

Eindrapportage: Validatie vleermuisonderzoek aan de hand van sporen in en rond spouwmuren.

Datura Environmental Solutions

Met medewerking van Twisk Ecologisch Onderzoek, Insuproducts BV, Regelink Ecologie & Landschap en Miecon BV



Colofon

Titel	Eindrapportage: validatie vleermuisonderzoek aan de hand van sporen in en rond spouwmuren
Tekst, foto's en samenstelling	K. van Bochove, P. Twisk, C. Driessen, N. Menger
In opdracht van	Rijksdienst voor Ondernemend Nederland
Naam opdrachtgever	Daniëlle Bankert
Rapportnummer	RA24071
Datum oplevering rapport	5-12-2024
Aantal pagina's	49
Wijze van citeren	van Bochove, K., Twisk, P. , Driessen, C., Menger, N. 2024. Rapportage validatie vleermuisonderzoek aan de hand van sporen in en rond spouwmuren. Rapport RA24071, Datura, Wageningen.
Hoofdanalist	J. Rook

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 eDNA	8
1.3 Vervolgonderzoek door middel van keutels	9
1.4 Onderzoeksvragen	9
1.5 Fasering	9
1.6 Leeswijzer	10
2. Methode	11
2.1 Globale aanpak	11
2.2 Deelonderzoeken	12
2.3. Environmental DNA	14
2.4 eDNA bemonstering	14
2.5 Laboratoriumanalyse eDNA	16
2.7 Keutelonderzoek	17
2.8 Data-analyse	18
3. Resultaten	21
3.1 Lab controles en bepalen grenswaardes	21
3.2 Vergelijking eDNA stof-, lucht- en sponsmonsters	23
3.3 Toetsen of totale afwezigheid van vleermuizen vastgesteld kan worden	24
3.4 Toetsen of recente aanwezigheid van vleermuisverblijfplaatsen aan te tonen is	26
3.5 Verkennen of er signalen van afbraak zichtbaar zijn in de eDNA data	26
3.6 Bepalen van soorten, grootte en functies op basis van keutelonderzoek	28
3.7 Praktijkonderzoek in Appingedam	28
3.8 Aantonen van soorten door middel van eDNA onderzoek	29
4. Discussie	30
4.1 Detectielimiet sponsmethode	30
4.2 Vergelijking eDNA methodes	30
4.3 Toetsen of totale afwezigheid van vleermuizen vastgesteld kan worden	31
4.4 Actuele aan- of afwezigheid	33
4.5 Toetsen of recente aanwezigheid van vleermuisverblijfplaatsen aan te tonen is	34
4.6 Verkennen of er signalen van afbraak zichtbaar zijn in de eDNA data	34
4.7 Soortsamenstelling vaststellen op basis van eDNA onderzoek	35

4.8 Bepalen van functie en grootte van verblijfplaatsen doormiddel van keutelonderzoek	36
5. Multicriteria-analyse	38
5.1 Aanpak	38
5.2 Resultaten	40
5.3 Samenvatting resultaten MCA	43
6. Conclusies	44
6.1 Beantwoorden onderzoeksvragen	44
6.2 Overige conclusies	45
7. Advies	47

Samenvatting

Het Nationaal Isolatieprogramma streeft ernaar 2,5 miljoen woningen te isoleren tegen 2030. Bij isolatie moet rekening gehouden worden met vleermuizen vanwege hun beschermde status. Het vleermuisprotocol schrijft voor hoe onderzoek naar deze dieren uitgevoerd dient te worden. Dit is echter arbeidsintensief, seizoensgebonden en moeilijk schaalbaar. eDNA (environmental DNA) onderzoek en keutelonderzoek vormen mogelijk goede alternatieven. Met de eDNA methode wordt DNA gedetecteerd dat vleermuizen in of rond verblijfplaatsen achterlaten. Deze methode is zo gevoelig dat hiermee naar verwachting goed de afwezigheid van vleermuizen in een gebouw kan worden vastgesteld. Ervaringen met keutelonderzoek wijzen erop dat deze methode minstens net zo volledig is als onderzoek volgens vleermuisprotocol. Voordat deze methoden in de praktijk toegepast kunnen worden moeten ze vergeleken worden met onderzoek volgens het vleermuisprotocol.

RVO heeft opdracht gegeven om drie eDNA methodes en keutelonderzoek te vergelijken met onderzoek volgens vleermuisprotocol. Deze rapportage geeft hiervan de uitkomsten. In fase 1 van het onderzoek zijn met behulp van een vacuümpomp eDNA monsters genomen van de lucht die aanwezig is in spouwmuren. Ook zijn monsters verzameld van stof en ander materiaal dat aanwezig is in de spouwen. Tenslotte zijn er eDNA monsters verzameld door met een kleine vochtige spons in mogelijke uitvliegopeningen te wrijven. Daarnaast is op dezelfde locaties naar vleermuiskeutels gezocht en is het aantal keutels per verblijfplaats ingeschat. Op de meeste van deze locaties is, onafhankelijk, ook onderzoek naar vleermuizen volgens het vleermuisprotocol uitgevoerd.

In een tussenrapportage zijn de drie methoden om eDNA te detecteren met elkaar vergeleken. De sponsmethode kwam daarbij als beste naar voren om afwezigheid van vleermuizen aan te tonen. In de tweede fase zijn extra locaties, waar vleermuisonderzoek volgens protocol werd uitgevoerd, onderzocht met de eDNA sponsmethode en op keutels.

Met de eDNA sponsmethode werden hoge concentraties eDNA gedetecteerd op 86% van de locaties waar vleermuisonderzoek volgens vleermuisprotocol verblijfplaatsen aantoonde. Met de sponsmethode is eDNA aangetroffen op 22 van de 43 locaties waar protocolonderzoek geen verblijfplaats aangetoond heeft. Bij 12 van de 22 locaties waar sponsmonsters positief waren, maar protocolonderzoek niet, zijn ook vleermuiskeutels gevonden. In 10 monsters werd wel eDNA gedetecteerd, maar werden er geen keutels gevonden, en werd ook met protocolonderzoek geen verblijfplaatsen aangetoond. Op basis van de huidige dataset is het niet mogelijk om betrouwbare uitspraken te doen of het hierbij gaat om vals positieve eDNA waarnemingen, of vals negatieve waarnemingen van de andere methodes. Ook werd bij 16/17 verblijfplaatsen die in 2023 vastgesteld werden met protocolonderzoek in 2024 eDNA gedetecteerd. In 2024 werd eDNA gedetecteerd op 10 van de 11 locaties waar protocolonderzoek geen vleermuizen vaststelde in 2023. Bij 8 van deze 10 locaties werden vleermuiskeutels gevonden.

Bij het keutelonderzoek werd in 94% (16/17) van de gevallen waar protocolonderzoek aanwezigheid van vleermuizen vastgesteld heeft, ook met behulp van keutelonderzoek de aanwezigheid aangetoond. Bovendien werd met keutelonderzoek de aanwezigheid van een verblijfplaats vastgesteld bij 17 van de 55 locaties waar geen vleermuizen vastgesteld werden met

protocolonderzoek. Er konden niet voldoende data verzameld worden om vast te stellen of de grootte van verblijfplaatsen geschat kan worden op basis van keutelonderzoek.

Er kan geconcludeerd worden dat de eDNA spons methode een goede methode is om afwezigheid van vleermuisverblijfplaats aan te tonen in het seizoen dat vleermuizen actief zijn (1 mei- 15 oktober). Ook verblijfplaatsen die in 2023 gevonden werden konden in 2024 goed aangetoond worden. Er is echter onvoldoende data om met zekerheid uitspraken te doen over de afbraaksnelheid van eDNA, maar de nu beschikbare data indiceren dat afbraak (afname van eDNA concentratie) waargenomen kan worden over een tijdspanne van enkele maanden. Er is nader onderzoek nodig om vast te stellen of de afwezigheid van verblijfplaatsen betrouwbaar vastgesteld kan worden in de winterperiode (november-februari). Ook is er nader onderzoek nodig naar minder algemene en zeldzame soorten om vast te stellen of ook de aan- of afwezigheid van deze soorten betrouwbaar vastgesteld kan worden met eDNA.

1. Inleiding

1.1 Aanleiding

In het Nationaal Isolatieprogramma is de ambitie geformuleerd om 2,5 miljoen woningen met een laag energielabel te isoleren in de periode tot en met 2030. Het isoleren van spouwmuren is onderdeel daarvan.

Het is van belang, en volgens nationaal en internationaal recht verplicht, om zowel vleermuispopulaties als individuele vleermuizen te beschermen. Een uitgebreid overzicht van het wettelijke kader is opgenomen in bijlagen 1. Uit de Omgevingswet volgt dat vleermuizen niet gedood of verstoord mogen worden en hun verblijfplaats niet vernield mag worden. Uit de uitspraak van de Afdeling bestuursrechtspraak van de Raad van State (ABRvS) van 21 april 2021 (201900294/1/R2) volgt dat er een onderzoek uitgevoerd dient te worden naar de gevolgen die het doden van individuen en beschadigen en vernielen van de voortplantings- en verblijfplaatsen van vleermuizen heeft voor de staat van instandhouding van de populaties van deze vleermuizen. Op 2 augustus 2023 (202103977/1/R2) heeft de ABRvS in de uitspraak aangegeven dat dit betekent dat bij het isoleren van bestaande woningen en gebouwen de aanwezigheid van vleermuizen goed onderzocht moet worden. Voorafgaande aan het isoleren moet vastgesteld worden of er verblijfplaatsen aanwezig zijn. Daarbij moet ook de functie van de verblijfplaats bepaald worden (zomer-, paar-, kraam- of winterverblijfplaats). De invulling van de specifieke zorgplicht, zoals bedoeld in artikel 11.27 van het Besluit activiteiten leefomgeving, om informatie te verkrijgen over mogelijke aanwezigheid van beschermde soorten door middel van veldonderzoek is inmiddels een algemeen gedeeld uitgangspunt in Nederland. De nu gangbare manier om invulling te geven aan het veldonderzoek is een onderzoek volgens het vleermuisprotocol 2021 (hierna “protocolonderzoek” genoemd). Deze methode is seizoensgebonden en arbeidsintensief. Uit eerdere studies (Twisk et al. 2023, Twisk, 2024, van Bochove et al 2024), is naar voren gekomen dat keutelonderzoek en eDNA onderzoek potentieel alternatieven kunnen vormen bij het opsporen van vleermuizen in de spouw. Voordat dergelijke nieuwe methodes in de praktijk toegepast kunnen dient de betrouwbaarheid van de methodes gevalideerd te worden. Een validatie is van belang om de bescherming en staat van instandhouding van vleermuispopulaties te waarborgen, de juridische houdbaarheid van de methodes te waarborgen, en draagvlak in de ecologiesector realiseren.

Rijksdienst voor Ondernemend Nederland (RVO) heeft gevraagd om onderzoek te doen naar de mogelijkheden om eDNA onderzoek en keutelonderzoek in te zetten als alternatieven voor het protocolonderzoek bij het opsporen van vleermuizen in de spouw. Daarbij is de randvoorwaarde gesteld dat het inzetten van een nieuwe methode alleen geadviseerd kan worden als die nieuwe methodes minstens zo betrouwbaar zijn als protocolonderzoek. De betrouwbaarheid omvat twee aspecten: het aantonen van *afwezigheid* van vleermuizen en het aantonen van *aanwezigheid* van vleermuizen.

Aantonen van afwezigheid- Wil een initiatiefnemer afwezigheid vaststellen zodat isolatiewerkzaamheden uitgevoerd kunnen worden, dan is het van belang om een methode in te zetten die betrouwbaar de afwezigheid kan aantonen. Om betrouwbaar de afwezigheid van vleermuizen vast te stellen is het van belang om een methode in te zetten waarmee de kans groot

is dat een verblijfplaats aangetoond wordt, als deze aanwezig is. Het optreden van vals negatieve waarnemingen dient bij het aantonen van afwezigheid dus geminimaliseerd te worden.

Vaststellen van aanwezigheid- Wordt er juist onderzoek gedaan naar de bezettingsgraad (bijvoorbeeld monitoring van aantal panden dat door vleermuizen gebruikt wordt in een bepaalde regio) dan is het juist van belang om aanwezigheid betrouwbaar vast te kunnen stellen, of minstens te weten hoe vaak vals positieve waarnemingen optreden. Immers, als er vals positieve waarnemingen optreden dan wordt het aantal woningen met een verblijfplaats overschat. Om betrouwbaar de aanwezigheid van vleermuizen vast te stellen is het juist van belang om het optreden van vals positieve locaties te minimaliseren. Om vast te stellen of vleermuizen aanwezig zijn moeten de dieren zelf worden waargenomen, visueel of aan de hand van hun geluiden. Keutelonderzoek en eDNA onderzoek zijn daar allebei niet geschikt voor. Wel geven deze twee methoden informatie over het gebruik van een gebouw doordat vleermuizen er eDNA en/of uitwerpselen achter laten. Aannemelijk is dat vleermuizen vaak eDNA achterlaten. In de ruimten waarin ze verblijven laten ze ook vaak uitwerpselen achter. Als werkhypothese in het hier beschreven onderzoek wordt ervan uit gegaan dat de kans op het vaststellen van (het gebruik van een gebouw door) vleermuizen aan de hand van eDNA hoog is. Deze kans kan zelfs zo hoog zijn dat er sprake kan zijn van 'vals positieve' detectie omdat (waarschijnlijk lage concentraties) eDNA niet alleen aan te treffen zijn op locaties waar een verblijfplaats aanwezig is. De kans op het vaststellen van een verblijfplaats van vleermuizen aan de hand van uitwerpselen is waarschijnlijk redelijk hoog; aannemelijk is dat uitwerpselen veel langer herkenbaar aanwezig blijven dan eDNA. Het aantreffen van eDNA wijst mogelijk op recentere aanwezigheid van vleermuizen dan het vinden van uitwerpselen.

In dit onderzoek is onderscheid gemaakt tussen actuele en recente aanwezigheid vast te stellen. Hierbij is actuele aan- of afwezigheid gedefinieerd als aan- of afwezigheid van vleermuizen in een hetzelfde seizoen (bijvoorbeeld eDNA metingen in juni 2024, vergeleken met resultaten van de protocolonderzoek in de kraamperiode 2024). Recente aanwezigheid definiëren we als de aanwezigheid van vleermuizen dat een jaar daarvoor vastgesteld werd door middel van protocolonderzoek.

1.2 eDNA

Vleermuizen laten eDNA (environmental DNA) achter in de omgeving waar ze leven (Garrett *et al.* 2023a, Garret *et al.* 2023b). Uit eerder onderzoek bij Dokkum is gebleken dat er eDNA rond uitvliegopeningen bemonsterd kan worden met een spons (van Bochove *et al.* 2024). Bovendien bleek er eDNA aanwezig te zijn in de lucht dat uit een spouw opgezogen werd, en werd er eDNA gedetecteerd in stofmonsters die verzameld zijn van de bodem van de spouw. Van Bochove *et al.* 2024 vonden eDNA van meer soorten vleermuizen dan met protocolonderzoek en keutelonderzoek vastgesteld werden. In deze studie wordt onderzocht wat de betrouwbaarheid is van de drie eDNA-testen door deze te vergelijken met protocolonderzoek.

1.3 Vervolgonderzoek door middel van keutels

In deze studie is ook onderzocht of keutelonderzoek geschikt om aan- of afwezigheid van vleermuizen vast te stellen. Op basis van de huidige eDNA technieken kan de grootte en functie van de verblijfplaats niet bepaald worden. Daarom is in deze studie ook geprobeerd aan de hand van keutelonderzoek de grootte en functie van verblijfplaatsen vast te stellen.

Peter Twisk en Miecon (Twisk et al, 2023) hebben in een aantal situaties vastgesteld dat onderzoek naar uitwerpselen en andere sporen van vleermuizen een beeld kunnen geven van de aanwezigheid van verblijfplaatsen van vleermuizen. Twisk (2024) heeft echter ook de indruk dat het vinden van keutels bemoeilijkt kan worden door de aanwezigheid van isolatie in de spouw. In deze studie wordt daarom onderzocht of het mogelijk is om afwezigheid van vleermuizen betrouwbaar vast te stellen door middel van keutelonderzoek, of minstens zo betrouwbaar als bij onderzoek volgens protocol.

1.4 Onderzoeksvragen

In deze studie is gezocht naar antwoorden op de volgende vragen:

1. Hoe effectief, betrouwbaar, praktisch toepasbaar en betaalbaar zijn eDNA onderzoek in spouwmuren en keutelonderzoek om:

- a) Volledige afwezigheid van vleermuizen in gebouwen vast te stellen?
- b) Actuele aan- of afwezigheid van vleermuizen en hun verblijfplaatsen in gebouwen vast te stellen?
- c) Verblijfplaatsen van vleermuizen aan te tonen op locaties waar eerder (tot een jaar daarvoor) vleermuizen vastgesteld zijn?

De vragen worden beantwoord in vergelijking met onderzoek uitgevoerd volgens het vleermuisprotocol.

2. In welke mate kan met keutelonderzoek onderscheid gemaakt worden in de soorten, aantallen vleermuizen en functies van de verblijfplaatsen?

3. Welke (combinatie van) methode(s) van vleermuisonderzoek leidt tot een snelle, betrouwbare, betaalbare en efficiënte manier van het vaststellen van aan- of afwezigheid van vleermuizen in spouwmuren, alsmede mogelijke functies te duiden en kan landelijk worden uitgerold?

Verder is nagegaan of de toegepaste methoden nog hiaten vertonen en welk onderzoek nodig is deze hiaten aan te vullen.

1.5 Fasering

Het project is opgedeeld in twee fases. In de eerste fase (kraamperiode: mei-half augustus 2024) zijn gegevens verzameld aan de hand waarvan bepaald is welke eDNA methode het meest geschikt is om op een snelle, betrouwbare, betaalbare en efficiënte manier de aan- of afwezigheid van vleermuizen in spouwmuren vast te stellen. In de tweede fase (paarperiode: september-oktober) is uitsluitend de meest geschikte eDNA methode verder gevalideerd en is ook keutelonderzoek uitgebreid onderzocht.

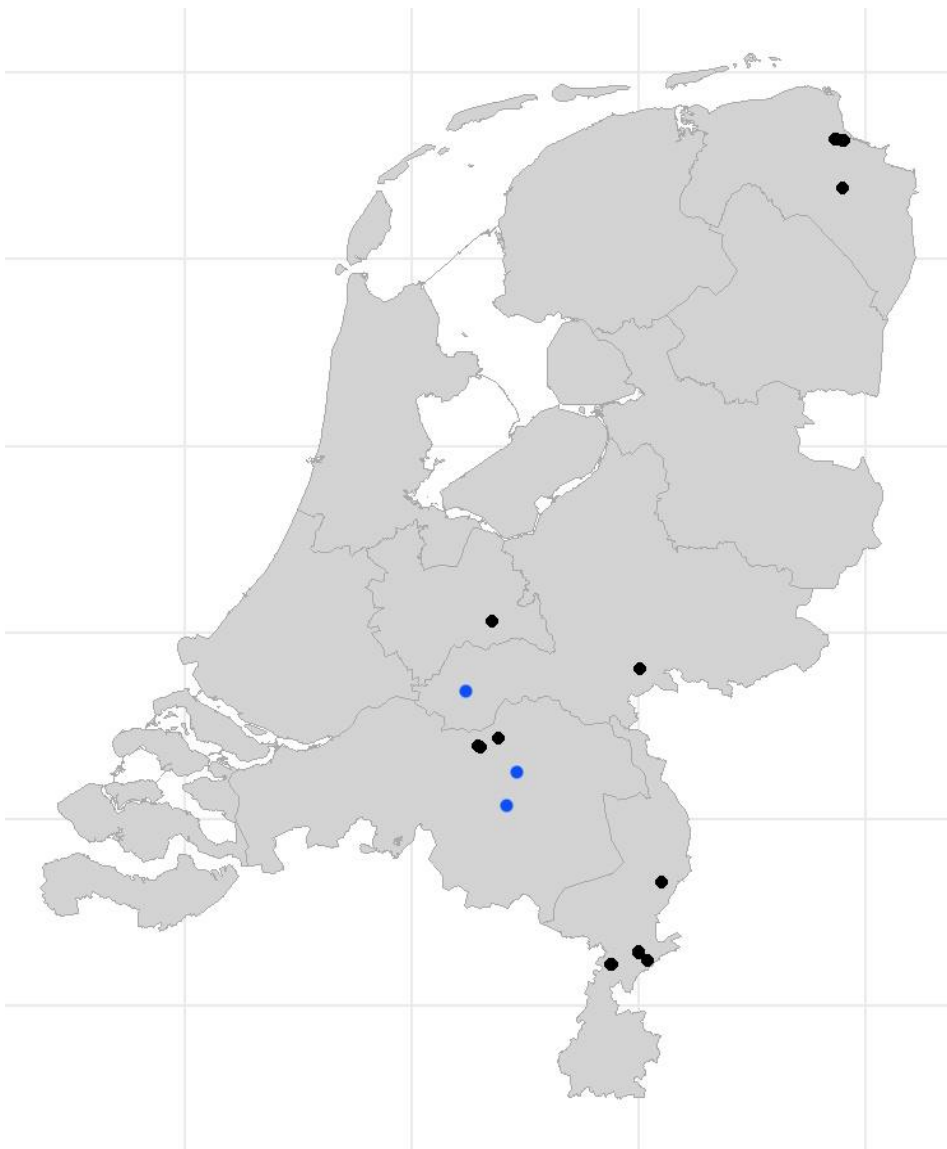
1.6 Leeswijzer

In het eerste deel wordt op een objectieve wijze beschreven welke onderzoeksmethoden gebruikt zijn en worden de resultaten van het veldonderzoek weergegeven en bediscussieerd. In het eerste deel ligt de focus op het vaststellen van de betrouwbaarheid van eDNA- en keutelonderzoek, en wordt onderzocht wat de toegevoegde waarde van keutelonderzoek is. In het tweede deel worden op basis van een multicriteria-analyse de verschillende toegepaste methodes afgewogen waarin de praktische toepasbaarheid, schaalbaarheid en betaalbaarheid geëvalueerd worden. Ten behoeve van de multicriteria-analyse worden diverse aannames gedaan die omgeven zijn met onzekerheid. Vanwege de subjectiviteit van de scores die toegekend worden aan de verschillende criteria hebben we deze analyse in een apart hoofdstuk opgenomen. Het rapport wordt afgerond met een conclusie en advies.

2. Methode

2.1 Globale aanpak

De keutel- en eDNA onderzoeken zijn per adres of deel van een gebouw uitgevoerd zodat de resultaten van de verschillende methodes op voldoende detailniveau te vergelijken zijn. Figuur 1 geeft een indruk van de spreiding van de locaties die bemonsterd zijn. Aan de hand van de verkregen dataset is geanalyseerd hoe effectief, betrouwbaar, praktisch toepasbaar en betaalbaar eDNA onderzoek en keutelonderzoek zijn, in vergelijking met elkaar en/of protocolonderzoek. In de volgende paragrafen wordt de aanpak nader toegelicht.



Figuur 1. Kaart waarop de locaties waar onderzoek plaats gevonden heeft weergegeven zijn. In zwart de onderzoeksgebieden waarbij het keutel- en eDNA veldonderzoek in juni plaatsgevonden heeft, en in blauw de locaties waarbij het keutel- en eDNA veldonderzoek in het najaar uitgevoerd is.

2.2 Deelonderzoeken

Een uitgebreid overzicht van de bemonsterde locaties is opgenomen in bijlagen 2, en een samenvatting hiervan is weergegeven in tabel 1. Uit privacy overwegingen worden exacte adressen in dit rapport niet weergegeven. De verschillende methoden zijn onafhankelijk van elkaar uitgevoerd, dat wil zeggen dat het voor de veld- en laboratoriummedewerkers op voorhand niet bekend was of er wel of niet vleermuizen aanwezig zijn. In de volgende alinea's wordt de gekozen aanpak per locatie nader toegelicht.

Tabel 1. Overzicht van bemonsterde locaties.

Locatie	Deelonderzoek	Aantal locaties	Jaar protocol onderzoek	Periode keutel onderzoek	Periode eDNA bemonstering	Type eDNA monsters
Doorn 1-6	Basisonderzoek deel 1	6	'23	jun '24	jun '24	spons, lucht, stof
Delfzijl 1-4 en 6-17 Rosmalen 1-2 Doornenburg	Basisonderzoek deel 2	19	'24	jun '24	jun '24	spons, lucht, stof
Rosmalen 3-5 Delfzijl 5	Basisonderzoek deel 3	4	'24	jun '24	jun '24	spons
Leerdam 1-10	Basisonderzoek deel 4	10	'23	okt '24	sep '24	spons
Schijndel 1-14 Sint-Oedenrode 1-7	Basisonderzoek deel 5	21	'24	okt '24	sep '24	spons
Limburg	Limburg	12	'23	-	jun '24	spons, lucht, stof
Appingedam	Appingedam	34	-	-	jun '24	spons, lucht, stof
Veldcontroles	Veldcontroles	8	-	-	jun '24	spons, lucht, stof
Steenwijk	Soortgericht	5	-	-	sep '24	spons

Basisonderzoek. Er zijn 60 locaties waar zowel protocolonderzoek, keutelonderzoek en eDNA onderzoek plaatsgevonden heeft. Op voorhand was de verwachting dat er relatief veel locaties zouden zijn waar met protocolonderzoek geen verblijfplaatsen van vleermuizen vastgesteld zouden worden. Om ervoor te zorgen dat er voldoende locaties in de dataset zijn waar protocolonderzoek wel verblijfplaatsen van vleermuizen aantoonbaar is gepoogd om met name locaties te bemonsteren waar de kans groot is dat er vleermuizen aangetroffen zouden worden met protocolonderzoek. Op een deel van de locaties waren in mei of begin juni reeds verblijfplaatsen gevonden middels het protocolonderzoek. Deze locaties zijn gericht bemonsterd. Daarnaast zijn ook relatief veel hoekwoningen met een kopgevel bemonsterd omdat de verwachting was dat daar meer locaties tussen zouden zitten waar vleermuizen aanwezig zouden zijn.

eDNA - Op 25 locaties zijn in juni 2024 eDNA stof-, spons- en luchtmonsters verzameld (basisonderzoek deel 1 en 2). Op basis van deze uitkomsten (evaluatie fase 1) bleek dat met de eDNA lucht- en stofmethode de afwezigheid van vleermuizen niet betrouwbaar vastgesteld kan worden, omdat veel verblijfplaatsen met deze methodes gemist werden. Het spons onderzoek leverde daarentegen meer locaties met verblijfplaatsen op dan onderzoek volgens protocol. Daarom is bij verdere bemonsteringen in september 2024 alleen de sponsmethode ingezet (35

locaties, basisonderzoek deel 3, 4 en 5). In totaal zijn er dus 60 locaties bemonsterd met de sponsmethode.

Keutels - Op alle 60 locaties is keutelonderzoek uitgevoerd door Twisk Ecologisch Onderzoek of door Miecon BV. Op 25 locaties heeft het keutelonderzoek plaats gevonden in juni 2024 (basisonderzoek deel 1 en 2) en op 35 locaties heeft het keutelonderzoek plaats gevonden in oktober 2024 (basisonderzoek 3, 4 en 5).

Bat-detector - Er is op alle 60 locaties bat-detector uitgevoerd door derden (Ecoreest, Econsultancy, Twisk Ecologisch Onderzoek, Bureau Viridis, Cobra Adviseurs). In het geval dat het protocol onderzoek uitgevoerd werd door Twisk Ecologisch Onderzoek is het keutelonderzoek en de eDNA bemonstering uitgevoerd door Miecon BV om de onafhankelijkheid van de uitkomsten te waarborgen.

Bij 44 locaties (basisonderzoek deel 2, 3 en 5) is in 2024 protocolonderzoek uitgevoerd, bij 16 locaties (basisonderzoek deel 1 en 4) is een protocolonderzoek in 2023 uitgevoerd. Bij basisonderzoek deel 1 was een kraamverblijf van gewone dwergvleermuizen aanwezig in grondgebonden woningen (enige kraamverblijf in het basisonderzoek). Basisonderzoek deel 4 betrof een appartementencomplex waar de vleermuizen uitvliegen uit open stootvoegen en andere kieren.

Veldcontroles. Het was op voorhand niet uit te sluiten dat er op de te onderzoeken locaties (lage) concentraties eDNA aanwezig waren in de omgeving, afkomstig van bijvoorbeeld langs vliegende dieren. We verwachten echter dat rondom in- en uitvliegopeningen de hoeveelheid eDNA relatief hoog zal zijn. Om informatie te krijgen over de aanwezigheid en hoogte van een achtergrond signaal zijn er 8 locaties bemonsterd waar op voorhand vastgesteld werd dat de spouw niet toegankelijk is voor vleermuizen en aanwezigheid van verblijfplaatsen dus was uit te sluiten. Op deze locaties is uitsluitend eDNA onderzoek verricht. Hier werden zowel de eDNA sponsmonsters, luchtmonsters als stofmonsters verzameld maar werd dus geen protocolonderzoek en keutelonderzoek uitgevoerd.

Provincie Limburg. In Limburg zijn vanuit een opdracht en financiering van de provincie Limburg aan Regelink Ecologie & Landschap aanvullend 12 panden bemonsterd met drie type eDNA monsters (stof, spons en luchtmonsters). Deze bemonsteringen hebben plaats gevonden op locaties waar op basis van protocolonderzoek in 2023 gebleken is dat er verblijfplaatsen (paar, kraam- en zomerverblijfplaatsen) van laatvlieger en/of gewone dwergvleermuis aanwezig zijn. Deze data zijn gebruikt om met grotere zekerheid te bepalen of afwezigheid van vleermuizen bepaald kan worden op basis van de eDNA methodieken.

Appingedam. In Appingedam zijn, in opdracht van en met financiering door Groningerhuis, 33 locaties met drie eDNA methodes (stof, spons en luchtmonsters) bemonsterd. Het is niet bekend of er verblijfplaatsen van vleermuizen aanwezig zijn. Deze data geven een beeld van het in praktijk toepassen van de eDNA methodiek.

Soortgerichte bemonsteringen. Er zijn gericht 4 bekende kraamverblijven en 1 paarverblijf van rosse vleermuis bemonsterd in rijtjeswoningen in Steenwijk. Deze verblijfplaatsen zijn in 2014 gevonden en in eerste instantie gedetermineerd als laatvlieger verblijven. Pas in 2016 werd vastgesteld dat het verblijfplaatsen van rosse vleermuis betreft. Sindsdien vinden er geregeld tellingen plaats van uitvliegende vleermuizen. Deze locaties zijn gericht bemonsterd met uitsluitend de eDNA sponsmethode. Deze data geven extra inzicht in de toepasbaarheid van de eDNA sponsmethode voor minder algemene soorten omdat in de overige deelonderzoeken slechts op één locatie rosse vleermuis vastgesteld werd (door middel van eDNA).

2.3. Environmental DNA

Ten behoeve van eerdere studies (waaronder van Bochove et al. 2024) zijn reeds protocollen ontwikkeld en toegepast voor het verzamelen van sponsmonsters, luchtmonsters en stofmonsters. Deze protocollen zijn doorontwikkeld en in dit onderzoek toegepast. Figuur 2 geeft de globale workflow weer die is toegepast in dit project.

2.4 eDNA bemonstering

eDNA sponsmonsters

Het toegepaste veldprotocol voor het verzamelen van de eDNA sponsmonsters is opgenomen in bijlagen 3. In het kort is de methode als volgt te omschrijven. Met behulp van een kleine vochtige spons is eDNA rond uitvliegopeningen verzameld en direct in het veld geconserveerd in een 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. Na de bemonstering is het DNA geconserveerd door de spons over te brengen naar een potje met conserveringsbuffer. Bij de metingen aan voor vleermuizen niet toegankelijke spouwmuren is de buitenzijde van de muur bestreken. Figuur 3 geeft een impressie van de werkwijze in het veld.



Figuur 2. Opsporen van vleermuizen door middel van eDNA.

eDNA luchtmonsters

Het toegepaste veldprotocol voor het verzamelen van de eDNA luchtmonsters is opgenomen in bijlagen 4. De luchtmonsters zijn verzameld door een slang de spouwmuur in te duwen via een open stootvoeg of een geboord gat. Figuur 4 geeft een impressie van de opstelling. De lucht is door een glasvezelfilter geleid en het eDNA blijft op het filter achter. Deze bemonstering heeft plaats gevonden onderaan de gevel, of op een met een ladder bereikbare hoogte (maximaal 4 meter hoogte). Alle gevels waar toegangsmogelijkheden voor vleermuizen aanwezig waren, zijn bemonsterd (met uitzondering van de controle monsters die verzameld zijn bij spouwmuren waar geen potentiële toegangsmogelijkheden aanwezig zijn). Per gevel zijn er 2 posities bemonsterd met hetzelfde luchtfilter (mengmonster). Per positie is minimaal 3 minuten lucht aangezogen. Per monster is totaal minimaal 10 minuten lucht aangezogen. De gebruikte vacuümpomp heeft een capaciteit van 17 liter per minuut. Bij 10 minuten pompen wordt dus 170 liter lucht door het filter gepompt. Bij drie gevels is de totale aanzuigtijd dus (3 gevels x 2 posities x 3 minuten = 18 minuten). In eerder wetenschappelijk onderzoek wordt een vergelijkbare methode toegepast (Garrett et al. 2023a en 2023b). In deze onderzoeken werden echter langere pomptijden toegepast (12-24 uur). Wij hebben gekozen voor een relatief korte pomptijd omdat het volume van een spouw klein is en één van de vereisten is om een kostenefficiënte methode toe te passen. Bovendien is onze verwachting dat bij langere pomptijden de kans groot is dat ook lucht uit andere ruimtes (bijvoorbeeld het dak) aangezogen wordt, hetgeen tot vals positieve waarnemingen kan leiden. Geboorde gaten worden na afloop gevuld met cement. De filters bevinden zich in een zelfdrogende capsule waardoor het eDNA geconserveerd blijft. Bij aankomst in het laboratorium zijn de capsules opgeslagen bij 4°C.



Figuur 3. eDNA monstername met behulp van een spons. Hierbij wordt de spons gemonteerd op een telescoopstok.



Figuur 4. Opstelling die gebruikt is voor het verzamelen van een eDNA lucht- en stofmonsters.

eDNA stofmonsters

Het toegepaste veldprotocol voor het verzamelen van de eDNA stofmonsters is opgenomen in bijlagen 5. De stofmonsters zijn verzameld door onder in de gevel, via open stootvoegen of geboorde gaten, stof en ander materiaal zoals spinnenwebben op te zuigen met een vacuümpomp. Het stof is opgevangen in een steriele capsule en vervolgens overgebracht naar een opslagbuis met silica capsules. Het streven was om minimaal 3 mL stof te verzamelen. In de praktijk bleek het in een aantal gevallen niet haalbaar om dergelijk volume aan materiaal te verzamelen omdat er in de spouw weinig stof aanwezig was. De stofmonsters zijn opgeslagen bij 4°C.

2.5 Laboratoriumanalyse eDNA

De eDNA analyses zijn uitgevoerd in de laboratoriumfaciliteiten van Datura. Dit laboratorium is speciaal voor eDNA onderzoek ingericht. In het laboratorium is het eDNA uit de monsters geïsoleerd en het DNA is gezuiverd. Vervolgens is er een controle uitgevoerd om vast te stellen of er sprake is van PCR inhibitie. Vervolgens zijn alle eDNA monsters eerst 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. Op voorhand is in het laboratorium vastgesteld dat een gevoelige amplificatie gerealiseerd kan worden van alle in Nederland voorkomende vleermuizen (zie bijlagen 6 voor een lijst van soorten). De qPCRs zijn uitgevoerd met 12 PCR replica's. Daarbij wordt 12 maal een qPCR-test uitgevoerd op een deelvolume van het monster. Het toepassen van 12 replica's resulteert in een zeer gevoelige

detectie. Hiervoor is gekozen omdat de hoeveelheid eDNA in het milieu binnen veel soortgroepen laag is.

De monsters waarin eDNA van vleermuizen gedetecteerd werd, zijn vervolgens onderworpen aan een tweede test (metabarcoding) om vast te stellen van welke soorten er eDNA aanwezig is in de monsters. Deze analyse is duurder en complexer, en daardoor is de doorlooptijd van deze analyse op het moment nog enkele weken. Deze analyse is ook toegepast op verzamelde keutels.

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.

2.7 Keutelonderzoek

Het inspecteren van spouwmuren op sporen is een methode die nog in ontwikkeling is. Voorafgaand aan het onderzoek is een voorlopig veldprotocol opgesteld op basis van de toen beschikbare kennis en ervaring van de betrokken expert. Een bijgewerkte versie van dit veldprotocol is opgenomen in bijlagen 7. Voor onderzoek van grondgebonden woningen met meer dan een etage is in beginsel een hoogwerker nodig; bij een deel van de woningen is onderzoek met een ladder ook mogelijk volgens de gedragscode die door na-isoleerders wordt gebruikt.

De buitenkant van het pand is gecontroleerd op aanwezigheid van keutels van vleermuizen, bijvoorbeeld op de muur of vensterbank. Als het pand bereikbaar was met een hoogwerker zijn kantpannen opgetild om aanwezigheid van keutels onder de pannen vast te stellen of is de ruimte onder de pannen gecontroleerd met een endoscoop. De spouw is visueel geïnspecteerd met een endoscoop via open stootvoegen. Als open stootvoegen afwezig waren, dan zijn met een accuboormachine gaatjes geboord om in de spouw te kunnen kijken. Daarbij is zo te werk gegaan dat potentieel versturende handelingen (als gaatjes boren) pas toegepast zijn als andere mogelijkheden om sporen waar te nemen niet resulteerde in vaststelling van aanwezigheid van vleermuizen. Gaten werden niet dieper dan 10 cm uitgeboord. Dit is de breedte van een baksteen, zodat de kans dat vleermuizen bij het boren gedood of verwond zouden worden zo klein mogelijk was. De hoeveelheid aangetroffen keutels is per vindplaats (bijv. achter open stootvoeg, op vensterbank, onder dakpannen enz.) genoteerd in de volgende categorieën: 0 = geen; 1 = 1 – 10 keutels; 2 = 10 – 100; 3 = 100 – 500; 4 = 500 – 1000; 5 = dichte laag. Op basis van een combinatie van sporen als het aantal keutels, concentratie van keutels en aanwezigheid van vetsporen is geschat of er sprake is van een grote (kraam-, grote zomer- of massawinterverblijfplaats) of een kleine verblijfplaats (kleine zomer- of paarverblijfplaats, <4 dieren).

Op basis van vorm en grootte van uitwerpselen is gepoogd om een inschatting te maken van de soort. Als alle keutels klein zijn en een gelijkende vorm en afmeting hebben dan wordt verondersteld dat het gaat om een verblijfplaats van gewone dwergvleermuizen. Als er daarnaast ook iets grotere keutels aanwezig zijn dan wordt verondersteld dat ook ruige dwergvleermuis gebruikt maakt van de locatie. Als daarnaast ook grote keutels gevonden worden dan wordt verondersteld dat er sprake is van een verblijfplaats van laatvlieger of meervleermuis. Als de keutels in kleur variëren van zwart tot helder bruin dan worden keutels genoteerd als grootoorvleermuis. Als het mogelijk was, zijn er keutels verzameld. Op deze keutels is een DNA barcoding analyse uitgevoerd om de soort te bepalen.

Tevens zijn bij dit onderzoek bouweigenschappen van de onderzochte gebouwen vastgelegd zoals de aanwezigheid van isolatie en eventuele restructies in de spouw die toegankelijk zijn voor vleermuizen. Een beschrijving van de onderzochte gebouwen is opgenomen in bijlage 8.

2.8 Data-analyse

Data-management

Het onderzoek resulteert in een dataset waarin per locatie de resultaten van protocolonderzoek, eDNA onderzoek en sporenonderzoek alsook de bijbehorende metadata (bijvoorbeeld datum, of specifieke aanduiding van een bepaalde gevel) zijn vastgelegd. Er is een PostgreSQL database opgezet waarin de data van keutelonderzoek, eDNA testen en protocolonderzoek en de bijbehorende metadata opgeslagen zijn.

Bepalen grenswaardes

Er is geanalyseerd hoeveel eDNA van vleermuizen er aanwezig is in en op muren waar de spouw niet toegankelijk is voor vleermuizen. Er zijn twee sets van locaties gebruikt voor deze analyse.

- 8 veldcontroles. Dit betrof muren met een spouw waarvan op voorhand werd vastgesteld dat deze niet toegankelijk waren voor vleermuizen. Deze werden bemonsterd met de eDNA lucht, stof en sponsmethode.
- 8 tussenwoningen uit basisonderzoek deel 5, waarbij in het keutelonderzoek bleek dat de spouw niet toegankelijk is voor vleermuizen. Bij deze woningen zijn eDNA sponsmonsters verzameld langs randen van de kozijnen en dakgoot, omdat deze potentieel toegang zouden kunnen bieden tot de spouw.

De grenswaardes zijn zo gesteld dat de controle locaties negatief gescoord worden, zodat aanwezigheid van achtergrond eDNA (van bijvoorbeeld langs vliegende dieren) niet leidt tot een positieve uitslag. Vervolgens is geanalyseerd welke fractie van bemonsterde verblijfplaatsen negatief gescoord wordt.

Op basis van deze analyse zijn sponsmonsters positief gescoord als minimaal 11 van de 12 replica's positief resultaat gaven met een gemiddelde ct-waarde van 40 of lager (lagere ct-waarde betekend meer eDNA; ct-waarde van 40 komt neer op circa 82 moleculen per mL template). Stof- en luchtmonsters zijn positief gescoord als minimaal 1 van de 12 replica's positief scoorde.

Selecteren van een eDNA methode

Aan het einde van fase 1 is geëvalueerd welke eDNA methode (stof/lucht/sponsmethode) het meest geschikt is om aan- of afwezigheid van vleermuizen vast te stellen. Hiervoor is gebruik gemaakt van de volgende data:

- Basisonderzoek deel 1 (protocolonderzoek in 2023). Dit betreft 6 locaties.
- Basisonderzoek deel 2 (protocolonderzoek in 2024). Dit betreft 19 locaties.
- Data verkregen uit het project in Provincie Limburg (protocolonderzoek in 2023). Dit betreft 12 locaties.

Totaal is er voor de vergelijking van de eDNA methodes dus van 37 locaties data gebruikt.

Toetsen of totale afwezigheid van verblijfplaatsen van vleermuizen vastgesteld kan worden

Voor deze analyse is gebruikgemaakt van data van de eDNA sponsmonsters, protocolonderzoek en keutelonderzoek. Ten behoeve van het vaststellen van de betrouwbaarheid om afwezigheid van verblijfplaatsen van vleermuizen vast te stellen met behulp van eDNA sponsmonsters is gebruik gemaakt van de volgende data:

- Alle data uit het basisonderzoek (totaal 60 locaties), waarbij het protocolonderzoek deels in 2023 en deels in 2024 uitgevoerd is.
- Data verkregen uit het project in Provincie Limburg (protocolonderzoek in 2023). Dit betreft 12 locaties.

Deze vergelijking is dus uitgevoerd op basis van data van 72 locaties.

Ten behoeve van het vaststellen van de betrouwbaarheid om afwezigheid van verblijfplaatsen van vleermuizen vast te stellen met behulp van keutelonderzoek is alleen gebruik gemaakt van de data vanuit het basisonderzoek (60 locaties).

Per locatie en methode is gescoord of er een vleermuisverblijfplaats is gevonden en de resultaten per methode worden vervolgens vergeleken. Indien er geen significant verschil wordt waargenomen tussen protocolonderzoek en keutel of eDNA onderzoek dan kan worden geconcludeerd dat de nieuwe methode vergelijkbare resultaten oplevert als het protocolonderzoek. In het geval dat er wel een significant verschil wordt waargenomen kan echter niet worden bepaald welke methode meer in de buurt van de realiteit ligt (de realiteit is namelijk niet bekend). Wel is gekeken naar het aantal vals negatieven ten opzichte van het protocolonderzoek. Als de nieuwe methode (eDNA en/of keutelonderzoek) resulteert in een lage hoeveelheid vals negatieven betekent dit dat de nieuwe methode weinig verblijfplaatsen mist die vastgesteld zijn met protocolonderzoek. Als weinig verblijfplaatsen gemist worden, en potentieel zelfs meer verblijfplaatsen gevonden worden, dan kan geconcludeerd worden dat de methode minstens net zo bruikbaar is als protocolonderzoek om afwezigheid vast te stellen.

Idealiter zouden alle bemonsterde locaties willekeurig geselecteerd moeten worden. Het was echter praktisch niet haalbaar om alle monsters op willekeurige adressen te verzamelen, en daarom zijn de bemonsteringen geclusterd in een aantal wijken. Er zijn verspreid over 8 wijken 60 locaties onderzocht met zowel keutelonderzoek als protocolonderzoek. Tevens zijn er, verspreid over 12 wijken, 72 locaties onderzocht met zowel eDNA sponsmonsters als protocolonderzoek. Op voorhand kunnen we niet uitsluiten dat in een bepaalde wijk de ene methode beter werkt dan de andere methode. Daar is rekening mee gehouden in de statistische toets die uitgevoerd is.

De statistische analyse is uitgevoerd met gebruik van de programmeertaal R (4.2.2). Om te toetsen of keutelonderzoek of eDNA methodes vergelijkbare resultaten geven met protocolonderzoek is gebruik gemaakt van een Logistisch Regressie model met "Mixed Effects". Daarbij is de methode in het model als onafhankelijke variabele (fixed effect) opgenomen en is de wijk waar de locatie zich in bevindt opgenomen als "mixed effect". Het model houdt er dus rekening mee dat de effectiviteit van de methodes kan verschillen per wijk. Het model corrigeert hiervoor zodat de uitkomsten van de methodes op betrouwbare wijze vergeleken kunnen worden.

Toetsen of actuele aan- of afwezigheid van vleermuizen in gebouwen vastgesteld kan worden

Voor deze analyse is een vergelijking uitgevoerd tussen:

- eDNA en keutelwaarnemingen in juni 2024 enerzijds en verblijfplaatsen die in de zomer (kraamperiode) 2024 vastgesteld zijn door middel van protocolonderzoek anderzijds. Bij deze vergelijking is gebruikt gemaakt van data van basisonderzoek deel 2 en 3. Dit betreft 23 locaties.
- eDNA en keutelwaarnemingen in september/oktober 2024 enerzijds verblijfplaatsen die in het najaar (paarperiode) 2024 vastgesteld zijn door middel van protocolonderzoek anderzijds. Bij deze vergelijking is gebruikt gemaakt van data van basisonderzoek deel 5. Dit betreft 21 locaties.

Voor deze analyse is in totaal dus gebruik gemaakt van data van 44 locaties.

Toetsen of aanwezigheid van vleermuisverblijfplaatsen aan te tonen is op locaties waar eerder (tot een jaar daarvoor) vleermuizen vastgesteld zijn

In 2023 is op 28 locaties protocolonderzoek uitgevoerd (basisonderzoek deel 1 en 5, en Limburg dataset). Geanalyseerd is welk percentage van de locaties waar bij het protocolonderzoek vleermuizen vastgesteld zijn in 2023, ook eDNA of keutels vastgesteld konden worden in 2024.

Verkennen of er signalen van afbraak zichtbaar zijn in de eDNA data

In het najaar 2024 zijn eDNA monsters genomen op 21 locaties waar in 2024 protocolonderzoek uitgevoerd is (basisonderzoek deel 5). Op basis van gegevens uit het protocolonderzoek is vastgesteld welke locaties in de zomer in gebruik waren (zomerverblijven) maar in de najaar ronde geen vleermuizen waargenomen zijn. Vervolgens is geanalyseerd in welk deel van de zomerverblijfplaatsen in het najaar eDNA of keutels vastgesteld konden worden.

Verder is onderzocht of er bij zomer- en paarverblijven van enkele dieren verschil is in eDNA concentratie tussen de zomer en najaar meting. Om de vergelijking te baseren op zoveel mogelijk data is er gebruik gemaakt van locaties waar in 2023 en 2024 zomer- en paarverblijfplaatsen gevonden zijn met protocolonderzoek. Van deze locaties zijn de eDNA concentraties vergeleken zoals deze gemeten zijn in 2024.

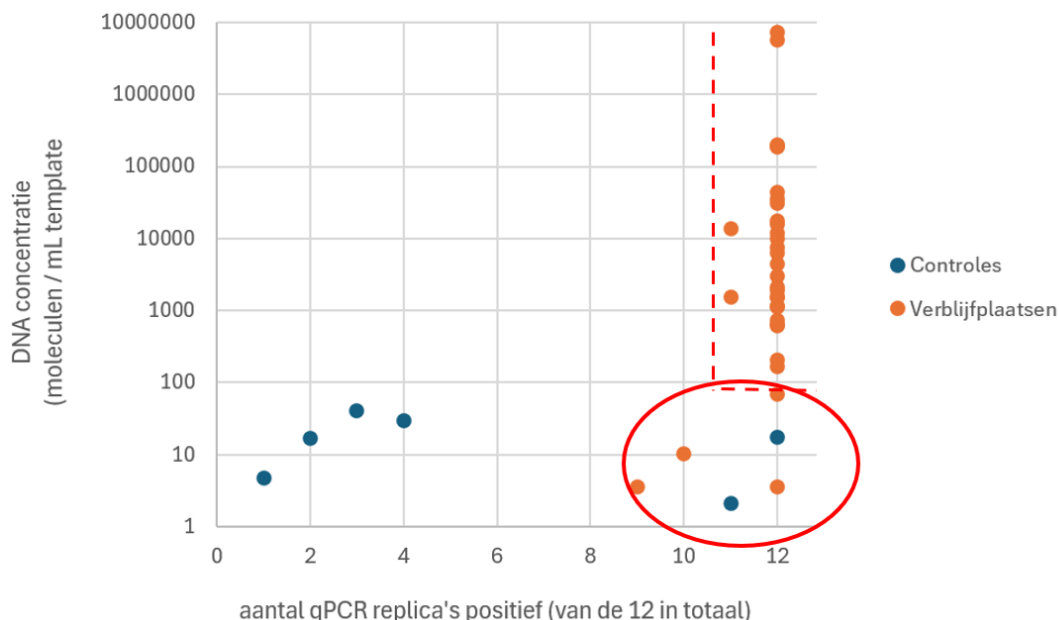
Bepalen van soorten, aantallen en functies van verblijfplaatsen op basis van keutels

Geanalyseerd is hoeveel keutels er gevonden zijn bij kleine verblijfplaatsen (1-4 dieren) en een grote verblijfplaats (kraamverblijfplaats van gewone dwergvleermuis van tientallen dieren). Deze analyse is uitgevoerd op basis van alle locaties uit het basisexperiment (60 locaties). Op 12 locaties zijn keutels verzameld, en is de identificatie op uiterlijk gecontroleerd door middel van DNA analyse. Hierbij werd één keutel per locatie op DNA onderzocht.

3. Resultaten

3.1 Lab controles en bepalen grenswaardes

Er is geen eDNA (ook geen lage concentraties) gedetecteerd in de extractiecontroles en PCR-controles. Daarmee is aangetoond dat tijdens het laboratoriumproces geen contaminaties zijn ontstaan. Op geen van de 8 controle locaties waar eDNA stof- en luchtmonsters genomen werden, is eDNA gedetecteerd. Op 9 van de 16 controle locaties waar sponsmonsters verzameld werden is geen eDNA van vleermuizen gedetecteerd in de sponsmonsters. Bij de overige 7 locaties werden lage concentraties eDNA gedetecteerd in de sponsmonsters (zie tabel 2, en figuur 5). Op 5 van de 7 controle locaties waar een kleine hoeveelheid eDNA aanwezig was gaven 1-4 van de 12 qPCR replica's een positieve uitslag. Dit betreft zeer lage concentraties eDNA, die op basis van het aantal positieve replica's duidelijk te onderscheiden zijn van de hogere eDNA concentraties die aangetroffen worden bij verblijfplaatsen. Met behulp van metabarcoding werd vastgesteld dat dit lage concentraties eDNA van gewone dwergvleermuis betreft. Op 2 van de 7 locaties waar een lage hoeveelheid eDNA gemeten werd (Schijndel_5 en Sint-Oedenrode_3) was het aantal positieve qPCR replica's hoger (12/12 en 11/12 respectievelijk). Dit is vergelijkbaar met het aantal positieve qPCR replica's dat aangetroffen wordt bij verblijfplaatsen. De gemiddelde ct-waarde was echter hoger dan 40 (<82 DNA moleculen / mL PCR template). Met behulp van metabarcoding werd vastgesteld dat dit lage concentraties eDNA van rosse vleermuis bij Sint-Oedenrode_3 en ruige dwergvleermuis en rosse vleermuis bij Schijndel_5 betrof. Op basis hiervan zijn de grenswaardes gesteld op een ct-waarde van 40 (~82 moleculen / mL PCR template). Bij 4 van de 34 (12%) van de verblijfplaatsen bevond de eDNA concentratie van vleermuizen (in het algemeen) zich onder de gestelde grenswaarde. Deze locaties werden dus vals negatief gescoord. De eigenschappen van deze verblijfplaatsen zijn weergegeven in tabel 3.



Figuur 5. Overzicht van de gemeten eDNA concentraties in de sponsmonsters bij verblijfplaatsen en controle locaties. De verblijfplaatsen binnen de rode stippellijn zijn gescoord als verblijfplaats. Locaties met een gemiddelde ct-waarde hoger dan 40 (~82 moleculen/mL template) en minder dan 11/12 PCR replica's zijn negatief gescoord. Als gevolg daarvan zijn vier verblijfplaatsen in de rode cirkel negatief gescoord.

Tabel 2. Overzicht van het aantal PCR replica's dat positief was op de negatieve controle locaties (spouw niet toegankelijk voor vleermuizen). De qPCRs zijn uitgevoerd met 12 replica's. Het aantal replica's geeft een indicatie voor de hoeveelheid eDNA in de monsters. Lucht- en stofmonsters zijn positief gescoord als er minimaal 1 replica positief was. Gezien het feit dat er lage concentraties eDNA aanwezig zijn op muren van panden waar vleermuizen geen verblijfplaats hebben worden sponsmonsters (verzameld in- en rond potentiële uitvliegopeningen) alleen positief gescoord als er minimaal 11 van de 12 PCR replica's positief scoorden.

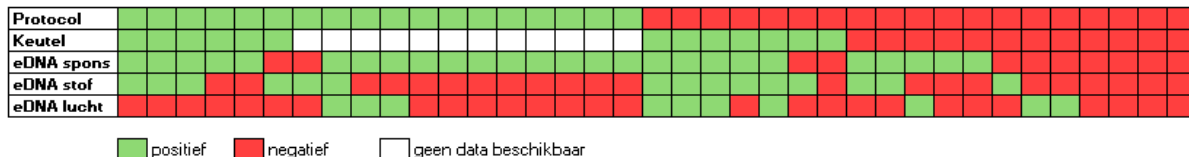
Locatie	Type pand	Stofmonster	Luchtmonster	Sponsmonster	Gem. Ct-waarde sponsmonsters
Den Bosch 1	Appartement complex	0/12	0/12	1/12	41,2
Den Bosch 2	Appartement complex	0/12	0/12	3/12	40,8
Den Bosch 3	Appartement complex	0/12	0/12	4/12	43,3
Den Bosch 4	Appartement complex	0/12	0/12	0/12	
Appingedam_34	Tussenwoning	0/12	0/12	0/12	
Appingedam_35	Tussenwoning	0/12	0/12	0/12	
Appingedam_36	Tussenwoning	0/12	0/12	0/12	
Appingedam_37	Tussenwoning	0/12	0/12	0/12	
Schijndel_1	Tussenwoning			0/12	
Schijndel_4	Tussenwoning			0/12	
Schijndel_5	Tussenwoning			12/12	41,8
Schijndel_8	Tussenwoning			0/12	
Schijndel_9	Tussenwoning			0/12	
Sint_Oedenrode_2	Tussenwoning			2/12	41,9
Sint_Oedenrode_3	Tussenwoning			11/12	44,3
Sint_Oedenrode_6	Tussenwoning			4/12	49,0

Tabel 3. Overzicht van locaties waar de hoeveelheid eDNA zich onder de grenswaarde bevond, terwijl protocolonderzoek de aanwezigheid van een verblijfplaats aantoonde.

	eDNA bemonsterd op:	Type verblijfplaats	Protocolonderzoek uitgevoerd in:	Soort vastgesteld via protocol
Posterholt_2	26-6-2024	Zomerverblijfplaats & mogelijk paarverblijf	2023	Gewone dwergvleermuis
Delfzijl_8	13-6-2024	Paarverblijfplaats	2024	Gewone dwergvleermuis
Sint-Oedenrode_4	17-9-2024	Zomerverblijfplaats	2024	Gewone dwergvleermuis
Schijndel_2	17-9-2024	Zomerverblijfplaats	2024	Laatvlieger

3.2 Vergelijking eDNA stof-, lucht- en sponsmonsters

Een volledig overzicht van de resultaten van de eDNA analyses is opgenomen in bijlage 9. Een visuele samenvatting van de positieve en negatieve uitkomsten van de verschillende methodes is weergegeven in figuur 6. De resultaten van deze methodes zijn sterk verschillend. Globaal gezien worden de meeste verblijfplaatsen gevonden met de sponsmethode, en is er weinig overeenkomst met de resultaten van de stof- en luchtmethode.



Figuur 6. Overzicht van de aan- en afwezigheid van vleermuizen zoals vastgesteld met 3 eDNA methodes in vergelijking met protocolonderzoek en keutelonderzoek. Locaties waar het keutelonderzoek niet volledig uitgevoerd kon worden zijn in deze figuur negatief gescoord.

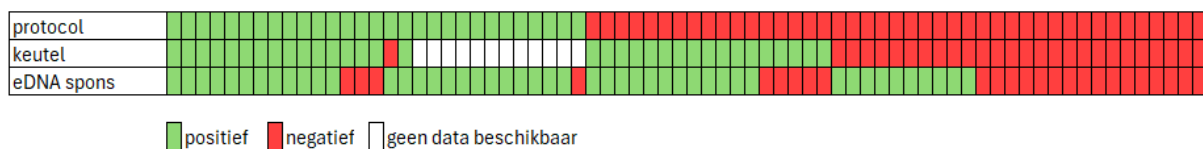
De 3 eDNA methodes werden getest op 37 locaties waar protocolonderzoek uitgevoerd is. Op 18 van de 37 locaties werd met protocolonderzoek vastgesteld dat er vleermuizen aanwezig waren. Met gebruik van de eDNA stofmonsters zijn 6 van de 18 ($\pm 33\%$) verblijfplaatsen gevonden die met protocolonderzoek zijn aangetoond. De hoeveelheid eDNA in deze monsters was laag (maximaal 10/12 en gemiddeld 7/12 replica's positief). Met de lucht methode zijn 3 van de 18 ($\pm 17\%$) locaties eDNA gedetecteerd waar met protocolonderzoek een verblijfplaats vastgesteld werd. Ook in deze drie monsters was de concentratie eDNA laag (maximaal 2/12 en gemiddeld 1,3/12 replica's positief). Bij de meeste verblijfplaatsen die vastgesteld werden met protocolonderzoek werd dus geen eDNA gedetecteerd met de stof- en luchtmethode. Aan de andere kant is er eDNA in stofmonsters gedetecteerd bij 9 van 19 locaties waar volgens protocolonderzoek geen verblijfplaatsen aanwezig zijn. In de luchtmonsters werd eDNA gedetecteerd bij 7 van de 19 locaties waar volgens protocolonderzoek geen verblijfplaatsen aanwezig zijn.

Met de sponsmonsters werd eDNA gedetecteerd op 16 van de 18 locaties (89%) waar protocolonderzoek een verblijfplaats heeft aangetoond. Ook werd eDNA gedetecteerd in de sponsmonsters op 10 van de 19 locaties waar protocolonderzoek geen verblijfplaats vond. Bij 5 van de 10 locaties waar sponsmonsters eDNA aantoonde, maar bij het protocolonderzoek geen verblijfplaats aangetoond werd, zijn wel vleermuiskeutels gevonden. Bij 5 van de 37 locaties was een sponsmonster positief, terwijl protocolonderzoek en keutelonderzoek negatief waren.

3.3 Toetsen of totale afwezigheid van vleermuizen vastgesteld kan worden met eDNA- of keutelonderzoek

eDNA

De betrouwbaarheid van de sponsmethode is getoetst op basis van data van monsternames in de kraamperiode (fase 1) en de paarperiode (fase 2). De resultaten zijn visueel weergegeven in figuur 7. Met gebruik van de eDNA sponsmethode werden 62% meer locaties positief gescoord, dan met protocolonderzoek (47 positieve locaties met eDNA, 29 positieve locaties met protocolonderzoek). Er werd eDNA gedetecteerd bij 25 van de 29 locaties (86%) waar verblijfplaatsen vastgesteld werden met protocolonderzoek. Daarnaast werd bij alle 5 bekende verblijfplaatsen van rosse vleermuis eDNA gedetecteerd met de sponsmethode. Met de sponsmethode is eDNA aangetroffen bij 22 van de 43 locaties waar protocolonderzoek geen verblijvenplaats aangetoond heeft. Bij 12 van de 22 locaties waar sponsmonsters positief waren, maar protocolonderzoek niet, zijn wel vleermuiskeutels gevonden (zie tabel 4). Tenslotte werd op 21 locaties waar protocol geen vleermuizen vaststelde, ook geen eDNA gedetecteerd.



Figuur 7. Overzicht van de aan- en afwezigheid zoals vastgesteld met eDNA sponsmethode en keutelonderzoek in vergelijking met protocolonderzoek. Locaties waar het keutelonderzoek niet volledig uitgevoerd kon worden zijn in deze figuur negatief gescoord.

Tabel 4. Overzicht van de uitkomsten van de eDNA sponsmonsters en het keutelonderzoek op locaties 43 locaties waar met protocolonderzoek geen verblijfplaats vastgesteld is.

		Keutelonderzoek	
		Keutels aangetroffen	Geen keutels aangetroffen
eDNA spons methode	Positief gescoord	12	10
	Negatief gescoord	5	16

In het basisonderzoek (n=60) en de locaties in Provincie Limburg (n=12) samen is in de sponsmonsters op 47 locaties eDNA aangetoond. Bij 37 locaties kon de aanwezigheid van vleermuizen bevestigd worden middels het keutelonderzoek en/of protocolonderzoek. Daarmee is de kans dat er daadwerkelijk (op basis van protocol- en/of keutelonderzoek) een verblijfplaats aanwezig is als er eDNA gedetecteerd wordt minimaal 79%.

Om te testen of de uitkomsten van protocolonderzoek significant anders zijn dan de uitkomsten van de eDNA sponsmethode is een Logisch Regressie model met "Mixed Effects" toegepast. Dit bleek legitiem te zijn omdat de data een normale verdeling volgt. De eigenschappen van het

model zijn opgenomen in tabel 5. De standaarddeviatie van het random effect (de wijken) was groot (3,317). Dit duidt erop dat de effectiviteit van de methodes verschillen van wijk tot wijk. De uitkomsten van het model tonen aan dat de uitkomsten van de eDNA sponsmonsters en het protocolonderzoek significant verschillend zijn (meer positieve detecties met eDNA dan met protocolonderzoek), zelfs als er gecorrigeerd wordt voor de wijk waarin de monsters genomen wordt.

Tabel 5. Uitkomsten van een Logistisch Regressie model met “Mixed Effects” met methode als “fixed effect” en wijk als “random effect”. AIC = Akaike Information Criterion; BIC = Bayesian Information Criterion; Log Lik=Log-Likelihood; Dev = Deviance; df.resid = Residual degrees of freedom; Var ran effect = variantie random effect; St. dev ran effect = standaard deviatie random effect.

AIC	BIC	Log Lik	Dev	df.resid	Var ran effect	St. dev ran effect
172.6	181.6	-83.3	166.6	141	3.317	1.821

	schatter	std. fout	z-waarde	p-waarde
snijpunt	-0.1859	0.6462	-0.288	0.773596
methode	1.5620	0.4281	3.649	0.000264

Keutelonderzoek

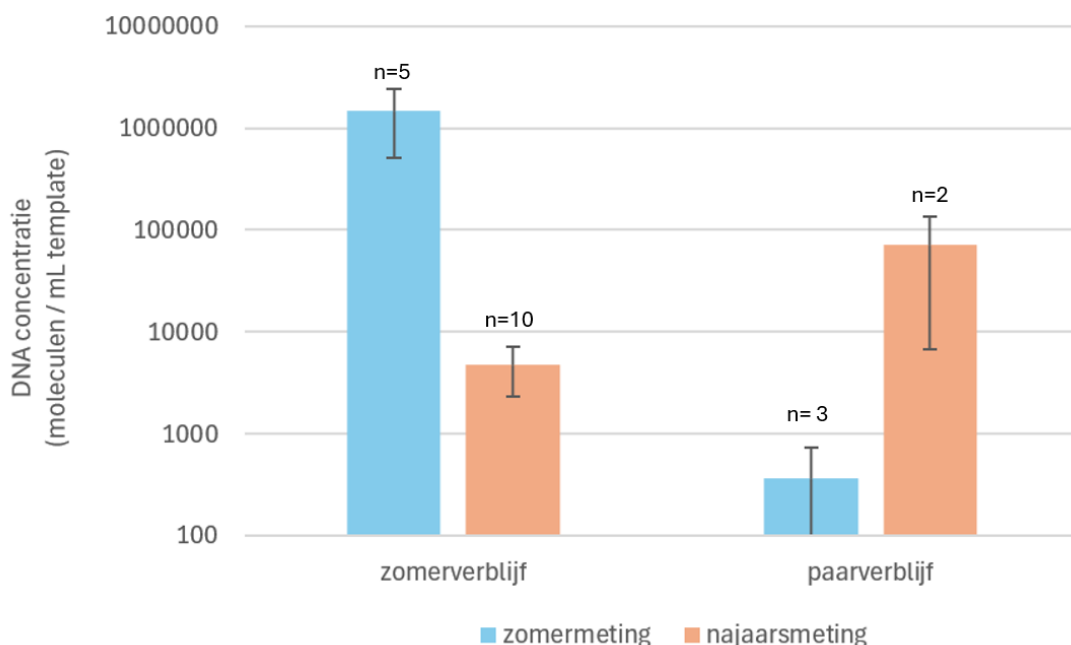
Van de 60 locaties, konden er 55 locaties volledig onderzocht worden op aanwezigheid van sporen als uitwerpselen. Bij 5 locaties kon de inspectie niet, of niet volledig uitgevoerd worden omdat het gebouw niet bereikbaar was met de hoogwerker, of omdat de gevel volledig bekleed was met hout waardoor geen gaatjes geboord konden worden. De inspecties van deze 55 gebouwen leverden sporen op bij 33 gebouwen. Om de uitkomsten van het keutelonderzoek te valideren worden de resultaten vergeleken met de huidige standaard, het protocolonderzoek (zie figuur 5). Bij 16 van de 17 (94%) verblijfplaatsen die gevonden zijn met protocolonderzoek is ook met het keutelonderzoek aanwezigheid van een verblijfplaats vastgesteld. Op 17 locaties werden wel keutels gevonden, terwijl protocolonderzoek geen verblijfplaats vaststelde. Op 12 van deze 17 locaties werd ook eDNA gemeten met de sponsmethode. Op 16 locaties werden zowel bij het protocol- als bij het keutelonderzoek geen verblijfplaatsen van vleermuizen vastgesteld .

Om te testen of de uitkomsten van het protocolonderzoek significant anders zijn dan de uitkomsten van de keutelmethode is een Logistisch Regressie model met “Mixed Effects” toegepast. Dit bleek legitiem te zijn omdat de data een normale verdeling volgt. De eigenschappen van het model zijn opgenomen in tabel 6. De standaarddeviatie van het random effect (de wijken) was klein (0,21). Dit duidt erop dat er weinig verschillen zijn tussen de methodes van wijk tot wijk. De uitkomsten van het model tonen aan dat de uitkomsten van de keutelonderzoek en het protocolonderzoek significant verschillend zijn, ook als er gecorrigeerd wordt voor de wijk waarin de monsters genomen wordt.

Tabel 7. Resultaten bij 5 zomerverblijfplaatsen, waar in najaar 2024 eDNA en keutelonderzoek uitgevoerd werd. Lv= laatvlieger, tv= tweekleurige vleermuis, gd= gewone dwergvleermuis, rg= ruige dwergvleermuis. Soorten die dikgedrukt zijn in de resultaten van het keutelonderzoek, betreffen keutels waarbij de identificatie bevestigd is door middel van DNA-onderzoek. Alleen bij schijndel_3, schijndel_14 en Sint-Oedenrode_7 kwam de eDNA concentratie boven de gestelde grenswaarde.

	Locatie	Schijndel_2	Schijndel_3	Schijndel_14	Sint-Oedenrode_4	Sint-Oedenrode_7
Protocolonderzoek	Datum van waarneming	17-7-2024	17-7-2024	18-7-2024	13-5-2024	13-5-2024
	Soort	lv	lv	gd	gd	gd
	Functie	zomerverblijf	zomerverblijf	zomerverblijf	zomerverblijf	zomerverblijf
	Gedrag	uitvliegend	uitvliegend	invliegend	invliegend	invliegend
	Aantal	2	1	1	1	2
Keutelonderzoek	Aantal keutels	50-100	1-5	50-100	100-500	100-500
	Soorten	gd, lv	lv	gd	d spec, lv	gd, lv
eDNA	Metabarcoding	-	gd, rg, tv	gd	-	gd
	Concentratie (moleculen/ mL template)	4	9867	4485	4	205
	Aantal positieve replica's (uit 12 totaal)	9	12	12	12	12

In figuur 9 zijn de gemeten eDNA concentraties weergegeven van zomer- en paarverblijfplaatsen van enkele dieren tijdens de zomerbemonstering en najaarbemonstering. Er lijkt een trend te zijn dat er bij paarverblijven minder eDNA gemeten wordt in de zomer en bij zomerverblijven minder eDNA gemeten wordt in het najaar. De gemiddeld laagste concentratie werd gemeten bij paarverblijven die in de zomer bemonsterd zijn. De variatie in eDNA concentratie tussen verblijfplaatsen was echter groot en de steekproef te klein om een statistisch significant effect aan te tonen.



Figuur 9. Gemeten eDNA concentraties in de zomer en het najaar bij zomerverblijven en paarverblijven waar protocolonderzoek 1-2 dieren per verblijfplaats vaststelde. Let op dat de y-as logaritmisch oploopt.

3.6 Bepalen van soorten, grootte en functies op basis van keutelonderzoek

Bepalen van grootte en functie van verblijfplaatsen

Met protocolonderzoek werd slechts op één locatie (Doorn_6) de aanwezigheid van een kraamverblijf vastgesteld in het basisonderzoek. Bij deze woning werden <10 keutels gevonden. Bij andere woningen in hetzelfde rijtje werden wel grote aantallen keutels (>100) gevonden. Bij Doorn_2 was op moment van onderzoek daadwerkelijk een kraamgroep gewone dwergvleermuizen aanwezig, zodat voor de beoordeling van het type verblijfplaats de hoeveelheden uitwerpselen alleen een ondersteunende rol speelden.

In het basisonderzoek werd op 16 locaties een kleine verblijfplaats vastgesteld. Bij 12 van deze locaties werden minder dan 100 keutels gevonden, bij 3 locaties meer dan 100, en bij 1 locatie werden geen keutels gevonden.

Identificeren van soorten

In veel gevallen was het praktisch niet mogelijk om keutels te verzamelen. Op 17 locaties zijn echter keutels verzameld. Op 12 keutels werd succesvol een DNA barcoding analyse uitgevoerd. Bij 5 keutels was het niet mogelijk om met DNA barcoding de identiteit te bepalen omdat de analyse resulteerde in een zogenaamd “dubbel signaal”. Bij 8 van de 12 keutels werd de soort correct bepaald op basis van uiterlijk (zie tabel 8).

Tabel 8. Overzicht van de verschillen en overeenkomsten tussen de identificatie van keutels op basis van uiterlijk, uitkomst van de DNA analyse.

		DNA barcoding analyse			
		Gewone dwergvleermuis	Laatvlieger	Meervleermuis	Ruige dwergvleermuis
Uiterlijk	Gewone dwergvleermuis	6	0	0	1
	Laatvlieger	1	1	0	0
	Meervleermuis	0	0	0	0
	Ruige dwergvleermuis	1	0	1	1

3.7 Praktijkonderzoek in Appingedam

Het volledige overzicht van de resultaten van de praktijktest bij Appingedam is opgenomen in bijlage 10. Bij de praktijktest in Appingedam werd met de sponsmethode één verblijfplaats aangetoond. Deze verblijfplaats bevond zich in het appartement complex. In geen van de rijtjeswoningen werd eDNA aangetoond met de sponsmethode. Bij de verblijfplaats is een hoge concentratie eDNA gemeten (96317 moleculen per mL template). Opvallend is dat in de woningen rondom de waarschijnlijke verblijfplaats ook lage concentraties eDNA gemeten werd in de sponsmonsters (5-46 moleculen per mL template). In stof- en luchtmonsters werden alleen zeer lage eDNA concentraties gemeten. Hierop vormde alleen Appingedam_9 een uitzondering, hier scoorde zowel het luchtmonster als het stofmonster hoog (12/12 qPCR replica's positief) terwijl het sponsmonster negatief scoorde.

3.8 Aantonen van soorten door middel van eDNA onderzoek

Er is eDNA aangetoond van 5 soorten vleermuizen: gewone dwergvleermuis, ruige dwergvleermuis, laatvlieger, tweekleurige vleermuis en rosse vleermuis.

Gewone dwergvleermuis

Van de 23 verblijfplaatsen die gevonden werden met protocolonderzoek werden er 20 ook aangetoond met de eDNA sponsmethode. Daarnaast werd gewone dwergvleermuis ook gedetecteerd op 5 locaties waar protocolonderzoek alleen laatvlieger vaststelde, en op één locatie waar protocolonderzoek alleen ruige dwergvleermuis vaststelde. Daarnaast is gewone dwergvleermuis ook vastgesteld op 19 locaties waar protocolonderzoek geen verblijfplaatsen vond.

Ruige dwergvleermuis

Met protocolonderzoek werd slechts op één locatie een verblijfplaats (paarverblijf) van ruige dwergvleermuis aangetoond. Op deze locatie werd ook eDNA van ruige dwergvleermuis aangetoond. Daarnaast werd eDNA van ruige dwergvleermuis aangetroffen in 12 sponsmonsters, op locaties waar protocolonderzoek geen ruige dwergvleermuis aantoonde.

Laatvlieger

Met protocolonderzoek werden één kraamkolonie en vijf zomerverblijfplaatsen van laatvlieger vastgesteld. Met de sponsmethode werd eDNA gedetecteerd bij de kraamkolonie en één zomerverblijfplaats. Bij de overige vier zomerverblijfplaatsen werd geen eDNA van laatvlieger gedetecteerd. Bij één van de vier zomerverblijfplaatsen werd wel eDNA van tweekleurige vleermuis gedetecteerd. Bij de twee van de drie verblijfplaatsen waar laatvlieger niet gedetecteerd werd is wel eDNA van gewone en/of ruige dwergvleermuis gedetecteerd, maar niet van laatvlieger. Verder werd op één locatie waar protocolonderzoek geen laatvlieger aangetroffen heeft, wel eDNA van laatvlieger gevonden.

Tweekleurige vleermuis

Met protocolonderzoek en keutelonderzoek werd geen tweekleurige vleermuis vastgesteld. Wel werd tweekleurige vleermuis aangetoond in één eDNA monster, op een locatie waar protocolonderzoek laatvlieger aantoonde.

Rosse vleermuis

Met protocolonderzoek werd op geen enkele locatie rosse vleermuis vastgesteld. Op één locatie (appartementencomplex in Leerdam) werd eDNA van rosse vleermuis gedetecteerd in de sponsmonsters. Aanvullend werden vier bekende kraamverblijven en één paarverblijfplaats van rosse vleermuis bemonsterd met eDNA. Bij al deze verblijfplaatsen werd eDNA van rosse vleermuis gedetecteerd. Deze locaties werden echter niet onderzocht met keutelonderzoek.

Overige soorten

Soorten die hierboven niet behandeld worden zijn niet gedetecteerd in deze studie. Soorten waarvan verblijfplaatsen te verwachten zijn in panden zijn meervleermuis, laatvlieger, gewone grootoorvleermuis, grijze grootoorvleermuis, baardvleermuis, Brandt's vleermuis, watervleermuis, bosvleermuis en kleine dwergvleermuis.

4. Discussie

4.1 Detectielimiet sponsmethode

De grenswaardes (detectielimiet) van de sponsmethode is in deze studie afgesteld op minimaal 11/12 positieve replica's en een maximale ct-waarde van 40. Uit deze studie blijken op de controle locaties lage concentraties eDNA aanwezig te zijn (van gewone dwergvleermuis, rosse vleermuis en ruige dwergvleermuis). Dit eDNA is waarschijnlijk afkomstig van langsvliegende dieren. Bij gevoeligere detectie zouden dus verblijfplaatsen vastgesteld worden op locaties waar geen verblijfplaats aanwezig kunnen zijn. De kans op aanwezigheid van lage concentraties eDNA aan de buitenzijden van panden maakt het belangrijk dat gericht alleen potentiële invliegopeningen bemonsterd worden met de sponsmethode. Bij bemonstering van grote oppervlaktes buitenmuur is te verwachten dat de hoeveelheid eDNA boven de grenswaarde uit komt, wat kan leiden tot een vals positieve detectie.

In deze studie bleken alle locaties waar verblijfplaatsen aanwezig zijn en een ct-waarde van 40 of lager hadden 11 of 12 van de 12 positieve qPCR replica's te geven. Bij toepassing van de eDNA methodiek in de periode dat vleermuizen actief zijn is het niet zinvol om de qPCR met 12 qPCR replica's uit te voeren. In de zomerperiode is het voldoende om de qPCR-analyse met 2 qPCR replica's per monster uit te voeren en de analyse te herhalen als slechts 1 van de 2 qPCR replica's positief resultaat geven.

Er is nader onderzoek nodig om te bepalen of in de winterrustperiode (november tot en met maart) een aangepaste drempelwaarde gehanteerd moet worden. Mogelijk zijn de eDNA concentraties rond verblijfplaatsen in deze periode lager als gevolg van de verminderde activiteit. Ook is de verwachting dat de hoeveelheid achtergrond DNA (afkomstig van foeragerende dieren) lager is in de winter. Mogelijk is daarom een gevoeligere afstelling in de winterperiode noodzakelijk om afwezigheid van vleermuizen betrouwbaar vast te kunnen stellen. Gelet op betrekkelijk recente waarnemingen van activiteit in de winter en onder andere rond grote winterverblijfplaatsen van gewone dwergvleermuizen is bij zulke verblijfplaatsen echter juist een veel hogere concentratie DNA te verwachten in de winter.

4.2 Vergelijking eDNA methodes

Er zijn drie eDNA methodes getest voor het vaststellen van aan- of afwezigheid van verblijfplaatsen van vleermuizen en vergeleken met de huidige standaard, protocolonderzoek. In lucht en stofmonsters die verzameld zijn op de bodem van de spouw is eDNA aangetroffen bij respectievelijk $\pm 33\%$ en $\pm 17\%$ van de verblijfplaatsen die met protocolonderzoek vastgesteld zijn. Er worden dus veel verblijfplaatsen gemist met deze methodes. Om deze reden zijn deze methodes zoals uitgevoerd in dit onderzoek ongeschikt voor het vaststellen van afwezigheid van verblijfplaatsen van vleermuizen.

In figuur 6 is te zien dat als de twee methodes (stof en lucht) met elkaar vergeleken worden, ze ook niet consequent verblijfplaatsen op dezelfde locaties vinden, maar dat ze elkaar tegenspreken. Wellicht dat de interne spouw structuur en isolatie hier een rol in speelt. Zo is het moeilijk te controleren of de spouw onder in een open verbinding heeft met de spouw bovenin waar de

invliegopeningen zich bevinden en de dieren zich waarschijnlijk ophouden. Het kan waardevol zijn om deze methodes uitgebreider te testen in situaties waarbij bekend is waar verblijfplaatsen zich bevinden en lucht zich kan verplaatsen. Hiermee zijn de methoden mogelijk te valideren, om zo te komen tot een protocol wat consequenter verblijfplaatsen kan aantonen. Hierbij kan gedacht worden aan hoe de lucht uit de spouwmuren worden gezogen (bijvoorbeeld met welke kracht en tijdsduur). In deze studie zijn de stof- en luchtmonsters uit praktische overwegingen onderin de spouw verzameld. Vleermuizen daarentegen houden zich voornamelijk boven in de spouw, of in het dak op. Mogelijk geven deze methoden betere resultaten als de bemonstering boven in de spouw of onder het dak plaats zou vinden.

Op 5 van de 37 locaties van fase 1 werd eDNA in de sponsmonsters gevonden terwijl protocolonderzoek geen verblijfplaats aantoonde en er ook geen keutels gevonden werden. Dit zouden vals positieve detecties kunnen betreffen, al valt niet uit te sluiten dat het keutel- en protocolonderzoek op deze locaties vals negatief zijn. Uit deze vergelijking tussen eDNA spons, lucht- en stofmethode komt de sponsmethode als methode naar voren waarmee de meeste verblijfplaatsen gevonden worden en het optreden van vals positief resultaat beperkt lijkt. De sponsmethode is om deze reden in de 2^e fase van het project ingezet om data te verzamelen in de paarperiode.

4.3 Toetsen of totale afwezigheid van vleermuizen vastgesteld kan worden met eDNA- of keutelonderzoek

eDNA sponsmethode

Om betrouwbaar de afwezigheid van vleermuizen aan te kunnen tonen, moet een methode toegepast worden waarmee de kans groot is dat een verblijfplaats aangetoond wordt, als deze aanwezig is. De tot nu toe gebruikelijke methode, beschreven in het Vleermuisprotocol, is te zien als 'de standaard', hoewel aannemelijk is dat hiermee niet alle verblijfplaatsen van vleermuizen worden gevonden. Met gebruik van de eDNA sponsmethode werd 86% van de verblijfplaatsen vastgesteld die gevonden zijn met protocolonderzoek, en werden op 22 plaatsen verblijfplaatsen vastgesteld die bij het protocolonderzoek niet waren gevonden. Op 12 locaties wijst de vondst van keutel ook op de aanwezigheid van een verblijfplaats. In situaties waar alleen eDNA gedetecteerd werd speelt de vraag wat 'de waarheid' is. Zijn de extra verblijfplaatsen die met sponsmonsters gevonden zijn daadwerkelijk verblijfplaatsen, of is deze methode dusdanig gevoelig dat er vleermuisactiviteit gemeten wordt terwijl er geen verblijfplaats aanwezig is? Hierbij is bijvoorbeeld te denken aan een foeragerend dier of urine wat bij potentiële uitvliegopeningen terecht is gekomen. Gesteld kan worden dat dit verschil tussen de eDNA sponsmethode en het protocolonderzoek in het voordeel is van de sponsmethode als het gaat om bescherming van de vleermuizen.

Een deel van de positieve waarnemingen met de eDNA sponsmethode en het keutelonderzoek zijn niet te relateren aan aanwezigheid van vleermuizen op het moment van het onderzoek, hetgeen met protocolonderzoek wel het geval is. Daar staat tegenover dat het protocolonderzoek alleen informatie geeft over aanwezigheid van (actieve) vleermuizen op de momenten van het

onderzoek, terwijl onderzoek op basis van eDNA en keutels informatie geeft over aanwezigheid van vleermuizen in de periode van weken of maanden voorafgaande aan het onderzoek.

Vooralsnog is niet met zekerheid te stellen hoelang eDNA detecteerbaar blijft. Deze studie is uitgevoerd in de periode dat vleermuizen actief zijn. Ten aanzien van het aantonen van volledige afwezigheid van verblijfplaatsen blijkt de sponsmethode dus een betrouwbare methode te zijn wanneer deze toegepast wordt in de periode dat vleermuizen actief zijn. De datum dat de eerste vleermuizen terugkeren bij kraamverblijven varieert tussen van 15 februari tot begin april. Uit de resultaten van dit onderzoek blijkt dat de eDNA methode eind september nog betrouwbare resultaten geeft. De methode is daarom dus zeker tussen 1 mei tot 15 oktober betrouwbaar in te zetten.

Keutelonderzoek

Uit dit onderzoek blijkt dat bij 16/17 locaties (94%) waar protocolonderzoek aanwezigheid van vleermuizen vastgesteld heeft in 2023 of 2024, ook met behulp van keutelonderzoek in 2024 de aanwezigheid aangetoond werd. Bovendien werd met keutelonderzoek de aanwezigheid van een verblijfplaats vastgesteld bij 17 van de 43 (40%) locaties waar geen vleermuizen vastgesteld werden met protocolonderzoek. Op basis hiervan kan geconcludeerd worden dat keutelonderzoek minstens net zo geschikt is om afwezigheid van vleermuizen te bepalen als protocolonderzoek. Er zijn geen signalen dat vleermuiskeutels binnen een jaar afbreken. Deze methode kan dus jaarrond ingezet worden.

Gedrag van vleermuizen

Vleermuizen maken meestal gebruik van meerdere openingen om een pand binnen te komen. Bij het uitgevoerde onderzoek werden de meeste keutels vrij dicht bij deze openingen gevonden. Echter zijn er ook verblijfplaatsen bekend waar dieren zich meters verplaatsen. Het is voorstelbaar en aannemelijk dat vleermuizen bij een kopgevel naar binnen gaan, en doorkruipen naar een tussenwoning. Als er bij deze tussenwoning geen (als zodanig herkenbare) invliegopeningen aanwezig zijn, dan kan een negatieve eDNA uitslag verkregen worden, terwijl de spouw van deze tussenwoning wel gebruikt wordt door vleermuizen. Bij het enige kraamverblijf in de dataset (Doorn), blijkt uit het keutelonderzoek dat de kraamgroep het hele woonblok gebruikt (Doorn_1 tot Doorn_11). Hier zijn echter in alle woningen uitvliegopeningen aanwezig die toegang bieden tot de spouw. Bij alle woningen werd er eDNA aangetroffen bij de uitvliegopeningen, met uitzondering van één woning (Doorn_5). Mogelijk zijn de uitvliegopeningen van deze woning langere tijd niet gebruikt, en zijn de keutels die gevonden werden in deze woning hier al langere tijd aanwezig. We vermoeden dat dieren bij deze verblijfplaats niet ver kruipen, en gebruik maken van uitvliegopeningen van het pand waar ze zich ophouden, maar op basis van dit onderzoek is dat niet met zekerheid te bepalen.

Andersom werd bij een appartementencomplex in Schijndel (Schijndel_11 tot Schijndel_14) met keutel- en protocolonderzoek aanwezigheid van verblijfplaatsen vastgesteld bij Schijndel_12-14, terwijl met eDNA ook Schijndel_11 een positieve uitslag gaf. Hier gaf juist eDNA dus een vollediger beeld.

4.4 Actuele aan- of afwezigheid

Vaststellen van actuele afwezigheid

Als er in een bepaald seizoen vleermuizen aanwezig zijn, en in hetzelfde seizoen wordt eDNA- of keutelonderzoek uitgevoerd dan is, op basis van de resultaten van het onderhavige onderzoek, aannemelijk dat er ook eDNA wordt gedetecteerd resp. keutels worden gevonden. Dit geeft aan dat als er geen eDNA of keutels gevonden worden, er waarschijnlijk geen vleermuizen aanwezig zijn.

Vaststellen van actuele aanwezigheid

Een groot deel van de waarnemingen met het eDNA- en keutelonderzoek kan niet gerelateerd worden aan actuele aanwezigheid – omdat door middel van protocolonderzoek geen vleermuizen zijn vastgesteld in hetzelfde seizoen. Deels is dit te verklaren doordat vleermuizen gebruik maken van de locatie in een andere periode van het jaar. Zo werd er bij 3 van de 15 locaties waar eDNA gedetecteerd werd, maar in hetzelfde seizoen geen verblijfplaats vastgesteld werd met protocolonderzoek, in een ander seizoen wel de aanwezigheid van een verblijfplaats vastgesteld met protocolonderzoek. Op deze locaties is het aannemelijk dat eDNA gedetecteerd werd dat daar al langer aanwezig was. Dit betekent dat als de eDNA sponsmethode of een keutelonderzoek een positieve uitslag geeft, niet vastgesteld kan worden of vleermuizen op moment van bemonsteren aanwezig zijn, of op een moment in het verleden.

In theorie kunnen ook vals positieve waarnemingen optreden, waardoor, als er eDNA of keutels gevonden worden, niet met 100% zekerheid gesteld kan worden dat er daadwerkelijk vleermuizen aanwezig zijn. Om inzicht te krijgen in de mate waarin vals positieve waarnemingen optreden is in dit onderzoek op 16 controle locaties de concentratie van achtergrond DNA vastgesteld dat bijvoorbeeld afkomstig is van langsvliegende dieren. Op basis van deze locaties is de detectielimiet (grenswaardes) bepaald. Het aantal van 16 controle locaties is een betrekkelijk kleine steekproef en we kunnen dus niet uitsluiten dat er geen vals positieve waarnemingen optreden. Ook kunnen keutels van muizen aangezien worden voor vleermuiskeutels. Dit laatste kan voorkomen worden door een DNA-analyse uit te voeren op de keutels, mits het mogelijk is om keutels te verzamelen.

Uit dit onderzoek blijkt dat de kans minimaal 79% is dat als er eDNA gedetecteerd wordt, er daadwerkelijk een verblijfplaats aanwezig is. Dit percentage ligt waarschijnlijk hoger omdat het aannemelijk is dat eDNA onderzoek meer verblijfplaatsen vindt dan protocolonderzoek. Bij 4 van de 10 locaties waar de sponsmonsters positief resultaat gaven, maar protocol- en keutelonderzoek negatief resultaat, kon geen, of geen volledige inspectie op keutels uitgevoerd worden omdat de hoogwerker niet dichtbij genoeg gereden kon worden. Daardoor kon slechts deels, of geheel niet geïnspecteerd worden. Het is mogelijk dat het keutelonderzoek hierdoor vals negatief resultaat gegeven heeft. Ook is het van belang te benoemen dat veel locaties in deze studie geselecteerd zijn omdat op basis van gebouwkenmerken en reeds uitgevoerd protocolonderzoek de kans groot geacht werd dat er vleermuizen aanwezig zijn. Op basis van de resultaten van het basisonderzoek kan vastgesteld worden dat het aandeel vals positieve waarnemingen (ten opzichte van het totaal aantal locatie) maximaal 21% bedraagt (in 21% van gevallen is er wel eDNA gedetecteerd, maar zijn er met protocolonderzoek en keutelonderzoek geen verblijfplaatsen gevonden). In de praktijkstudie in Appingedam (waar locaties niet voorgeselecteerd werden op basis van hoge potentie voor vleermuizen) werd slechts bij 1 van de 34 locaties eDNA aangetroffen in de sponsmonsters. Als dit een vals positieve waarneming betreft was het percentage vals positieven

in deze praktijkstudie maximaal 3%. Echter geldt dat we de realiteit niet kennen, en dat op basis van de huidige data niet vastgesteld kan worden hoe vaak vals positieve waarnemingen daadwerkelijk optreden. De aanwezigheid van eDNA moet dus vooralsnog gezien worden als een goede indicatie dat er een verblijfplaats aanwezig is.

Intensievere monitoring op mogelijke vals positieve locaties zou meer inzicht in kunnen geven of er sprake is van vals positieve detecties met de eDNA sponsmethode, of dat de andere methodes vals negatief resultaat gegeven hebben. Dit zou bijvoorbeeld kunnen met behulp van een jaarronde inzet van een combinatie van camera's en geluidrecorders.

4.5 Toetsen of aanwezigheid van vleermuisverblijfplaatsen is aan te tonen op locaties waar eerder (tot een jaar daarvoor) vleermuizen zijn vastgesteld

Met eDNA zijn in 2024 53% meer locaties (10 locaties) gevonden dan met protocolonderzoek in 2023. Bij 16 van de 17 (94%) locaties waar protocolonderzoek vleermuizen aantoonde, is aanwezigheid van vleermuizen vastgesteld met eDNA. Ook met keutelonderzoek werden keutels gevonden bij 7/9 (78%) locaties waar protocolonderzoek een negatieve uitslag gaf. Er is in 2024 geen protocolonderzoek uitgevoerd bij deze locaties. Het is daarom onbekend of de vleermuizen nog steeds aanwezig waren op deze locaties. Ook is onbekend of de extra locaties die gevonden werden met het keutel- en eDNA onderzoek sindsdien gekoloniseerd zijn, of dat deze locaties gemist zijn met protocolonderzoek. Deze informatie is derhalve niet bruikbaar om aan te tonen dat met deze methoden de aan- of afwezigheid van vleermuizen tot een jaar daarvoor kan worden vastgesteld. Wel tonen de resultaten de robuustheid van de eDNA methode aan. Ondanks dat het eDNA onderzoek op deze locaties een jaar na protocolonderzoek uitgevoerd is, worden nog steeds vrijwel alle verblijfplaatsen aangetoond.

Bij een sponsbemonstering in juni 2024 werd geen eDNA gevonden bij Posterholt_2. Hier werd een zomerverblijfplaats en mogelijke paarverblijfplaats van laatvlieger vastgesteld in 2023. Mogelijk is het eDNA in de tussenliggende periode afgebroken en was deze verblijfplaats in 2024 niet in gebruik. Het is echter ook mogelijk dat de verblijfplaats ook in 2024 in gebruik was, en deze verblijfplaats niet gedetecteerd is als gevolg van een andere nog onbekende reden.

4.6 Verkennen of er signalen van afbraak zichtbaar zijn in de eDNA data

2 van de 5 zomerverblijfplaatsen die de zomer 2024 aangetoond werden zijn in het najaar 2024 negatief gescoord met de eDNA sponsmethode (Sint-Oedenrode_4 & Schijndel_2). Mogelijk is het eDNA op deze locaties in een aantal maanden tijd te ver afgebroken. Wel werden op alle 5 locaties keutels gevonden. Dit zou erop kunnen duiden dat eDNA sneller afbreekt dan keutels. Het aantal locaties is echter te klein om daar betrouwbare uitspraken over te kunnen doen.

Om een beeld te krijgen in hoeverre afbraak van eDNA een rol kan spelen bij het missen van verblijfplaatsen is geanalyseerd hoeveel eDNA er in de zomer en het najaar gemeten wordt bij zomer- en paarverblijven. Er is niet voldoende data beschikbaar om een significant effect aan te tonen, maar de hoeveelheid eDNA bij zomerverblijfplaatsen lijkt hoger te zijn in de zomer, dan in het najaar. En andersom, lijkt de eDNA concentratie bij paarverblijven hoger te zijn in het najaar,

dan in de zomer. Dit is een indicatie dat in enkele maanden tijd de eDNA concentratie meetbaar afneemt. Desalniettemin werden er met eDNA structureel meer verblijfplaatsen gevonden dan met protocolonderzoek. De eDNA sponsmethode vond statistisch significant meer verblijfplaatsen dan protocolonderzoek, en is dus betrouwbaar genoeg om toegepast te worden in de periode dat vleermuizen actief zijn.

Van Bochove *et al.* 2024 toonden aan dat eDNA van meervleermuis, gewone dwergvleermuis, ruige dwergvleermuis en laatvlieger gedetecteerd kan worden in december. Echter werden in dat onderzoek slechts 8 sponsmonsters verzameld, hetgeen een te kleine dataset is om betrouwbare uitspraken te doen over de inzetbaarheid van de methode in de winterperiode. Er is daarom meer onderzoek nodig om inzicht te krijgen in de betrouwbaarheid van de eDNA methode in de winterperiode.

4.7 Soortsamenstelling vaststellen op basis van eDNA onderzoek

De afwezigheid van vleermuizen in het algemeen kan zeer betrouwbaar vastgesteld worden, zoals toegelicht in paragraaf 4.3. Zelfs als bepaalde soorten gemist werden, zijn er wel andere soorten gedetecteerd. Het is echter nog onduidelijk in hoeverre de soortsamenstelling betrouwbaar vastgesteld kan worden op basis van eDNA onderzoek.

Voor gewone dwergvleermuis en ruige dwergvleermuis is in het huidige onderzoek aangetoond dat aan- en afwezigheid vastgesteld kan worden in de periode dat vleermuizen actief zijn. Wat opvalt is dat ruige dwergvleermuis op 13 locaties vastgesteld werd met eDNA, terwijl protocolonderzoek slechts op één locatie ruige dwergvleermuizen vaststelde. Mogelijk worden snel uitvliegende dwergvleermuizen aangezien voor gewone dwergvleermuis, terwijl het in werkelijkheid om ruige dwergvleermuis gaat. Het zou ook kunnen dat het eDNA van ruige dwergvleermuizen afkomstig is van trekkende individuen die slechts kort van de verblijfplaats gebruik maken, en daardoor gemist zijn met protocolonderzoek.

Op 6 locaties werd laatvlieger vastgesteld door middel van protocolonderzoek. Van deze locaties werd op 2 locaties eDNA van laatvlieger aangetoond, waaronder de locatie met de enige kraamverblijfplaats van laatvlieger in de dataset. Daarnaast werd één verblijfplaats met eDNA aangetoond, die met protocolonderzoek niet vastgesteld werd. Het is mogelijk dat bij het protocolonderzoek andere soorten aangezien zijn voor laatvlieger. In 3 van de 4 gevallen waar laatvlieger niet gedetecteerd werd met eDNA werd wel eDNA van andere vleermuissoorten gedetecteerd. Van de 4 locaties waar laatvlieger niet gedetecteerd werd, werd op 1 locatie (Schijndel_3) eDNA van tweekleurige vleermuis gedetecteerd. Dit wijst erop dat in het protocolonderzoek tweekleurige vleermuis aangezien is voor laatvlieger. Bij toepassen van een qPCR test waarbij alleen gekeken wordt naar aan/afwezigheid van vleermuizen in het algemeen zou dus 1 van de 6 locaties met laatvlieger vleermuisvrij verklaard zijn, terwijl er een zomerverblijf van laatvlieger aanwezig was.

Bij de verblijfplaatsen van laatvlieger (Sint Odiliënberg_2, Echt_5 en Schijndel_2) waar geen eDNA van laatvlieger gedetecteerd is, zijn de uitvliegopeningen die gebruikt worden wel bemonsterd. Het is dus niet zo dat laatvlieger gemist is omdat de gebruikte uitvliegopeningen niet bemonsterd

zijn. De eDNA bemonstering heeft 2-12 maanden plaats gevonden na het vaststellen van een verblijfplaats door middel van protocolonderzoek. Mogelijk dat het eDNA in de tussenliggende tijd afgebroken is. Van laatvlieger is echter ook bekend dat deze soort maar heel kort zwermt bij zomerverblijfplaatsen. Ook verhuizen dieren van deze soort vaak. Mogelijk bouwt er daarom minder eDNA op in de uitvliegopeningen. Er is aanvullend onderzoek nodig om hier meer duiding aan te geven.

Evident is dat eDNA onderzoek en keutelonderzoek waardevolle aanvullingen vormen met betrekking tot het vaststellen van vleermuissoorten die gebruik maken van een pand. Vooral nog is er te weinig data beschikbaar om uitspraken te doen over de betrouwbaarheid van eDNA sponsten aanzien van de soorten waarvan verblijfplaatsen aanwezig kunnen zijn.

Er zijn verschillen bekend over het in- en uitvlieggedrag van soorten vleermuizen. Het huidige protocol van de sponsbemonstering richt zich op het bemonsteren van uitvliegopeningen in de gevel en bij kantpannen. Van onder andere meervleermuis en tweekleurige vleermuis is bekend dat deze ook kunnen in- en uitvliegen vanuit kieren tussen dakpannen. Het is nog onbekend of deze dieren vanaf het invliegplaats doorkruipen naar de spouw. In het huidige protocol wordt bewust niet boven op het dak bemonsterd, omdat de verwachting is dat daar veel eDNA aanwezig is van foeragerende vleermuizen, wat tot vals positief resultaat kan leiden. Het is nog onbekend of dergelijke verblijfplaatsen onopgemerkt blijven met het huidige bemonsteringsprotocol. Dus hoewel Datura in eerdere (niet gepubliceerde experimenten) vastgesteld heeft dat de toegepaste laboratoriummethode alle vleermuissoorten kan detecteren, is er wel nader onderzoek nodig om vast te stellen of het huidige monsterprotocol effectief is in het bemonsteren van alle vleermuissoorten.

4.8 Bepalen van functie en grootte van verblijfplaatsen doormiddel van keutelonderzoek

Vaststellen van functie

In theorie kan op basis van keutelonderzoek alleen de grootte bepaald worden van een verblijfplaats, en niet de functie. Immers, er kan ook sprake zijn van een klein kraamverblijf van enkele individuen. Echter dient opgemerkt te worden dat dit ook geldt voor protocolonderzoek. Over het algemeen wordt verondersteld dat er bij een grote groep vleermuizen die gevonden wordt in de zomer, er sprake is van een kraamgroep. Echter kunnen ook grotere groepen vleermuizen uit mannetjes bestaan, en andersom, een kraamgroep kan bestaan uit enkele individuen. Met een inspectie in de juiste periode van het jaar kan een functie bepaald worden (bijvoorbeeld waarnemen van jongen in de kraamperiode). Gericht inspecteren van verblijfplaatsen om jongen vast te stellen zou echter kunnen leiden tot verstoring en achten we daarom niet wenselijk. Tenslotte kan soms ook met camera's vastgesteld worden of er jonge of zogende dieren tussen de uitvliegers aanwezig zijn.

Vaststellen van verblijfplaats grootte

Ondanks flinke aanvullende inspanningen om meer dan één kraamverblijf en ook (zogenaamde massa-) winterverblijfplaatsen bij het onderzoek te betrekken is het niet gelukt hiervoor medewerking te krijgen. Uitgangspunt in deze studie was dat er protocolonderzoek uitgevoerd moest worden op de onderzoek locaties. In de praktijk worden er echter weinig kraam- en

massawinterverblijven gevonden bij protocolonderzoek. De meeste recent gevonden grote verblijfplaatsen zijn vastgesteld door middel van SMP- of zenderonderzoek. Als gevolg daarvan is er slechts op één locatie met kraamverblijfplaatsen keutelonderzoek uitgevoerd. Er is derhalve onvoldoende informatie om binnen dit onderzoek om een goede indruk te krijgen van (kenmerken van) kraam- en winterverblijfplaatsen. Op basis van de verzamelde informatie is hier zodoende geen goede beschrijving of definitie van te geven.

Bij 12/16 locaties met een kleine verblijfplaats (<4 dieren) werden minder dan 100 keutels aangetroffen. Bij 3 locaties met een kleine verblijfplaats en bij de enige locaties met een kraamverblijf (Doorn) werden 100-500 keutels aangetroffen per woning. Bij een studie in Dokkum (Twisk, 2024) werden ook meer dan 100 keutels aangetroffen bij een kraamverblijf van meervleermuis. Echter wordt een dergelijk aantal keutels dus ook in 25% van de gevallen met een kleine verblijfplaats aangetroffen. Een zeker onderscheid maken tussen grote en kleine verblijven lijkt op eerste gezicht dus niet mogelijk, maar aanwezigheid van 100 of meer keutels is wel een indicatie dat er een kraamverblijf aanwezig kan zijn.

Opvallend dat is protocolonderzoek de aanwezigheid van een kraamgroep van gewone dwergvleermuis vaststelde bij Doorn_6, terwijl daar minder dan 100 keutels gevonden werden. In andere woningen in hetzelfde rijtje werden echter wel grote aantallen keutels gevonden. Het gehele blok dient dus gezien te worden als kraamverblijfplaats. Dit kan een indicatie zijn dat bij het beoordelen van de grootte van een groep vleermuizen het gehele blok onderzocht dient te worden.

Vaststellen van soortsaamenstelling

Op basis van de aanwezige keutels is geprobeerd te bepalen welke soorten aanwezig zijn. Echter bleek een identificatie op basis van het uiterlijk van een keutel niet betrouwbaar te zijn. Daarvoor is een DNA-analyse van de uitwerpselen nu de beste methode.

Bij 5 van de 17 locaties is het niet gelukt om betrouwbaar resultaat te verkrijgen door middel van DNA barcoding bijvoorbeeld als gevolg van contaminatie met menselijk DNA. DNA metabarcoding zou bij deze monsters waarschijnlijk wel goed resultaat geven, maar het was niet haalbaar om binnen de beoogde planning nog een metabarcoding analyse op deze monsters uit te voeren.

Toepasbaarheid van keutelonderzoek

In eerdere onderzoeken is ervaren dat het zoeken van keutels bemoeilijkt kan worden door de aanwezigheid van isolatiemateriaal in de spouw (Twisk *et al.* 2024). Deze ervaring werd bevestigd in het huidige onderzoek. Dit maakt dat het inspecteren van de ruimte onder dakpannen van belang is. Deze ruimte is overzichtelijker dan een spouw waarin isolatie aanwezig is en kan daardoor gemakkelijker geïnspecteerd worden. Ondanks dat het huidige onderzoek zich met name richtte op het vaststellen van vleermuizen in de spouw, bleek het controleren van het dak grote meerwaarde te hebben om aanwezigheid van vleermuizen aan te tonen. In sommige gevallen werden alleen keutels gevonden tussen het dakbeschoot en de pannen, ondanks aanwezigheid van een open verbinding naar de spouw. In het belang van vleermuisbescherming gaan wij er daarom vanuit dat vleermuizen gebruik maken van de spouw, ook al worden alleen keutels in het dak gevonden

5. Multicriteria-analyse

5.1 Aanpak

Er is een Multicriteria-analyse (MCA) uitgevoerd om te beoordelen welke methode van vleermuisonderzoek leidt tot een snelle, betrouwbare, betaalbare en efficiënte manier van het vaststellen van aan- of afwezigheid van vleermuizen in spouwmuren en functies, en landelijk uit te rollen is. De MCA bestaat uit de volgende stappen:

1. Het definiëren van de evaluatiecriteria.
2. Per methode toekennen van de scores aan de diverse evaluatiecriteria.
3. Bereken van een eindscore per methode.

In de MCA zijn alleen protocolonderzoek, eDNA spons methode en keutelonderzoek opgenomen. Vooraf is gesteld dat de betrouwbaarheid ten aanzien van het aantonen van afwezigheid minimaal zo goed dient te zijn als bij protocolonderzoek. Dat is bij de eDNA lucht- en stofmethodes zoals uitgevoerd in deze studie zeker niet het geval. Daarom zijn de eDNA lucht- en stofmethode in deze MCA buiten beschouwing gelaten. We hebben alle factoren even zwaar mee laten wegen. Alle scores zijn berekend op een schaal van 1-10.

Omdat er nog veel onzekerheid is met betrekking tot exacte detectiekans van keutelonderzoek, protocolonderzoek en eDNA sponsmethode zijn deze aspecten niet opgenomen als criterium in de MCA. Ook is er onzekerheid wat de mate van betrouwbaarheid is ten aanzien van het aantonen van vleermuizen (onbekend in welke mate vals positieve waarnemingen optreden). Daarom is besloten om deze criteria niet mee te laten wegen in de MCA. Ook is er te weinig variatie in de dataset aanwezig om voor keutelonderzoek te kunnen bepalen in welke mate de grootte en functie van verblijfplaatsen vastgesteld kan worden. Daarom zijn ook deze criteria nog niet meegenomen in deze analyse.

In de volgende alinea's worden de criteria toegelicht.

Mogelijkheid om grootte en functie vast te stellen

De ideale methode geeft niet alleen inzicht in de aanwezigheid van vleermuizen, maar ook de grootte en functie van verblijfplaatsen.

Inzetbaarheid bij uiteenlopende locaties

De ideale methode kan op alle locaties ingezet worden. Onafhankelijk van de omgeving (aanwezigheid van obstakels in de omgeving kan bereikbaarheid met hoogwerker beperken). Ook kan de methode bij uiteenlopende typen panden ingezet worden, zowel bij grondgebonden woningen als bij hoogbouw. Ook wordt de inzetbaarheid van de methode niet bepaald door eventuele aanwezigheid van isolatie in de spouw.

De inzetbaarheid van de methodes zijn gescoord op een schaal van 1 (nauwelijks inzetbaar) -10 (zeer breed inzetbaar).

Mogelijkheid voor onderzoek binnen kantoortijden

Voor elke methode is bepaald of de methode wel (score van 10) of niet (score van 1) binnen kantoortijden uitgevoerd kan worden.

Aantal locaties per dag

De methode is beter schaalbaar als veel locaties onderzocht kunnen worden op een velddag. Hiervoor is berekend hoeveel locaties per dag van 8 uur onderzocht kunnen worden, gedeeld door de benodigde personele inzet (keutelonderzoek zijn bijvoorbeeld 2 personen nodig). Een score voor deze parameter is berekend door de doorlooptijd in dagen vast te stellen op een schaal van 0-20 locaties per dag.

Bijbehorende berekening voor een score tussen 1-10 is: $[\text{aantal locaties per dag}] / 20 * 10$.

Doorlooptijd onderzoek

De wens is om een snelle methodes te ontwikkelen voor het opsporen van vleermuizen. De doorlooptijd van het onderzoek is daarmee een belangrijke factor die bepaald hoe snel resultaat verkregen kan worden. Een score voor deze parameter is berekend door de doorlooptijd in dagen vast te stellen op een schaal van 0-365 dagen (1 jaar).

Een score van 1-10 is als volgt berekend: $10 - ([\text{doorlooptijd in dagen}] / 365 * 10)$. Een methode met een lange doorlooptijd scoort lager dan een methode met hoge doorlooptijd.

Kosten per locatie

De kosten zijn gebaseerd op onderzoek bij een grondgebonden woningen. De kosten zijn berekend per woonblok bestaande uit 5 woningen. Daarin is niet alleen rekening gehouden met de tijd die het kost om het veldwerk uit te voeren, maar ook de voorbereiding van het veldwerk, dataverwerking, interpretatie, rapportage en bijkomende kosten zoals huur van een hoogwerker. De kosten voor de diverse onderzoeken zullen verschillend zijn per partij, hier is gewerkt met een uurtarief van €100 exclusief BTW.

De kosten per locatie zijn berekend op een schaal van €0-5000 per locatie. De berekening van de score is als volgt: $10 - ([\text{€ per locatie}] / 5000 * 10)$. Een score van 1 is dus zeer duur, een score van 10 zeer kostenefficiënt.

Benodigde expertise en opleiding

De benodigde expertise is ingeschat op een schaal van 1 (veel expertise nodig) -10 (weinig expertise benodigd).

Benodigde kapitale investeringen

Het uitgangspunt dat we genomen hebben is dat er 2,5 miljoen woningen geïsoleerd dienen te worden tot 2030. Dit komt globaal neer op 416.000 per jaar. De benodigde kapitale investeringen in apparatuur die nodig is om op deze schaal te onderzoeken is globaal berekend. De benodigde investeringen zijn uitgezet op een schaal van €0-100 miljoen. De score wordt als volgt berekend: $10 - ([\text{benodigde investering in €}] / €100.000.000 / 10)$.

5.2 Resultaten

Een overzicht van de verkregen scores is weergegeven in tabel 9. Sponsmonsters scoorde gemiddeld het hoogste (7,7), gevolgd door keutelonderzoek (5,6) en protocolonderzoek (3,7). In de volgende alinea's volgt een bondige beschrijving van de bevindingen en onderbouwing van de scores van de diverse criteria.

Tabel 9. Scores ten behoeve van de multicriteria-analyse

Schaalbaarheid en efficiëntie	Protocolonderzoek	Sponsmonsters	Keutelonderzoek
Bepalen grootte en functie verblijfplaatsen	7	1	1
Inzetbaarheid bij uiteenlopende locaties	8	8	6
Het aantal locaties per persoon per dag	0,4	10	2,5
Onderzoek tijdens kantooruren	1	10	10
Doorlooptijd onderzoek	5,1	9,5	9,3
Betaalbaarheid			
Kosten per woonblok (5 woningen)	0,8	6,4	4,4
Implementatie			
Benodigde kapitale investeringen	3	10	9,4
Benodigde expertise en opleiding	2	7	4
Gemiddelde score	3,4	7,7	5,8

Mogelijkheid om grootte en functie vast te stellen

- *Protocolonderzoek*: Deze methode geeft inzicht in aantallen en functie van een verblijfplaats. Daarbij dient opgemerkt te worden dat dit wel een moment opname betreft, hetgeen een vertekenend beeld kan geven. (Score 7)
- *eDNA spons*: Deze methode geeft vooralsnog geen inzicht in aantallen en functie van de verblijfplaats. (Score 1)
- *Keutelonderzoek*: Op basis van keutelonderzoek kan in de basis geen onderscheid gemaakt worden tussen functies van de verblijfplaats. In potentie kan er onderscheid gemaakt worden tussen kleine en grote verblijfplaatsen. Op basis van de huidige dataset is het echter nog niet mogelijk om vast te stellen of dit inderdaad mogelijk is. (Score 1)

Inzetbaarheid bij uiteenlopende locaties

- *Protocolonderzoek*: Protocolonderzoek is breed inzetbaar. Grootste bottleneck vormen vaak achtertuinen, die tijdens de nachtelijke bezoeken meestal niet toegankelijk zijn. Bij hoge flats is het vaak moeilijk om op grotere hoogte vleermuizen waar te nemen en te identificeren. Deze methode wordt niet negatief beïnvloed door aanwezigheid van isolatiemateriaal in de spouw (Score: 8)
- *DNA spons*: De eDNA sponsmethode kan in beginsel toegepast worden op alle panden tot een maximale hoogte van 12 meter (maximale hoogte waarmee voldoende controle over de telescoopstok gehouden kan worden om een bemonstering uit te kunnen voeren). De inzet van de methode bij hogere panden is theoretisch mogelijk, maar in deze studie niet onderzocht. In dergelijke situaties zou gebruik gemaakt kunnen worden van een hoogwerker. De inzet van de methode wordt niet bemoeilijkt door aanwezigheid van isolatiemateriaal in de spouw. (Score 8)

- *Keutelonderzoek*: Voor uitvoeren van keutelonderzoek is vrijwel altijd de inzet van een hoogwerker noodzakelijk. In de meeste situaties kan met behulp van een autohoogwerker (Palfinger P260) gewerkt worden. Voordelen van deze autohoogwerker zijn de eenvoudige bediening, de eenvoud waarmee tussen adressen en onderzoeksgebieden gereden kan worden en de relatief lage kosten. In deze studie bleken echter 8% van de panden niet bereikbaar te zijn met een autohoogwerker. Deze locaties hadden wel onderzocht kunnen worden met een verreiker. Het inzetten van een verreiker is echter duurder, moeilijk te besturen en een verreiker dient vervoert te worden op een oplegger van een vrachtwagen. Daarmee is de afweging om of te accepteren dat niet alle woningen volledig onderzocht kunnen worden, of om een duurdere verreiker in te zetten. In de praktijk is de inzet van een verreiker met name aantrekkelijk als tientallen woningen in één wijk onderzocht dienen te worden. Tenslotte kan de aanwezigheid van isolatie in de spouw de inspecteerbaarheid beïnvloeden. In eerder onderzoek van Twisk (2024) kon echter moeilijk overzicht van de spouw gekregen worden omdat de vleermuizen daar door open ruimtes tussen vlokken van isolatie heen kropen. Deze ervaring werd bevestigd in het huidige onderzoek. Ook kon er in sommige gevallen maar beperkt geïnspecteerd worden als gevolg van de houten betimmering die aanwezig was tegen de muur. Gaten boren in de houten betimmering zou resulteren in permanente schade, hetgeen niet wenselijk is. (Score 6)

Mogelijkheid voor onderzoek binnen kantoor tijden

- *Protocolonderzoek*: Vindt plaats in de avonduren. (Score 1)
- Keutelonderzoek en eDNA bemonsteringen: Wordt uitgevoerd tijdens kantooruren. (Score 10)

Doorlooptijd onderzoek

- *Protocolonderzoek*: Voor een onderzoek volgens vleermuisprotocol dienen minimaal tussen 15 mei en 15 juli 2-3 bezoeken en tussen 15 augustus en 15 oktober 2 bezoeken gebracht te worden. Daarmee is de doorlooptijd minimaal 180 dagen. (Score 5,1)
- *eDNA spons*: De doorlooptijd van eDNA analyse is in deze berekening op 18 dagen gesteld. Voor een eDNA analyse is geen (omvangrijke) voorbereiding nodig, deze kan direct uitgevoerd worden. Een bemonstering & qPCR-analyse (aan-of afwezigheid van eDNA) heeft een doorlooptijd van 2-4 werkdagen. Totale doorlooptijd van bemonstering tot metabarcoding analyse (soortsamenstelling) is circa 18 dagen. (Score 9,5)
- *Keutelonderzoek*: Bij keutelonderzoek moet circa één week van te voren een hoogwerker geregeld worden, maar zijn na het uitvoeren van het veldwerk de resultaten van aan- of afwezigheid direct beschikbaar. Indien gevonden keutels op soort geïdentificeerd worden door DNA barcoding dan komt er nog één week bovenop. Totale doorlooptijd van reserveren hoogwerker tot uitkomst DNA-barcoding analyse is circa 25 dagen. (Score 9,3)

Aantal locaties per dag

- *Protocolonderzoek*: Met protocolonderzoek kunnen 0,75 locaties per persoon per dag onderzocht worden. Protocolonderzoek is daarmee de meest arbeidsintensieve methode. (Score 0,4)
- *eDNA spons*: Deze methode is het meest tijd efficiënt. We gaan in deze MCA uit van gemiddeld 15 woningen per dag. Dit betreft een gemiddelde en gaat er vanuit dat de woningen zich in één wijk bevinden. Indien er sprake is van meer dan 5 minuten reistijd tussen locaties dan kunnen minder woningen onderzocht worden. (Score 7,5)

- *Keutelonderzoek:* Bij keutelonderzoek kunnen 2 personen gemiddeld 5 woningen per dag onderzoeken die binnen één wijk gelegen zijn, dus 2,5 locaties per persoon. (Score 1,25)

Kosten per woonblok van 5 adressen

Protocolonderzoek: We zijn uitgegaan van 5 bezoeken waarbij tijdens elk bezoek alle 5 adressen tegelijk onderzocht kunnen worden. Dit vraagt een tijdsbesteding van 4 uur veldwerk en 2 uur reistijd per bezoek (totaal 30 uur veldonderzoek). Daarnaast rekenen we met 16 uur voor dataverwerking, rapportage, overleg en projectmanagement. Totaal 46 uur * €100,- is €4600,-. (Score 0,8)

eDNA spons: Veldwerk van 5 adressen kost gemiddeld 2,7 uur (€270). De verwachting is dat voor het aantonen van afwezigheid met name qPCR ingezet zal worden (circa €180,- per analyse). In deze berekening zijn we echter uitgegaan van een metabarcoding analyse (circa €300,- per analyse). Daarnaast zijn er verzendkosten monstermaterialen en de genomen monsters (€10,- per monster). Totale kosten voor 5 adressen is €1820,-. (Score: 6,4)

Keutelonderzoek: Bij het berekenen van de prijs van keutelonderzoek is rekening gehouden met de huur van een P260 autohoogwerker (€500,- voor één dag). In de praktijk is soms een duurdere verreiker nodig. We zijn uitgegaan van 16 uur voor het onderzoeken van 5 adressen (€1600,-). Daarnaast is uitgegaan van 5 DNA barcoding analyses om een identificatie te verkrijgen van gevonden keutels (€700,- voor 5 monsters). Totale kosten voor 5 adressen bedragen €2800,-. (Score 4,4).

Benodigde kapitale investeringen

Protocolonderzoek: De kraamperiode beslaat circa 9 weken (45 werkdagen) en in deze periode dienen 3 bezoeken uitgevoerd te worden. Per uitrusting kunnen er dus 15 locaties per jaar onderzocht worden. Om 416.000 woningen per jaar te kunnen onderzoeken zijn er minimaal 27.733 uitrustingen nodig. Uitgaande van de kosten van een uitrusting van €2500,- komt dit neer op een investering van 70 miljoen euro. (Score: 3)

eDNA spons: Bestaande eDNA laboratoria hebben gezamenlijk de capaciteit om >1000 testen per dag uit te voeren. Indien nodig kan met extra investeringen de capaciteit verder vergroot worden. Globaal is een investering van €30.000,- nodig om de capaciteit in het laboratorium met 100 testen per dag te vergroten. Uitgaande dat de methode jaarrond ingezet gaat worden, en er 416.000 woningen per jaar onderzocht worden dan betreft dit maximaal 2000 testen per dag. Er is dan een investering nodig van circa €300.000,- om de laboratoriumcapaciteit op te schalen (Score:10,0)

Keutelonderzoek: Om keutelonderzoek op grote schaal uit te voeren dient er een behoorlijk investering gedaan worden in hoogwerkers. Met een investering in een hoogwerker á €80.000,- kunnen 5 locaties per dag onderzocht worden. Uitgaande dat gemiddeld 20% van de eDNA testen positief zijn, en elke positieve eDNA test opgevolgd wordt met keutelonderzoek dan dienen er 400 locaties per dag te worden onderzocht. Er moeten dan continu 80 hoogwerkers ingezet worden. Dat vraagt een investering van ruim 6 miljoen euro (Score: 9,4).

Benodigde expertise

Protocolonderzoek: Er is veel expertise nodig voor het uitvoeren van protocolonderzoek. De onderzoeker dient ruime ervaring te hebben met het herkennen van gedrag van vleermuizen en het werken met een bat-detector. Er is dan ook een uitgebreide opleiding nodig voordat kwalitatief betrouwbaar veldwerk uitgevoerd kan worden volgens het vleermuisprotocol. (Score 2)

eDNA onderzoek: De monsters kunnen genomen worden volgens een gestandaardiseerd protocol. Voor het verzamelen van sponsmonsters is echter wel expertise nodig. De sponsmonsters worden

verzameld door met de spons te vegen langs potentiële invliegopeningen. De monsternemer dient daarom opgeleid te worden in het herkennen van potentiële uitvliegopeningen. Wel kan een overzicht van mogelijke invliegopeningen vastgelegd worden in een checklist die de monsternemer kan afwerken waarmee de kans verkleind kan worden dat er invliegopeningen over het hoofd gezien worden. (Score: 7)

Keutelonderzoek: Ook voor keutelonderzoek is behoorlijk veel expertise nodig. Keutels van vleermuizen zijn lastig te herkennen. Vaak blijken vermeende vleermuiskeutels afkomstig te zijn van huisspitsmuis. Ook het identificeren van vleermuizenkeutels tot op soort is voor experts zeer moeilijk, zo niet onmogelijk. Daarnaast moet de onderzoeker veel kennis hebben waar vleermuizen zich ophouden zodat op de juiste plekken gezocht wordt naar sporen. Tenslotte is ook het inschatten van grootte en functie van de verblijfplaats lastig en dient te gebeuren aan de hand van een combinatie van kenmerken als de hoeveelheid keutels, de mate waarin de keutels geconcentreerd aanwezig zijn op bepaalde plekken en de aanwezigheid van vetvlekken. Al met al is behoorlijk veel expertise nodig om de soort, functie en grootte van verblijfplaats accuraat te bepalen. (Score: 4)

5.3 Samenvatting resultaten MCA

De eDNA spons methode komt uit de MCA als beste naar voren met een score van 7,7. De kosten van onderzoek met eDNA sponsmonsters is laag en de methode is zeer schaalbaar. Het keutelonderzoek scoorde met 5,6 lager, met name als gevolg van het feit dat deze methode arbeidsintensief is, een dure hoogwerker nodig is en expertise nodig is om de aanwezige sporen te vinden en goed te interpreteren. Protocolonderzoek scoorde met 3,7 punten het laagst. Protocolonderzoek is duur, arbeidsintensief en het lijkt niet haalbaar om deze methode op grote schaal te implementeren. Van de onderzochte methodes is protocolonderzoek echter de enige methode waarmee (gegeven de huidige stand van de techniek) uitspraken gedaan kunnen worden over de grootte en functie van verblijfplaatsen.

6. Conclusies

6.1 Beantwoorden onderzoeksvragen

1. *Hoe effectief, betrouwbaar, praktisch toepasbaar en betaalbaar zijn eDNA onderzoek en keutelonderzoek om volledige afwezigheid van vleermuizen in spouwmuren van gebouwen vast te stellen?*

Met qPCR-analyse van de eDNA sponsmethode worden 62% meer locaties positief gescoord dan met protocolonderzoek. Deze eDNA sponsmethode is dus in vergelijking tot protocolonderzoek geschikt om, op een voor de vleermuizen veilige manier, afwezigheid van vleermuizen en verblijfplaatsen van vleermuizen vast te stellen in de periode dat vleermuizen actief zijn. De eDNA methode is minimaal in te zetten in de periode van 1 mei tot 15 oktober omdat vleermuizen tussen februari en begin april terugkeren bij kraamverblijven, en in dit onderzoek eind september nog goede resultaten verkregen werden met de eDNA sponsmethode. Bovendien levert de methode snel resultaat, zijn de kosten laag, en kan de methode eenvoudig op grote schaal toegepast worden. eDNA lucht- en stofmonsters zoals toegepast in dit onderzoek resulteren in een hoog percentage vals negatieve detecties ten opzichte van het protocolonderzoek. Deze methodes zijn, op de hier beschreven manier, niet betrouwbaar inzetbaar om totale afwezigheid van verblijfplaatsen aan te tonen. Ook is keutelonderzoek een betrouwbare methode om afwezigheid van vleermuizen vast te stellen. Deze methode kan jaarrond worden toegepast. Wel is keutelonderzoek relatief kostbaar en de praktische toepasbaarheid is beperkt, omdat keutelonderzoek niet op alle locaties ingezet kan worden, en niet op grote schaal toe te passen is.

2. *Hoe effectief en betrouwbaar zijn eDNA onderzoek en keutelonderzoek om actuele aan- of afwezigheid van vleermuizen en hun verblijfplaatsen in gebouwen vast te stellen?*

Het is niet mogelijk om met de eDNA sponsmethode of keutelonderzoek vast te stellen of vleermuizen op moment van onderzoek aanwezig zijn (tenzij bij een inspectie vleermuizen waargenomen worden). Wel kan bij afwezigheid van eDNA of keutels gesteld worden dat er op moment van bemonsteren geen vleermuizen aanwezig zijn. Andersom, kan niet gesteld worden dat er op moment van bemonsteren vleermuizen aanwezig zijn als er keutels of eDNA aangetroffen wordt, omdat het eDNA en de keutels ook enige tijd geleden achtergelaten kunnen zijn. In 21% van de positieve monsters vond protocolonderzoek geen vleermuizen en werden ook geen keutels gevonden. We kunnen geen definitieve uitspraken over een oorsprong van eDNA op deze locaties omdat de afbraaksnelheid van eDNA van vleermuizen rond uitvliegopeningen nog onbekend is.

3. *Hoe effectief en betrouwbaar zijn eDNA onderzoek en keutelonderzoek om verblijfplaatsen van vleermuizen aan te tonen op locaties waar eerder (tot een jaar daarvoor) vleermuizen vastgesteld zijn?*

Er werd in 2024 eDNA gedetecteerd bij 94% van de verblijfplaatsen die in 2023 vastgesteld werden, en bovendien werden er 53% meer locaties met eDNA gevonden. Ook werden er keutels gevonden bij 4 van de 5 locaties die onderzocht zijn op keutels, en werden bovendien keutels gevonden bij 7 van de 9 (78%) locaties waar protocolonderzoek een negatieve uitslag gaf. Ondanks dat het eDNA en keutelonderzoek op deze locaties een jaar na protocolonderzoek uitgevoerd zijn, worden nog steeds vrijwel alle verblijfplaatsen aangetoond. Deze informatie is niet bruikbaar om aan te tonen

dat met deze methoden de aan- of afwezigheid van vleermuizen tot een jaar daarvoor kan worden vastgesteld. Wel tonen de resultaten de robuustheid van de eDNA methode aan.

4. *In welke mate kan met keutelonderzoek onderscheid gemaakt worden in de soorten, aantallen vleermuizen en functies van de verblijfplaatsen?*

In het huidige onderzoek is het niet gelukt om keutelonderzoek uit te voeren bij voldoende kraamverblijven en (massa)winterverblijven om te bepalen of de grootte van een verblijfplaats te schatten is op basis van het aantal keutels dat aangetroffen wordt. Er is daarom meer onderzoek nodig om meer variatie te krijgen in de dataset, zodat hierover uitspraken gedaan kunnen worden. Vooralsnog is protocolonderzoek de aangewezen methode om grootte en functie van een verblijfplaats te bepalen. Wel kan keutelonderzoek grote meerwaarde bieden om de locaties van verblijfplaatsen in gebouwen en het verhuisgedrag van vleermuizen in beeld te brengen. Door panden te onderzoeken in de buurt van een bekende kraamverblijfplaats kan een beeld verkregen worden welke panden gebruikt worden door de kraamgroep.

Op basis van de resultaten van het onderhavige onderzoek is aannemelijk dat bij keutelonderzoek de aanwezigheid van soorten alleen kan bepaald worden als er een DNA analyse uitgevoerd wordt op verzamelde keutels. Identificatie van keutels op basis van uiterlijk bleek niet voldoende betrouwbaar te zijn. In de praktijk is het nu niet altijd mogelijk om keutels te verzamelen, waardoor de betreffende soort(en) niet altijd bepaald kunnen worden.

5. *Welke (combinatie van) methode(s) van vleermuisonderzoek leidt tot een snelle, betrouwbare, betaalbare en efficiënte manier van het vaststellen van aan- of afwezigheid van vleermuizen in spouwmuren, alsmede mogelijke functies te duiden en kan landelijk worden uitgerold?*

Voor het aantonen van afwezigheid is eDNA de meest snelle, betrouwbare, betaalbare en efficiënte methode. De eDNA methode kan op grote schaal landelijk uitgerold worden. Omdat nog niet precies bekend is of, en zo ja, hoe vaak er vals positief resultaat verkregen wordt met een eDNA test kan het meerwaarde hebben om aanvullend keutelonderzoek uit te voeren, om aanwezigheid van vleermuizen te bevestigen. Keutelonderzoek is echter minder betaalbaar en niet op grote schaal uit te voeren. Toepassen van keutelonderzoek als aanvulling op eDNA onderzoek is daarom vooral relevant voor het beter in kaart brengen van satellietlocaties van kraamverblijven. Ook kan keutelonderzoek zelfstandig, of als aanvulling op eDNA onderzoek ingezet in de winter, om afwezigheid van vleermuizen vast te stellen, zolang nog onbekend is of de eDNA methode ook in de winter tot betrouwbare resultaten leidt.

6.2 Overige conclusies

- Er zijn te weinig data beschikbaar om te toetsen of soortnamenstelling betrouwbaar vastgesteld kan worden op basis van eDNA onderzoek. Hierbij gaat het concreet om meervleermuis, laatvlieger, gewone grootoorvleermuis, grijze grootoorvleermuis, tweekleurige vleermuis, baardvleermuis, Brandt's vleermuis, watervleermuis, bosvleermuis, kleine dwergvleermuis en rosse vleermuis. Het is daarom nog niet mogelijk om op basis van de huidige data conclusies te trekken in hoeverre eDNA onderzoek bruikbaar is voor het aantonen van aan- of afwezigheid van specifieke soorten.
- Op basis van de gemeten eDNA concentraties in de zomer en najaar bij zomer- en paarverblijven is een eerste indicatie verkregen dat er afbraak waarneembaar is over een tijdspanne van enkele maanden. In een aantal gevallen heeft afbraak van eDNA mogelijk geleid tot het missen van de verblijfplaats met eDNA. Het is daarom van belang om meer inzicht te krijgen in de afbraaksnelheid van eDNA. Het is met name van belang om te

onderzoeken of eDNA van vleermuizen detecteerbaar blijft in de periode dat vleermuizen overwegend in winterrust zijn (periode november-februari).

7. Advies

- We adviseren om het eDNA onderzoek (bemonstering van in- en uitvliegopeningen) toe te passen om afwezigheid van vleermuizen en hun verblijfplaatsen vast te stellen in de periode dat vleermuizen actief zijn. Daarbij achten we 1 mei tot 15 oktober een veilige grens waarbinnen eDNA zeker toegepast kan worden om afwezigheid van vleermuizen aan te tonen. De eDNA methodiek is niet alleen betrouwbaar, maar ook kostenefficiënt, en zeer schaalbaar. De eDNA sponsmethode kan ook ingezet worden om huidige afwezigheid van vleermuizen vast te stellen, om zodoende te toetsen of het nodig is om een pand natuurvrij te maken. De in dit onderzoek gevalideerde eDNA methodiek geeft overigens alleen informatie over aanwezige vleermuizen. Er kan sprake zijn van aanwezigheid van functies voor andere beschermde soorten zoals jaarrond beschermde nesten van vogels.
- Ook keutelonderzoek kan betrouwbaar de afwezigheid van vleermuizen vaststellen in tenminste de zomerperiode. Keutelonderzoek is echter niet op grote schaal toe te passen omdat de methode arbeidsintensief is en er een hoogwerker nodig is bij de bemonstering. Zolang onbekend is of, en zo ja hoe, eDNA toegepast moet worden in de winterperiode adviseren we om in de winterperiode keutelonderzoek in te zetten, of om eDNA en keutelonderzoek te combineren. Wij hebben voldoende vertrouwen in de combinatie van beide methodieken, dat als eDNA en keutelonderzoek een negatieve uitslag geven in de winter, jaarronde afwezigheid van vleermuizen aannemelijk is. Daarbij benadrukken we dat hierbij het keutel onderzoekprotocol gevolgd dient te worden zoals deze methode in dit onderzoek toegepast is. Onderdeel daarvan is dat ook het dak geïnspecteerd wordt, bijvoorbeeld door over de hele lengte van het dak kantpannen op te tillen.
- We adviseren om nader te onderzoeken of de eDNA methode in de toekomst ook in de winter als zelfstandige methode toegepast kan worden. Het is van belang om vast te stellen hoe snel eDNA afbreekt, en welke factoren de afbraaksnelheid beïnvloeden. De huidige drempelwaardes zijn gebaseerd op data die verzameld is in zomer 2024, een relatief natte en warme zomer. We adviseren nader te onderzoeken in welke mate de afbraak van eDNA van vleermuizen gestuurd wordt door weersomstandigheden. Bij het finetunen van de methode kan gekeken worden of de optimale drempelwaarde beïnvloed wordt door weersomstandigheden. Ook dient tenminste vastgesteld te worden of eDNA van vleermuizen bij zomerverblijven, kraamverblijven, paarverblijven en winterverblijven in de winterperiode detecteerbaar is. Daarbij adviseren wij om te bepalen of de drempelwaardes die gehanteerd worden in de zomerperiode leiden tot een betrouwbare detectie in de winterperiode. Mogelijk moeten in de winter lagere drempelwaardes gehanteerd worden dan in de zomer. Als uit vervolgonderzoek blijkt dat niet alle typen verblijfplaatsen jaarrond detecteerbaar zijn dan adviseren we een kalender te ontwikkelen waarop duidelijk aangegeven is welke typen verblijfplaatsen op welk moment van het jaar aangetoond kunnen worden met behulp van eDNA.
- Een positieve eDNA waarneming kan opgevolgd worden met keutelonderzoek om bevestiging te krijgen van de aanwezigheid van vleermuizen. Het is echter niet mogelijk om op basis van keutelonderzoek de functie van een verblijfplaats te bepalen. Ook adviseren we om keutelonderzoek nog niet in te zetten als methode om de grootte van een verblijfplaats te bepalen. In het huidige onderzoek is nog niet voldoende bewijs verzameld om te kunnen onderbouwen dat de grootte van een verblijfplaats betrouwbaar vastgesteld

kan worden op basis van de hoeveelheid keutels. We adviseren daarom om meer data te verzamelen over de hoeveelheid keutels bij grote kraamverblijven en (massa)winterverblijven, gezien deze grotendeels ontbreken in de huidige dataset.

- We adviseren nader onderzoek te doen naar het gedrag van vleermuizen binnen panden. Bij een isolatieprojecten van individuele woningen kan het voorkomen dat alleen van een tussenwoning onderzocht wordt of er eDNA aanwezig is. In de situatie dat deze woning door vleermuizen gebruikt wordt maar de invliegopening zich in een nabijgelegen woning bevindt, dan zou het voor kunnen komen dat een (deel van) een verblijfplaats verloren gaat, als een eDNA test van de onderzochte woning negatieve uitslag geeft. In dit onderzoek hebben we niet de indruk dat dergelijke situaties veel voorkomen, maar het is zinvol om nader te onderzoeken hoe groot het risico is dat er (delen van) verblijfplaatsen verloren gaan als onderzoek zich richt op individuele woningen.
Om aanwezigheid van vleermuizen en de soortsaamenstelling te kunnen bepalen is het van belang om nader te onderzoeken of de eDNA bemonsteringmethode ook andere soorten dan gewone- en ruige dwergvleermuis goed oppikt. Wij adviseren daarom om bekende verblijfplaatsen te bemonsteren van andere soorten zoals meervleermuis, laatvlieger, gewone grootoorvleermuis, grijze grootoorvleermuis, tweekleurige vleermuis, baardvleermuis, Brandt's vleermuis, watervleermuis, bosvleermuis, kleine dwergvleermuis en rosse vleermuis. Extra aandacht is nodig voor de laatvlieger, omdat zomerverblijfplaatsen van laatvlieger in dit onderzoek relatief vaak niet gedetecteerd werden met de eDNA sponsmethode op locaties waar vleermuisprotocol aanwezigheid van laatvlieger aantoonde. Een voorwaarde die gesteld werd bij de uitvoering van het huidige onderzoek was dat op alle onderzoek locaties in 2024 of eventueel 2023 protocolonderzoek uitgevoerd moest worden. De kans is echter klein dat bij lopend protocolonderzoek verblijfplaatsen van dergelijke zeldzame(re) soorten gevonden wordt. Het verdient daarom de aanbeveling om in vervolgonderzoek deze voorwaarde los te laten en gericht bekende verblijfplaatsen van deze soorten te bemonsteren. De aanwezigheid van een verblijfplaats kan ook vastgesteld zijn op basis van bijvoorbeeld zenderonderzoek, SMP-onderzoek of tellingen door vrijwilligers.
- Als het gaat om praktische uitvoering van de eDNA sponsmethode dient er een helder protocol opgesteld en uitgerold te worden. Dit om te borgen dat de methodiek op een goede manier ingezet wordt. Hierbij zijn de volgende aandachtspunten van belang:
 - Bij het uitvoeren van een laboratoriumanalyse waarmee aan- of afwezigheid van vleermuizen in het algemeen bepaald wordt, dient een analysemethode toegepast te worden waarmee alle in Nederland voorkomende gebouw bewonende vleermuissoorten gedetecteerd kunnen worden.
 - De toegepaste combinatie van veld- en laboratoriumprotocollen dienen aantoonbaar te leiden tot het tenminste betrouwbaar vaststellen van afwezigheid van vleermuizen (en moet dus resulteren in een hoge detectiekans). Dit dient zowel onderbouwt te worden met data in de periode van maart-oktober, als de periode van november-februari. Daarbij dient duidelijk vastgesteld te zijn dat gestelde grenswaardes op basis van aantal replica's, ct-waarde, DNA concentratie, qPCR end-point concentration leiden tot een hoge detectiekans, zowel in de zomer als winterperiode. De methode dient aantoonbaar effectief te zijn voor zowel algemene als zeldzame soorten vleermuizen.

- In het veldprotocol dient helder omschreven te worden hoe een eDNA bemonstering verzameld dient te worden op een manier dat de kans dat er contaminatie ontstaat bij de bemonstering tot een minimum beperkt wordt. In deze studie is aannemelijk gemaakt dat er eDNA aanwezig is op oppervlaktes in de omgeving van foeragerende vleermuizen. De bemonstering dient dus specifiek gericht te worden op potentiële in- en uitvliegopeningen. Het protocol zoals opgenomen in bijlagen 3 resulteerde in dit onderzoek in betrouwbare uitkomsten.
- In de zomer adviseren we de volgende werkwijze om een voldoende gevoelige eDNA meting te realiseren. Een monster dient positief gescoord te worden als beide qPCR replica's een positieve uitslag geven, met een gemiddelde ct-waarde van 40 of lager. Een monster dient negatief gescoord te worden als beide, of één van beide replica's positief zijn, maar de gemiddelde ct-waarde hoger is dan 40 . Als één replica een positieve uitslag geeft, en de ct-waarde van deze replica is lager dan 40, dan dient de analyse herhaald te worden. De analyse wordt dan positief gescoord als drie van de vier replica's een positieve uitslag geven en de ct-waarde gemiddeld lager is dan 40.
- Tenslotte dient vastgesteld te worden wie bevoegd zijn om een eDNA monster te verzamelen. Hierbij dient duidelijk omschreven te worden of dit een onafhankelijke partij moet zijn, of dat ook bedrijven in de isolatiesector (die daartoe gecertificeerd zijn) een eDNA bemonstering mogen uitvoeren.

8. Dankwoord

We danken een ieder die een bijdrage geleverd heeft aan dit project. De volgende woningcorporatie medewerking verleend: Woonmeij (Frans Brouwers), Kleurrijk Wonen (Roland Kuijpers), BrabantWonen (Bert Wagt), Nabij Wonen, Wonen Limburg (Janine van den Kerkhof), Acanthus en Groningerhuis. Diverse ecologisch adviesbureaus hebben data van protocolonderzoeken ter beschikking gesteld: Arcadis (Jasper Osterthun), Bureau Viridus (Marco Snijder en Natasja Groenink) Cobra adviseurs (Jaap van Dorst en Jasper Verhaar), Bureau Viridis (Marco Snijder en Natasja Groenink), Econsultancy (Jeroen Driessen en Eline Testroote) en Ecoreest (Wendy Duijndam). Ook danken we deelnemers aan de klankbordgroep, Stichting SEVON en de Zoogdiervereniging voor waardevolle feedback gedurende dit onderzoek.

9. Literatuur

- Garrett, N. R., Watkins, J., Francis, C. M., Simmons, N. B., Ivanova, N., Naaum, A., ... & Clare, E. L. (2023a). Out of thin air: surveying tropical bat roosts through air sampling of eDNA. *PeerJ*, 11, e14772.
- Garrett, N. R., Watkins, J., Simmons, N. B., Fenton, B., Maeda-Obregon, A., Sanchez, D. E., ... & Clare, E. L. (2023b). Airborne eDNA documents a diverse and ecologically complex tropical bat and other mammal community. *Environmental DNA*.
- Sundjaja, J. H., Shrestha, R., & Krishan, K. (2020). McNemar And Mann-Whitney U Tests.
- Twisk, P.T., C. Hardeman, W. van den Heuvel, M. Stevens; S. Jansen, 2023. De waarde van inspectie bij vleermuisonderzoek. *Vlen-nieuwsbrief* 85.
- Twisk, P.T., 2024. Inspectie woningen in Dokkum op vleermuisssporen. Rapport 2023-34 Twisk Ecologisch Onderzoek & Miecon.
- van Bochove K., Wellens-Roemaat, S. 2024. Detecteren van vleermuizen in de spouw door middel van eDNA, een pilotstudie in Dokkum. Rapport RA23242, Datura, Wageningen.
- Vleermuisvakberaad Netwerk Groene Bureaus, Zoogdiervereniging en Gegevensautoriteit Natuur (2021). Vleermuisprotocol 2021.

Bijlagen 1. Wettelijke kader.

Het verzamelen van informatie over aanwezigheid van vleermuizen in gebouwen is noodzakelijk in verband met de volgende bepalingen in de Omgevingswet. Citaten uit deze wet staan hieronder cursief. Delen die niet relevant zijn worden weggelaten; dit staat aangegeven met (...).

Artikel 5.1 (Omgevingsvergunningplichtige activiteiten wet)

1. Het is verboden zonder omgevingsvergunning de volgende activiteiten te verrichten:

a. een omgevings... (...).

Artikel 5.2 (Afbakening vergunningplicht artikel 5.1)

5. Op grond van artikel 5.1, worden in ieder geval gevallen aangewezen ter uitvoering van:

*a. de **habitatrichtlijn** (...).*

Alle in Nederland voorkomende vleermuissoorten zijn beschermd via de habitatrichtlijn, en dus ook beschermd via de twee hiervoor genoemde artikelen in de Omgevingswet. Voor activiteiten die invloed kunnen hebben op vleermuizen is dus een omgevingsvergunning nodig.

Artikel 11.27 (specifieke zorgplicht)

1. Degene die een flora- en fauna-activiteit (een activiteit met mogelijke gevolgen voor dieren of planten die van nature in het wild leven) (...), is verplicht:

*a. **alle maatregelen te nemen die redelijkerwijs van diegene kunnen worden gevraagd om die gevolgen te voorkomen;***

b. voor zover die gevolgen niet kunnen worden voorkomen: die gevolgen zoveel mogelijk te beperken of ongedaan te maken; en

c. als die gevolgen onvoldoende kunnen worden beperkt: die activiteit achterwege te laten voor zover dat redelijkerwijs van diegene kan worden gevraagd.

2. Voor flora- en fauna-activiteiten houdt deze plicht in ieder geval in dat:

*a. **voorafgaand aan het verrichten van de activiteit wordt nagegaan of er aanwijzingen zijn van de aanwezigheid op de locatie waar de activiteit wordt verricht of in de directe nabijheid van die locatie van: (...)***

2°. van nature in Nederland in het wild levende dieren of planten van soorten, genoemd in de bijlagen II, IV en V bij de habitatrichtlijn; (...)

(alle in Nederland voorkomende vleermuissoorten staan vermeld in bijlage IV van de habitatrichtlijn)

*b. als deze aanwijzingen er zijn: **wordt vastgesteld of op voorhand** op grond van objectieve gegevens **nadelige gevolgen** kunnen worden uitgesloten voor dieren van die soorten, hun nesten, hun foerageerplaatsen, hun **voortplantingsplaatsen**, hun **rustplaatsen** en hun eieren, of voor planten van die soorten;*

c. als die gevolgen niet kunnen worden uitgesloten: wordt nagegaan welke gevolgen de activiteit kan hebben voor dieren van die soorten, hun nesten, hun foerageerplaatsen, hun voortplantingsplaatsen, hun rustplaatsen en hun eieren, of voor planten van die soorten;

d. alle passende preventieve maatregelen worden getroffen om die nadelige gevolgen te voorkomen;

e. tijdens en na het verrichten van de activiteit wordt nagegaan of de getroffen maatregelen de beoogde effecten hebben; en

f. het verrichten van de activiteit wordt gestaakt als de nadelige gevolgen toch niet worden voorkomen, of, als staken van de activiteit redelijkerwijs niet meer mogelijk is, passende herstelmaatregelen worden getroffen.

Het in deze rapportage beschreven onderzoek heeft dus tot doel invulling te geven aan de specifieke zorgplicht, op basis waarvan onder andere preventieve maatregelen genomen kunnen worden.

Bijlagen 2. Overzicht van de alle bemonsterde locaties waar onderzoek plaats gevonden heeft.

Locatie	Type object	Type bat-detector onderzoek	Jaar bat-detector onderzoek	Type eDNA	Datum eDNA bemonstering	Datum keutel onderzoek	Deelproject	Opmerking
Delfzijl_1	Hoekwoning	Protocol	2024	Spons, Lucht, Stof	12-6-2024	12-6-2024	Basisonderzoek	
Delfzijl_2	Hoekwoning	Protocol	2024	Spons, Lucht, Stof	12-6-2024	12-6-2024	Basisonderzoek	
Delfzijl_3	Tussenwoning	Protocol	2024	Spons, Lucht, Stof	12-6-2024	12-6-2024	Basisonderzoek	Slechts deels inspecteerbaar ivm houten betimmering
Delfzijl_4	Tussenwoning	Protocol	2024	Spons, Lucht, Stof	12-6-2024	12-6-2024	Basisonderzoek	
Delfzijl_5	Tussenwoning	Protocol	2024	Spons, Lucht, Stof	12-6-2024	12-6-2024	Basisonderzoek	
Delfzijl_6	Hoekwoning	Protocol	2024	Spons, Lucht, Stof	12-6-2024	-	Basisonderzoek	Niet bereikbaar met hoogwerker
Delfzijl_7	Hoekwoning	Protocol	2024	Spons, Lucht, Stof	13-6-2024	13-6-2024	Basisonderzoek	
Delfzijl_8	Hoekwoning	Protocol	2024	Spons, Lucht, Stof	13-6-2024	13-6-2024	Basisonderzoek	
Delfzijl_9	Hoekwoning	Protocol	2024	Spons, Lucht, Stof	13-6-2024	13-6-2024	Basisonderzoek	
Delfzijl_10	Hoekwoning	Protocol	2024	Spons, Lucht, Stof	13-6-2024	13-6-2024	Basisonderzoek	
Delfzijl_11	Hoekwoning	Protocol	2024	Spons, Lucht, Stof	13-6-2024	13-6-2024	Basisonderzoek	
Delfzijl_12	Hoekwoning	Protocol	2024	Spons, Lucht, Stof	14-6-2024	-	Basisonderzoek	Niet bereikbaar met hoogwerker
Delfzijl_13	Hoekwoning	Protocol	2024	Spons, Lucht, Stof	14-6-2024	-	Basisonderzoek	Niet bereikbaar met hoogwerker
Delfzijl_14	Hoekwoning	Protocol	2024	Spons, Lucht, Stof	14-6-2024	14-6-2024	Basisonderzoek	
Delfzijl_15	Hoekwoning	Protocol	2024	Spons, Lucht, Stof	13-6-2024	14-6-2024	Basisonderzoek	
Delfzijl_16	Hoekwoning	Protocol	2024	Spons, Lucht, Stof	13-6-2024	13-6-2024	Basisonderzoek	
Delfzijl_17	Hoekwoning	Protocol	2024	Spons, Lucht, Stof	14-6-2024	14-6-2024	Basisonderzoek	
Doornenburg	Hoekwoning	Protocol	2024	Spons, Lucht, Stof	30-6-2024	5-7-2024	Basisonderzoek	
Leerdam_1	Appartementen	Protocol	2023	Spons	10-9-2024	1-10-2024	Basisonderzoek	
Leerdam_2	Appartementen	Protocol	2023	Spons	10-9-2024	-	Basisonderzoek	Niet bereikbaar met hoogwerker
Leerdam_3	Appartementen	Protocol	2023	Spons	10-9-2024	30-9-2024	Basisonderzoek	
Leerdam_4	Appartementen	Protocol	2023	Spons	18-9-2024	30-9-2024	Basisonderzoek	
Leerdam_5	Appartementen	Protocol	2023	Spons	18-9-2024	30-9-2024	Basisonderzoek	
Leerdam_6	Appartementen	Protocol	2023	Spons	10-9-2024	1-10-2024	Basisonderzoek	
Leerdam_7	Appartementen	Protocol	2023	Spons	18-9-2024	30-9-2024	Basisonderzoek	
Leerdam_8	Appartementen	Protocol	2023	Spons	18-9-2024	30-9-2024	Basisonderzoek	
Leerdam_9	Appartementen	Protocol	2023	Spons	10-9-2024	30-9-2024	Basisonderzoek	
Leerdam_10	Appartementen	Protocol	2023	Spons	10-9-2024	1-10-2024	Basisonderzoek	
Rosmalen_1	School, laagbouw	Protocol	2024	Spons, Lucht, Stof	26-6-2024	26-6-2024	Basisonderzoek	
Rosmalen_2	School, laagbouw	Protocol	2024	Spons, Lucht, Stof	26-6-2024	26-6-2024	Basisonderzoek	
Rosmalen_3	School, laagbouw	Protocol	2024	Spons, Lucht	26-6-2024	26-6-2024	Basisonderzoek	
Rosmalen_4	School, laagbouw	Protocol	2024	Spons	26-6-2024	26-6-2024	Basisonderzoek	
Rosmalen_5	School, laagbouw	Protocol	2024	Spons	26-6-2024	26-6-2024	Basisonderzoek	
Schijndel_1	Tussenwoning	Protocol	2024	Spons	17-9-2024	4-10-2024	Basisonderzoek	
Schijndel_2	Hoekwoning	Protocol	2024	Spons	17-9-2024	4-10-2024	Basisonderzoek	
Schijndel_3	Hoekwoning	Protocol	2024	Spons	17-9-2024	3-10-2024	Basisonderzoek	
Schijndel_4	Tussenwoning	Protocol	2024	Spons	17-9-2024	3-10-2024	Basisonderzoek	Spouw volledig geïsoleerd, dak niet onderzocht.
Schijndel_5	Tussenwoning	Protocol	2024	Spons	17-9-2024	3-10-2024	Basisonderzoek	Spouw volledig geïsoleerd, dak niet onderzocht.
Schijndel_6	Hoekwoning	Protocol	2024	Spons	17-9-2024	3-10-2024	Basisonderzoek	
Schijndel_7	Hoekwoning	Protocol	2024	Spons	17-9-2024	3-10-2024	Basisonderzoek	
Schijndel_8	Tussenwoning	Protocol	2024	Spons	17-9-2024	3-10-2024	Basisonderzoek	Spouw volledig geïsoleerd, alleen controle onder loodslabben.
Schijndel_9	Tussenwoning	Protocol	2024	Spons	17-9-2024	3-10-2024	Basisonderzoek	Spouw volledig geïsoleerd, dak niet onderzocht.

Locatie	Type object	Type bat-detector onderzoek	Jaar bat-detector onderzoek	Type eDNA	Datum eDNA bemonstering	Datum keutel onderzoek	Deelproject	Opmerking
Schijndel_10	Hoekwoning	Protocol	2024	Spons	17-9-2024	4-10-2024	Basisonderzoek	
Schijndel_11	Appartementen	Protocol	2024	Spons	17-9-2024	3-10-2024	Basisonderzoek	
Schijndel_12	Appartementen	Protocol	2024	Spons	17-9-2024	3-10-2024	Basisonderzoek	
Schijndel_13	Appartementen	Protocol	2024	Spons	17-9-2024	3-10-2024	Basisonderzoek	
Schijndel_14	Appartementen	Protocol	2024	Spons	17-9-2024	2-10-2024	Basisonderzoek	
Sint-Oedenrode_1	Hoekwoning	Protocol	2024	Spons	17-9-2024	2-10-2024	Basisonderzoek	
Sint-Oedenrode_2	Tussenwoning	Protocol	2024	Spons	17-9-2024	2-10-2024	Basisonderzoek	Spouw volledig geïsoleerd, dak niet onderzocht.
Sint-Oedenrode_3	Tussenwoning	Protocol	2024	Spons	17-9-2024	2-10-2024	Basisonderzoek	Spouw volledig geïsoleerd, dak niet onderzocht.
Sint-Oedenrode_4	Hoekwoning	Protocol	2024	Spons	17-9-2024	2-10-2024	Basisonderzoek	
Sint-Oedenrode_5	Hoekwoning	Protocol	2024	Spons	17-9-2024	2-10-2024	Basisonderzoek	
Sint-Oedenrode_6	Tussenwoning	Protocol	2024	Spons	17-9-2024	2-10-2024	Basisonderzoek	Spouw volledig geïsoleerd, dak niet onderzocht.
Sint-Oedenrode_7	Hoekwoning	Protocol	2024	Spons	17-9-2024	2-10-2024	Basisonderzoek	
Doorn_1	Hoekwoning	Protocol	2023	Spons, Lucht, Stof	2-6-2024	2-6-2024	Basisonderzoek	
Doorn_2	Tussenwoning	Protocol	2023	Spons, Lucht, Stof	5-6-2024	5-6-2024	Basisonderzoek	
Doorn_3	Tussenwoning	Protocol	2023	Spons, Lucht, Stof	20-6-2024	20-6-2024	Basisonderzoek	
Doorn_4	Tussenwoning	Protocol	2023	Spons, Lucht, Stof	20-6-2024	20-6-2024	Basisonderzoek	
Doorn_5	Tussenwoning	Protocol	2023	Spons, Lucht, Stof	20-6-2024	20-6-2024	Basisonderzoek	
Doorn_6	Hoekwoning	Protocol	2023	Spons, Lucht, Stof	20-6-2024	20-6-2024	Basisonderzoek	
Baarlo_1	Hoekwoning	Protocol	2023	Spons, Lucht, Stof	26-6-2024	-	Provincie Limburg	
Baarlo_2	Hoekwoning	Protocol	2023	Spons, Lucht, Stof	26-6-2024	-	Provincie Limburg	
Echt_1	Hoekwoning	Protocol	2023	Spons, Lucht, Stof	26-6-2024	-	Provincie Limburg	
Echt_2	Hoekwoning	Protocol	2023	Spons, Lucht, Stof	26-6-2024	-	Provincie Limburg	
Echt_3	Hoekwoning	Protocol	2023	Spons, Lucht, Stof	26-6-2024	-	Provincie Limburg	
Echt_4	Hoekwoning	Protocol	2023	Spons, Lucht, Stof	26-6-2024	-	Provincie Limburg	
Echt_5	Hoekwoning	Protocol	2023	Spons, Lucht, Stof	26-6-2024	-	Provincie Limburg	
Posterholt_1	Hoekwoning	Protocol	2023	Spons, Lucht, Stof	26-6-2024	-	Provincie Limburg	
Posterholt_2	Hoekwoning	Protocol	2023	Spons, Lucht, Stof	26-6-2024	-	Provincie Limburg	
Sint Odiliënberg_1	Hoekwoning	Protocol	2023	Spons, Lucht, Stof	26-6-2024	-	Provincie Limburg	
Sint Odiliënberg_2	Hoekwoning	Protocol	2023	Spons, Lucht, Stof	26-6-2024	-	Provincie Limburg	
Sint Odiliënberg_3	Hoekwoning	Protocol	2023	Spons, Lucht, Stof	26-6-2024	-	Provincie Limburg	
Steenwijk_1	Hoekwoning	Vrijwilligers	-	Spons	17-9-2024	-	Soortgericht	
Steenwijk_2	Tussenwoning	Vrijwilligers	-	Spons	17-9-2024	-	Soortgericht	
Steenwijk_3	Tussenwoning	Vrijwilligers	-	Spons	17-9-2024	-	Soortgericht	
Steenwijk_4	Hoekwoning	Vrijwilligers	-	Spons	17-9-2024	-	Soortgericht	
Steenwijk_5	Hoekwoning	Vrijwilligers	-	Spons	17-9-2024	-	Soortgericht	
Appingedam_1	Hoekwoning	-	-	Spons, Lucht, Stof	17-6-2024	-	Appingedam	
Appingedam_2	Tussenwoning	-	-	Spons, Lucht, Stof	17-6-2024	-	Appingedam	
Appingedam_3	Tussenwoning	-	-	Spons, Lucht, Stof	18-6-2024	-	Appingedam	
Appingedam_4	Tussenwoning	-	-	Spons, Lucht, Stof	18-6-2024	-	Appingedam	
Appingedam_5	Tussenwoning	-	-	Spons, Lucht, Stof	18-6-2024	-	Appingedam	
Appingedam_6	Tussenwoning	-	-	Spons, Lucht, Stof	18-6-2024	-	Appingedam	
Appingedam_7	Hoekwoning	-	-	Spons, Lucht, Stof	18-6-2024	-	Appingedam	
Appingedam_8	Hoekwoning	-	-	Spons, Lucht, Stof	18-6-2024	-	Appingedam	

Locatie	Type object	Type bat-detector onderzoek	Jaar bat-detector onderzoek	Type eDNA	Datum eDNA bemonstering	Datum keutel onderzoek	Deelproject	Opmerking
Appingedam_9	Tussenwoning	-	-	Spons, Lucht, Stof	18-6-2024	-	Appingedam	
Appingedam_10	Tussenwoning	-	-	Spons, Lucht, Stof	18-6-2024	-	Appingedam	
Appingedam_11	Tussenwoning	-	-	Spons, Lucht, Stof	18-6-2024	-	Appingedam	
Appingedam_12	Tussenwoning	-	-	Spons, Lucht, Stof	18-6-2024	-	Appingedam	
Appingedam_13	Tussenwoning	-	-	Spons, Lucht, Stof	18-6-2024	-	Appingedam	
Appingedam_14	Hoekwoning	-	-	Spons, Lucht, Stof	18-6-2024	-	Appingedam	
Appingedam_15	Hoekwoning	-	-	Spons, Lucht, Stof	17-6-2024	-	Appingedam	
Appingedam_16	Tussenwoning	-	-	Spons, Lucht, Stof	17-6-2024	-	Appingedam	
Appingedam_17	Tussenwoning	-	-	Spons, Lucht, Stof	17-6-2024	-	Appingedam	
Appingedam_18	Tussenwoning	-	-	Spons, Lucht, Stof	17-6-2024	-	Appingedam	
Appingedam_19	Tussenwoning	-	-	Spons, Lucht, Stof	17-6-2024	-	Appingedam	
Appingedam_20	Tussenwoning	-	-	Spons, Lucht, Stof	17-6-2024	-	Appingedam	
Appingedam_21	Tussenwoning	-	-	Spons, Lucht, Stof	17-6-2024	-	Appingedam	
Appingedam_22	Tussenwoning	-	-	Spons, Lucht, Stof	17-6-2024	-	Appingedam	
Appingedam_23	Tussenwoning	-	-	Spons, Lucht, Stof	17-6-2024	-	Appingedam	
Appingedam_24	Tussenwoning	-	-	Spons, Lucht, Stof	17-6-2024	-	Appingedam	
Appingedam_25	Tussenwoning	-	-	Spons, Lucht, Stof	17-6-2024	-	Appingedam	
Appingedam_26	Tussenwoning	-	-	Spons, Lucht, Stof	17-6-2024	-	Appingedam	
Appingedam_27	Hoekwoning	-	-	Spons, Lucht, Stof	17-6-2024	-	Appingedam	
Appingedam_28	Appartementen	-	-	Spons, Lucht, Stof	18-6-2024	-	Appingedam	
Appingedam_29	Appartementen	-	-	Spons, Lucht, Stof	18-6-2024	-	Appingedam	
Appingedam_30	Appartementen	-	-	Spons, Lucht, Stof	18-6-2024	-	Appingedam	
Appingedam_31	Appartementen	-	-	Spons, Lucht, Stof	18-6-2024	-	Appingedam	
Appingedam_32	Appartementen	-	-	Spons, Lucht, Stof	18-6-2024	-	Appingedam	
Appingedam_33	Appartementen	-	-	Spons, Lucht, Stof	18-6-2024	-	Appingedam	
Appingedam_34	Tussenwoning	-	-	Spons, Lucht, Stof	18-6-2024	-	Extra controles	
Appingedam_35	Tussenwoning	-	-	Spons, Lucht, Stof	18-6-2024	-	Extra controles	
Appingedam_36	Tussenwoning	-	-	Spons, Lucht, Stof	18-6-2024	-	Extra controles	
Appingedam_37	Tussenwoning	-	-	Spons, Lucht, Stof	18-6-2024	-	Extra controles	
Den Bosch_1	Appartementen	-	-	Spons, Lucht, Stof	19-6-2024	-	Extra controles	
Den Bosch_2	Appartementen	-	-	Spons, Lucht, Stof	19-6-2024	-	Extra controles	
Den Bosch_3	Appartementen	-	-	Spons, Lucht, Stof	18-6-2024	-	Extra controles	
Den Bosch_4	Appartementen	-	-	Spons, Lucht, Stof	18-6-2024	-	Extra controles	

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. Bij grote panden (<9 meter hoog) dient één monster genomen te worden per 40 meter muurlengte.
 - b. Bij een appartementencomplexen (>9 meter hoog):
 - i. Verzamel minimaal één monster per gevel.
 - ii. Verzamel meerdere monsters indien de gevel langer is dan 25 meter (één monster per 25 strekkende meter).
4. Monteer de spons op een telescoopstok
5. Dip de spons in de pot met vloeistof zodat deze iets vochtig is.
6. Verzamel submonsters door alle potentiële uitvliegopeningen te bestrijken met de spons (minimaal 4 strijkende bewegingen per uitvliegopening). Het is essentieel dat ALLE potentiële uitvliegopeningen bemonsterd worden. Controleer de aanwezigheid van:
 - Open stootvoegen gevels
 - Open stootvoegen schoorsteen
 - Loodslabben die grenzen aan de gevel
 - Speet onder vensterbank
 - Spleten naar kozijnen
 - 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
- Spleten bij balkons
- Spleten beschadiging van verdiepingsvloer/ betonband
- Beschadigingen achter regenpijp

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

7. Bij het bestrijken van uitvliegopeningen kan er vloeistof verloren gaan. Zorg dat er uiteindelijk minimaal 25 mL vloeistof in de pot achterblijft voor de analyse.
8. Als alle toegangsopeningen 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.

eDNA bemonstering protocol luchtmonsters vleermuizen in de spouw

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

De sample kit bevat:

- 2 paar handschoenen
- Smith-Rooth Self-preserving eDNA Filter (glasvezel filter)
- Benodigde slangen

Overige benodigdheden:

- Vacuümpomp
- Endoscoop
- Eventueel ladder of hoogwerker
- Eventueel zand, cement, water en een emmer

Voorinspectie

1. Noteer het monsternummer, en leg vast bij welk adres/ deel van de woning het monster verzameld is.
2. Eerst dient geïnspecteerd te worden of er reeds isolatiemateriaal in de spouw aanwezig is.
 - a. Check met een endoscoop via een bestaande opening zoals een open stootvoeg, of een geboord gat, of er isolatiemateriaal in de spouw aanwezig is.
 - i. Als er geen isolatiemateriaal aanwezig is dan kan de lucht aangezogen worden via gaten aan de onderzijde van de spouw
 - ii. Als er wel isolatie aanwezig is dan zullen vleermuizen alleen aanwezig zijn in luchtpockets in de isolatie. Dergelijke luchtpockets zijn aanwezig aan de bovenkant van de spouw, als gevolg van het uitzakken van de isolatie. De luchtmonsters dienen genomen te worden in de luchtpockets die bereikbaar zijn voor vleermuizen.

Bemonstering

1. De werkwijze hangt af van het type woning:
 - a. Bij een grondgebonden woning: verzamel in beginsel één monster per adres.
 - b. Bij een appartementencomplex met een doorlopende spouw:
 - i. Verzamel minimaal één monster per gevel.
 - ii. Verzamel meerdere monsters indien de gevel langer is dan 25 meter (één monster per 25 strekkende meter).
 - c. Bij een appartementencomplex met een onderbroken spouw (een spouw die onderbroken is door bijvoorbeeld een horizontale betonnen plaat):
 - i. Verzamel per gevel minimaal één monster per horizontale laag (die verticaal ononderbroken is). Er hoeft geen monster verzameld te worden op de begane grond van een appartementencomplex met een onderbroken spouw.
 - ii. Verzamel meerdere monsters indien de gevel langer is dan 25 meter (één monster per 25 strekkende meter).
2. Sluit de “gele” kant van de capsule aan op de vacuümpomp.
3. Sluit de bijgeleverde slang aan op de witte kant van de capsule. Deze slang wordt via een

geboord gat of een open stootvoeg in de spouwmuur gebracht (minimaal 10 cm in de spouw duwen).

4. Neem in elke muur met een spouw een submonster. Per muur dient er minimaal 3 minuten lucht aangezogen te worden. Totaal dient er minimaal 10 minuten lucht aangezogen te worden. Dat betekent dat als de woning slechts bestaat uit een voor- en achterzijde (2 te bemonsteren spouwen) er 5 minuten per spouwmuur bemonsterd dient te worden.
5. Vul eventueel geboorde gaten met specie (3 zand, 1 deel cement, 0,5 deel water).

Bewaren van de monsters

6. Het eDNA blijft achter op het membraan dat in de capsule aanwezig is. De capsule kan terug gestopt worden in de monsterzak.
7. De monsters kunnen bij 4 °C in de koelkast bewaard worden. Lange termijn opslag (vanaf 2 weken) dient te gebeuren bij -20 °C tot -80 °C. Hoe er echter rekening mee dat er verlies in DNA concentratie kan optreden bij het bevriezen en ontdooien van DNA.

eDNA bemonstering protocol stofmonsters vleermuizen in de spouw

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

De sample kit bevat:

- 2 paar handschoenen
- Smith-Rooth Self-preserving eDNA Filter (glasvezel filter)
- Benodigde slangen
- 50 mL opslagbuis met daarin een kleine capsule met silicakorrels

Overige benodigdheden:

- Vacuümpomp
- Endoscoop
- Eventueel ladder of hoogwerker
- Eventueel zand, cement, water en een emmer

Voorinspectie

3. Noteer het monsternummer, en leg vast bij welk adres/ deel van de woning het monster verzameld is.
4. Eerst dient geïnspecteerd te worden of er reeds isolatiemateriaal in de spouw aanwezig is.
 - a. Check met een endoscoop via een bestaande opening zoals een open stootvoeg, of een geboord gat, of er isolatiemateriaal in de spouw aanwezig is.
 - i. Als er geen isolatiemateriaal aanwezig is dan kan de stof opgezogen worden via gaten aan de onderzijde van de spouw.
 - ii. Als er wel isolatie aanwezig is dan zullen vleermuizen alleen aanwezig zijn in luchtpockets in de isolatie. Dergelijke luchtpockets zijn aanwezig aan de bovenkant van de spouw, als gevolg van het uitzakken van de isolatie. De stofmonsters dienen genomen te worden in de luchtpockets die bereikbaar zijn voor vleermuizen.

Bemonstering

5. De werkwijze hangt af van het type woning:
 - a. Bij een grondgebonden woning: verzamel in beginsel één monster per adres.
 - b. Bij een appartementencomplex met een doorlopende spouw:
 - i. Verzamel minimaal één monster per gevel.
 - ii. Verzamel meerdere monsters indien de gevel langer is dan 25 meter (één monster per 25 strekkende meter).
 - c. Bij een appartementencomplex met een onderbroken spouw (een spouw die onderbroken is door bijvoorbeeld een horizontale betonnen plaat):
 - i. Verzamel per gevel minimaal één monster per horizontale laag (die verticaal ononderbroken is).
 - ii. Verzamel meerdere monsters indien de gevel langer is dan 25 meter (één monster per 25 strekkende meter).
6. Een monster bestaat uit meerdere submonsters. Verzamel minimaal één submonsters in elk fysiek gescheiden deel van de spouw dat toegankelijk is voor vleermuizen. Verzamel maximaal 6 submonsters per monster. Zijn er meer submonsters nodig om bij

het betreffende adres alle gescheiden delen te bemonsteren, verzamel dan meerdere monsters.

7. Sluit de “gele” kant van de capsule aan op de vacuümpomp.
8. Sluit de bijgeleverde slang aan op de witte kant van de capsule. Deze slang wordt via een geboord gat of een open stootvoeg in de spouwmuur gebracht (minimaal 10 cm in de spouw duwen).
9. Neem in elke muur met een spouw een submonster. Streef ernaar om circa 2-3 mL materiaal per muur aan te zuigen. Het aangezogen materiaal kan bestaan uit stof, spinnenwebben of andere ‘viezigheid’.
10. Vul eventueel geboorde gaten met specie (3 zand, 1 deel cement, 0,5 deel water).

Bewaren van de monsters

11. Het verzamelde materiaal met daarin het eDNA blijft in de capsule achter. Trek de slang van het witte deel van de capsule en tik de capsule leeg in de 50 mL buis.
12. De monsters kunnen bij 4 °C in de koelkast bewaard worden. Lange termijn opslag (vanaf 2 weken) dient te gebeuren bij -20 °C tot -80 °C. Hoe er echter rekening mee dat er verlies in DNA concentratie kan optreden bij het bevriezen en ontdooien van DNA.

Bijlage 6. Lijst van soorten waarop in het laboratorium getest is of er gevoelige amplificatie gerealiseerd kan worden met behulp van het toegepaste qPCR-assay.

Wetenschappelijke naam	Nederlandse naam
<i>Barbastella barbastellus</i>	Mopsvleermuis
<i>Eptesicus serotinus</i>	Laatvlieger
<i>Vespertilio murinus</i>	Tweekleurige vleermuis
<i>Myotis bechsteinii</i>	Bechsteins vleermuis
<i>Myotis brandtii</i>	Brandt's vleermuis
<i>Myotis dasycneme</i>	Meervleermuis
<i>Myotis daubentonii</i>	Watervleermuis
<i>Myotis emarginatus</i>	Ingekorven vleermuis
<i>Myotis myotis</i>	Vale vleermuis
<i>Myotis mystacinus</i>	Baardvleermuis
<i>Myotis nattereri</i>	Franjestaart
<i>Nyctalus leisleri</i>	Bosvleermuis
<i>Nyctalus noctula</i>	Rosse vleermuis
<i>Pipistrellus nathusii</i>	Ruige dwergvleermuis
<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	Gewone dwergvleermuis
<i>Pipistrellus pygmaeus</i>	Kleine dwergvleermuis
<i>Plecotus auritus</i>	Gewone grootoorvleermuis
<i>Plecotus austriacus</i>	Grijze grootoorvleermuis
<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	Grote hoefijzerneus

Bijlage 7. Voorlopig veldprotocol voor het uitvoeren van een keutelonderzoek. Dit protocol zal worden verbeterd naar aanleiding van ervaringen en resultaten die in dit onderzoek verkregen worden. Dit voorlopige veldprotocol dient daarmee als basis voor verdere doorontwikkeling.

Protocol inspectie spouwmuren op vleermuissporen

Doel

Het doel van de hier beschreven inspectie is het bepalen van het gebruik van spouwmuren van woningen door vleermuizen, dan wel het (redelijkerwijs) uitsluiten ervan.

Voorwaarden

Om te dienen als volwaardig, in het kader van wet- en regelgeving geaccepteerd, onderzoek voldoet de inspectie aan de volgende voorwaarden:

- De inspectie is volledig. Dit betekent dat onderzocht en gedocumenteerd is welke delen geschikt zijn als verblijfplaats voor vleermuizen en hoe deze zijn geïnspecteerd.
- Ook is onderzocht en gedocumenteerd welke delen van het gebouw niet geschikt zijn als verblijfplaats voor vleermuizen en waarom niet.
- Het onderzoek is uitgevoerd door een (of meer) ter zake deskundige(n), zowel op het gebied van (sporen van) vleermuizen als van de constructie van gebouwen.
- Van het onderzoek is een rapportage opgesteld, waarin onder andere de locatie, de onderzoeksdatum, de betrokken onderzoekers, de werkwijze en de resultaten (inclusief beeldmateriaal) zijn vastgelegd.

Werkwijze

Benodigdheden

- Ladder (werkhoogte 7,5 m), en indien een dak met dakpannen aanwezig is ook een hoogwerker;
- Accu boormachine en boren van 10 of 12 mm dik en tenminste 10 cm lang (tenzij er veel open stootvoegen zijn);
- Voegspecie, een stevig bakje, wat water, voegspijker en plamuurmes (tenzij er veel open stootvoegen zijn);
- Spouwendoscoop met opname-functie;
- Fototoestel;
- Zaklamp;
- Verrekijker welke, als minimumafstand, tot op 2 m of minder is scherp te stellen;
- Buisjes voor het verzamelen van uitwerpselen en watervaste stift voor noteren adres op het buisje.

Contact met bewoners

Uiteraard moet de inspectie gebeuren in overleg met de bewoners en met toestemming van de eigenaar. Bij het contact met de bewoners kan het waardevol zijn te vragen of zij iets bemerkte hebben over de aanwezigheid van vleermuizen. Daarbij moet er wel rekening mee gehouden worden dat de bewoners een ander belang kunnen hebben bij deze informatie dan de onderzoeker.

Boren van gaten

Indien voor het inspecteren van de spouw gaten geboord moeten worden kan dit het beste gedaan worden bij de (dichte) stootvoegen. Vaak is de specie hier minder dicht waardoor het boren

eenvoudiger gaat. Bij het boren moet ook rekening gehouden worden met de kans dat vleermuizen in een spouw aanwezig zijn. Bakstenen zijn in de regel 10 cm breed (en een muur dus 10 cm dik). Door een boor van ongeveer 10 cm lang te gebruiken wordt de kans dat vleermuizen bij het boren gewond of gedood worden zo klein mogelijk. Bij gebruik van een langere boor kan een lengte van 10 cm op de boor worden afgetekend.

Nadat gaten zijn geboord en de inspectie van de spouw is uitgevoerd worden de gaten direct weer gedicht met behulp van voegspecie.

Documenteren van inspectie en waarnemingen

Van de inspectie moet een verslag gemaakt worden. In dit verslag moet duidelijk beschreven worden welke mogelijkheden het geïnspecteerde huis biedt voor verblijfplaatsen van vleermuizen. In verband met de wettelijke bescherming van vleermuizen is het noodzakelijk waarnemingen van vleermuizen en hun sporen te documenteren. Daarom moet een endoscoop gebruikt worden waarmee foto- of video-opnamen gemaakt kunnen worden. Ook moet gedocumenteerd worden welke delen van een gebouw niet toegankelijk zijn voor vleermuizen. Beeldmateriaal moet opgenomen worden in een rapportage.

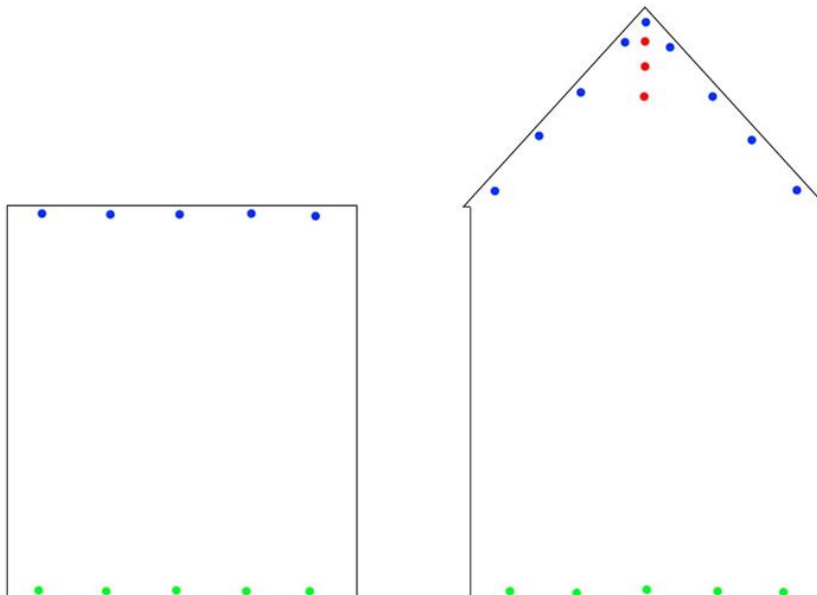
Voorinspectie

1. Eerst moet vastgesteld worden of er open stootvoegen aanwezig zijn en zo ja, hoeveel en waar. Vaak is dit van te voren via Google streetview te zien. Let hierbij op de datum waarop de betreffende opname door Google gemaakt is; naar mate een opname ouder is neemt de betrouwbaarheid ervan af. Let ook op open stootvoegen in schoorstenen (indien aanwezig). Open stootvoegen onderin een gevel zijn heel vaak alleen aan de buitenzijde van de muur open, maar in de spouw dicht als gevolg van specie die bij het metselen in de spouw gevallen is. Om na te gaan of er uitwerpselen van vleermuizen onderin de spouw aanwezig zijn kan het zinvol zijn deze stootvoegen uit te boren zodat de spouw daar gecontroleerd kan worden.
2. Ga ook na of er andere openingen zijn waarlangs vleermuizen de spouw kunnen bereiken. Dit kan gaan om onder andere:
 - Ventilatievoegen (drie tot vijf verticale openingen in de buitenmuur) die dienen voor de ventilatie in badkamer, toilet of keuken. Let er hierbij ook op of deze toegang geven tot de spouw.
 - Een kier onder de dakpannen direct boven de buitenmuur van de kopgevel;
 - De ruimte onder de kantpannen (indien deze niet vastgemetseld zijn);
 - Een kier bij de dakrand zoals een metalen of houten afwerkrand;
 - Ruimten onder loodslabben;
 - Een kier onder de onderzijde van ramen (bij de waterslag of lekdorpel) of tussen de buitenmuur en een raamkozijn;
 - Een opening bij een dilatatievoeg;
 - Een kier tussen een muur en gevelbekleding als boeiborden of windveren;
 - Spleten bij balkons, verdiepingsvloeren, betonbanden of in draagbalken;
 - Een scheur of ander gat in de buitenmuur;
 - Een opening achter een regenpijp of rond de doorvoer van een regenpijp in de dakrand.Let er hierbij ook op of er vleermuizen of vleermuisuitwerpselen aanwezig zijn. Ook kan een bruine verkleuring aanwezig zijn als gevolg van het regelmatig landen en wegkruipen van vleermuizen.
Maak foto's van het gebouw waarop al deze onderdelen zichtbaar zijn, of waarop te zien is dat ze niet aanwezig zijn.
3. Vervolgens dient geïnspecteerd te worden of er reeds isolatiemateriaal in de spouw aanwezig is.

- i. Check met een endoscoop via een bestaande opening zoals een open stootvoeg, of via een geboord gat, of er isolatiemateriaal in de spouw aanwezig is.
- ii. Als er geen isolatiemateriaal aanwezig is kan de spouw vaak volledig worden geïnspecteerd.
- iii. Als er isolatiemateriaal in de vorm van steen- of glaswol is toegepast is er meestal een restspouw van enkele cm breed aanwezig die door vleermuizen gebruikt kan worden. Dit maakt het vrijwel onmogelijk de spouw volledig te onderzoeken. Nabij toegangsopeningen die door vleermuizen gebruikt worden zijn dan vaak wel uitwerpselen aanwezig.
- iv. Als er een na-isolatie methode is gebruikt (wat naderhand, maar ook bij de bouw gedaan kan zijn) is er geen open spouw aanwezig, maar zijn er vaak wel restruimten bovenin de spouw aanwezig. Dit is het gevolg van het niet volledig vullen van de spouw bij het isoleren of van het inzakken van het isolatiemateriaal. Deze ruimten zijn vaak goed te inspecteren met een endoscoop.
- v. Als er oud isolatiemateriaal in de spouw aanwezig is dat is verbrokken
 Het voorgaande leidt tot vier categorieën van woningen: niet geïsoleerd, onvolledig geïsoleerd, volledig geïsoleerd en met restanten van isolatiemateriaal. In de eerste drie van deze categorieën is inspectie op aanwezigheid van vleermuizen zinvol. Indien verbrokken isolatiemateriaal aanwezig is, is het niet mogelijk een goede indruk te krijgen van afwezigheid van vleermuizen en is een inspectie met endoscoop niet geschikt om afwezigheid van vleermuizen te bepalen.
 Ook van al dan niet aanwezig isolatiemateriaal moeten foto's gemaakt worden.

Inspectie niet geïsoleerde spouwen

1. Controleer de spouwen via (indien aanwezig) alle open stootvoegen en/of via boorgaten volgens het schema in figuur 1, blauwe en groene stippen, op sporen van vleermuizen.



Figuur 1. Controleschema spouwmuren. Indien er geen open stootvoegen aanwezig zijn worden langs de bovenzijde en onderzijde van de muren gaten geboord. Dit gebeurt op ± 15 cm van de onder- en bovenzijde en op een afstand van 1 m tussen de gaten. De rode stippen (rechtsboven) zijn alleen van toepassing bij een volledig geïsoleerde spouw.

Inspectie onvolledig geïsoleerde spouwen

1. Controleer de spouwen via (indien aanwezig) alle open stootvoegen die zich hoger bevinden dan 1 m boven de onderzijde van de buitenmuren en via boorgaten op ± 15 cm onder de bovenzijde van buitenmuren (blauwe stippen in figuur 1) op sporen van vleermuizen.

Inspectie volledig geïsoleerde spouwen

1. Controleer of er bovenin de spouw een restruimte aanwezig is (rode stippen in figuur 1). Begin hierbij op 10-15 cm onder de nok van de gevel. Boor hiervoor (indien geen open stootvoeg aanwezig is) een gat en controleer de spouw met een endoscoop. Als er inderdaad een restruimte aanwezig is, probeer dan in te schatten hoe groot deze ruimte is aan de hand van zichtbare bakstenen (deze zijn 7 cm hoog en 18-20 cm breed). Boor een gat op 20-30 cm onder het eerste gat en herhaal dit tot je een goed beeld hebt van de grootte van de restruimte in de spouw. De onderzijde van deze restruimte moet je goed kunnen inspecteren op aanwezigheid van uitwerpselen van vleermuizen.
2. Isolatiemateriaal kan vrij willekeurig verdeeld aanwezig zijn in een spouw. Daarom moet langs de bovenzijde van de muren op steeds ± 1 m afstand gecontroleerd worden of er een restruimte aanwezig is (blauwe stippen in figuur 1). Dit gebeurt door (indien nodig, als geen open stootvoegen aanwezig zijn) op 10-15 cm onder de dakrand gaten te boren en de spouw met endoscoop te controleren.

Gebruikte termen

Dilatatievoeg	Verticale spleet tussen muurdelen om rek en krimp van de buitenmuur op te vangen. Bij een open dilatatievoeg is de spleet niet afgewerkt, bij een dichte dilatatievoeg is deze afgewerkt met een flexibel, rubberachtig materiaal.
Metselbaard	Uitstulping van specie in de spouw. Aangezien de binnenzijde van de spouw niet wordt afgewerkt, bevinden metselbaarden zich vaak aan de binnenzijde van de spouwmuur.
(Lucht)spouw	De ruimte tussen de binnen- en buitenmuur (ook spouwbladen genoemd), oftewel de luchtspouw plus isolatiemateriaal.
Spouwanker of -haak	Anker, dat de binnen- en buitenmuur met elkaar verbindt.
Stootvoeg	Verticale voeg tussen bakstenen.
Lintvoeg	Horizontale voeg tussen bakstenen.
Open stootvoeg	stootvoeg zonder specie, die dient voor beluchting van de spouw en/of om water uit de spouw naar te laten lopen.
Ventilatievoeg	lange open voeg, vaak tussen verticaal toegepaste bakstenen, die dient als ventilatie van keuken, toilet of badkamer. Deze voegen kunnen toegang geven tot de spouw, mits aanwezig.
Dakbeschot	laag planken of plaatmateriaal, bevestigd tegen de dragende balken, die het dak aan de binnenzijde vormen. Tegenwoordig is hier vaak aan binnen- of buitenzijde (onder de dakpannen) isolatiemateriaal op aangebracht.
Muurplaat	houten balk die, bij een hellend dak, plat op de muur is bevestigd en waarop de dragende balken van het dak zijn bevestigd.
Gevel-, kant-, eindpan	Dakpan aan de zijkant van het dak.
Nokvorst of -pan	Dakpan op de nok van het dak.
Eindvorst	Eerste of laatste van de rij nokvorsten.
Kopgevel	Zijde van het huis die uitloopt in de punt van het dak.

Bijlage 8. Beschrijvingen onderzochte gebouwen (muv afzonderlijke woningen).

Zeventien woningen Delfzijl

Geschakelde grondgebonden eengezinswoningen. De woningen hebben twee woonetages en een zolderetage. De zadeldaken zijn bedekt met betonpannen. Er zijn geen schoorstenen aanwezig. De daken van de zolderetages lopen over in de daken van bergingen aan de voorzijde van de woningen. Er zijn geen windveren toegepast en geen open stootvoegen aanwezig. In voor- en achtergevels zijn ten dele houten buitenmuren toegepast. In blinde gevels zijn ventilatievoegen toegepast. De spouwen zijn geïsoleerd met XPS platen waarbij een doorlopende verticale restspouw aanwezig is.

Drie flatgebouwen Leerdam.

Flatgebouwen van drie bouwlagen hoog met zadeldaken die met betonnen dakpannen zijn bedekt. Geen windveren bij de dakranden. Op de daken zijn schoorstenen aanwezig. In de bakstenen muren zijn betrekkelijk veel en grote open stootvoegen aanwezig. De spouwen zijn geïsoleerd met spuitwol. Desondanks zijn achter de open stootvoegen regelmatig kleine ruimten aanwezig. In de kopgevels nabij de punt van het dak is in veel gevallen een restruimte aanwezig, maar die is waarschijnlijk niet via de kantpannen bereikbaar voor vlermuizen.

School Rosmalen

Een multifunctioneel gebouw met klaslokalen en ruimten die voor kinderopvang gebruikt worden. Er is een bouwlaag aanwezig. Op veel plaatsen is een plat dak aanwezig, op een deel van het gebouw ook puntdaken die met betonnen dakpannen zijn bedekt. Bij deze daken zijn ook enkele kleine gevels die met trespa zijn afgewerkt. Ook zijn grote delen van de muren met trespa afgewerkt. Er is een beperkt aantal open stootvoegen aanwezig, alleen op ongeveer 30 cm boven maaiveld. Er zijn spouwen aanwezig die met isolatiedekens zijn gevuld, met een verticale restspouw van enkele centimeters. Dakranden zijn bij de platte delen afgewerkt met een metalen daktrim, waaronder mogelijk her en der kleine toegangsopeningen zijn. Verder zijn er, bij plaatsen waar regenpijpen door dakranden lopen, openingen rondom de regenpijpen aanwezig die door vlermuizen als toegang gebruikt kunnen worden.

Tien woningen Schijndel

De tien woningen maken deel uit van drie blokken van vier geschakelde woningen. Grondgebonden eengezinswoningen met zadeldaken die met betonpannen gedekt zijn. Er zijn schoorstenen aanwezig. Er zijn geen windveren toegepast. De woningen hebben spouwmuren die volledig gevuld zijn met spuitwol. Er zijn geen open stootvoegen aanwezig.

Zeven woningen Sint-Oedenrode

Dit betreft geschakelde, grondgebonden eengezinswoningen met een zadeldak, gedekt met betonpannen. Er zijn schoorstenen aanwezig. Bij de dakranden zijn windveren toegepast. Er zijn alleen op ongeveer 30 cm boven de grond open stootvoegen aanwezig. Er zijn spouwmuren aanwezig die volledig zijn geïsoleerd met spuitwol.

Zes woningen Doorn

Zes grondgebonden eengezinswoningen. De woningen hebben zadeldaken die gedekt zijn met betonnen dakpannen. De dakranden zijn afgewerkt met windveren. De muren hebben een spouw die met steen- of glaswollendekens of met polystyreen platen zijn geïsoleerd. Er is een verticale restspouw aanwezig van enkele cm diep. In het buitenblad zijn open stootvoegen van ongeveer 10 mm breed aanwezig op verschillende hoogten.

Flatgebouw, 's-Hertogenbosch

Een flatgebouw van vijf bouwlagen hoog. Het gebouw heeft een plat dak. De woningen stonden al ongeveer een half jaar leeg tijdens het sporen- en DNA-onderzoek. Bij de woningen zijn werende maatregelen genomen door het dichtmaken en het aanbrengen van exclusionflaps bij open stootvoegen. In de buitenmuren is een beperkt aantal open stootvoegen aanwezig. Andere toegangsopeningen of mogelijke verblijfplaatsen voor vleermuizen zijn niet aanwezig. De spouwen zijn na-geïsoleerd met spuitwol. Bovenin de spouwen zijn op enkele plaatsen horizontale restruimten aanwezig.

Uiterdijk, Appingedam

34 eenpersoons- en eengezinswoningen. Deels grondgebonden woningen, deels gestapelde appartementen. De woningen hebben een plat dak, afgewerkt met een metalen daktrim. In kleine delen van gevels zijn trespa platen toegepast. Ook zijn bij de woningen open stootvoegen toegepast.

Woningblok, Schijndel

Een blok met drie etages met woningen. Het gebouw heeft een plat dak dat is afgewerkt met opstaande dakranden waarop zinken platen zijn aangebracht. Het gebouw heeft geen open stootvoegen. De spouwmuren zijn grotendeels geïsoleerd met glas- of steenwol. Bovenin zijn restruimtes aanwezig, maar deze zijn mogelijk grotendeels niet toegankelijk voor vleermuizen.

Bijlagen 9. Overzicht van de resultaten van het protocolonderzoek, eDNA onderzoek en keutelonderzoek. De bemonsterde verblijfplaatsen van rosse vleermuis zijn ook opgenomen in dit overzicht, hoewel daar geen recent protocolonderzoek heeft plaats gevonden. Recente aanwezigheid van rosse vleermuis op deze locaties is echter wel vastgesteld door vrijwilligers.

Stof= Aantal positieve qPCR replica's van de totaal 12 uitgevoerde replica's in de stofmonsters.

Lucht= Aantal positieve qPCR replica's van de totaal 12 uitgevoerde replica's in de luchtmonsters.

Spons= Aantal positieve qPCR replica's van de totaal 12 uitgevoerde replica's in de sponsmonsters.

Spons con.= Gemeten eDNA concentratie (moleculen/mL template) in de sponsmonsters.

Spons Sc= Gescoorde aan- of afwezigheid (1 of 0) in de eDNA sponsmonsters.

Spons Soort= Soorten die vastgesteld door middel van eDNA metabarcoding van de sponsmonsters.

Prot Soort= Soorten die vastgesteld zijn met protocolonderzoek.

Prot Func= Functie van de verblijfplaats zoals deze is vastgesteld door middel van protocolonderzoek.

Keutel #= Aantal gevonden keutels.

Keutel gr.= Grootte van de verblijfplaats zoals ingeschat op basis van het aantal keutels. – betekend dat er geen conclusie getrokken kon worden omdat de locatie niet, of niet volledig geïnspecteerd kon worden.

Keutel s.= Soorten gevonden bij keutelonderzoek. Dikgedrukte soorten zijn bevestigd door middel van DNA analyse van de keutel. Overige soorten zijn schattingen op basis van uiterlijk.

Afkortingen soorten: gd= gewone dwergvleermuis; rd= ruige dwergvleermuis; mv= meervleermuis; lv= laatvlieger; tv= tweekleurige vleermuis; rs= rosse vleermuis.

Afkortingen verblijfplaatsen: pv= paarverblijfplaats; zv= zomerverblijfplaats; kv= kraamverblijfplaats.

Locatie	Stof	Lucht	Spons	Spons con.	Spons sc.	Spons Soort	Prot Soort	Prot Func	Keutel #	Keutel gr.	Keutel s.
Delfzijl_1	0	0	2	0	0				0	geen	
Delfzijl_2	6	0	12	4030	1	gd, rd			0	geen	
Delfzijl_3	7	0	10	36	0				0	-	
Delfzijl_4	0	11	4	28	0				0	geen	
Delfzijl_5			11	72	0				0	geen	
Delfzijl_6	0	0	12	4449	1	gd			0	-	
Delfzijl_7	0	1	5	44	0				0	geen	
Delfzijl_8	5	0	12	69	0		gd	pv	5-10	klein	dwerg sp.
Delfzijl_9	0	0	12	168	1	gd	gd	zv	1-5	klein	gd
Delfzijl_10	0	0	12	3010	1	gd	gd	zv	10-20	klein	gd, rd, lv
Delfzijl_11	0	0	10	66	0				1-5	klein	gd
Delfzijl_12	0	5	12	200	1	gd, rd			0	-	
Delfzijl_13	0	0	12	231	1	gd			0	-	
Delfzijl_14	4	0	11	151	1	gd			0	geen	
Delfzijl_15	12	0	12	47829	1	gd			100-500	groot	gd
Delfzijl_16	7	0	12	1517	1	gd, rd	gd	pv & zv	10-20	klein	gd, rg, mv
Delfzijl_17	2	0	12	35635	1	gd	gd	zv	100-500	groot	gd, rg, lv
Doornenburg	0	0	1	106	0				0	geen	
Leerdam_1			12	1907	1	lv, rv, rd, gd	lv, gd	zv	50-100	klein	gd
Leerdam_2			11	13844	1	gd, rd			0	-	
Leerdam_3			12	43768	1	rd			50-100	klein	gd
Leerdam_4			12	11749	1	gd, rd	rd	pv	1-5	klein	gd
Leerdam_5			12	6073	1	gd			50-100	klein	gd
Leerdam_6			12	93558	1	gd, rd			0	geen	
Leerdam_7			12	287577	1	rd			50-100	klein	gd
Leerdam_8			12	1769	1	gd	gd	zv	0	geen	
Leerdam_9			12	7838	1	gd	gd	zv	50-100	klein	gd
Leerdam_10			12	748	1	gd, rd, lv			1-5	klein	rd
Rosmalen_1	0	0	3	10	0				0	geen	
Rosmalen_2	0	0	1	30	0				0	geen	
Rosmalen_3		0	12	223	1	gd			1-5	klein	dwerg sp.
Rosmalen_4			12	32	1	gd			0	geen	
Rosmalen_5			0	0	0				1-5	klein	dwerg sp.
SchijndeL1			0	0	0				0	geen	
SchijndeL2			9	4	0		lv	zv	50-100	klein	gd
SchijndeL3			12	9867	1	gd, rd, tv	lv	zv	1-5	klein	dwerg sp.
SchijndeL4			0	0	0				0	geen	
SchijndeL5			12	17	0				0	geen	
SchijndeL6			12	9630	1	gd			0	geen	
SchijndeL7			12	20659	1				1-5	klein	gd, rd
SchijndeL8			0	0	0				0	geen	
SchijndeL9			0	0	0				0	geen	
SchijndeL10			12	673	1	gd, rd			1-5	klein	gd, rd
SchijndeL11			12	53847	1	gd			0	geen	
SchijndeL12			12	1115	1	gd	gd	pv & zv	1-5	klein	dwerg sp.

Locatie	Stof	Lucht	Spons	Spons con.	Spons sc.	Spons Soort	Prot Soort	Prot Func	Keutel #	Keutel gr.	Keutel s.
Schijndel_13			12	2103	1	gd	gd	pv	1-5	klein	gd
Schijndel_14			12	4485	1	gd	gd	zv	50-100	klein	gd
Sint-Dedenrode_1			8	30	0				50-100	klein	rd
Sint-Dedenrode_2			2	17	0				0	geen	
Sint-Dedenrode_3			11	2	0				0	geen	
Sint-Dedenrode_4			12	4	0		gd	zv	100-500	groot	dwerg sp.
Sint-Dedenrode_5			12	39	0				1-5	klein	dwerg sp.
Sint-Dedenrode_6			4	0	0				0	geen	
Sint-Dedenrode_7			12	205	1	gd	gd	zv	100-500	groot	gd
Doorn_1	11	4	12	623	1	gd			1-5	klein	gd
Doorn_2	12	12	12	75658	1	gd			100-500	groot	gd
Doorn_3	12	12	12	1074778	1	gd			100-500	groot	gd
Doorn_4	12	12	12	3568	1	gd			100-500	groot	gd
Doorn_5	12	0	3	4	0				100-500	groot	gd
Doorn_6	9	0	12	612	1	gd	gd	kv	5-10	klein	gd
Baarlo_1	0	0	12	30732	1	gd	gd	pv & zv			
Baarlo_2	0	0	12	742	1	gd	gd	pv			
Echt_1	0	0	12	7202879	1	gd	gd	zv			
Echt_2	0	2	12	194354	1	gd	gd	zv			
Echt_3	0	1	12	7402	1	gd	gd	zv			
Echt_4	0	0	12	5757652	1	gd	gd	zv			
Echt_5	0	0	12	15886	1	gd, rd	lv	zv			
Posterholt_1	0	0	12	6260	1	gd	gd	zv			
Posterholt_2	10	0	10	10	0		gd	pv & zv			
Sint Odiliënberg_1	9	1	12	634	1	gd	gd	pv & zv			
Sint Odiliënberg_2	0	0	12	1513	1	gd	lv	zv			
Sint Odiliënberg_3	0	0	12	183392	1	gd, rd	lv	kv			
Steenwijk_1			11	1562	1	rv	rv	kv			
Steenwijk_2			12	17735	1	rv	rv	kv			
Steenwijk_3			12	199445	1	rv, rd	rv	pv			
Steenwijk_4			12	1171	1	rv	rv	kv			
Steenwijk_5			12	44278	1	rv	rv	kv			
Den Bosch 1	0	0	1	30	0						
Den Bosch 2	0	0	3	41	0						
Den Bosch 3	0	0	4	5	0						
Den Bosch 4	0	0	0		0						
Appingedam_34	0	0	0		0						
Appingedam_35	0	0	0		0						
Appingedam_36	0	0	0		0						
Appingedam_37	0	0	0		0						

Bijlagen 10. Overzicht van de uitkomsten van de bemonsteringen in Appingedam.

Locatie	Type object	Aantal positieve qPCR replica's uit 12			DNA concentratie sponsmonsters (moleculen/mL template)
		Spons	Stof	Lucht	
Appingedam_1	Hoekwoning	1	0	0	512
Appingedam_2	Tussenwoning	0	0	0	
Appingedam_3	Tussenwoning	0	0	0	
Appingedam_4	Tussenwoning	0	0	0	
Appingedam_5	Tussenwoning	0	0	0	
Appingedam_6	Tussenwoning	0	0	0	
Appingedam_7	Hoekwoning	0	0	2	
Appingedam_8	Hoekwoning	1	0	0	85
Appingedam_9	Tussenwoning	0	12	12	
Appingedam_10	Tussenwoning	1	0	0	
Appingedam_11	Tussenwoning	0	0	0	
Appingedam_12	Tussenwoning	0	0	0	
Appingedam_13	Tussenwoning	0	0	0	
Appingedam_14	Hoekwoning	8	0	0	69
Appingedam_15	Hoekwoning	0	0	0	
Appingedam_16	Tussenwoning	8	0	0	79
Appingedam_17	Tussenwoning	0	0	0	
Appingedam_18	Tussenwoning	0	0	0	
Appingedam_19	Tussenwoning	1	1	0	
Appingedam_20	Tussenwoning	0	1	0	
Appingedam_21	Tussenwoning	0	0	0	
Appingedam_22	Tussenwoning	1	0	0	
Appingedam_23	Tussenwoning	0	0	0	
Appingedam_24	Tussenwoning	1	0	0	
Appingedam_25	Tussenwoning	4	0	0	
Appingedam_26	Tussenwoning	2	0	0	80
Appingedam_27	Hoekwoning	5	0	0	59
Appingedam_28	Appartementencomplex	12	0	0	96317
Appingedam_29	Appartementencomplex	5	0	0	5
Appingedam_30	Appartementencomplex	1	0	0	5
Appingedam_31	Appartementencomplex	3	0	0	5
Appingedam_32	Appartementencomplex	2	0	0	46
Appingedam_33	Appartementencomplex	0	0	0	