de tijd ongeveer volgens een exponentieel patroon afneemt, is met dezelfde modelberekening ook de halfwaardetijd uitgerekend: de tijd die nodig is voordat de helft van de oorspronkelijke hoeveelheid DNA is verdwenen. Op deze manier is er een schatting gemaakt van hoe snel DNA in het milieu uiteenvalt, onafhankelijk van verschillen tussen soorten en kasten.

Van de kasten is ook de mate van vocht, temperatuur, oriëntatie, directe zoninval genoteerd. Effecten van deze factoren zijn getest door ze als interactie-term met de tijd op te nemen in het model. In geval van vocht en temperatuur gebeurde dit ook als combinatie (droog-warm, vochtig-warm, droog-koud, etcetera).

De halfwaardetijd is de periode waarin de helft van de oorspronkelijke hoeveelheid DNA verdwenen is. Bij een exponentieel afnamepatroon kan die worden berekend met:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k}$$

waarbij k de afbraaksnelheid is. Omdat de afbraaksnelheid in ons model neerkomt op het negatieve van de helling, kon dat getal gebruikt. Voor het bepalen van het betrouwbaarheidsinterval van de halfwaardetijd is een bootstrap-methode toegepast. Hierbij

worden de gegevens meerdere keren opnieuw bemonsterd en opnieuw geanalyseerd, zodat een betrouwbaar interval kan worden berekend waarbinnen de werkelijke waarden waarschijnlijk liggen. Dit geeft een inschatting van de precisie van de afgeleide waarden, zoals de halfwaardetijd van het DNA, zonder dat we aannames hoeven te maken over de verdeling van de data.

2.3 Kraamverblijf laatvliegers

2.3.1 Opzet onderzoek

Er zijn op drie datums bemonsteringen uitgevoerd bij een kraamverblijfplaats van laatvliegers bij de Priesterkoozolder van de Matthiaskerk te Castenray (gemeente Venray). De laatvliegers maken voor het in- en uitvliegen gebruik van 10 uitvliegopeningen. Het aantal in- en uitvliegende dieren wordt bij deze verblijfplaats gemonitord met behulp van 3 lichtsensoren. Sensor B mat het aantal in- en uitvliegende dieren bij uitvliegopening 1-4. Sensor D registreert uitvliegopening 5-8. Sensor C registreert uitvliegopening 9. Bij uitvliegopening 10 is geen sensor aanwezig. De sensorinstallaties worden beheerd door Stichting de Laatvlieger.

Op 14 maart, 25 april en 26 augustus 2025 werden eDNA sponsmonsters verzameld van alle 10 uitvliegopeningen. De datum van 14 maart is gekozen omdat de laatvliegers vanaf eind maart weer terugkeren naar het kraamverblijf. Zodoende kon vastgesteld worden of eDNA van het voorgaande seizoen aan het einde van de winterperiode nog detecteerbaar was. Met de daaropvolgende bemonsteringen is de opbouw (in combinatie met afbraak) van eDNA gevolgd over de tijd. Ook is de data verkregen van de sensor registraties over de periode 1 januari 2024- 26 augustus 2025.

2.3.2 Laboratoriumanalyse

De eDNA extractie werd uitgevoerd zoals beschreven in paragraaf “2.2.3 eDNA analyse panden” met als verschil dat op deze monsters uitsluitend een voor laatvlieger soort-specifieke qPCR uitgevoerd is om de hoeveelheid eDNA van laatvlieger in de monsters te kwantificeren.

2.3.3 Data-analyse

De data-analyses werden uitgevoerd in R (versie 4.5.1; R Core Team). Het aantal uitvliegende dieren per sensor is geschat door het aantal uitvliegende dieren te tellen die geregistreerd werden tussen 15 minuten voor en 120 minuten na zonsondergang. Twee van de sensors meten de gecombineerde activiteit van 4 uitvliegopeningen (dus 1 sensor voor opening 1-4, en een sensor voor opening 5-8). Om de activiteit van vleermuizen zoals gemeten met de sensor te kunnen koppelen aan de gemeten eDNA concentraties is de gemiddelde eDNA concentratie van de 4 uitvliegopeningen gebruikt. De eDNA concentratie die bij opening 3 gemeten is op 14 maart 2025 lijkt een outlier te zijn en is om die reden niet meegenomen bij het berekenen van de gemiddelde eDNA concentratie.

Er is een model ontwikkeld om de hoeveelheid eDNA te beschrijven als een functie van de afgifte en afbraak van eDNA. Hiervoor is een accumulatie–afbraakmodel toegepast. Dit model beschrijft de dynamiek van de eDNA-concentratie C_t (eDNA moleculen per spons) in de tijd als een functie van de dagelijkse uitvliegactiviteit N_t (het aantal uitvliegende vleermuizen per sensor):

$$C_t = (1 - \beta) C_{t-1} + \alpha N_{t-1}$$

waarbij:

- α de **afgifteparameter** is, die de hoeveelheid eDNA weergeeft die per vleermuis per tijdstap vrijkomt;
- β de **afbraakparameter** is, die de fractie eDNA weergeeft die per tijdstap uit het systeem verdwijnt.

Het model gaat ervan uit dat eDNA zich op de uitvliegopening ophoopt als gevolg de van vleermuisactiviteit, en vervolgens exponentieel afneemt door afbraak. Het model is geëvalueerd en toegepast op gegevens van drie detectiepoorten (1, 2, en 3) met gedeelde waarden voor α en β , die gezamenlijk werden gefit.

De parameters α en β werden bepaald door middel van niet-lineaire optimalisatie (methode: L-BFGS-B) in R, waarbij de som van de kwadraten van log-getransformeerde verschillen tussen waargenomen en voorspelde eDNA-concentraties werd geminimaliseerd. Dit werd uitgevoerd met de pakketten *tidyverse* en *lubridate*.

De halfwaardetijd van eDNA werd berekend uit de afbraakparameter als:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{\beta}$$

waarbij $t_{1/2}$ de tijd (in dagen) weergeeft waarna de helft van het eDNA-signaal verdwenen is. De onzekerheid in deze schatting werd bepaald met behulp van een bootstrapprocedure (200 herhalingen), waarbij het model herhaaldelijk werd gefit op willekeurig geresampled datasets.

2.4 Analyse houdbaarheid eDNA

In de drie hierboven beschreven experimenten zijn halfwaardetijden verkregen. Op basis van deze halfwaardetijden is een analyse gedaan hoelang eDNA detecteerbaar blijft bij verblijfplaatsen. Als startpunt is hiervoor gebruik gemaakt van eDNA concentraties die gemeten zijn bij verblijfplaatsen op moment dat er waarschijnlijk dieren aanwezig waren:

- 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)

De volgende berekening is uitgevoerd. De k (vervalconstante per dag) is voor elke van de drie vastgestelde halfwaardetijden berekend als:

$$k = \frac{\ln(2)}{t_{1/2}}$$

waarbij:

- $t_{1/2}$ = halfwaardetijd (tijd dat helft van eDNA afbreekt)

Vervolgens is berekend hoelang elke uitgangskoncentratie in theorie detecteerbaar zou blijven bij de drie vastgestelde halfwaardetijden, uitgaande van een detectielimiet van 500 moleculen per spons. Tijd totdat het eDNA afgebroken werd tot het detectielimiet is berekend als:

$$t = \frac{\ln(N_0/L)}{k}$$

waarbij

- t = tijd in dagen totdat de concentratie onder de detectielimiet valt,
- L = detectielimiet (500 moleculen),
- N_0 = uitgangskoncentratie.

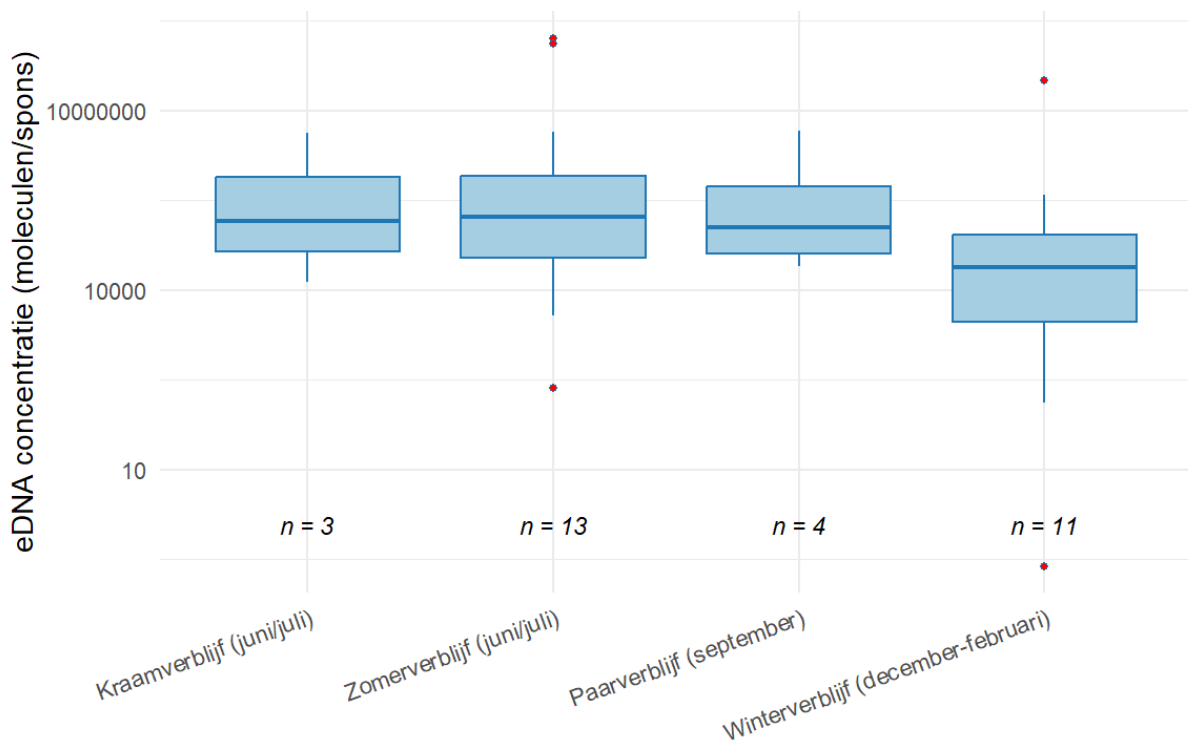
Indien $N_0 \leq L$, werd de houdbaarheid vastgesteld op **0 dagen** (reeds onder detectielimiet bij aanvang).

3. Resultaten

3.1 Praktijkstudie panden

eDNA concentratie per type verblijfplaats bij aanwezigheid van dieren

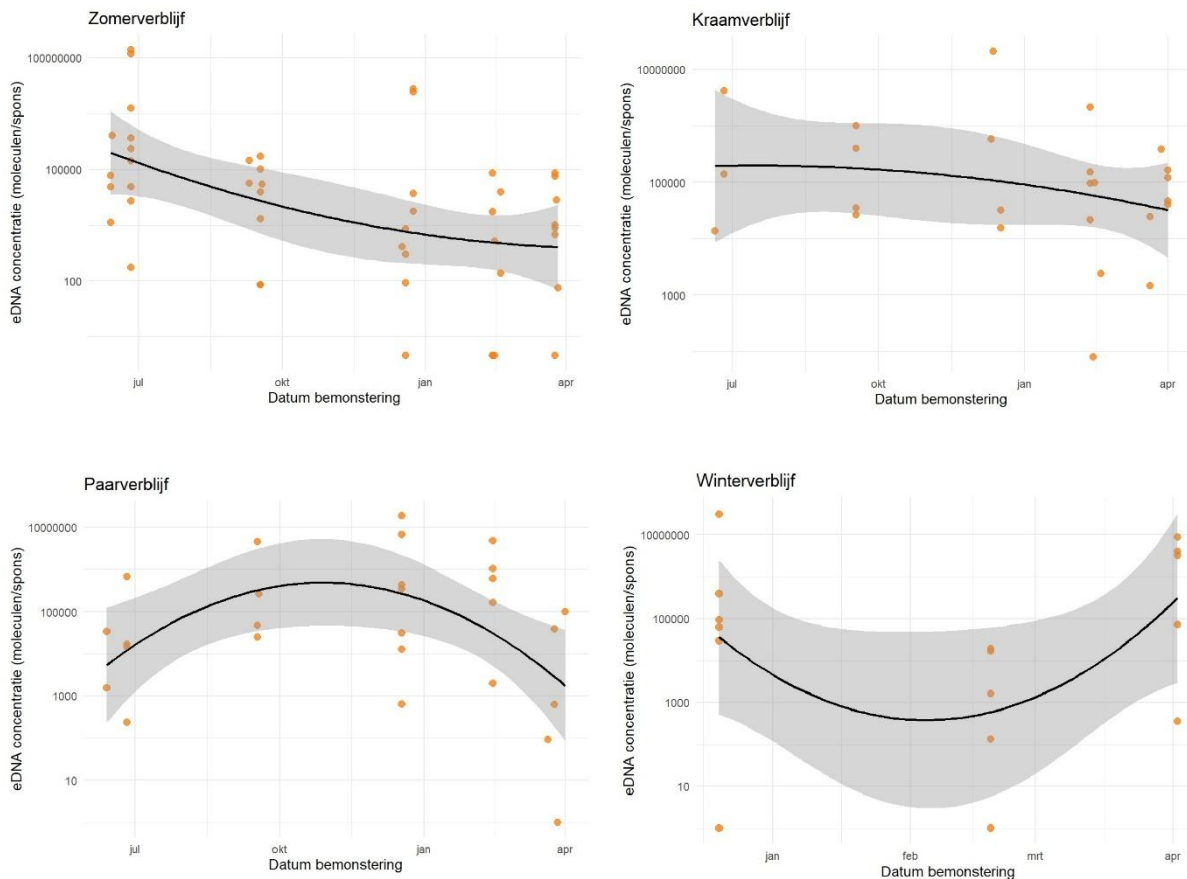
De eDNA concentratie bij verblijfplaatsen die bemonsterd zijn in de periode dat er naar alle waarschijnlijkheid dieren aanwezig zijn verschilde niet significant per functie en/of het aantal dieren dat vastgesteld is door middel van het bat-detector onderzoek, zie figuur 4 (Kruskal-Wallis chi-squared = 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 van verblijfplaatsen op moment dat het aannemelijk is dat er dieren aanwezig zijn.

eDNA concentraties per functie door het jaar heen

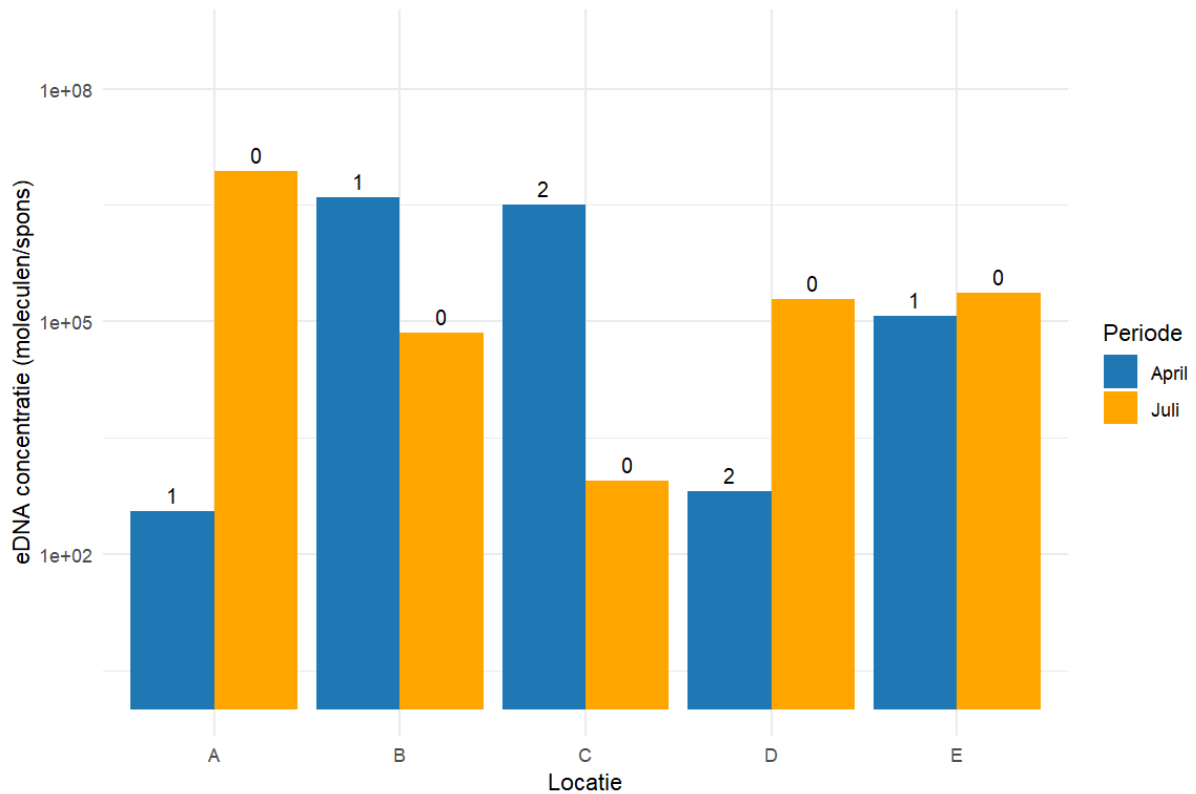
De eDNA concentratie bij zomerverblijven toont een statistisch significante negatieve trend over tijd (zie figuur 5). De concentratie was het hoogst in de zomer, om vervolgens over de tijd af te nemen (Kwadratische regressie; Adjusted R-squared: 0,196; F-statistic: 6,48; p-waarde=0,003). Ook de eDNA 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). De uitkomsten van de Shapiro-Wilk normality test, Durbin-Watson test en de studentized Breusch-Pagan test waren voor alle subsets van de data (winterverblijven, zomerverblijven, kraamverblijven, paarverblijven) niet significant, hetgeen aantoont dat aan de voorwaarden voldaan is om deze vorm van regressie te mogen toepassen.



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.

eDNA concentratie bij winterverblijven

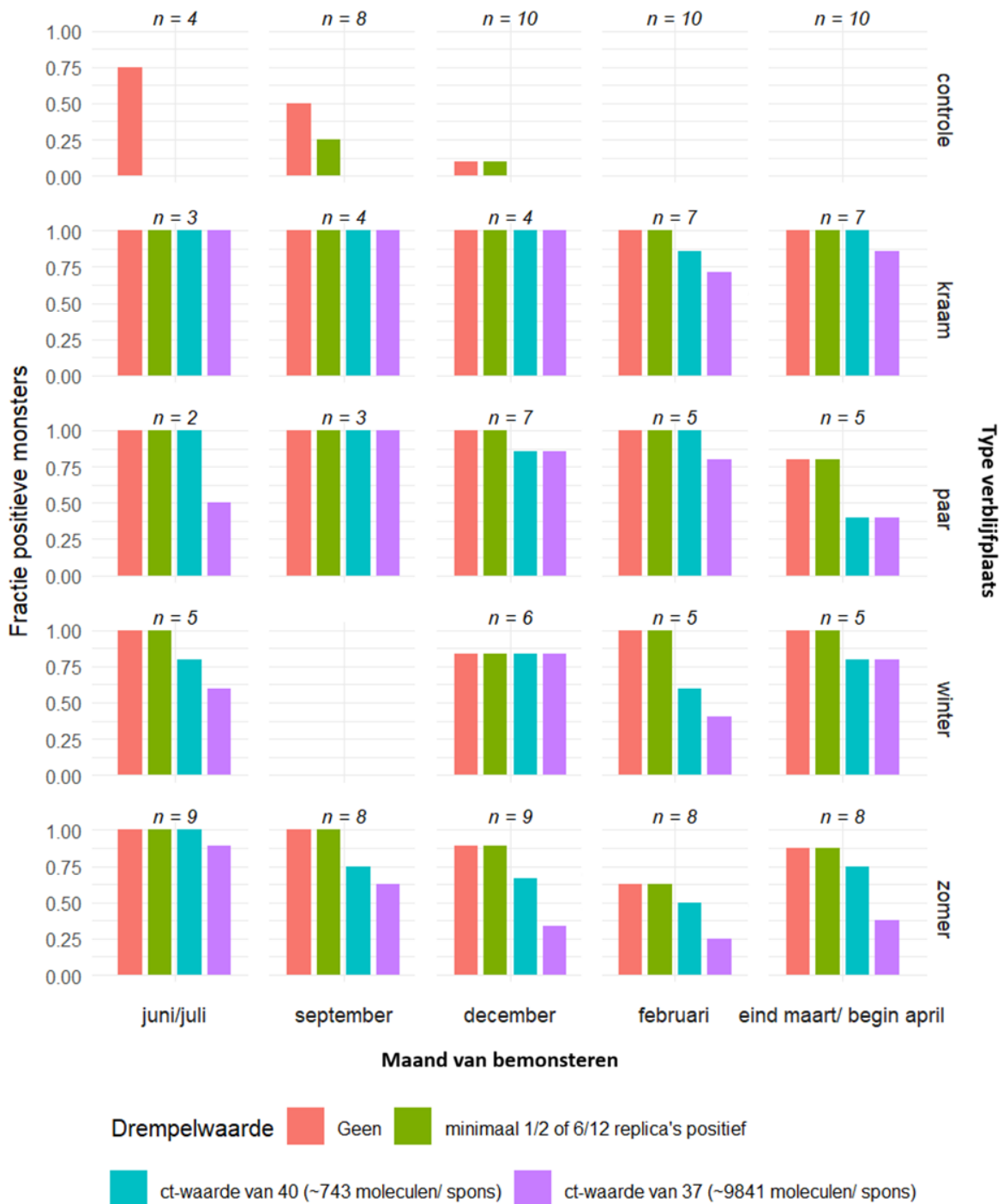
Op 2 april 2025 werden bij de bemonsterde dilatatievoegen 1 of 2 gewone dwergvleermuizen visueel vastgesteld. Bij de bemonstering op 23 juli 2025 werden er visueel geen vleermuizen waargenomen. Bij alle eDNA metingen, zowel in april als in juli, werd eDNA van gewone dwergvleermuis aantreffen. De eDNA concentraties per locatie lieten enige variatie zien tussen april en juli, maar de verschillen waren niet consistent (zie figuur 6). Een eenzijdige Wilcoxon Signed-Rank Test werd uitgevoerd om te toetsen of de DNA-concentraties in juli lager waren dan in april. Er werd geen significant verschil gevonden tussen de eDNA concentratie in april en juli ($V = 8$; p -waarde = 0,594).



Figuur 6. eDNA concentratie van vleermuizen in 5 dilatatievoegen (locatie A-E) in een flat in Tilburg waarin een massawinterverblijf van gewone dwergvleermuizen huist. Dezelfde locaties zijn bemonsterd op 2 april en 23 juli 2025. De getallen boven de staven geven weer hoeveel dieren er ten tijde van de bemonstering visueel waargenomen zijn.

Detectiekans door het jaar heen

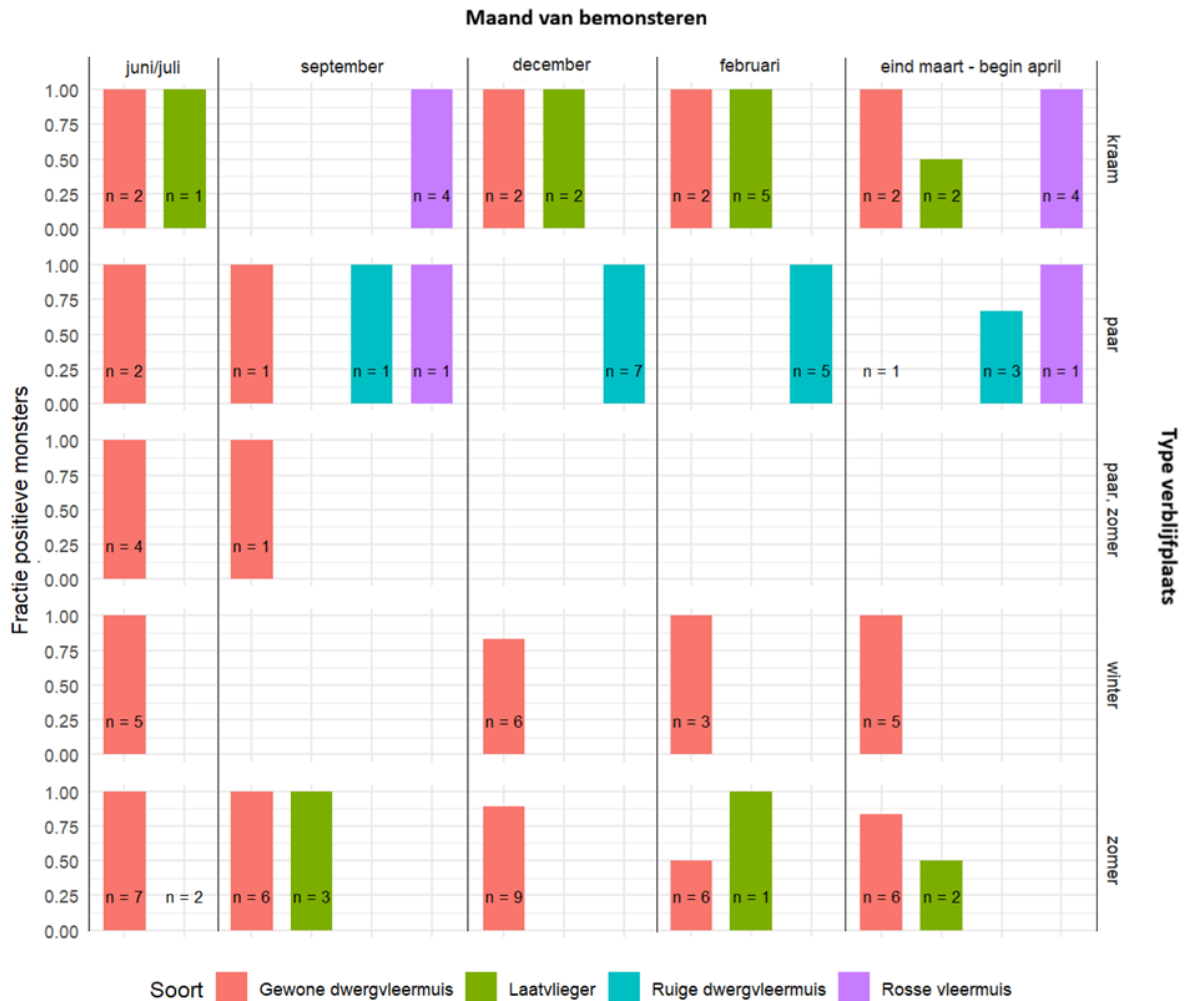
De resultaten van de qPCR-analyses bij panden zijn weergegeven in figuur 7. Bij kraamverblijven blijft het eDNA het gehele jaar goed detecteerbaar en wordt de detectie nauwelijks beïnvloed door het toepassen van drempelwaardes. Bij kleinere verblijfplaatsen is de detectiekans het grootste in de periode 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.



Figuur 7. 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. De n geeft aan op hoeveel metingen de betreffende staaf gebaseerd is.

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 overzicht van de resultaten van de metabarcoding analyse in vergelijking tot protocolonderzoek en gegevens van vrijwilligers is opgenomen in bijlagen 1. In figuur 8 is weergegeven in welke fractie van de monsters de soort (zoals vastgesteld met bat-detector onderzoek) ook aangetoond werd door middel van eDNA.



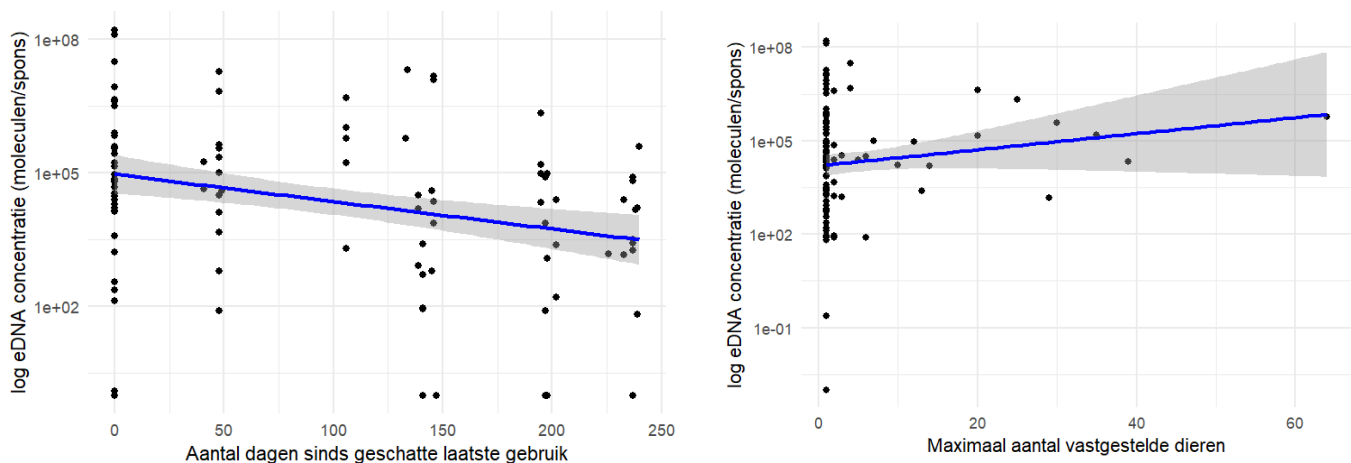
Figuur 8. Weergaven van de fractie van locaties waar eDNA gedetecteerd werd van een bepaalde soort, gegeven de aanwezigheid van een verblijfplaats van de betreffende soort. Als de qPCR analyse negatief was werd er ook geen metabarcoding uitgevoerd, en werd het monster voor de betreffende soort in deze 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). De n geeft aan op hoeveel metingen de betreffende staaf gebaseerd is.

Modelering van de hoeveelheid eDNA

Van alle opgenomen parameters bleek alleen het aantal dagen sinds de geschatte laatste aanwezigheid van vleermuizen bij de verblijfplaats significant te relateren aan de hoeveelheid eDNA (zie tabel 4). Het aantal dieren en de functie van de verblijfplaats had geen statistisch significante invloed op de gemeten eDNA concentratie. Zie figuur 9 voor een visuele weergave. De afbraakconstante werd door het model bepaald op $\beta = 0.0204$, wat resulteert in een geschatte halfwaardetijd van 34 dagen. Het 95% betrouwbaarheidsinterval voor de halfwaardetijd bedroeg 23 tot 64 dagen.

Tabel 4. Overzicht van schatting van de betreffende parameter, en corresponderende significanties.

	Schatting	Standaardfout	Z-waarde	P-waarde
(Snijpunt)	11,439	0,9987	13,705	<2,2e-16
Aantal dieren	0,0473	0,0394	1,395	0,163
Dagen sinds laatste gebruik	-0,0195	0,0060	-3,687	0,0002
Kraamverblijf	1,4380	1,6888	1,097	0,273
Paarverblijf	1,0892	1,1870	0,971	0,331
Zomer & paarverblijf	-1,6724	2,1762	-0,850	0,395
Winterverblijf	-1,0725	1,4681	-0,559	0,576



Figuur 9. Visualisatie van de eDNA concentratie uitgezet tegen het aantal dagen sinds het geschatte laatste gebruik (links, statistisch significante relatie) en het maximaal aantal vastgestelde dieren (rechts, geen statistisch significante relatie). Het grijze vlak geeft het 95% betrouwbaarheidsinterval weer.

Controles

Alle extracties controles en PCR controles gaven negatieve uitslag. In de veldcontroles 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 (zie bijlage 2). Bij het toepassen van 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.

Soortsamenstelling bij panden

Gewone dwergvleermuis- Bij 63 van de 70 bemonsterde verblijfplaatsen van gewone dwergvleermuis werd eDNA gedetecteerd (90%). In alle gevallen werd met metabarcoding de aanwezigheid van eDNA van gewone dwergvleermuis bevestigd. Daarnaast werd eDNA van gewone dwergvleermuis aangetroffen bij 29 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 24 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 (22%) 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 23 locaties waar protocolonderzoek verblijfplaatsen van andere soorten aantrof.

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 5 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 5. Overzicht van 4 locaties waar geen volledige bemonstering uitgevoerd is.

Type verblijfplaats, soort en moment van monsternamen	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 Afbraakexperiment kasten

Aanwezigheid en eDNA

Soortsamenstelling

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 bijlage 4 voor een gedetailleerd overzicht). Voor zover de monitoringsgegevens beschikbaar waren, werd in alle kasten tenminste eDNA van de soorten aangetroffen die ook vastgesteld zijn aan de hand van visuele inspecties die gedaan zijn in 2024. In veel kasten werd daarnaast ook eDNA van andere soorten aangetroffen. Er werd in de kasten alleen eDNA aangetroffen van soorten waarvan het bekend is dat ze gebruik maken van de kasten (ook andere kasten, dan opgenomen in het experiment) in de betreffende omgeving.

In één monster heeft de metabarcoding een vals negatief resultaat gegeven voor gewone dwergvleermuis. In deze kast is bij de visuele inspecties vastgesteld dat er rosse vleermuis, ruige en gewone dwergvleermuis van de kast gebruik maken. In het eDNA monster werd met de qPCR voor gewone dwergvleermuis een eDNA concentratie van 1050 eDNA moleculen/spons gemeten. Gewone dwergvleermuis maakte in de metabarcoding analyse echter slechts 0,4% van de reads uit, waardoor deze onder de gestelde threshold van 1% viel. In het betreffende monster werd een hoge concentratie eDNA van rosse vleermuis en ruige dwergvleermuis gemeten, waardoor het aandeel eDNA van gewone dwergvleermuis onder de gestelde drempelwaarde viel.

Controles

In de zes controle kasten is, net als de monsters, vier keer de eDNA concentratie gemeten. In de controle monsters door middel van qPCR getest op alle zes soorten die betrokken zijn in het experiment. Dit resulteerde in een subdataset met 144 metingen. In 3 metingen werd eDNA van vleermuizen gemeten (zie tabel 6). Dit betrof in alle gevallen zeer lage concentraties onder of net boven het theoretische detectielimiet. Alle extractiecontroles en PCR controles hebben geen positief resultaat gegeven.

Tabel 6. Overzicht van eDNA detecties op controle kasten. De gemeten eDNA concentraties hebben de eenheid eDNA moleculen/spons.

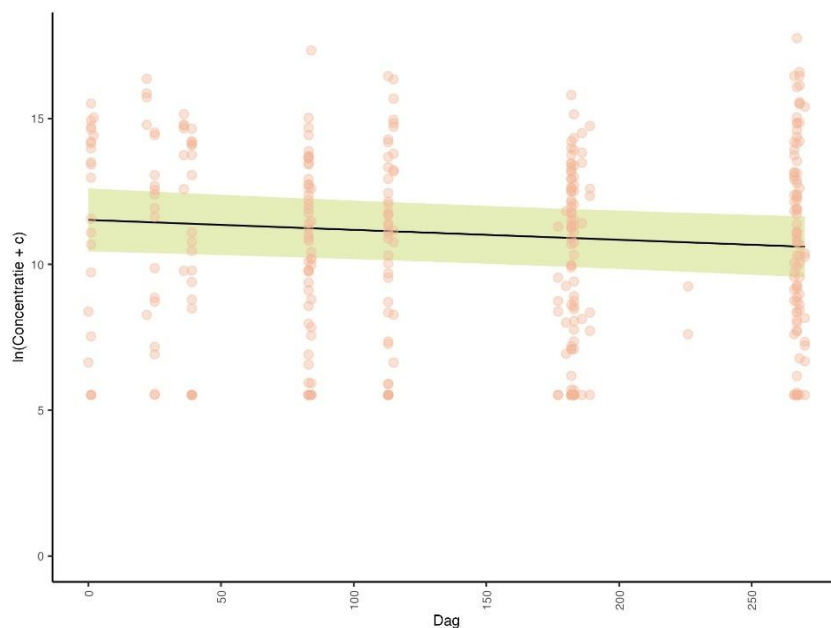
Kast_nr	kast_type	Soort	Ronde 1	Ronde 2	Ronde 3
Controle2	plat Vivara	Rosse vleermuis	0	429	0
Controle6	schwegler rond 3FN	Rosse vleermuis	3094	0	0
Controle3	plat Vivara	Gewone dwergvleermuis	0	0	802

Veranderingen in concentratie gedurende het jaar

De veranderingen in de gemeten eDNA concentraties in de kasten is geanalyseerd met een mixed model, zodat variatie door soort en individuele kast wordt gecorrigeerd. De exacte resultaten van het mixed model van effect van tijd op de gemetenconcentraties eDNA zijn opgenomen in bijlage 6.

Het model laat zien dat de (ln-getransformeerde) DNA-concentratie gemiddeld afnam door de tijd (zie figuur 10). De geschatte helling (het regressiecoefficient) voor het effect van tijd bedroeg $-0,00341$ per dag (SE = $0,00141$, $p = 0,016$). Dit betekent dat de log-DNA-concentratie dagelijks iets afneemt, wat wijst op een geleidelijke afbraak van DNA. Het gemiddelde beginniveau van de (logaritmische) DNA-concentratie was $11,52$ (SE = $0,55$).

Het model hield bovendien rekening met verschillen tussen soorten en tussen kasten. De variatie tussen kasten (Kast_nr) was relatief groot (SD = $2,01$), terwijl de variatie in concentratie tussen soorten kleiner was maar nog steeds duidelijk aanwezig (SD = $0,93$). De resterende variatie binnen de metingen was $2,36$. Welke strook bemonsterd werd, had geen significant effect op de gemeten concentratie. Blijkbaar laten de dieren aan de randen niet meer of minder DNA achter dan in het midden.

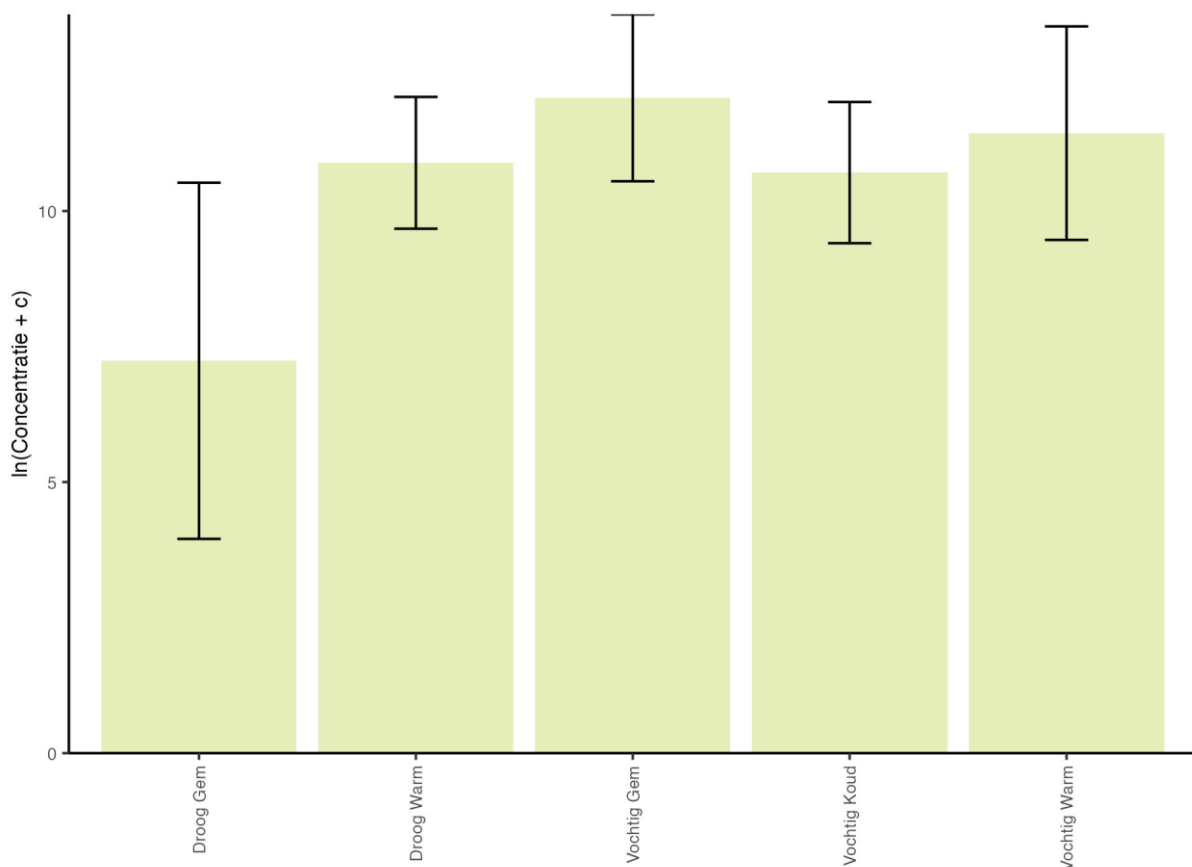


Figuur 10. Effect van dag op de ln-getransformeerde concentratie gemeten DNA, gecorrigeerd voor kast en vleermuissoort.

Daarnaast is met een aantal modelvarianten getoetst of het effect van tijd op de concentratie eDNA ook afhangt van kasttype, kastmateriaal en intern klimaat en omgevingsvariabelen, met een reeks modelvarianten.

Er was geen duidelijk effect van kasttype op de concentratie eDNA ($p > 0.1$). Het materiaal van de kasten is wel sterk significant. In de kasten van houtbeton zijn significant lagere concentraties eDNA gemeten dan in de kast van het model Schwegler type 1FF met houten achterkant ($p < 0.001$).

De kasten waren ingedeeld in kasten met veel en weinig direct zonlicht. Maar dit, en de oriëntatie van de kasten had geen toegevoegde verklarende waarde voor het model. Ook vocht (in klassen) en temperatuur (in klassen) had geen toegevoegde verklarende waarde in het model. Tot slot is het effect van een combinatie van deze twee genomen (vochtig – warm, vochtig – gemiddeld, et cetera). Hierbij waren er wel effecten op de concentratie gemeten eDNA. Er was geen significante interactie tussen temperatuur-vocht en tijd. Dit betekent dat er geen merkbaar verschil in afbraaksnelheid was tussen kasten die verschillen in temperatuur en vochtigheid. Wel was er een significant effect van temperatuur-vocht op de concentratie over de hele meetperiode. Kastklimaat had wel een effect op het gemeten concentratie eDNA. In vochtige kasten met een gemiddelde ($p=0.02$) en warme temperatuur ($p=0.02$) is er significant hogere eDNA concentratie gemeten. De andere klimaatklassen hadden geen significant effect op de concentratie gemeten DNA (figuur 11).



Figuur 11. Effect van een combinatie van temperatuur en vochtigheid op de concentratie gemeten DNA, gecorrigeerd voor dag van de meting, kast en vleermuissoort.

Halfwaardetijd

Met de hierboven berekende hellingshoek (de regressiecoëfficiënt voor tijd) kan de halfwaardetijd worden berekend:

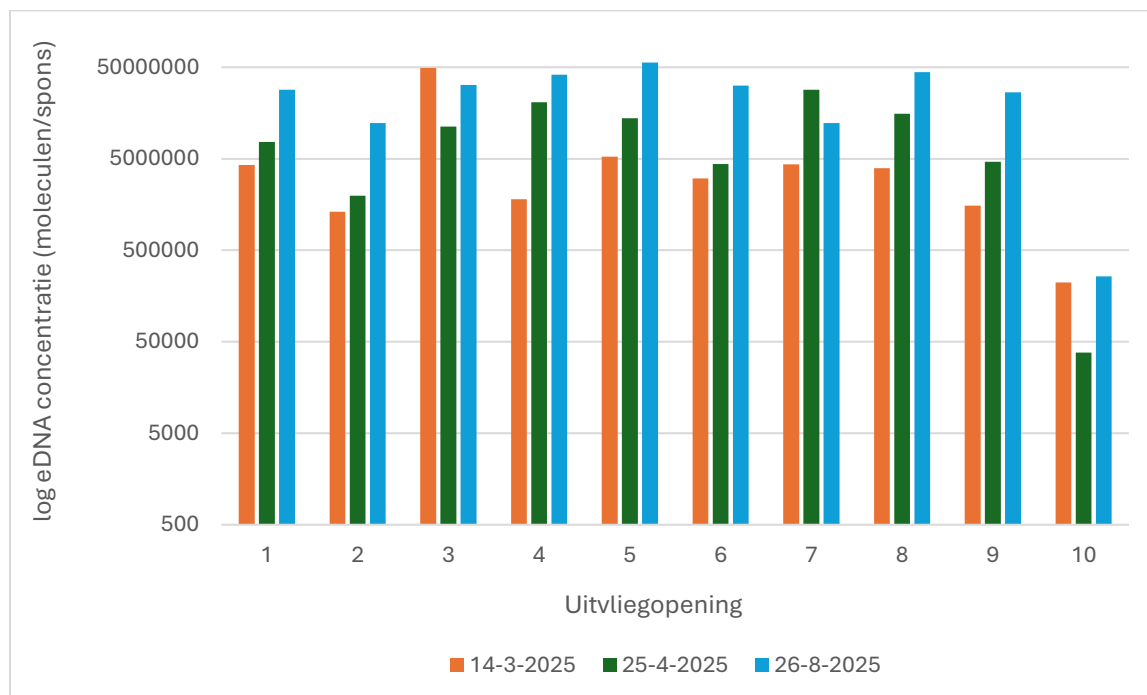
$$\beta = -0.00341 \text{ per dag}$$

$$T_{1/2} = \ln(2) / 0.00341 = 203 \text{ dagen}$$

Dit betekent dat het gemiddeld ongeveer 200 dagen duurde voordat de helft van de concentratie DNA verdwenen was, wanneer gecorrigeerd wordt voor verschillen tussen soorten en kasten. Omdat de helling klein is en de spreiding tussen locaties relatief groot, moet deze waarde voorzichtig geïnterpreteerd worden. Het berekende 95% betrouwbaarheidsinterval is namelijk best groot: tussen de 109 en 635 dagen.

3.3 Kraamverblijf laatvliegers

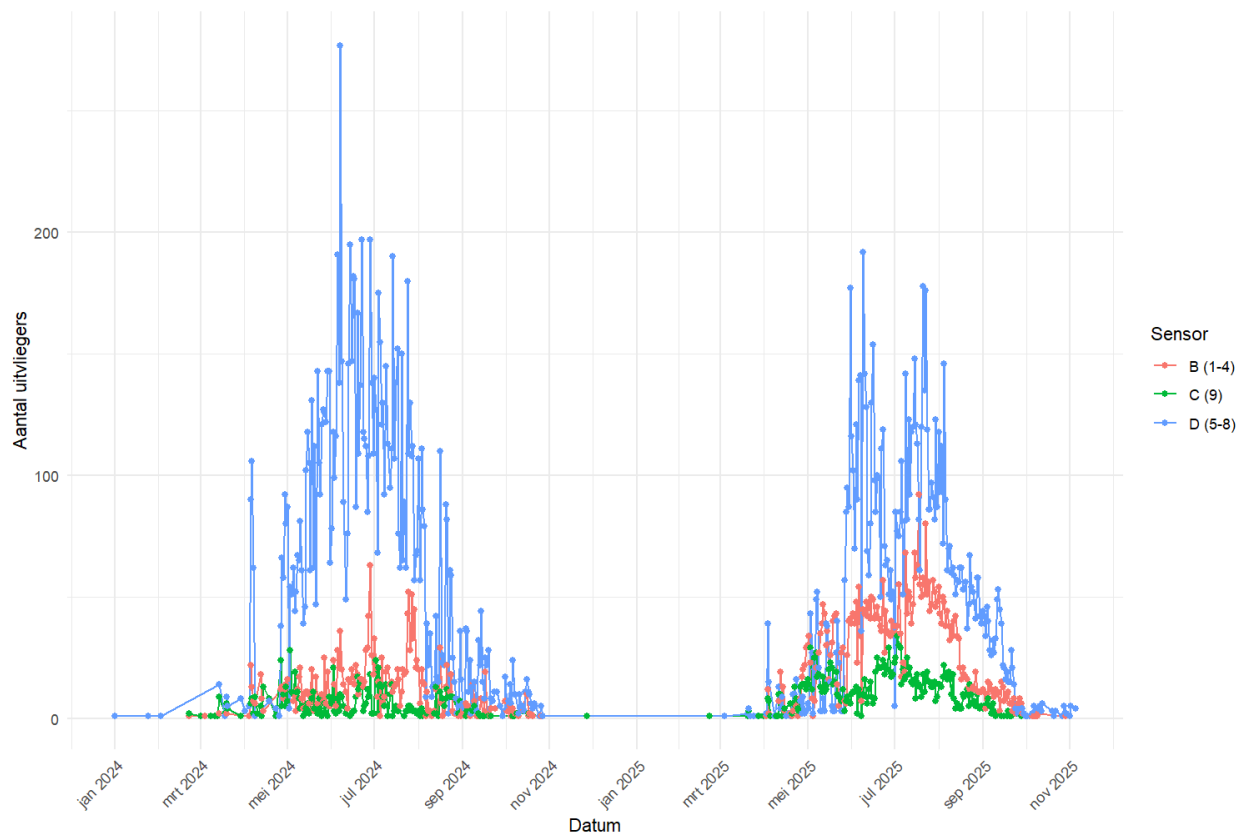
De concentratie eDNA zoals gemeten bij de 10 uitvliegopeningen is weergegeven in figuur 12. Het aantal uitvliegende dieren per sensor is weergegeven in figuur 13. In de periode 1 november 2024-23 maart 2025 werd weinig activiteit geregistreerd door de sensoren (zie tabel 7). Bij uitvliegopening 1-4 zijn zelf helemaal geen dieren gepasseerd tussen 27 oktober 2024 en 23 maart 2025. Toch werd op 14 maart 2025 bij alle uitvliegopeningen eDNA van laatvlieger gemeten.



Figuur 12. De gemeten eDNA concentraties van laatvlieger bij 10 uitvliegopeningen bij een kraamkolonie in Castenray. De detectielimiet van de analyse bevindt zich op ongeveer 500 moleculen /spoons.

Tabel 7. Gecombineerd aantal uitvliegende laatvliegers bij sensor B (uitvliegopening 1-4), C (opening 9) en D (opening 5-8) gedurende de winterperiode tot 23 maart 2025 (dag waarop eDNA monster genomen werd).

Datum	B (1-4)	C (9)	D (5-8)
26-10-2024	1		5
27-10-2024		1	
21-2-2025		1	
4-3-2025			1

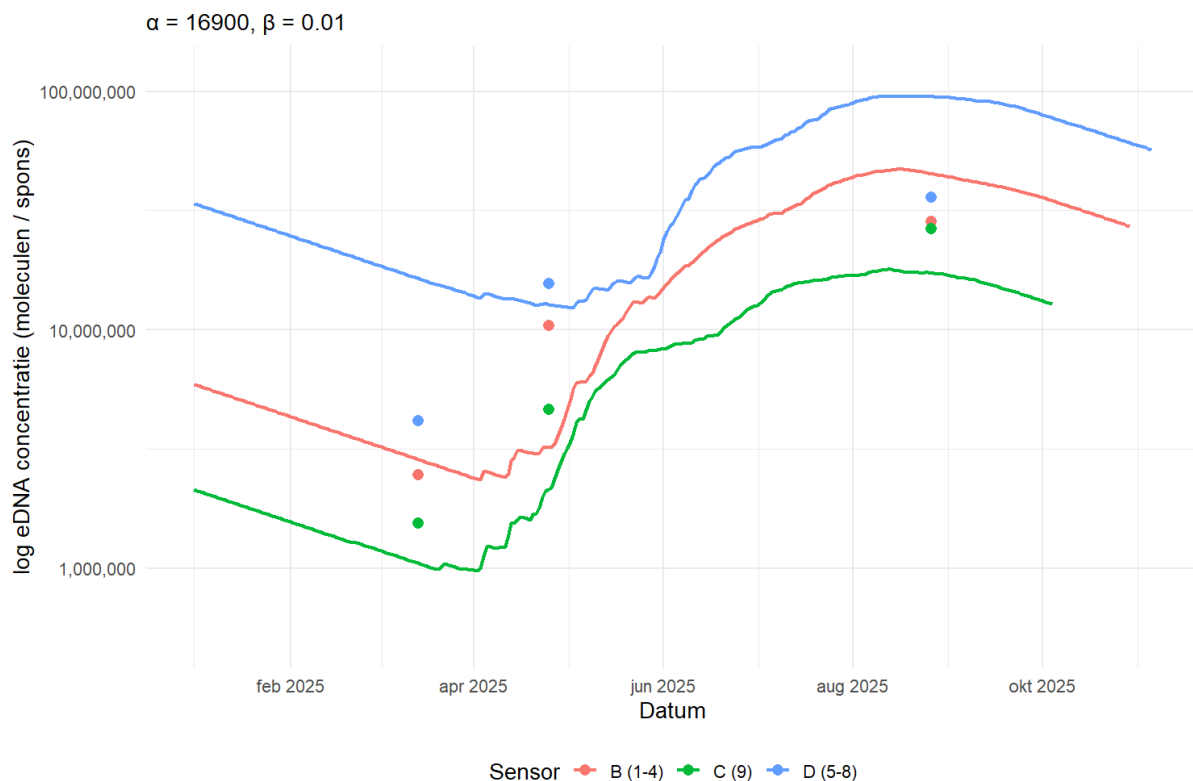


Figuur 13. Aantal registraties per dag van uitvliegende dieren tussen 15 minuten voor en 120 na zonsondergang.

De α (afgifteparameter) is geschat op 16900 en β (afbraakparameter) is geschat op 0,01. De betrouwbaarheid van het accumulatie–afbraakmodel is weergegeven in tabel 8. De uitkomsten van het model zijn geplot in figuur 14. De halfwaardetijd van eDNA op de uitvliegopeningen, berekend op basis van het accumulatie–afbraakmodel, is geschat op 65 dagen (95% betrouwbaarheidsinterval: 37–69 dagen). Deze schatting is echter onderhevig aan grote onzekerheid, omdat het model gebaseerd is op slechts drie eDNA-meetmomenten per locatie. De beperkte temporele resolutie betekent dat het model parameters α (afgifte) en β (afbraak) niet onafhankelijk kan identificeren, waardoor het betrouwbaarheidsinterval waarschijnlijk een onderschatting van de werkelijke onzekerheid vormt. De waarden dienen daarom als een indicatieve orde van grootte en niet een exacte schatting van de eDNA-afbraaksnelheid.

Tabel 8. Betrouwbaarheid van het model per sensor.

Sensor (uitvliegopening)	RMSE Root Mean Squared Error	R ²
B (1-4)	0,733	0,692
D (5-8)	0,979	0,517
C (9)	0,556	0,979



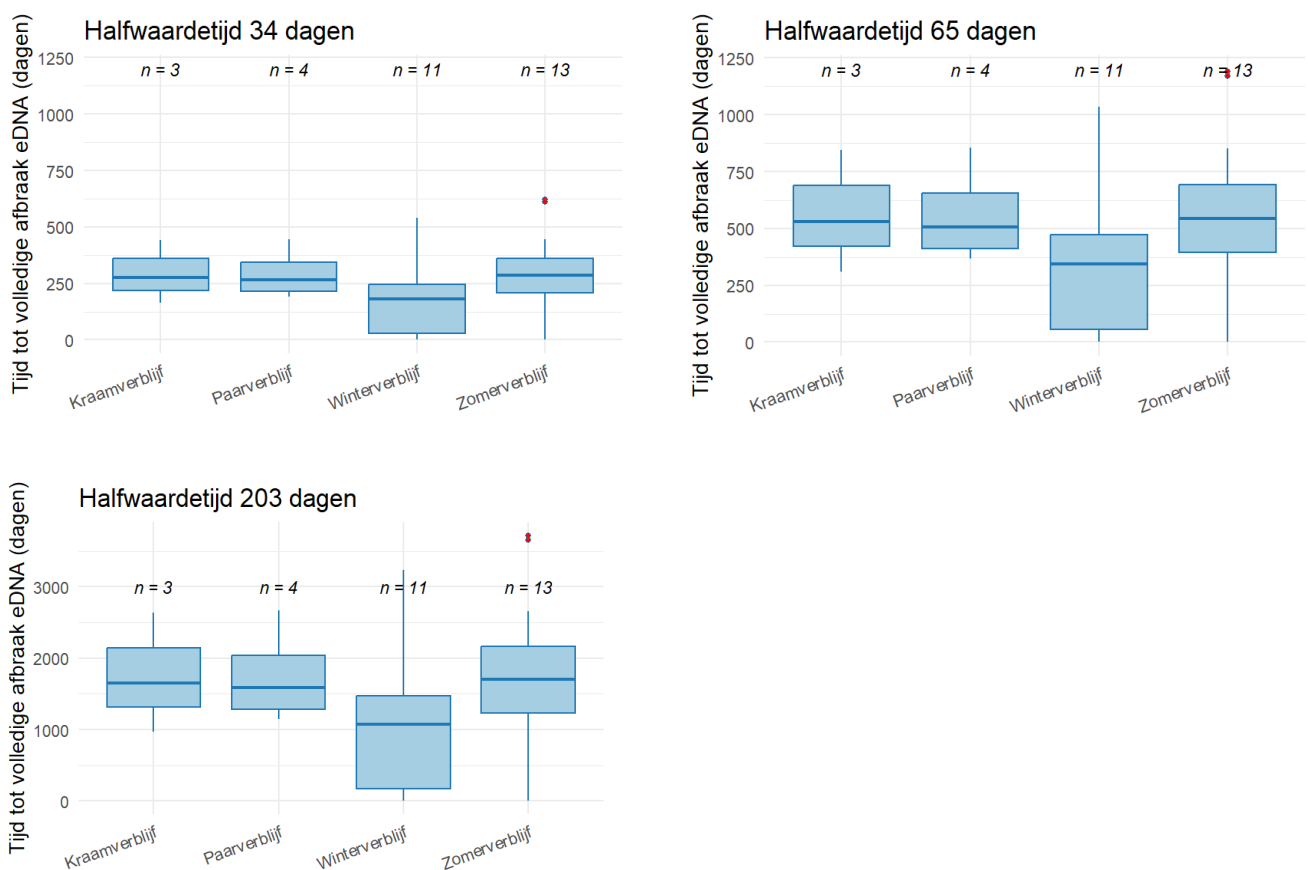
Figuur 14. Uitkomsten van het toegepaste accumulatie–afbraakmodel. De lijnen geven de gemodelleerde, en de punten de daadwerkelijk gemeten eDNA concentratie weer.

3.4 Analyse houdbaarheid eDNA

In de drie hierboven beschreven experimenten zijn schattingen van halfwaardetijden verkregen. In tabel 9 is een overzicht opgenomen van de gevonden halfwaardetijden. Op basis van deze halfwaardetijden is berekend hoelang eDNA in theorie detecteerbaar blijft bij verblijfplaatsen, uitgaande van de eDNA concentratie die gemeten is bij verblijfplaatsen op moment dat er waarschijnlijk dieren aanwezig zijn. De gemiddelde houdbaarheid van eDNA bij verblijfplaatsen is weergegeven in tabel 9 en in boxplots (figuur 15).

Tabel 9. Overzicht van de geschatte halfwaardetijden per experiment, inclusief de ondergrens en bovengrens van het 95% betrouwbaarheidsinterval. De gemiddelde houdbaarheid is berekend als de gemiddelde periode dat het duurt dat eDNA afbraak bij verblijfplaatsen uitgaande van de betreffende halfwaardetijd.

Experiment	Geschatte halfwaardetijd	Ondergrens 95 BI	Bovengrens 95 BI	Houdbaarheid bij verblijfplaatsen in dagen
Panden	34	23	64	256
Laatvlieger kolonie	65	37	69	490
Kasten	203	109	635	1530



Figuur 15. Boxplots van berekende tijd (dagen) waarin eDNA afbreekt tot onder het detectielimiet uitgaande van een halfwaardetijd van 34 dagen (linksboven), 65 dagen (rechtsboven) en 203 dagen (linksonder).

4. Discussie

Modellering eDNA concentratie bij panden

Voor het modelleren van de eDNA concentratie bij panden is gebruik gemaakt van een schatting van het aantal dieren en de datum dat de betreffende verblijfplaats voor het laatst bezocht is door vleermuizen. Beide betreffen grove schattingen. Het aantal dieren betreft bij de meeste locatie een eenmalige telling van uitvliegende of invliegende dieren en is dus een moment opname. Vleermuizen verhuizen regelmatig, en een eenmalige telling zal vaak niet representatief zijn. Er is geen relatie gevonden tussen het aantal dieren dat in het veld vastgesteld is en de eDNA concentratie. Dit kan mogelijk verklaard worden omdat één enkele in of - uitvliegtelling niet representatief is voor het daadwerkelijk aantal dieren dat door het seizoen heen gebruik maakt van de betreffende verblijfplaats. Ook de tijd sinds laatste bezoek door vleermuizen betreft een schatting die gemaakt is op basis van de functie van een verblijfplaats. De functie van verblijfplaats is dan weer een inschatting van een ecooloog op basis van onderzoek volgens vleermuizen protocol. In sommige gevallen heeft het veldonderzoek bovendien al een jaar eerder plaatsgevonden. De schatting van het aantal dagen sinds laatste bezoek betreft dus een grove indicatie, op basis waarvan een grove schatting van de afbraaksnelheid verkregen is. Het is mogelijk dat bij bijvoorbeeld kraamverblijven dieren ook buiten de kraamperiode gebruik maken van de verblijfplaats, terwijl nu de aanname is gedaan dat bij een kraamverblijfplaats alleen in de kraamperiode dieren aanwezig zijn. Het zou zo kunnen zijn dat het in de winter gemeten eDNA concentratie bij kraamverblijven niet alleen verklaard kan worden door een langzame afbraak, maar ook door verse afgifte buiten de kraamperiode. Dus hoewel het voor jaarronde toepasbaarheid van de eDNA methode in feite niet uitmaakt of dit verse afgifte betreft, of langzame afbraak, kan het wel zijn dat eDNA sneller afbreekt dan uit de modellering van de eDNA concentratie bij panden blijkt.

Kastenexperiment

In dit experiment zijn vleermuiskasten gebruikt om een beeld te krijgen van de afbraak van eDNA op panden. In het experiment is zowel gebruik gemaakt van houten als betonnen kasten om uit te sluiten dat het type materiaal grote invloed heeft op de afbraaksnelheid. Er zijn geen effecten van het type kast op de afbraaksnelheid gevonden. Toch kunnen we niet uitsluiten dat het eDNA op de bemonsterde oppervlaktes van panden met een andere snelheid afbreekt dan op vleermuiskasten gezien de grote variatie in materiaalsoorten en eigenschappen van panden. Er is eDNA aangetroffen in 3 van de 144 controlemetingen van het kastenexperiment. Deze monsters zijn verzameld bij kasten die nieuw uit de verpakking komen. Er is geen eDNA gemeten in extractie controles en PCR controles. Dit maakt het aannemelijk dat het gemeten eDNA zich daadwerkelijk op de kasten bevond. Het betroffen lage concentraties net boven of onder het theoretische detectielimiet. Ervaring van de auteurs is dat het in experimenten, waarbij behandelingen op korte afstand van elkaar staan dergelijke kleine contaminaties vrijwel niet te voorkomen zijn. DNA kan bijvoorbeeld van de kasten met (hoge concentraties) eDNA overwaaien naar de controle kasten of zou door bijvoorbeeld door insecten of vogels verplaatst kunnen zijn. De hoogste concentratie in een controle monster die gemeten is, betreft 3084 moleculen/spons. Dit is 396 keer lager dan de gemiddelde concentratie in de metingen op de kasten, en 22.459 keer lager dan de hoogste concentratie die gemeten is op een kast. De gemeten concentraties in de controle monsters zijn daarmee zo laag dat dergelijk contaminatieniveau geen invloed heeft op de uitkomsten van het experiment. In het algemeen nam de concentratie van DNA over de meetperiode af. Er waren echter uitbijters binnen sommige kastreeksen, waarbij een tweede, derde of vierde meting (veel) een veel hogere concentratie opleverde dan de andere metingen. Vermoedelijk is dit het gevolg

van voorkeur van de vleermuizen voor een hoek of juist het midden van de betreffende kast, zodat een van de 4 monsterstroken relatief veel eDNA bevatte. Doordat de volgorde van bemonsteren van de 4 stroken is gerandomiseerd, zal er geen systematisch effect van deze piekmetingen zijn op de berekening van de afbraaksnelheid. Er was dan ook geen significant verschil tussen concentraties in de strook 1, 2, 3 en 4 van de kasten.

Er is geen effect gevonden van temperatuur, vochtigheid, oriëntatie en mate van directe lichtinval op de afbraaksnelheid. Daarbij dient wel opgemerkt te worden dat de variatie tussen de kasten en metingen groot was, en dat de afbraaksnelheid zeer laag was. Mogelijk dat er wel effecten gemeten kunnen worden bij een experiment dat langer loopt (meerdere jaren). Er was geen significant verschil in gemeten concentraties tussen kasttypen. Wel waren concentraties in de houten kasten (Schwegler 1FF) hoger dan in de houtbetonnen kasten. Mogelijk wordt DNA minder goed afgezet op houtbeton, of minder goed bemonsterd, of zorgt dit ervoor dat eDNA sneller afbreekt.

Echter kan op basis van deze resultaten wel geconcludeerd worden dat als er effecten zouden zijn op lange termijn, het niet aannemelijk is dat er grote effecten gevonden zullen worden. Opvallend is dat er gemiddeld een iets hogere eDNA concentratie gemeten is bij de kasten die vochtiger en warmer waren. Dit zou een indicatie kunnen zijn dat de afbraak toch beïnvloed wordt door vocht en temperatuur. Echter zien we geen effect van de genoemde factoren op de afbraaksnelheid, en bovendien zou het effect tegen verwachting zijn. Uit eerdere studies is bekend dat eDNA juist sneller afbreekt onder vochtige en warme omstandigheden Naef *et al.* (2023). We vermoeden daarom dat we toevallig kasten gebruikt hebben met hogere eDNA concentratie bij de behandelingen met een hogere temperatuur en vochtigheid.

Modellering eDNA concentratie bij laatvlieger kolonie

De uitkomsten van het model afgifte-afbraakmodel dat toegepast is op de eDNA concentraties die gemeten zijn bij de kraamkolonie laatvliegers is zeer onzeker om deze gebaseerd is op slechts 9 metingen. Daardoor is het onderscheid tussen de opbouwparameter en afbraakparameter moeilijk te maken en ligt het 95% betrouwbaarheidsinterval mogelijk verder uit elkaar dan gerapporteerd. De berekende halfwaardetijd op basis van dit experiment moet dus als indicatief beschouwd worden. Wel is sensor data gebruikt uit 2024 en 2025 waardoor het model ook rekening houdt met eDNA dat in het verleden (2024) al reeds opgebouwd is bij de uitvliegopeningen.

Synthese halfwaardetijd

In alle drie deelprojecten zijn schattingen gemaakt van de afbraaksnelheid en de halfwaardetijd van eDNA. De onzekerheid van de schattingen is vrij groot, waardoor de 95% betrouwbaarheid intervallen tamelijk ruim zijn. De schattingen tezamen geven echter een beeld van de range waarin de halfwaardetijd zich waarschijnlijk bevindt. In het meest pessimistische scenario (verkregen via het pandenexperiment) breekt eDNA bij verblijfplaatsen in 256 dagen af tot onder de detectielimiet. Hoewel dit minder dan een jaar is, is het wel aannemelijk dat eDNA in dit scenario in veel gevallen jaarrond detecteerbaar is. Immers, tegen de tijd dat het eDNA afgebroken is zijn er het seizoen erna weer dieren aanwezig die weer vers eDNA achterlaten bij de uitvliegopeningen. In het meest gunstige scenario (verkregen via het afbraakexperiment met behulp van de kasten) duurt het 4 jaar voordat eDNA afbreekt tot onder de detectielimiet.

Van belang om op de merken is dat in het scenario dat eDNA gemiddeld 256 dagen detecteerbaar blijft, er locaties zijn waarbij eDNA langer, maar ook korter dan het gemiddelde detecteerbaar blijft.

In gevallen waarbij in de zomer bij een zomerverblijf relatief weinig eDNA afgegeven wordt is dat kans groter dat er in de winter niets meer gedetecteerd wordt. Dit zien we terug in de praktijk. In de zomer (juni-september) werd in alle monsters die genomen zijn bij zomerverblijven eDNA gedetecteerd. In de winterperiode (december-begin april) werd bij 80% van de zomerverblijven eDNA gedetecteerd. Overigens werd bij kraamverblijven zowel in de zomer als in de winter bij alle verblijfplaatsen eDNA gedetecteerd. In dit onderzoek zijn met name verblijfplaatsen van gewone dwergvleermuis, en in mindere mate ruige dwergvleermuis, laatvlieger en rosse vleermuis bemonsterd. Het is niet bekend of alle soorten evenveel eDNA achterlaten. Echter, als er soorten zijn die minder eDNA achterlaten dan zal dit voor zomerverblijfplaatsen met name in de winter leiden tot een lagere detectiekans.

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 9840 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 toepassen 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 van 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.

Drempelwaarde B: Minimaal 50% van de PCR replica's positief & minimaal 743 moleculen/spons 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 lagere detectiekansen (in de winter een detectiekans van 64% van zomerverblijven) dan wanneer er geen drempelwaarde toegepast wordt (dat resulteert in de winter in een detectiekans van 80% van zomerverblijven). Drempelwaarde B resulteert echter wel in hogere detectiekansen dan wanneer een curve alleen positief gescoord wordt bij een ct-waarde kleiner dan 37 (drempelwaarde C; in de winter een detectiekans van 32% bij zomerverblijven). Dit geldt met name in de periode van het jaar dat vleermuizen niet, of minder gebruik maken van de uitvliegopening. Toch worden ook bij drempelwaarde B in de winterperiode diverse verblijfplaatsen gemist. 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 (80% bij zomerverblijven die bemonsterd worden in de winter). 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%). Gezien de veldsituatie betrof deze "vals positieve" detecties geen laboratoriumfouten, maar was het eDNA daadwerkelijk in de monsters aanwezig. 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 betreffende panden/ woonblokken worden dus wel degelijk door vleermuizen gebruikt als verblijfplaats. 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 de 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. Het gedrag (en daarmee detecteerbaarheid in de winter) van vleermuizen zou echter per vleermuissoort kunnen verschillen.

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 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.

In deze studie zijn voornamelijk verblijfplaatsen van gewone dwergvleermuis (n=70) 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. Dit onderzoek is uitgevoerd bij dilatatievoegen waar 1 of 2 dieren per voeg aanwezig waren. Wij denken dat dit representatief is voor kleine winterverblijfplaatsen waar één of enkele vleermuizen overwinteren. Echter is dit moeilijk te toetsen omdat er weinig of zelfs geen woningen bekend zijn waar vleermuizen in de spouw overwinteren omdat het methodologisch zeer lastig is om overwinterde vleermuizen aan te tonen in de spouw.

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 in het pandenonderzoek 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 breidt zich laatste jaren sterk

uit naar het noorden (Bouillard *et al.* 2020). Het is dus aannemelijk dat Kuhls dwergvleermuis Nederland bereikt heeft.

Standaardisatie tussen laboratoria

Het is wenselijk om de gevoeligheid waarmee gemeten wordt te standaardiseren tussen laboratoria. Een drempelwaarde op ct-waarde is moeilijk te standaardiseren omdat de bemonstering, de eDNA extractie en de efficiency van het toegepaste eDNA assay verschilt tussen laboratoria. Om de vergelijkbaarheid tussen laboratoria in de toekomst te verbeteren is het daarom zinvol om drempelwaardes en de uitkomsten van analyses in toekomst te rapporteren in aantallen eDNA moleculen/ spons (of roller) omdat deze eenheid te vergelijken vallen, en omdat deze niet afhankelijk is van de efficiency van het toegepaste qPCR-assay. In deze studie is niet op gestandaardiseerde wijze gebruik gemaakt van een interne controle waarmee het rendement van de extractie gemeten kan worden. De gerapporteerde eDNA concentraties per spons in deze rapportage zijn dus niet gecorrigeerd voor het rendement gedurende de extractie. Aannemelijk is dat een deel van het eDNA op de spons verloren gaat tijdens de extractie. De concentraties eDNA in de monsters zullen in de praktijk dus hoger zijn dan gerapporteerd. Het verdient de aanbeveling om bij toekomstige studies standaard een interne controle toe te voegen aan de lysis buffer zodat het rendement van de eDNA extractie gekwantificeerd kan worden.

5. Conclusies

5.1 Conclusies onderzoeksvragen

Hoe lang is eDNA materiaal traceerbaar bij in-/uitvliegopeningen bij de verschillende verblijfplaatsen van gebouw-bewonende vleermuissoorten?

De schattingen op basis van de verschillende experimenten lopen uiteen van 256 dagen tot 4 jaar.

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 in panden is het aannemelijk dat 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. Wel dient opgemerkt te worden dat deze conclusie getrokken wordt op basis van een onderzoek bij twee flats waarbij 16 dilatatievoegen bemonsterd zijn (dus 16 monsters) waarin één of twee gewone dwergvleermuizen overwinteren. Wij vermoeden dat dit representatief is voor panden in het algemeen, maar dit is met dit onderzoek niet hard te maken. Verder geldt deze conclusie alleen als er voldoende gevoelig gemeten wordt. Voor de methode (zoals deze wordt toegepast in dit onderzoek) houdt dat in dat 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 (van met name gewone dwergvleermuis) 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). Ook winterverblijven kunnen in de winter aangetoond worden met eDNA (zie onderzoeksvraag hierboven). 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 (zoals ct-waarde van minimaal 40) is de kans aanzienlijk groter dat zomerverblijven in de winter, en paarverblijven in de zomer gemist worden. De resultaten van ruige dwergvleermuis, laatvlieger en rosse vleermuis geven de indruk dat de methode ook voor deze soorten jaarrond effectief is, maar vanuit wetenschappelijk perspectief is de dataset niet groot genoeg voor een definitieve conclusie met betrekking tot deze soorten.

Tot hoe lang terug kan een vleermuis aan- of afwezig zijn geweest bij aan- of afwezigheid van eDNA?

De traagste afbraaksnelheid is gemeten in het kastenexperiment. Uit het kastenexperiment blijkt dat eDNA dat gedetecteerd wordt tot 4 jaar geleden afgegeven kan zijn. Bij panden duidt de afwezigheid van eDNA erop dat er ~256 dagen of langer geen dieren aanwezig geweest zijn.

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?

Er zijn geen effecten vastgesteld van temperatuur, vochtigheid, oriëntatie en mate van lichtinval op de afbraaksnelheid van eDNA. Het is moeilijk hard te maken dat deze factoren in de praktijk helemaal geen effect hebben, maar het is niet aannemelijk dat deze factoren een groot effect hebben.

Kan bij vastgestelde afwezigheid van eDNA van vleermuizen worden geconcludeerd dat vleermuizen het afgelopen jaar geen gebruik hebben gemaakt van de in-/uitvliegopening?

Schattingen van de afbraaktijd van eDNA lopen op basis van de drie uitgevoerde studies uiteen van 256 dagen tot 4 jaar. Vermoedelijk zal in de meeste gevallen eDNA een jaar detecteerbaar blijven, en kan dus geconcludeerd worden dat vleermuizen afgelopen jaar geen gebruik gemaakt hebben van de in- /uitvliegopening. Mogelijk zijn er echter situaties waarbij het meest pessimistische scenario realiteit is, en eDNA al na 256 dagen afgebroken is.

5.2 Overige conclusies

- De kans op vals positieve waarnemingen (wel eDNA in het monster, geen verblijfplaats) 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 winterverblijven, 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.

6. Advies

- In het kader van na-isolatie projecten is het advies om de eDNA sponsmethode jaarrond in te zetten om alle soorten vleermuizen in de spouw op te sporen, mits de toegepaste bemonsteringsmethode, laboratoriumanalyse, en laboratoriuminrichting het mogelijk maken om met voldoende gevoeligheid te detecteren. Voor de analyses zoals die in deze studie uitgevoerd zijn betekent dit dat de analyse positief gescoord wordt als minimaal 1 van de 2 qPCR replica's positieve uitslag geeft en er geen aanvullende drempelwaarde gehanteerd wordt. Onderzoek naar gewone dwergvleermuis leverde jaarrond goede resultaten op van de techniek en de resultaten van de ruige dwergvleermuis, rosse vleermuis en laatvlieger geven geen aanleiding om te verwachten dat de techniek voor andere soorten onbetrouwbaar zou zijn. Op basis van dit onderzoek is het aannemelijk geworden dat als er wel een drempelwaarde gehanteerd bij de in dit onderzoek toegepaste moleculaire methode, de kans groot is dat zomerverblijven in de winter, en paarverblijven in de zomer, gemist worden.
- De adviezen in deze rapportage zijn gebaseerd op onderzoek bij verblijfplaatsen van gewone dwergvleermuis, en in mindere mate ruige dwergvleermuis, laatvlieger en rosse vleermuis. We bevelen daarom aan om dit onderzoek uit te breiden met metingen bij verblijfplaatsen van andere gebouw bewonende vleermuissoorten en aanvullende metingen bij verblijfplaatsen van ruige dwergvleermuis, laatvlieger en rosse vleermuis. 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 of andere gebouwdelen bemonsterd worden. Daarbij dient onderzocht te worden welke uitvliegopeningen door vleermuizen gebruikt worden, en dus bemonsterd dienen te worden.
- Systematische registratie van de bemonsterde openingen is belangrijk in verband met de kwaliteitswaarborging. Het is advies om een registratie verplicht te stellen via een 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 monstereethodes 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 monstereethodes 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 744 eDNA moleculen/spons). Vals positieve waarnemingen lijken alleen te ontstaan in de buurt van verblijfplaatsen, mogelijk als gevolg van zwermgedrag. Op basis van deze studie lijkt 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 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. We adviseren in de toekomst een interne controle toe passen zodat de extractie efficiency berekend en gerapporteerd kan worden. Dit maakt het mogelijk om de gevoeligheid van meten te standaardiseren tussen laboratoria.

7. Dankwoord

We danken iedereen 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.

8. Literatuur

- Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S (2015). *Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4*. Journal of Statistical Software, 67(1), 1-48. doi:10.18637/jss.v067.i01
- 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.
- Kuznetsova A, Brockhoff PB, Christensen RHB (2017). *lmerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models*. Journal of Statistical Software, 82(13), 1-26. doi:10.18637/jss.v082.i13
- Lankveld, W. 2024. De houdbaarheid van vleermuizen-eDNA bij verblijven in spouwmuren. Arcadis, Arnhem.
- Lamb, P. D., Fonseca, V. G., Maxwell, D. L., & Nnanatu, C. C. (2022). Systematic review and meta-analysis: Water type and temperature affect environmental DNA decay. *Molecular Ecology Resources*, 22(7), 2494-2505.
- Lüdecke D (2018). *ggeffects: Tidy Data Frames of Marginal Effects from Regression Models*. Journal of Open Source Software, 3(26), 772. doi:10.21105/joss.00772
- Naef, T., Besnard, A. L., Lehnen, L., Petit, E. J., Van Schaik, J., & Puechmaille, S. J. (2023). How to quantify factors degrading DNA in the environment and predict degradation for effective sampling design. *Environmental DNA*, 5(3), 403-416.
- R Core Team (2025). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- 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.

Bijlage 1. Overzicht van bemonsterde panden.

Overzicht van alle bemonsterde panden met een verblijfplaats inclusief resultaten van de eDNA algemene vleermuis qPCR en metabarcoding analyse.

GD = Gewone dwergvleermuis. RD = Ruige dwergvleermuis. LV = Laatvlieger. RV = Rosse vleermuis.

Plaats	Type woning	Gebouwdelen bemonsterd	Onvolledige bemonstering	Onderzoek	Gedrag	functie	aantal dieren waargenomen	soorten bat-detector	datum eDNA bemonstering	positieve qPCR replica's	ml conserveringsbuffer	Laatvlieger	Meer vleermuis	Rosse vleermuis	Ruige dwergvleermuis	Gewone dwergvleermuis	Tweekleurige vleermuis	Baardvleermuis	
Arkel	Rijteswoning	Kantpannen		Protocol '24	zwermend	kraam	6	GD	2025-02-13	1/2	2	0,0126	0	0	0	0	0,9874	0	0
Arkel	Rijteswoning	Kantpannen	Nee	Protocol '24	zwermend	zomer	1	GD	2025-03-25	2/2	67	0	0	0	0	0,1552	0,8448	0	0
Arkel	Rijteswoning	Kantpannen	Nee	Protocol '24	zwermend	zomer	1	GD	2025-03-25	2/2	45	0	0	0	0	0,4013	0,5987	0	0
Arkel	Rijteswoning	Kantpannen, loodslabben	Nee	Protocol '24	invliegend	zomer	1	GD	2025-03-25	0/2	0						0	0	0
Asten	Rijteswoning	Kantpannen, opening achter dakgoot	Nee	Protocol '24	in- en uitvliegend	zomer	1	GD	2024-12-17	2/2	21	0	0	0	0	0	0,9917	0	0
Avezaath	Rijteswoning	Open stootvoeg, opening achter dakgoot	Nee	Protocol '24	in- en uitvliegend	zomer	1	GD	2025-03-27	1/2	2	0	0	0,0138	0	0	0,9782	0	0
Avezaath	Rijteswoning	Open stootvoeg, kantpannen, opening achter dakgoot	Nee	Protocol '24	in- en uitvliegend	zomer	1	GD	2025-03-25	2/2	2003	0,0032	0,0004	0,0014	0	0,0366	0,9584	0	0
Baarlo	Rijteswoning	Kantpannen, daklijst	Nee	protocol '24	baltsend	paar	1	GD	2024-06-26	12/12	417	0	0	0	0	0	1	0	0
Baarlo	Rijteswoning	Kantpannen, daklijst	Nee	protocol '23	baltsend	paar, zomer	1	GD	2024-06-26	12/12	17292	0	0	0	0	0	1	0	0
Boskoop	Appartementen (4 verdiepingen)	Dilatatievoeg	Nee	Protocol '24	in- en uitvliegend	kraam	30	LV	2025-03-28	2/2	9563	0,9609	0	0,0077	0	0	0,0303	0	0
Delfzijl	Rijteswoning	Kantpannen	Nee	protocol '24	uitvliegen & aantikken	paar	3	GD	2024-06-13	12/12	39	0	0	0	0	0,5152	0,4848	0	0
Delfzijl	Rijteswoning	Kantpannen	Nee	protocol '24	invliegen & uitvliegen	zomer	1	GD	2024-06-13	12/12	94	0	0	0	0	0	1	0	0
Delfzijl	Rijteswoning	Kantpannen	Nee	protocol '24	invliegen	paar, zomer	1	GD	2024-06-13	12/12	854	0	0	0	0	0,0438	0,9562	0	0
Delfzijl	Rijteswoning	Kantpannen	Nee	protocol '24	invliegen & uitvliegen	zomer	1	GD	2024-06-13	12/12	1693	0	0	0	0	0	1	0	0
Delfzijl	Rijteswoning	Kantpannen	Nee	protocol '24	invliegen	zomer	1	GD	2024-06-14	12/12	20051	0	0	0	0	0	0,9978	0	0
Deurne	Rijteswoning	Open stootvoeg, kantpannen, opening achter dakgoot	Nee	Protocol '24	in- en uitvliegend	zomer	1	GD	2024-12-19	1/2	2	0,0184	0	0	0	0,0521	0,9295	0	0
Deurne	Rijteswoning	Open stootvoeg, kantpannen, opening achter dakgoot	Ja	Protocol '24	in- en uitvliegend	zomer	1	GD	2024-12-19	2/2	0								
Deurne	Rijteswoning	Open stootvoeg, kantpannen, opening achter dakgoot	Nee	Protocol '24	in- en uitvliegend	zomer	1	GD	2024-12-19	2/2	62	0,0008	0	0	0	0	0,9970	0	0
Deurne	Rijteswoning	Open stootvoeg, kantpannen, opening achter dakgoot	Nee	Protocol '24	in- en uitvliegend	zomer	1	GD	2024-12-19	1/2	13	0,1704	0	0	0	0,2332	0,5964	0	0
Doorn	Rijteswoning	Open stootvoeg, kantpannen	Nee	protocol '23	uitvliegend	kraam	60	GD	2024-06-20	12/12	345	0	0	0	0	0	1	0	0
Echt	Rijteswoning	Kantpannen	Nee	protocol '23	uitvliegend	zomer	1	GD	2024-06-26	12/12	3239708	0	0	0	0	0	0,9998	0	0
Echt	Rijteswoning	Kantpannen	Nee	protocol '23	uitvliegend	zomer	1	LV	2024-06-26	12/12	8939	0	0	0	0	0,0610	0,9390	0	0
Echt	Rijteswoning	Kantpannen	Nee	protocol '23	uitvliegend	zomer	1	GD	2024-06-26	12/12	4165	0	0	0	0	0	0,9904	0	0
Echt	Rijteswoning	Kantpannen, loodslabben	Nee	protocol '23	aantikken	zomer	1	GD	2024-06-26	12/12	4052906	0	0	0	0	0	1	0	0
Echt	Rijteswoning	Kantpannen	Nee	protocol '23	aantikkend	zomer	1	GD	2024-06-26	12/12	109359	0	0	0	0	0	0,9931	0	0
Erichem	Rijteswoning	Kantpannen, loodslabben	Nee	Protocol '24	in- en uitvliegend	kraam	5	GD	2025-03-21	2/2	613	0	0	0	0	0	0,9997	0	0
Giessenburg	Rijteswoning	Kantpannen	Ja	Protocol '24	in- en uitvliegend	paar	2	RD	2025-03-21	1/2	2	0	0	0	0	0	1	0	0
Giessenburg	Rijteswoning	Daklijst, loodslabben	Nee	Protocol '24	roepend	paar	1	RD	2025-03-25	2/2	15	0	0	0	0	0,9813	0,0188	0	0
Giessenburg	Rijteswoning	Kantpannen, loodslabben	Nee	Protocol '24	roepend	paar	1	RD	2025-03-25	2/2	980	0	0	0	0	0,8608	0,1392	0	0
Haren	School (3 verdiepingen)	Open stootvoeg	Ja	Protocol '24	in- en uitvliegend	zomer	1	LV	2025-03-26	2/2	375	0,0005	0	0	0	0	0,9994	0	0
Hoornaar	Rijteswoning	Kantpannen, loodslabben	Ja	Protocol '24	in- en uitvliegend	kraam	29	GD, LV	2025-03-21	2/2	37	0	0	0	0	0	1	0	0
Leerdam	Rijteswoning	Open stootvoeg, opening achter dakgoot	Nee	Protocol '24	in- en uitvliegend	zomer	1	GD	2024-12-24	2/2	304352	0	0	0,0006	0	0	0,9990	0	0
Leerdam	Appartementen (3 verdiepingen)	Open stootvoeg, kantpannen, kieren rond kozijnen	Nee	protocol '23	?	zomer	1	GD	2024-09-10	12/12	4410	0	0	0,0015	0	0	0,9964	0	0
Leerdam	Appartementen (3 verdiepingen)	Open stootvoeg, kantpannen, kieren rond kozijnen	Nee	protocol '23	onbekend	zomer	1	GD, LV	2024-09-10	12/12	1073	0,0264	0	0,1003	0	0,0871	0,7863	0	0
Leerdam	Rijteswoning	Daklijst, boeibord	Nee	Protocol '24	in- en uitvliegend	kraam	64	GD	2024-12-11	2/2	14485	0	0	0	0	0	0,9994	0	0
Leerdam	Appartementen (3 verdiepingen)	Open stootvoeg, kieren rond kozijnen	Nee	protocol '23	?	zomer	1	GD	2024-09-18	12/12	995	0	0	0,0011	0	0	0,9914	0	0
Leerdam	Appartementen (3 verdiepingen)	Open stootvoeg, kieren rond kozijnen	Nee	protocol '24	?	paar	1	RD	2024-09-18	12/12	6611	0	0	0,0024	0	0,9230	0,0745	0	0
Leerdam	Rijteswoning	Open stootvoeg, opening achter dakgoot	Nee	Protocol '24	in- en uitvliegend	zomer	1	GD	2024-12-24	2/2	570	0	0	0,0008	0	0	0,9987	0	0
Leerdam	Rijteswoning	Open stootvoeg, opening achter dakgoot	Nee	Protocol '24	in- en uitvliegend	zomer	1	GD	2024-12-24	2/2	364446	0	0	0,0003	0	0	0,9987	0	0
Leerdam	Rijteswoning	Kantpannen, opening achter dakgoot	Nee	Protocol '23	zwermend	zomer	1	GD	2025-02-13	0/2	0								
Leerdam	Rijteswoning	Kantpannen, loodslabben, dakgoot, opening achter dakgoot	Nee	Protocol '23	zwermend	zomer	1	GD	2025-02-13	0/2	0								
Leerdam	Rijteswoning	Kantpannen, opening achter dakgoot	Nee	Protocol '23	zwermend	zomer	1	GD	2025-02-13	2/2	1995	0,0005	0	0	0	0,0529	0,9465	0	0

Plaats	Type woning	Gebouwdelen bemonstert	Onvolledige bemonstering	Onderzoek	Gedrag	functie	aantal dieren waargenomen	soorten bat-detector	datum eDNA	eDNA moleculen / ml conserveringsbuffer	positieve qPCR replica's	Meer-vleermuis	Ruige dwergvleermuis	Gewone dwergvleermuis	Baartvleermuis	Tweekleurige vleermuis
Leerdam	Rijteswoning	Kantpannen, opening achter dakgoot	Nee	Protocol '23	?	zomer	1	GD	2025-02-13	2/2	184	0,0015	0	0	0,9984	0
Leerdam	Rijteswoning	Open stootvoeg	Nee	Protocol '23	uitvliegend	zomer	1	GD	2025-02-18	2/2	4					
Leerdam	Rijteswoning	Kantpannen, opening achter dakgoot	Nee	Protocol '23	in- en uitvliegend	kraam	2	LV	2025-02-18	2/2	618	0,9925	0	0	0	0
Leerdam	Rijteswoning	Kantpannen, opening achter dakgoot	Nee	Protocol '23	in- en uitvliegend	kraam	13	LV	2025-02-18	2/2	60	0,4152	0	0	0,0178	0,5669
Leerdam	Rijteswoning	Open stootvoeg, opening achter dakgoot	Nee	Protocol '24	in- en uitvliegend	zomer	1	GD	2024-12-24	2/2	188	0	0,0003	0	0	0,9995
Lichtenvoorde	Rijteswoning	Boeiborden	Nee	Vrijwilligers '24	uitvliegend	kraam	7	GD	2025-02-14	2/2	2442	0	0	0	0	0,9989
Liessel	Rijteswoning	Kantpannen	Nee	Protocol '24	in- en uitvliegend	kraam	14	LV	2024-12-17	2/2	388	0,3006	0	0	0,0580	0,6414
Liessel	Rijteswoning	Kantpannen, opening achter dakgoot	Nee	Protocol '24	in- en uitvliegend	kraam	6	LV	2024-12-17	2/2	802	0,2904	0	0	0,5195	0,1901
Mookhoek	Rijteswoning	Dilatatievoeg, opening achter dakgoot	Nee	Protocol '24	in- en uitvliegend	paar	1	RD	2024-12-18	2/2	461421	0	0	0	0,9758	0,0242
Mookhoek	Rijteswoning	Kantpannen, opening achter dakgoot	Nee	Protocol '24	ter plaatse	paar	1	RD	2024-12-18	2/2	774	0	0	0	0,9176	0,0824
Mookhoek	Rijteswoning	Kantpannen, opening achter dakgoot	Nee	Protocol '24	in- en uitvliegend	paar	1	RD	2024-12-18	2/2	169146	0	0	0	0,0235	0,9765
Mookhoek	Rijteswoning	Dilatatievoeg, opening achter dakgoot	Nee	Protocol '24	in- en uitvliegend	paar	1	RD	2024-12-18	2/2	8746	0	0	0	0,9723	0,0277
Mookhoek	Rijteswoning	Open stootvoeg, kantpannen, opening achter dakgoot	Nee	Protocol '24	in- en uitvliegend	paar	1	RD	2024-12-18	2/2	320	0	0	0,0021	0,9521	0,0457
Nijmegen	Bedrijfsgebouw (2 verdiepingen)	Open stootvoeg	Nee	Protocol '24	in- en uitvliegend	paar	1	GD	2025-03-27	0/2	0					
Numansdorp	Rijteswoning	Kantpannen, opening achter dakgoot	Nee	Protocol '24	uitvliegend	zomer	1	GD	2025-02-14	0/2	0					
Numansdorp	Rijteswoning	Open stootvoeg, dilatatievoeg, daklijst, opening achter dakgoot	Nee	Protocol '24	in- en uitvliegend	paar	4	RD	2025-02-14	2/2	119262	0	0	0	0,9977	0
Numansdorp	Rijteswoning	Kantpannen, opening achter dakgoot	Nee	Protocol '24	roepend	paar	1	RD	2025-02-14	2/2	15160	0	0	0	0,0723	0,9277
Numansdorp	Rijteswoning	Open stootvoeg, dilatatievoeg, daklijst, opening achter dakgoot	Nee	Protocol '24	roepend	paar	1	RD	2025-02-14	2/2	25747	0	0	0	0,9501	0,0498
Numansdorp	Rijteswoning	Kantpannen, daklijst, opening achter dakgoot	Nee	Protocol '24	uitvliegend	zomer	1	GD	2025-02-14	2/2	29	0,0281	0	0	0,4616	0,5103
Numansdorp	Rijteswoning	Kantpannen, opening achter dakgoot	Nee	Protocol '24	invliegend	paar	1	RD	2025-02-14	2/2	4130	0	0	0	0,9221	0,0779
Posterholt	Rijteswoning	Kantpannen	Nee	protocol '23	uitvliegend	kraam	20	GD	2024-06-26	12/12	3522	0	0	0	0	1
Posterholt	Rijteswoning	Open stootvoeg, kantpannen	Nee	protocol '23	baltsend	paar, zomer	1	GD	2024-06-26	10/12	6	0	0	0	0	1
Puttershoek	Rijteswoning	Kantpannen, opening achter dakgoot	Nee	Protocol '24	roepend	paar	1	RD	2025-02-14	2/2	50	0	0	0	0,4382	0,5618
Schijndel	Appartementen (3 verdiepingen)	Kantpannen, grote openingen	Nee	protocol '24	territoriaal gedrag	paar	1	GD	2024-09-17	12/12	1183	0	0	0	0	1
Schijndel	Rijteswoning	Kantpannen, opening achter dakgoot	Nee	protocol '24	uitvliegend	zomer	1	LV	2024-09-17	12/12	5552	0,0020	0,0099	0	0,3171	0,2509
Schijndel	Appartementen (3 verdiepingen)	Daklijst	Nee	protocol '24	territoriaal gedrag	paar, zomer	1	GD	2024-09-17	12/12	628	0	0,0016	0	0	0,9984
Schijndel	Rijteswoning	Kantpannen, opening achter dakgoot	Nee	protocol '24	uitvliegend	zomer	2	LV	2024-09-17	9/12	2	0,0583	0,2818	0	0,0231	0,6367
Schijndel	Appartementen (3 verdiepingen)	Daklijst	Nee	protocol '24	invliegend	zomer	1	GD	2024-09-17	12/12	2523	0	0	0	0	0,9960
Sint Odiliënberg	Rijteswoning	Kantpannen	Nee	protocol '23	invliegend	zomer	3	LV	2024-06-26	12/12	851	0	0	0	0	1
Sint Odiliënberg	Rijteswoning	Open stootvoeg, kantpannen	Nee	protocol '23	baltsend	paar, zomer	1	GD	2024-06-26	12/12	357	0	0	0	0,0176	0,9815
Sint Odiliënberg	Rijteswoning	Open stootvoeg, kantpannen	Nee	protocol '23	uitvliegend	kraam	20	LV	2024-06-26	12/12	103191	0,9612	0,0075	0	0	0,0313
Sint-Oedenrode	Rijteswoning	Kantpannen, opening achter dakgoot	Nee	protocol '24	invliegend	zomer	1	GD	2024-09-17	12/12	2	0	0	0	0	1
Sint-Oedenrode	Rijteswoning	Kantpannen, opening achter dakgoot	Nee	protocol '24	invliegend	zomer	2	GD	2024-09-17	12/12	116	0,0021	0,0167	0	0	0,9800
Spijk	Rijteswoning	Kantpannen, daklijst	Nee	Protocol '24	invliegend	zomer	1	GD	2025-03-25	2/2	1629	0	0	0	0,1107	0,8893
Spijk	Rijteswoning	Kantpannen	Nee	Protocol '24	uitvliegend/ zwermend	zomer	1	LV	2025-03-25	2/2	80	0	0	0	0,2152	0,7848
Steenwijk	Rijteswoning	Kantpannen	Nee	vrijwilligers '24	uitvliegend	kraam	?	RV	2024-09-17	12/12	659	0	0,9999	0	0	0
Steenwijk	Rijteswoning	Kantpannen	Nee	vrijwilligers '24	uitvliegend	kraam	?	RV	2024-09-17	12/12	9979	0	0,9997	0	0	0
Steenwijk	Rijteswoning	Kantpannen	Nee	vrijwilligers '24	uitvliegend	kraam	?	RV	2024-09-17	11/12	879	0	0,9991	0	0	0
Steenwijk	Rijteswoning	Kantpannen	Nee	vrijwilligers '24	uitvliegend	kraam	?	RV	2024-09-17	12/12	24914	0	0,9996	0	0	0
Steenwijk	Rijteswoning	Kantpannen	Nee	vrijwilligers '24	uitvliegend	paar	?	RV	2024-09-17	12/12	112223	0	0,4834	0	0,5164	0
Steenwijk	Rijteswoning	Kantpannen	Nee	Vrijwilligers '24	uitvliegend	kraam	?	RV	2025-04-01	2/2	997	0	0,9976	0	0	0
Steenwijk	Rijteswoning	Kantpannen	Nee	Vrijwilligers '24	uitvliegend	kraam	?	RV	2025-04-01	2/2	3003	0	0,9859	0	0,0136	0
Steenwijk	Rijteswoning	Kantpannen	Nee	Vrijwilligers '24	uitvliegend	paar	?	RV	2025-04-01	2/2	2474	0	0,7518	0	0,2274	0,0208
Steenwijk	Rijteswoning	Kantpannen	Nee	Vrijwilligers '24	uitvliegend	kraam	?	RV	2025-04-01	2/2	1154	0	0,9083	0	0,0893	0
Steenwijk	Rijteswoning	Kantpannen	Nee	Vrijwilligers '24	uitvliegend	kraam	?	RV	2025-04-01	2/2	4148	0	0,9984	0	0	0

Plaats	Type woning	Gebouwdelen bemonsterd	Onvolledige bemonstering	Onderzoek	Gedrag	functie	aantal dieren waargenomen	soorten bat-detectoren	datum eDNA bemonstering	edNA moleculen / ml conserveringsbuffer	positieve qPCR replica's	Laatvlieger	Meervleermuis	Rosse vleermuis	Ruige dwergvleermuis	Gewone dwergvleermuis	Tweekleurige vleermuis	Baardvleermuis	
Strijen	Rijteswoning	Kantpannen, opening achter dakgoot	Nee	Protocol '24	roepend	paar	1	RD	2024-12-18	2/2	16	0	0	0	0	0,9778	0,0222	0	0
Strijen	Rijteswoning	Kantpannen, opening achter dakgoot	Nee	Protocol '24	in- en uitvliegend	paar	1	RD	2024-12-18	2/2	10843	0	0	0	0	0,8500	0,1500	0	0
Tilburg	Flat (17 verdiepingen)	Dilatatievoeg (niet volgens protocol bemonsterd)	Nee	Visuele inspectie	ter plaatse	winter	1	GD	2024-12-20	2/2	2347	0	0	0	0	0	0,9994	0	0
Tilburg	Flat (17 verdiepingen)	Dilatatievoeg (niet volgens protocol bemonsterd)	Nee	Visuele inspectie	ter plaatse	winter	1	GD	2024-12-20	2/2	1560	0	0	0	0	0	0,9993	0	0
Tilburg	Flat (17 verdiepingen)	Dilatatievoeg (niet volgens protocol bemonsterd)	Nee	Visuele inspectie	ter plaatse	winter	1	GD	2024-12-20	2/2	741	0	0	0	0	0	0,9994	0	0
Tilburg	Flat (17 verdiepingen)	Dilatatievoeg (niet volgens protocol bemonsterd)	Nee	Visuele inspectie	ter plaatse	winter	1	GD	2024-12-20	0/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tilburg	Flat (16 verdiepingen)	Dilatatievoeg (niet volgens protocol bemonsterd)	Nee	Visuele inspectie	ter plaatse	winter	4	GD	2024-12-20	2/2	777633	0	0	0,0005	0	0	0,9991	0	0
Tilburg	Flat (17 verdiepingen)	Dilatatievoeg (niet volgens protocol bemonsterd)	Nee	Visuele inspectie	ter plaatse	winter	2	GD	2025-02-19	1/2	41	0	0	0	0	0	1	0	0
Tilburg	Flat (17 verdiepingen)	Dilatatievoeg (niet volgens protocol bemonsterd)	Nee	Visuele inspectie	ter plaatse	winter	1	GD	2025-02-19	1/2	3	0	0	0	0	0	1	0	0
Tilburg	Flat (17 verdiepingen)	Dilatatievoeg (niet volgens protocol bemonsterd)	Nee	Visuele inspectie	ter plaatse	winter	1	GD	2025-02-19	2/2	486	0	0	0	0	0	0,9998	0	0
Tilburg	Flat (17 verdiepingen)	Dilatatievoeg (niet volgens protocol bemonsterd)	Nee	Visuele inspectie	ter plaatse	winter	1	GD	2025-04-02	2/2	80597	0	0	0,0010	0	0	0,9989	0	0
Tilburg	Flat (16 verdiepingen)	Dilatatievoeg (niet volgens protocol bemonsterd)	Nee	Visuele inspectie	ter plaatse	winter	10	GD	2025-02-19	2/2	416	0	0	0	0	0	0,9998	0	0
Tilburg	Flat (17 verdiepingen)	Dilatatievoeg (niet volgens protocol bemonsterd)	Nee	Visuele inspectie	ter plaatse	winter	1	GD	2024-12-20	2/2	9834	0	0	0,0000	0	0	0,9995	0	0
Tilburg	Flat (17 verdiepingen)	Dilatatievoeg (niet volgens protocol bemonsterd)	Nee	Visuele inspectie	ter plaatse	winter	1	GD	2025-02-19	1/2	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Tilburg	Flat (17 verdiepingen)	Dilatatievoeg (niet volgens protocol bemonsterd)	Nee	Visuele inspectie	ter plaatse	winter	1	GD	2025-04-02	2/2	9	0	0	0,0057	0	0	0,9943	0	0
Tilburg	Flat (17 verdiepingen)	Dilatatievoeg (niet volgens protocol bemonsterd)	Nee	Visuele inspectie	ter plaatse	winter	2	GD	2025-04-02	2/2	1783	0	0	0,0018	0	0	0,9981	0	0
Tilburg	Flat (17 verdiepingen)	Dilatatievoeg (niet volgens protocol bemonsterd)	Nee	Visuele inspectie	ter plaatse	winter	2	GD	2025-04-02	2/2	100824	0	0	0,0009	0	0	0,9990	0	0
Tilburg	Flat (17 verdiepingen)	Dilatatievoeg (niet volgens protocol bemonsterd)	Nee	Visuele inspectie	ter plaatse	winter	1	GD	2025-04-02	2/2	216063	0	0	0,0010	0	0	0,9989	0	0
Tilburg	Flat (17 verdiepingen)	Dilatatievoeg (niet volgens protocol bemonsterd)	Nee	Visuele inspectie	ter plaatse	winter	2	GD	2025-03-23	2/2	1783	0	0	0	0	0	1	0	0
Tilburg	Flat (17 verdiepingen)	Dilatatievoeg (niet volgens protocol bemonsterd)	Nee	Visuele inspectie	ter plaatse	winter	1	GD	2025-03-23	2/2	80597	0	0	0	0	0	1	0	0
Tilburg	Flat (17 verdiepingen)	Dilatatievoeg (niet volgens protocol bemonsterd)	Nee	Visuele inspectie	ter plaatse	winter	1	GD	2025-03-23	2/2	216063	0	0	0	0	0	1	0	0
Tilburg	Flat (17 verdiepingen)	Dilatatievoeg (niet volgens protocol bemonsterd)	Nee	Visuele inspectie	ter plaatse	winter	2	GD	2025-03-23	2/2	100824	0	0	0	0	0	1	0	0
Tilburg	Flat (17 verdiepingen)	Dilatatievoeg (niet volgens protocol bemonsterd)	Nee	Visuele inspectie	ter plaatse	winter	1	GD	2025-03-23	2/2	9	0	0	0	0	0	1	0	0
Wageningen	Appartementen (3 verdiepingen)	Inbouwsteen	Nee	Vrijwilligers '24	in- en uitvliegend	kraam	111	GD	2024-12-12	2/2	519299	0	0	0	0	0	0,9995	0	0
Wageningen	Appartementen (3 verdiepingen)	Dilatatievoeg	Nee	Vrijwilligers '24	in- en uitvliegend	kraam	39	LV	2025-02-11	2/2	543	0,9314	0	0	0	0	0,0686	0	0
Wageningen	Appartementen (3 verdiepingen)	Dilatatievoeg	Nee	Vrijwilligers '24	in- en uitvliegend	kraam	12	LV	2025-02-11	2/2	2380	0,9875	0	0	0	0	0,0125	0	0
Wageningen	Appartementen (3 verdiepingen)	Dilatatievoeg	Nee	Vrijwilligers '24	in- en uitvliegend	kraam	35	LV	2025-02-11	2/2	3756	0,9964	0	0	0	0	0	0	0
Wageningen	Appartementen (3 verdiepingen)	Dilatatievoeg	Nee	Vrijwilligers '24	in- en uitvliegend	kraam	25	LV	2025-02-11	2/2	54000	0,9980	0	0	0	0	0	0	0

Bijlage 2. Controle locaties

Overzicht van alle bemonsterde controles 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	positieve qPCR replica's	eDNA moleculen / spors	Soorten metabarcoding
Den Bosch	Ontoegankelijk appartementcomplex	Nee	2024-06-18	1/12	107	
Den Bosch	Ontoegankelijk appartementcomplex	Nee	2024-06-18	0/12	0	
Den Bosch	Ontoegankelijk appartementcomplex	Nee	2024-06-19	4/12	665	
Den Bosch	Ontoegankelijk appartementcomplex	Nee	2024-06-19	3/12	912	
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	390	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	376	
Sint-Oedenrode	Tussenwoning zonder invliegopening in de bemonsterde muur	Ja	2024-09-17	11/12	47	RV, RD
Sint-Oedenrode	Tussenwoning zonder invliegopening in de bemonsterde muur	Ja	2024-09-17	4/12	1	
Liessel	Ontoegankelijke muur bij kraamverblijf	Ja	2024-12-17	0/2	0	
Tilburg	Ontoegankelijke muur van massawinterverblijf	Ja	2024-12-20	1/2	481	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	
Druuten	Ontoegankelijke woning	Nee	2024-12-30	0/2	0	
Druuten	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	
Druuten	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	

Bijlage 3. Bemonsteringsprotocol eDNA sponsmonsters.

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

Vorbereiding

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.

Bijlage 4. Overzicht kasten.

Overzicht van de kasten die gebruikt zijn in het kastenexperiment. Per soort is de laatste datum weergegeven waarop de betreffende soort is waargenomen doormiddel van visuele inspecties, en de aandelen eDNA per soort zoals gemeten in de monsters die verzameld zijn in de eerste bemonsteringsronde. Alleen soorten die waargenomen zijn of gedetecteerd zijn middels eDNA metabarcoding zijn opgenomen in deze tabel. Kastn waarbij geen waarnemingen zijn van visuele inspecties betreffen kasten waarvan de monitoringsdata niet beschikbaar was.

Metadata		Visuele inspecties (datum van laatste waarneming)					eDNA metabarcoding (aandeel in monster eerste ronde)								
Kast nr	Afkoms	Datum verwijfieren van kast	Vale vleermuis	Franjestaart	Rosse vleermuis	Gewone dwergvleermuis	Gewone grootvleermuis	Vale vleermuis	Franjestaart	Rosse vleermuis	Gewone dwergvleermuis	Gewone grootvleermuis			
B101	Boxtel	1-8-2024					1-8	0	0	0	0	1	0		
B102	Boxtel	1-8-2024					1-8	0	0	0	0	1	0		
B103	Boxtel	1-8-2024					1-8	0	0	0	0	1	0		
B104	Boxtel	1-8-2024					1-8	0	0	0	0	1	0		
D105	s-Hertogenbosch	1-8-2024					1-8	0	0	0	0	1	0		
D106	s-Hertogenbosch	1-8-2024					1-8	0	0	0	0	1	0		
D107	s-Hertogenbosch	1-8-2024					1-8	0	0	0	0	1	0		
D108	s-Hertogenbosch	1-8-2024					1-8	0	0	0,831	0	0,169	0		
K1	Wamberg, 's-Hertogenbosch	24-12-2024					23-9	0	0	0	0,904	0,096	0		
K10	Wamberg, 's-Hertogenbosch	24-12-2024				13-12	28-9	0	0	0,571	0,409	0,020	0		
K11	Wamberg, 's-Hertogenbosch	17-12-2024				13-12	23-9	0	0	0,132	0,868	0	0		
K12	Wamberg, 's-Hertogenbosch	17-12-2024				13-12	28-9	0	0	0,816	0,184	0	0		
K13	Wamberg, 's-Hertogenbosch	17-12-2024				18-11	23-9	0	0	0	1	0	0		
K14	Wamberg, 's-Hertogenbosch	17-12-2024				30-11	17-10	0	0	0,053	0,947	0	0		
K15	Wamberg, 's-Hertogenbosch	17-12-2024					16-9	0	0	0,016	0,984	0	0		
K16	Wamberg, 's-Hertogenbosch	17-12-2024					9-9	0	0	0,011	0,989	0	0		
K17	Wamberg, 's-Hertogenbosch	17-12-2024					14-10	0	0	0	1	0	0		
K18	Wamberg, 's-Hertogenbosch	17-12-2024					23-9	0	0	0	1	0	0		
K19	Wamberg, 's-Hertogenbosch	17-12-2024						25-11	0	0	0	0	1		
K2	Wamberg, 's-Hertogenbosch	24-12-2024					4-11	0	0	0	1	0	0		
K20	Wamberg, 's-Hertogenbosch	17-12-2024					13-9	22-3	0	0	0,027	0,585	0	0,387	
K25	Wamberg, 's-Hertogenbosch	24-12-2024					23-9	0	0	0,010	0,990	0	0		
K3	Wamberg, 's-Hertogenbosch	24-12-2024				1-3	27-10	0	0	0,095	0,905	0	0		
K4	Wamberg, 's-Hertogenbosch	24-12-2024				23-11	13-9	0	0	0,078	0,922	0	0		
K5	Wamberg, 's-Hertogenbosch	24-12-2024					23-9	0	0	0,118	0,882	0	0		
K6	Wamberg, 's-Hertogenbosch	24-12-2024					27-10	18-11	26-8	0	0,535	0,465	0	0	
K7	Wamberg, 's-Hertogenbosch	24-12-2024					13-12	23-9	0	0	0,947	0,053	0	0	
K8	Wamberg, 's-Hertogenbosch	24-12-2024				3-11	17-10	0	0	0,022	0,978	0	0		
L27	Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024					16-12	0	0	0,018	0,251	0,732	0		
L32	Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024	-	-	-	-	-	0	0,440	0	0,139	0	0,421		
L34	Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024					16-12	0	0,020	0	0	0,980	0		
L47	Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024					16-12	0	0	0	0	1	0		
L48	Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024					16-12	0	0	0	0	1	0		
L54	Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024			16-12			0	0,840	0	0	0,160	0		
L61	Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024	-	-	-	-	-	0,745	0	0,015	0,012	0,129	0,100		
L62	Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024	-	-	-	-	-	0,884	0	0,116	0	0	0		
L63	Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024	-	-	-	-	-	0	0,036	0	0	0,964	0		
L64	Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024	-	-	-	-	-	0	0,844	0	0	0,156	0		
L65	Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024	-	-	-	-	-	0	0,990	0	0	0,010	0		
L66	Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024	-	-	-	-	-	0	0	0	0	1	0		
L67	Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024	-	-	-	-	-	0	0,097	0,022	0,259	0,622	0		
L68	Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024	-	-	-	-	-	0	0	0	0	1	0		
L69	Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024	-	-	-	-	-	0	0,164	0	0	0,836	0		
L71	Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024	-	-	-	-	-	0	0	0,029	0,037	0,934	0		
L72	Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0,727	0,273		
L74	Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024	-	-	-	-	-	0	0	0	0	1	0		
L77	Lonnekerberg, Enschede	16-12-2024	-	-	-	-	-	0	0	0	0	1	0		
N201	Nuland, 's-Hertogenbosch	13-2-2025	-	-	-	-	-	0	0	0,028	0	0	0,972		
N202	Nuland, 's-Hertogenbosch	13-2-2025						12-6	0	0	0	0	1		
N203	Nuland, 's-Hertogenbosch	13-2-2025				20-12		11-10	0	0	0,860	0	0,140		
N204	Nuland, 's-Hertogenbosch	13-2-2025				29-11		16-8	0	0	0,575	0	0,425		
N48	Nuland, 's-Hertogenbosch	31-1-2025				8-11			0	0	0,768	0	0,232		
N51	Nuland, 's-Hertogenbosch	31-1-2025				8-11		12-6	0	0	0,913	0	0,087		
N52	Nuland, 's-Hertogenbosch	31-1-2025				29-11			0	0	1	0	0		

Bijlage 5. Overzicht en indeling van kasten

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	Oriëntatie	Vocht	Temperatuur	Score lichtinval
schwegler plat 1FF	Wamberg	Zon	Doornenburg	Noord	Vochtig	Gem	1,1
schwegler rond 2FS deurtje	Lonnekerberg	Zon	Doornenburg	Oost	Vochtig	Warm	6,7
schwegler plat 1FF	Wamberg	Zon	Doornenburg	Oost	Vochtig	Warm	4,4
schwegler rond 2FN	Lonnekerberg	Zon	Doornenburg	Zuid	Droog	Warm	6,7
schwegler rond 2FN	Lonnekerberg	Zon	Doornenburg	West	Droog	Warm	4,4
schwegler rond 2FN	Lonnekerberg	Zon	Doornenburg	West	Droog	Warm	4,4
schwegler rond 2FN	Lonnekerberg	Zon	Doornenburg	Noord	Vochtig	Gem	2,2
schwegler plat 1FF	Wamberg	Schaduw	Doornenburg	Noord	Vochtig	Koud	0,4
schwegler plat 1FF	Wamberg	Schaduw	Doornenburg	Oost	Vochtig	Koud	0,7
schwegler plat 1FF	Wamberg	Schaduw	Doornenburg	Zuid	Vochtig	Koud	1,1
schwegler plat 1FF	Wamberg	Schaduw	Doornenburg	West	Vochtig	Koud	0,7
schwegler rond 2FN	Lonnekerberg	Schaduw	Garagebox Wageningen	Nvt	Vochtig	Gem	0,0
schwegler rond 2FN	Lonnekerberg	Schaduw	Lab Wageningen	Nvt	Droog	Warm	0,0
schwegler rond 3FN	Controle	Schaduw	Lab Wageningen	Nvt	Droog	Warm	0,0
plat Vivara	Den Bosch	Halfschaduw	Boxtel	Noord	Vochtig	Gem	0,7
plat Vivara	Den Bosch	Halfschaduw	Boxtel	West	Droog	Gem	1,5
plat Vivara	Den Bosch	Halfschaduw	Boxtel	Zuid	Droog	Gem	2,2
plat Vivara	Den Bosch	Halfschaduw	Boxtel	West	Droog	Gem	1,5
plat Vivara	Controle	Halfschaduw	Boxtel	West	Droog	Gem	0,7
plat Vivara	Den Bosch	Zon	Den Bosch	Oost	Vochtig	Warm	2,2
plat Vivara	Den Bosch	Zon	Den Bosch	Oost	Vochtig	Warm	2,2
plat Vivara	Controle	Zon	Den Bosch	West	Droog	Warm	3,3
schwegler plat 1FF	Wamberg	Zon	Doornenburg	Zuid	Droog	Warm	3,3
schwegler rond 2FN	Lonnekerberg	Zon	Doornenburg	Zuid	Droog	Warm	6,7
schwegler plat 1FF	Wamberg	Zon	Doornenburg	Oost	Vochtig	Warm	2,2
schwegler plat 1FF	Wamberg	Zon	Doornenburg	West	Droog	Warm	2,2
schwegler plat 1FF	Wamberg	Zon	Doornenburg	Noord	Vochtig	Gem	1,1
schwegler rond 2FN	Lonnekerberg	Schaduw	Doornenburg	Noord	Vochtig	Koud	0,7
schwegler rond 2FS deurtje	Lonnekerberg	Schaduw	Doornenburg	Oost	Vochtig	Koud	2,2
schwegler plat 1FF	Wamberg	Schaduw	Doornenburg	Zuid	Vochtig	Koud	1,1
schwegler rond 2FS deurtje	Lonnekerberg	Schaduw	Doornenburg	West	Vochtig	Koud	2,2
plat Vivara	Den Bosch	Zon	Den Bosch	Oost	Vochtig	Warm	2,2
plat Vivara	Den Bosch	Zon	Den Bosch	West	Droog	Warm	2,2
schwegler rond 2FS deurtje	Lonnekerberg	Zon	Doornenburg	Zuid	Droog	Warm	10,0
schwegler plat 1FF	Wamberg	Zon	Doornenburg	Zuid	Droog	Warm	3,3
schwegler plat 1FF	Wamberg	Zon	Doornenburg	West	Droog	Warm	2,2
schwegler plat 1FF	Wamberg	Schaduw	Doornenburg	Noord	Vochtig	Koud	0,4
schwegler rond 2FN	Lonnekerberg	Schaduw	Doornenburg	Noord	Vochtig	Koud	0,7

schwegler plat 1FF	Wamberg	Schaduw	Doornenburg	Oost	Vochtig	Koud	0,7
schwegler plat 1FF	Wamberg	Schaduw	Doornenburg	Zuid	Vochtig	Koud	1,1
schwegler plat 1FF	Nuland	Schaduw	Garagebox Wageningen	Nvt	Vochtig	Gem	0,0
schwegler plat 1FF	Nuland	Schaduw	Lab Wageningen	Nvt	Droog	Warm	0,0
schwegler plat 1FF	Nuland	Schaduw	Lab Wageningen	Nvt	Droog	Warm	0,0
schwegler rond 2FN	Lonnekerberg	Zon	Doornenburg	Oost	Vochtig	Warm	4,4
schwegler plat 1FF	Wamberg	Zon	Doornenburg	Zuid	Droog	Warm	3,3
schwegler rond 2FN	Lonnekerberg	Zon	Doornenburg	Zuid	Droog	Warm	6,7
schwegler plat 1FF	Wamberg	Zon	Doornenburg	West	Droog	Warm	2,2
schwegler rond 2FS deurtje	Lonnekerberg	Zon	Doornenburg	West	Droog	Warm	6,7
schwegler rond 2FS deurtje	Lonnekerberg	Zon	Doornenburg	Noord	Vochtig	Gem	3,3
schwegler rond 3FN	Controle	Zon	Doornenburg	Noord	Vochtig	Gem	2,2
schwegler plat 1FF	Wamberg	Schaduw	Doornenburg	Noord	Vochtig	Koud	0,4
schwegler rond 2FN	Lonnekerberg	Schaduw	Doornenburg	Noord	Vochtig	Koud	0,7
schwegler rond 2FS deurtje	Lonnekerberg	Schaduw	Doornenburg	Oost	Vochtig	Koud	2,2
schwegler plat 1FF	Wamberg	Schaduw	Doornenburg	West	Vochtig	Koud	0,7
schwegler rond 3FN	Controle	Schaduw	Doornenburg	Zuid	Vochtig	Koud	2,2
schwegler plat 1FF	Nuland	Schaduw	Garagebox Wageningen	Nvt	Vochtig	Gem	0,0
schwegler plat 1FF	Nuland	Schaduw	Garagebox Wageningen	Nvt	Vochtig	Gem	0,0
schwegler rond 3FN	Controle	Schaduw	Garagebox Wageningen	Nvt	Vochtig	Gem	0,0
schwegler plat 1FF	Nuland	Schaduw	Lab Wageningen	Nvt	Droog	Warm	0,0
schwegler plat 1FF	Nuland	Schaduw	Lab Wageningen	Nvt	Droog	Warm	0,0

Bijlage 6. Resultaten afbraaksnelheid eDNA in kasten

Resultaten van het testen van effecten van tijd (dag) op de concentratie eDNA in de meting door middel van een linear mixed model in R met library lme4 en functie lmer. De concentratie is log-getransformeerd (zie methoden).

```
Linear mixed model fit by REML. t-tests use Satterthwaite's method
Formula: Concentration.log ~ dag + (1 | Species) + (1 | Kast_nr)
Data: dataDNA.subset.long.2025
```

REML criterion at convergence: 1768

Scaled residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.4183	-0.6071	0.0532	0.6014	2.6780

Random effects:

Groups Name	Variance	Std.Dev.
Kast_nr (Intercept)	4.033	2.008
Species (Intercept)	0.859	0.927
Residual	5.568	2.360

Number of obs: 364, groups: Kast_nr, 54; Species, 6

Fixed effects:

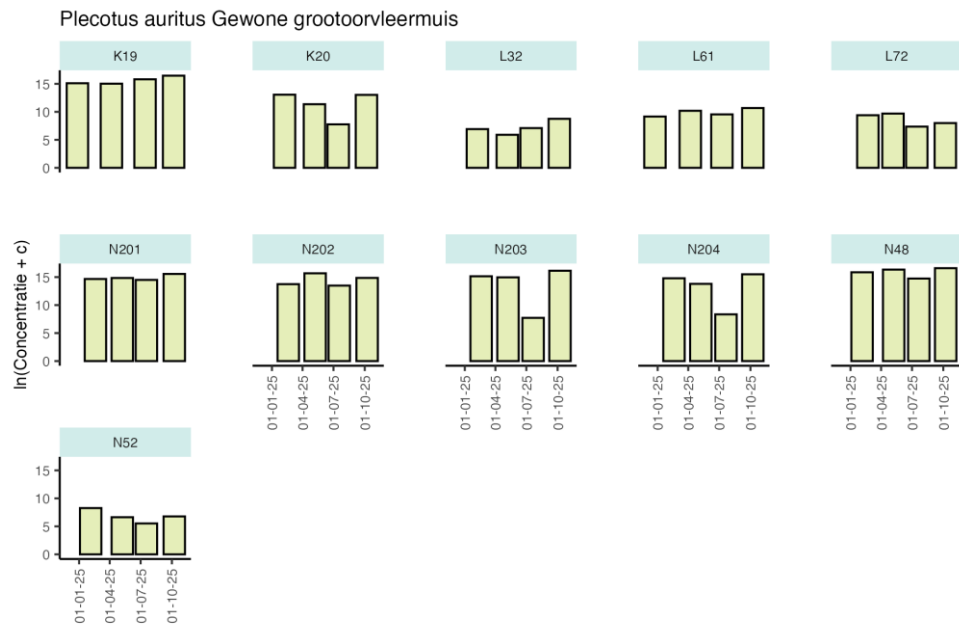
	Estimate	Std. Error	df	t value	Pr(> t)
(Intercept)	11.52404	0.54948	14.17566	20.97	4.5e-12 ***
dag	-0.00341	0.00141	310.62909	-2.42	0.016 *

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Correlation of Fixed Effects:

(Intr)	
dag	-0.397

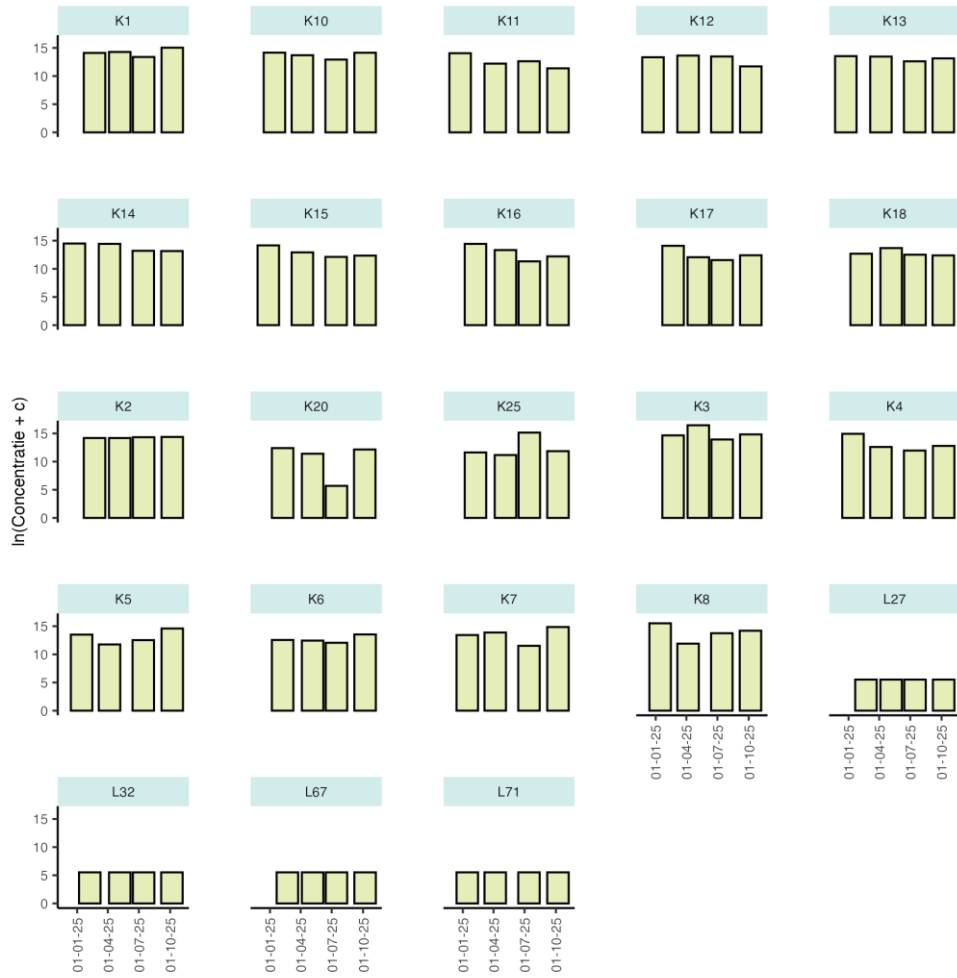
Bijlage 7. Gemeten concentraties in de kasten, per soort.



Pipistrellus pipistrellus Gewone dwergvleermuis



Pipistrellus nathusii Ruige dwergvleermuis



Nyctalus noctula Rosse Vleermuis



Myotis nattereri Franjestaart

