

eDNA als methode voor het detecteren van vleermuisverblijven

Hulpmiddel bij het isoleren van woningen getest
Versnellingsteam eDNA Vleermuis-vriendelijk Isoleren

Versie 2

24 september 2024

Contactpersoon

ARCADIS
Team Stadsnatuur

Arcadis Nederland B.V.
Postbus 264
6800 AG Arnhem
Nederland

Inhoudsopgave

1	Inleiding	5
1.1	Problematiek	5
1.2	Mogelijkheid vooronderzoek door isolatiebranche	5
1.3	Test eDNA bemonstering in spouwmuren	5
2	Opzet onderzoeken	7
2.1	Onderzoeksmethodieken	7
2.1.1	Bemonstering eDNA	7
2.1.2	Protocolonderzoek vleermuizen	7
2.2	Gefaseerd onderzoek naar toepassing eDNA	8
2.2.1	Fase 1: Onderzoek naar wijze van bemonstering	8
2.2.2	Fase 2: Bemonstering van 100 woningen	8
3	Onderzoeksresultaten	10
3.1	Fase 1: test bemonsteringsmethoden	10
3.1.1	Protocolonderzoek	10
3.1.2	Bemonstering eDNA	10
3.2	Fase 2: bemonstering van 100 woningen	11
3.2.1	Protocolonderzoek	11
3.2.2	Bemonstering eDNA	13
4	Analyse resultaten en conclusies	17
4.1	Vergelijking bemonsteringsmethodes eDNA	17
4.1.1	Vergelijking eDNA met protocolonderzoek (fase 1)	17
4.1.2	Selectie bemonsteringsmethode eDNA	17
4.2	Validatie vooronderzoek met eDNA	17
4.2.1	Vergelijking eDNA met protocolonderzoek (fase 1 en 2)	17
4.2.2	Validatie eDNA bemonstering	18
4.2.3	Dichtheid woningen met vleermuisverblijven	18

5	Conclusie, foutendiscussie en kennishiaten	19
5.1	Conclusie	19
5.2	Foutendiscussie	21
5.2.1	Vergelijking resultaten andere eDNA-studies	21
5.2.2	Interpretatie protocolonderzoek	21
5.2.3	Missen van verblijfplaatsen	21
5.3	Kennishiaten	21
5.3.1	Houdbaarheid eDNA	21
5.3.2	Volledigheid meting van soorten	23
6	Referenties	24
	Bijlagen	25
	Bijlage A. Samenstelling versnellingsteam	25
	Bijlage B. Overzicht van resultaten protocolonderzoek en eDNA-analyse.	25
	Bijlage C. Technische details van bemonstering en analyse	26
	Colofon	288

1 Inleiding

1.1 Problematiek

Binnen de Omgevingswet (voorheen Wet natuurbescherming) is het verstoren en doden van vleermuizen verboden. Het verdwijnen van verblijfplaatsen van vleermuizen is slechts toegestaan indien compenserende en mitigerende maatregelen worden genomen. Het gaat daarbij enerzijds om maatregelen om het doden en verstoren van vleermuizen te voorkomen, bijvoorbeeld door te werken buiten de kritische periode. Anderzijds gaat het om het aanbieden van alternatieve verblijfplaatsen.

Op dit moment worden woningen op grote schaal geïsoleerd waaronder het na-isoleren van spouwmuren. Het is bekend dat vleermuizen veelvuldig gebruik maken van deze ruimte om te verblijven. Binnen de huidige praktijk is het lastig om rekening te houden met beschermde vleermuizen en te voldoen aan de natuurwet- en regelgeving voor de isolatiebranche. Door de isolatie kunnen vleermuisverblijven verdwijnen. Ook is het mogelijk dat de ingangen naar andere verblijfplaatsen in een woning ontoegankelijk worden. Hierdoor kunnen vleermuizen hun verblijfplaatsen verliezen en populaties snel afnemen. Sommige isolatiematerialen kunnen daarnaast schadelijke chemicaliën bevatten voor vleermuizen als ze hiermee in direct contact komen. Vleermuizen kunnen deze stoffen per ongeluk innemen of opnemen, wat kan leiden tot gezondheidsproblemen of zelfs sterfte. Het risico op het doden en verstoren van vleermuizen is het grootst tijdens de kraamperiode en de winterslaapperiode. In de praktijk is er slechts een korte periode in de nazomer waar dit risico klein is.

1.2 Mogelijkheid vooronderzoek door isolatiebranche

Voordat er geïsoleerd kan worden, dient er eerst altijd onderzoek naar vleermuizen gedaan te worden. Als er daadwerkelijk vleermuisverblijven aanwezig zijn, zal een mitigatieplan opgesteld moeten worden. Hiervoor moet vervolgens een vergunning worden aangevraagd. Dit is een kostbare en tijdrovende aanpak die lastig is voor de isolatiebranche. Om gedurende het jaar meer ruimte en flexibiliteit te creëren voor de isolatiebranche is het wenselijk om gebruik te kunnen maken van vooronderzoek. Als hieruit blijkt dat geen vleermuisactiviteit aanwezig is in de spouwmuur, is strikt genomen geen sprake van overtreding van de Omgevingswet. Op dit moment wordt hard gewerkt aan innovatieve onderzoeksmethoden, waaronder het bemonsteren van eDNA in spouwmuren. Het versnellingsteam Vleermuis Vriendelijk Isoleren heeft Unitura verzocht om deze veelbelovende methodiek nader te onderwerpen aan een test. Deze methode heeft dan als voordeel dat die het gehele jaar kan worden ingezet en binnen enkele dagen uitsluitsel kan geven. Een ander voordeel is dat de methode systematisch kan worden ingezet en niet afhankelijk is van de beschikbaarheid van deskundige ecologen.

1.3 Test eDNA bemonstering in spouwmuren

In opdracht van het versnellingsteam Vleermuis Vriendelijk Isoleren (zie pagina 24 voor de deelnemende partijen) zijn drie methoden getest om door middel van eDNA de aanwezigheid van -en daarmee het gebruik door- vleermuizen in woningen te detecteren. De locaties voor de onderzoeken zijn beschikbaar gesteld door woningbouwcorporaties Wold & Waard, Wooninc, Goed Wonen en Leystromen. De test bestond uit de volgende twee onderzoeksfasen:

- Fase 1: testen van de potentie van verschillende bemonsteringsmethoden. In totaal zijn 10 woningen in Gemert en Geldrop bemonsterd volgens 3 methoden. Al deze woningen bevatten volgens het protocolonderzoek een verblijfplaats van vleermuizen. Er zijn controles uitgevoerd die wel het gehele behandelingsproces hebben ondergaan (o.a. om contaminatie van monsters te kunnen uitsluiten) maar niet in contact geweest zijn met de woningen.
- Fase 2: praktijktest van bemonstering van 100 woningen (fase 2), waarvan 50 in de woonkernen Gemert en Geldrop en 50 in de woonkernen Leek en Zuidhorn. De bemonstering en analyse in Fase 2 zijn blind uitgevoerd. Bij het analyseren van de monsters was niet bekend wat de resultaten uit het protocolonderzoek voor de betreffende woning waren.

Bij het bemonsteren van eDNA zijn twee onderzoeksbureaus betrokken. Beide onderzoeksbureaus hanteren hun eigen protocollen voor detectie van eDNA. Bij de bemonstering van de woningen zijn de volgende methoden gebruikt:

- Methode 1 van SGS (Société Générale de Surveillance): bemonstering van de muur rond openingen die geschikt kunnen zijn als toegang tot een vleermuisverblijf met een roller. Deze methode is kansrijk en daarom in fase 2 nader onderzocht.
- Methode 2 van SGS: aan de onderzijde afzuigen van de spouw. Deze methode is in Fase 1 getest, maar gaf onvoldoende resultaten. Deze methode is in Fase 2 niet meer toegepast.
- Methode 3 van Unitura & Sylphium (Sylphium Molecular Ecology): bemonstering van alle openingen van een woning waar een vleermuisverblijf achter aanwezig kan zijn door middel van het gericht afzuigen van lucht door de openingen. Deze methode is kansrijk en daarom in fase 2 nader onderzocht.

Ter controle is ook vleermuisonderzoek uitgevoerd volgens het Vleermuisprotocol. Het protocolonderzoek is uitgevoerd door Staro (in de woonkernen Gemert en Geldrop) en Biota (in de woonkernen Leek en Zuidhorn).

Arcadis heeft vervolgens de ecologische validatie (test) uitgevoerd waarbij de resultaten onderling zijn vergeleken. In onderhavig rapport worden de resultaten besproken. Deze resultaten zijn en worden gedeeld met RVO en het ministerie van BZK om te kunnen bezien of het mogelijk is om deze nieuwe onderzoeksmethodiek in te bedden de ecologische en juridische werkprotocollen voor de isolatiebranche.

2 Opzet onderzoeken

2.1 Onderzoeksmethodieken

2.1.1 Bemonstering eDNA

Het onderzoek naar DNA van vleermuizen in en op gebouwen (het zogenaamde eDNA, environmental DNA) heeft de afgelopen 10 jaar een grote vlucht genomen. Alle in Nederland voorkomende vleermuissoorten kunnen met een eDNA-analyse gedetecteerd worden. Hierbij wordt DNA in lucht, in stof of op muren verzameld en opgeslagen en vervolgens in het laboratorium geanalyseerd. Bij vleermuizen rond woningen kan het gaan om DNA in materiaal dat ze achterlaten bij en in de verblijfplaatsen in de woningen, zoals haren, poepjes, huidschilfers of speeksel. Verder kan dit DNA zich hechten aan stofdeeltjes waardoor ook in de lucht en in stof onder in de spouw eDNA van vleermuizen aangetroffen zou kunnen worden.

Het is nog de vraag hoe de woningen bemonsterd moeten worden om zo goed mogelijk de aanwezige eDNA op te vangen. Vervolgens is het ook de vraag welke analysemethode de beste resultaten geeft. De bemonstering van eDNA op woningen kan in theorie op de volgende vijf manieren worden uitgevoerd. Binnen deze studie (test) zijn enkel bemonstering 3, 4 en 5 toegepast.

1. Verzamelen van poepjes waarin DNA van de vleermuizen aanwezig is;
2. Deppen van de muren met een spons bij mogelijke in- en uitvliegopeningen;
3. **Met een roller opnemen van deeltjes op de muur bij mogelijke in- en uitvliegopeningen;**
4. **Zuigen van lucht vanuit de spouw bij mogelijke in- en uitvliegopeningen;**
5. **Opzuigen van de lucht uit de spouw van onderuit door ventilatiegaten.**

Over de verdere analyse van de eDNA monsters kan het volgende gemeld worden:

- PCR (Polymerase Chain Reaction) is de techniek om specifieke stukjes DNA te vermenigvuldigen. Het proces omvat een reeks verwarmings- en koelcycli en DNA-polymerase om het DNA miljoenen keren te dupliceren, waardoor minieme hoeveelheden DNA in miljarden kopieën worden omgezet. Hierdoor wordt het DNA beter detecteerbaar;
- Bij qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) wordt, net als bij PCR, gebruik gemaakt van warmte en DNA-polymerase om DNA-strengen te denatureren en te repliceren. qPCR onderscheidt zich echter door de amplificatie in realtime te monitoren. Het reactiemengsel van qPCR bevat fluorescerende kleurstoffen die interkristalliseren met geamplificeerd DNA en fluorescentie geven die evenredig is met de hoeveelheid gesynthetiseerd DNA. Naarmate de reactie vordert, wordt er meer DNA gesynthetiseerd en neemt de fluorescentie toe. De intensiteit van de fluorescentie wordt bij elke cyclus gemeten en uitgezet tegen het aantal cycli, waardoor de oorspronkelijke hoeveelheid DNA kan worden gekwantificeerd. (Bron: beatcancer.eu);
- Daarnaast bestaat de mogelijkheid om met zogenaamde meta-barcoding het DNA op soort te brengen. Met deze methode zijn bijvoorbeeld meerdere soorten in kerkzolders aangetoond op basis van eDNA in poepjes (Van den Tempel & Veldhuijzen Van Zanten, 2020). We gaan ervan uit dat deze analyse ook mogelijk is met de eDNA monsters die met andere methodieken zijn verkregen.

2.1.2 Protocolonderzoek vleermuizen

Het protocolonderzoek naar gebouwbewonende vleermuizen is uitgevoerd volgens het laatste vleermuisprotocol (NGB, 2021). Het onderzoek is uitgevoerd door Biota Advies (in Leek en Zuidhorn) en Staro (in Geldrop en Gemert). Afwijkend ten opzichte van het vleermuisprotocol is dat er enkel voorjaarsonderzoek is uitgevoerd en geen najaarsonderzoek. Hiermee zijn alleen de zomer- en kraamverblijfplaatsen vastgesteld en geen paarverblijven. Daardoor kunnen verblijven zijn gemist.

2.2 Gefaseerd onderzoek naar toepassing eDNA

2.2.1 Fase 1: Onderzoek naar wijze van bemonstering

Het doel van Fase 1 was om op basis van de resultaten een selectie te maken van één of twee vergelijkbare bemonsteringsmethoden. Om de verschillende manieren van bemonstering te testen, is gebruik gemaakt van reeds uitgevoerde onderzoeken volgens het Vleermuisprotocol. De woningen betroffen 9 woningen in Geldrop en Gemert waarin door Staro in 2024 middels protocolonderzoek een verblijfplaats van vleermuizen was vastgesteld. 1 woning bevond zich in Hilvarenbeek waar in 2023 door Teia (in opdracht van Leystromen) een verblijf met 15 uitvliegende gewone dwergvleermuizen was vastgesteld. Gebruik in 2024 is hiervan niet bekend.

Bij het bemonsteren van deze woningen op eDNA zijn twee onderzoeksbureaus betrokken. Beide onderzoeksbureaus hanteren hun eigen protocollen voor detectie van eDNA. Bij de bemonstering van de woningen zijn de volgende methoden gebruikt:

- Methode 1 van SGS (Société Générale de Surveillance): bemonstering van de muur rond openingen die geschikt kunnen zijn als toegang tot een vleermuisverblijf met een roller. Deze methode is kansrijk en daarom in fase 2 nader onderzocht. In het rapport wordt deze methode afgekort tot 'SGS1-Roller';
- Methode 2 van SGS: aan de onderzijde afzuigen van de spouw. Deze methode is in Fase 1 getest, maar gaf onvoldoende resultaten. Deze methode is in Fase 2 niet meer toegepast. In het rapport wordt deze methode afgekort tot 'SGS1-SR Filter';
- Methode 3 van Unitura & Sylphium (Sylphium Molecular Ecology): bemonstering van alle openingen van een woning waar een vleermuisverblijf achter aanwezig kan zijn door middel van het gericht afzuigen van lucht door de openingen. Deze methode is kansrijk en daarom in fase 2 nader onderzocht. In het rapport wordt deze methode afgekort tot 'Uni-Syl'.

Resultaten met uitkomst 'Inconclusive' (SGS) zijn opgevat als negatief (onvoldoende bewijs voor aanwezigheid van vleermuizen). De overeenkomsten tussen de methoden is getest met de McNemar-test voor 2x2 contingency-tabellen (tweezijdig) uit het python-pakket Statsmodels.

2.2.2 Fase 2: Bemonstering van 100 woningen

Het doel van Fase 2 was om voldoende woningen te bemonsteren op eDNA om een goede vergelijking te kunnen maken tussen protocolonderzoek en de eDNA-methoden. Het gaat om een praktijktest waarbij 50 in de woonkernen Gemert en Geldrop en 50 in de woonkernen Leek en Zuidhorn zijn bemonsterd en vergeleken met resultaten van protocolonderzoek.

Het protocolonderzoek is uitgevoerd door de ecologisch adviesbureaus Bureau Biota Ecologisch Advies en Educatie (woonkernen Leek en Zuidhorn) en Staro Natuur en Buitengebied (woonkernen Geldrop en Gemert). Afwijkend ten opzichte van het vleermuisprotocol is dat er enkel voorjaarsonderzoek is uitgevoerd en geen najaarsonderzoek. Hiermee zijn alleen de zomer- en kraamverblijfplaatsen vastgesteld en geen paarverblijven. Daardoor kunnen verblijven zijn gemist. De resultaten van het protocolonderzoek zijn door Arcadis gescand op correctheid van de conclusies uit die onderzoeken. Daarbij is met name gekeken naar de conclusies met betrekking tot een verblijfplaats. Gevallen waarbij een mogelijk verblijf werd geconcludeerd zijn niet als verblijf aangemerkt. Dit betrof waarnemingen als 'kwam daarvandaan vliegen', of 'aantikken, maar niet invliegen' of 'baltsend, volgens de buurman vaak zien invliegen'. Waarnemingen door buitenstaanders (bewoners) vormen geen standaard onderdeel van protocolonderzoek. In het gebruikte protocolonderzoek is niet gebruik gemaakt van uitvliegtellingen om eenmalige waarnemingen te bevestigen.

Uit de 329 woningen die met het protocolonderzoek door Biota en Staro zijn onderzocht - en waarvan de resultaten voor dit onderzoek beschikbaar zijn gesteld - is een selectie gemaakt van 100 woningen (25 in elke woonplaats) voor de eDNA bemonstering. Daarnaast zijn 12 adressen meegenomen waar volgens het protocolonderzoek verblijven zijn aangetroffen. In Leek en Zuidhorn is de bemonstering uitgevoerd door Unitura (met het stofzuigeren van gevelopeningen, methode 2 uit Fase 1) en zijn de monsters geanalyseerd door Sylphium. In Geldrop en Gemert is de bemonstering uitgevoerd door SGS (met het bemonsteren van oppervlakten met een roller, methode 3 uit Fase 1) en is ook door SGS de eDNA-analyse gedaan. Zie figuur 1 voor een voorbeeld van de bemonstering van een gevel in Zuidhorn.

Resultaten met uitkomst 'Inconclusive' (SGS) zijn opgevat als negatief (onvoldoende bewijs voor aanwezigheid van vleermuizen). Het onderzoek is blind uitgevoerd. Dit betekent dat de onderzoekers van de verschillende onderzoeksmethoden geen inzicht hebben gekregen in de onderzoeksresultaten tijdens het veldonderzoek. Hiermee is voorkomen dat de resultaten onderling zijn beïnvloed. De overeenkomsten tussen de methoden is getest met de McNemar-test voor 2x2 contingency-tabellen uit het python-pakket Statsmodels.



Figuur 1 Voorbeeld van de bemonstering (blauwe lijnen) door Unitura met een roller op de potentiële in- en uitvliegopeningen van een woning. Links: voorgevel; rechts: kopgevel. Adres: 5.1.2.e, Zuidhorn.

3 Onderzoeksresultaten

3.1 Fase 1: test bemonsteringsmethoden

3.1.1 Protocolonderzoek

Om de verschillende manieren van bemonstering te testen, is gebruik gemaakt van reeds uitgevoerde onderzoeken volgens het Vleermuisprotocol. De woningen betroffen 9 woningen in Geldrop en Gemert waarin door Staro in 2024 middels protocolonderzoek van tevoren een verblijfplaats van vleermuizen was vastgesteld. 1 woning bevond zich in Hilvarenbeek waar in 2023 door Teia (in opdracht van Leystromen) een verblijf met 15 uitvliegende gewone dwergvleermuizen was vastgesteld. Gebruik in 2024 is hiervan niet bekend.

Tabel 1 Resultaten protocolonderzoek. Verblijfplaats: ingevuld als naar oordeel van auteur ook werkelijk een verblijfplaats is aangetoond. ZV=zomerverblijf; Kraam=kraamverblijf. Van Staro zijn de aanvullende opmerkingen bij de waarnemingen nog niet ontvangen.

Woonplaats	Adres	Datum	Soort	Gedrag/ opmerking	Verblijf	Locatie	In kast	Bron
Geldrop	5.1.2.e	26-6-2024	Gewone dwergvleermuis	pm	ZV	Tussen dakoverstek en muur		Data Staro
Geldrop		26-6-2024	Gewone dwergvleermuis		ZV	4e of 5e randpan rechts van schoorsteen		Data Staro
Geldrop		26-6-2024	Gewone dwergvleermuis		ZV	3e of 4e dakpan, geteld van de schoorsteen naar rechts		Data Staro
Gemert		28-6-2024	Gewone dwergvleermuis		ZV	Kwam onder dakgoot uit		Data Staro
Gemert		28-6-2024	Gewone dwergvleermuis		ZV	Kwam onder dakgoot uit		Data Staro
Gemert		27-6-2024	Gewone dwergvleermuis		ZV	Onder randpan		Data Staro
Gemert		27-6-2024	Gewone dwergvleermuis		ZV	Opening tussen gevel en dakoverstek		Data Staro
Gemert		27-6-2024	Gewone dwergvleermuis		ZV	Verspreid over kopgevel 3 verblijfplaatsen, bij hoek kopgevel met voorgevel onder loodslab, onder randpannen links van schoorsteen en onder vijfde randpan van rechtsonder hoek kopgevel		Data Staro
Gemert		27-6-2024	Gewone dwergvleermuis		ZV	Onder vensterbank linkerraam		Data Staro
Hilvarenbeek			1-7-2023	Gewone dwergvleermuis	15 ex Uitvliegend	Kraam	Woning	

3.1.2 Bemonstering eDNA

Tabel 1el 2 geeft de resultaten van de verschillende bemonsteringsmethoden bij de 10 woningen waar verblijfplaatsen van vleermuizen zijn vastgesteld tijdens protocolonderzoek.

Tabel 1 Resultaten van de eDNA-analyses van Fase 1. Soort PO: in de woning vastgesteld verblijfplaats met protocolonderzoek Soort eDNA: soort op basis van eDNA (met tussen haakjes het aantal afgelezen DNA-moleculen); GD: gewone dwergvleermuis, LV: Laatvlieger. Aantal dieren: aantal in- of uitvliegende vleermuizen bij het verblijf. Getallen bij de methode geeft de uitslag van de eDNA-analyse: 1: vleermuizen aanwezig; o: geen vleermuizen aanwezig. Incl*: resultaat was 'inconclusive' (niet voldoende duidelijk).

Woonplaats	Adres	Soort PO	Aantal dieren	SGS1 – Roller	SGS2 – SR Filter	Uni-Syl	Soort eDNA
Geldrop	5.1.2.e	GD	pm	1	0	1	GD (41244)
Geldrop		GD	pm	1	0	1	GD (12317)
Geldrop		GD	pm	0	0	0	-
Gemert		GD	pm	1	0	1	GD (22534) LV (262)
Gemert		GD	pm	1	0	1	GD (65997)
Gemert		GD	pm	1	0	1	GD (1287)
Gemert		GD	pm	1	0	1	GD (72657) LV (2368)
Gemert		GD	pm	1	0	0	GD (35991)
Gemert		GD	pm	1	0	1	GD (1587)
Hilvarenbeek		GD	15 (2023)	Incl*	1	1	-

Pm: informatie over het aantal dieren volgt nog

De methode SGS1–Roller en Unitura-Sylphium gaven in 80% van de gevallen een positieve score, omdat 8 van de 10 vleermuisverblijven ook zijn vastgesteld met eDNA-bemonstering. De methode SGS2–SR Filter gaf in 10% (1 van de 10 vleermuisverblijven) van de gevallen een correcte score.

Met betrekking tot de resultaten kan het volgende opgemerkt worden:

- Alleen bij de 5.1.2.e geven alle 3 de methoden een negatief resultaat.
- Er is momenteel geen nadere informatie beschikbaar over het protocolonderzoek ter plekke en de specifieke waarnemingen, zodat verdere interpretatie niet mogelijk is.
- Het resultaat van Sylphium bij de 5.1.2.e in Hilvarenbeek gaf een overtuigende score van 12700 DNA-moleculen, terwijl het resultaat van SGS inconclusive was (maar wel met een DNA Yield van 157).
- Bij de 5.1.2.e in Geldrop scoorden alle methode negatief. Informatie over de waarneming van vleermuizen ter plaatse ontbreekt nog. De waarneming is mogelijk minder betrouwbaar als zekere verblijfplaats (opm. 5.1.2.e van Staro).
- Bij de 5.1.2.e Hilvarenbeek scoorde alleen de methode SGS 1–roller niet goed: het resultaat was 'inconclusive'. Volgens degene die de analyse heeft uitgevoerd had dit te maken met de fluorescentie die niet goed meetbaar was. Opvallend is dat de controle door SGS op een monster van Sylphium wel positief scoorde (wel eDNA aanwezig). Blijkbaar is de monsternamen met de roller hier niet goed gegaan. Dit adres is daarom buiten de verder analyse gelaten. Dat betekent dat in fase 1 uiteindelijk negen verblijfplaatsen zijn gecontroleerd op eDNA.

3.2 Fase 2: bemonstering van 100 woningen

3.2.1 Protocolonderzoek

Van de adressen waar protocolonderzoek is gedaan zijn 100 adressen geselecteerd, waarvan 50 in Geldrop en Gemert en de andere 50 in Leek en Zuidhorn. Daarvan waren 12 adressen met een vleermuisverblijf volgens het protocolonderzoek, waarvan 1 in Geldrop, 6 in Leek en 5 in Zuidhorn.

Tabel 3 Resultaten protocolonderzoek. Verblijfplaats: ingevuld als naar oordeel van auteur ook werkelijk een verblijfplaats is aangetoond. ZV=zomerverblijf; Kraam=kraamverblijf. Van Staro zijn de aanvullende opmerkingen bij de waarnemingen nog niet ontvangen.

Woonplaats	Adres	Datum	Soort	Gedrag	Opmerkingen	Verblijf	Locatie	In kast	Bron
Leek	5.1.2.e	2-7-2024	Gewone dwergvleermuis	Uitvliegend	bij kantpannen	ZV	noord kopgevel		Data Biota
Leek		5-7-2024	Gewone dwergvleermuis	uit richting zien komen	mogelijke verblijfplaats. uit die richting zien komen. bewoner beweert ook dat er een verblijf zit	ZV	gebouw (in spouwmuur), west kopgevel		Data Biota
Leek		18-6-2024	Gewone dwergvleermuis	uitvliegend		ZV	gebouw (onder dakbedekking), west kopgevel		Data Biota
Leek		14-6-2024	Gewone dwergvleermuis	aantikken	vleerbezoek 2O, aantikken	ZV	gebouw (algemeen), zuid kopgevel		Data Biota
Leek		14-6-2024	Gewone grootvleermuis	rondvliegend	vleerbezoek 2O, mogelijk verblijf, exact verblijf onbekend	ZV	onbepaald, west voorzijde		Data Biota
Leek		20-6-2024	Gewone dwergvleermuis	aantikken	aantikken, onzeker, ook foeragerend rondom gebouw	ZV	gebouw (onder dakbedekking), noord kopgevel		Data Biota
Leek		23-5-2024	Gewone dwergvleermuis	uitvliegend	vermoedelijk	ZV	gebouw (algemeen), noord kopgevel		Data Biota
Zuidhorn		28-6-2024	Gewone dwergvleermuis	uitvliegend		ZV	vleermuiskast, oost kopgevel; Tussenwoning	Ja	Data Biota
Zuidhorn		31-5-2024	Gewone dwergvleermuis	invliegend	2 waarnemingen op dit adres	ZV	gebouw (onder dakbedekking), oost kopgevel		Data Biota
Zuidhorn		5-7-2024	Gewone dwergvleermuis	aantikken	aantikker bij ramen	ZV	gebouw (achter vensterluik), west kopgevel		Data Biota
Zuidhorn		5-7-2024	Gewone dwergvleermuis	invliegend	4-6-2024: leek in te vliegen onder kantpannen net boven waar klimop eindigt, 2x waargenomen; 5-7-2024: 5 zwermers, 1 duidelijke uitvlieger	ZV	west kopgevel		Data Biota
Zuidhorn		30-5-2024	Ruige dwergvleermuis	baltzend rond-vliegen	Bewoner heeft vleermuis op meerdere momenten in en uit zien vliegen samen met een vriend met batdetector. Hij woont er elke zomer, ze hoort hem ook vaak vanaf haar slaapkamer bij muur. Ook baltzend/"vechtend"	ZV	gebouw (in spouwmuur), west kopgevel		Data Biota
Geldrop			Laatvlieger			ZV	Onder loodslab bij schoorsteen		Data Staro
Geldrop			Gewone dwergvleermuis			ZV	onder randpan rechts van schoorsteen		Data Staro

3.2.2 Bemonstering eDNA

In Fase 2 zijn 100 woningen bemonsterd met de eDNA-methoden (Tabel 2 tabel 3). Hiervan zijn er 3 afgevallen omdat de bewoners geen toestemming gaven voor het onderzoek (rood gemarkeerde tekst in tabel). Hier heeft geen bemonstering plaatsgevonden (GB). Bij 4 woningen waren vleermuiskasten aan de buitenzijde geplaatst (eveneens rood aangegeven in tabel). Omdat niet duidelijk was welk deel van de muur bemonsterd is, en of door de eventuele aanwezigheid van vleermuizen in de kasten sporen op de muren konden zijn achtergelaten, zijn ook deze woningen weggelaten uit de resultaten. Resteert dus 93 woningen in Fase 2 die in aanmerking komen voor verdere analyse.

In totaal zijn in de 100 woningen in totaal 46 keer eDNA-sporen van vleermuizen aangetroffen, waarvan 18 met de methode van SGS in Geldrop en Gemert en 28 met de methode Unitura-Sylphium in Leek en Zuidhorn. Binnen de 93 woningen die resteren voor de verdere analyse zijn in 43 woningen eDNA-sporen waargenomen.

Bij het protocolonderzoek zijn op 12 adressen een vleermuisverblijf vastgesteld, waarvan 1 in Geldrop, 6 in Leek en 5 in Zuidhorn. Rekening houdend met de woningen die zijn afgevallen, komt het totale aantal uit op 9 vleermuisverblijven. In 7 gevallen is op hetzelfde adres ook met eDNA-bemonstering een vleermuisverblijf vastgesteld (positieve score; blauw gemarkeerde tekst in de tabel). Op 2 adressen met een vleermuisverblijf heeft de eDNA-bemonstering geen vleermuisssporen opgeleverd (vals negatieve score). Andersom zijn op 36 adressen wel eDNA-sporen aangetroffen, maar heeft het protocolonderzoek geen vleermuisverblijf opgeleverd (vals positieve score).

Tabel 2 Resultaten van de eDNA-analyses van Fase 2. VMK: Vleermuiskast aanwezig. Soort PO: vleermuissoort op basis van in de woning vastgestelde verblijfplaats met protocolonderzoek, LV=laatvlieger, GD=gewone dwergvleermuis; GG=gewone grootoovleermuis, RD=ruige dwergvleermuis; Soort eDNA: soort op basis van eDNA (met tussen haakjes het aantal afgelezen DNA-moleculen); Aantal dieren: aantal in- of uitvliegende vleermuizen bij het verblijf. Getallen bij de methode geeft de uitslag van de eDNA-analyse: 1=vleermuizen aanwezig; 0=geen vleermuizen aanwezig; GB=geen bemonstering, en dus geen resultaat (kon niet bemonsterd worden doordat bewoner geen toestemming gaf). Inconcl=resultaat was 'inconclusive' (te onduidelijk om positieve dan wel negatieve conclusie aan te verbinden). Blauw gemarkeerde tekst: op dit adres vleermuisverblijf vastgesteld met zowel protocolonderzoek als eDNA-bemonstering.*

Woonplaats	Adres	Vleermuis kast	Soort PO	Aantal dieren	SGS1 – Roller	Uni-Syl	Soort eDNA
Geldrop	5.1.2.e				0		
Geldrop					0		
Geldrop					0		
Geldrop					0		
Geldrop					1		pm
Geldrop					1		Pm
Geldrop					1		Pm
Geldrop					1		Pm
Geldrop					1		Pm
Geldrop					0		
Geldrop					0		
Geldrop					1		Pm
Geldrop					1		Pm
Geldrop					0		
Geldrop					1		Pm
Geldrop					0		
Geldrop					1		Pm
Geldrop					1		Pm
Geldrop					0		
Geldrop					0		
Geldrop				1		Pm	

Geldrop	5.1.2.e			0		
Geldrop				GB		
Geldrop		LV	pm	GB		
Geldrop				GB		
Gemert				1		Pm
Gemert				0		
Gemert				0		
Gemert				0		
Gemert				0		
Gemert				0		
Gemert				1		Pm
Gemert				0		
Gemert				1		Pm
Gemert				0		
Gemert				0		
Gemert				Inconcl*		
Gemert				0		
Gemert				1		Pm
Gemert				Inconcl*		
Gemert				1		Pm
Gemert				1		Pm
Gemert				Inconcl*		
Gemert				1		Pm
Gemert				0		
Gemert				0		
Gemert				0		
Gemert				0		
Gemert				Inconcl*		
Gemert				0		
Leek					1	Pm
Leek					1	Pm
Leek					0	
Leek					1	Pm
Leek	VMK				1	Pm
Leek					0	
Leek					1	Pm
Leek		GD	1		1	Pm
Leek					0	
Leek		GD	1		1	Pm
Leek					0	
Leek					0	
Leek		GD	1		1	Pm
Leek		GG	1		0	
Leek					0	

5.1.2.e

Leek					0	
Leek					1	Pm
Leek					0	
Leek					1	Pm
Leek					1	Pm
Leek					1	Pm
Leek		GD	1		0	
Leek					1	Pm
Leek					0	
Leek		GD	1		1	Pm
Zuidhorn					1	Pm
Zuidhorn					1	Pm
Zuidhorn	VMK	GD	1		1	Pm
Zuidhorn					0	
Zuidhorn	VMK				1	Pm
Zuidhorn					0	
Zuidhorn					0	
Zuidhorn		GD	1		1	Pm
Zuidhorn		GD	1		1	Pm
Zuidhorn					0	
Zuidhorn					0	
Zuidhorn					0	
Zuidhorn					1	Pm
Zuidhorn	VMK	GD	1		0	
Zuidhorn					1	Pm
Zuidhorn					0	
Zuidhorn					1	Pm
Zuidhorn					1	Pm
Zuidhorn					1	Pm
Zuidhorn					1	Pm
Zuidhorn		RD	1		1	Pm
Zuidhorn					0	
Zuidhorn					0	
Zuidhorn					0	
Zuidhorn					1	Pm
Totaal	4 woningen met vloermuis-kasten	8 GD 1 RD 1 LV 1 GG		18 positief 25 negatief 4 inconcl 3 geen bemonstering	28 positief 22 negatief	

4 Analyseresultaten

4.1 Vergelijking bemonsteringsmethodes eDNA

4.1.1 Vergelijking eDNA met protocolonderzoek (Fase 1)

De overeenkomst tussen resultaten van de verschillende methoden zijn getest met de McNemar-test (Tabel 4). De methode van het rollen van de muur bij in- en uitvliegopeningen (SGS 1–SR Roller) en met de methode van het uitzuigen van de in- en uitvliegopeningen (methode Unitura-Sylphium) hebben sterke overeenkomst met het protocolonderzoek (sterk significant). Het leegzuigen van de spouw als bemonsteringsmethode is ook getest (methode SGS 2-SR Filter). De resultaten van deze methode wijken sterk af van de overige twee methoden (sterk significante afwijkend).

Tabel 3 Vergelijking van de overeenkomst in resultaten van de verschillende combinaties van bemonstering en analyse van eDNA in Fase 1. Weergegeven is de significantie (p-waarden) van de McNemar-test. NS: niet significant; *: significant ($p < 0.05$); **: sterk significant ($p < 0.01$); ***: zeer sterk significant ($p < 0.001$).

Methoden	SGS 1 - Roller	SGS 2 – SR Filter	UNI-Syl
SGS 1 - Roller	X	0.008 **	1.0 NS
SGS 2 – SR Filter		X	0.008 **
UNI-Syl			X

4.1.2 Selectie bemonsteringsmethode eDNA

Het gericht afzuigen van lucht uit de spouw (bemonstering door Unitura, analyse door Sylphium) gaf een correct resultaat in 80% van de gevallen (methode Unitura-Sylphium). Het samplen van de muur met een roller (methode SGS 1-Roller) gaf eveneens in 80% van de gevallen een positief resultaat. In Fase 1 is ook het leegzuigen van de spouw als bemonsteringsmethode getest (methode SGS 2-SR Filter). Deze methode gaf in slechts één geval een positief resultaat.

Op basis van deze resultaten is besloten om in Fase 2 alleen verder te gaan met de methode van het rollen van de muur bij in- en uitvliegopeningen (SGS 1–SR Roller) en met de methode van het uitzuigen van de in- en uitvliegopeningen (methode Unitura-Sylphium). Beide methoden zijn als gelijkwaardig beoordeeld en zijn verder toegepast in Fase 2.

4.2 Validatie vooronderzoek met eDNA

4.2.1 Betrouwbaarheid eDNA voor vaststellen vleermuisverblijven (Fase 1 en 2)

Het is belangrijk dat met eDNA-bemonstering de vleermuisverblijven die zijn vastgesteld tijdens het protocolonderzoek ook worden waargenomen. Het gaat in feite om de juridische betrouwbaarheid van deze bemonsteringsmethode aangezien protocolonderzoek geldt als de vigerende, juridisch bekrachtigde, onderzoeksmethode. Om dit te kunnen bepalen is gecheckt of de vastgestelde vleermuisverblijven ook zijn waargenomen bij de eDNA-bemonstering. Daarbij is de data uit fase 1 (10 woningen) en fase 2 (93 woningen) gebruikt. In totaal beslaat de steekproef dus uit 103 woningen (51 in Leek&Zuidhorn, 52 in Gemert&Geldrop). Daarbij zijn de woningen met aangebrachte vleermuiskasten buiten beschouwing gelaten alsook de woningen waar geen toestemming is verkregen voor de bemonstering.

De resultaten zijn weergegeven in Tabel 4. Deze hebben betrekking op de bemonsteringsmethode van het rollen van de muur bij in- en uitvliegopeningen (SGS 1–SR Roller) en het uitzuigen van de in- en uitvliegopeningen (methode Unitura-Sylphium). In fase 1 zijn bij deze methoden in 8 van de 10 vleermuisverblijven (conform protocolonderzoek) ook eDNA-sporen aangetroffen. In fase 2 zijn in 7 gevallen is op hetzelfde adres ook met eDNA-bemonstering een vleermuisverblijf vastgesteld. Op 2 adressen met een vleermuisverblijf heeft de eDNA-bemonstering geen vleermuis sporen opgeleverd.

Van de 19 met het protocolonderzoek vastgestelde verblijven (die meegenomen zijn in de analyse) konden er dus 15 wel met de eDNA-bemonstering worden aangetoond (positieve score) en 4 niet (vals negatieve score). Het gaat daarbij om een positieve score van 79% (betrouwbaarheid).

Tabel 4 Aangetroffen verblijven middels Protocol-onderzoek en eDNA-bemonstering in Fase 1 en Fase 2.

	PO: Verblijf aanwezig Fase 1	PO: Verblijf aanwezig Fase 2	PO: Verblijf aanwezig Fase 1 + 2
eDNA: Verblijf aanwezig	8	7	15
eDNA: Verblijf afwezig	2 (worst case)	2	4 (worst case)

Daarbij dient opgemerkt te worden dat dezescore een worst-case benadering is die uiteindelijk mogelijk positiever uitpakken als meer informatie beschikbaar is van de vleermuiswaarnemingen tijdens het protocolonderzoek.

- Woning aan 5.1.2.e Geldrop (fase 1) missen de details van de waarnemingen. Zodoende kan niet met zekerheid gesteld worden dat het inderdaad een verblijfplaats is (zie opmerkingen in en bij **Fout! Verwijzingsbron niet gevonden.**);
- Woning aan 5.1.2.e in Hilvarenbeek (fase 1) laat 2 van de 3 bemonsteringsmethoden wel een positief resultaat zien (ook een check van SGS op het monster van Sylphium was positief). Het is de vraag hoe deze laatste woning te scoren (wel of niet positief).

Indien deze 2 woningen buiten beschouwing worden gelaten, komt de score uit op een betrouwbaarheid van 88% (positieve score; 15 van 17 woningen). In 12% van de gevallen is dan nog sprake van een vals negatieve score (2 van 17 woningen).

4.2.2 Vergelijking trefkans eDNA met protocolonderzoek (Fase 2)

In fase 2 heeft blind onderzoek plaatsgevonden met eDNA-bemonstering en protocolonderzoek. Deze gegevens lenen zich voor een vergelijking tussen de trefkans op vleermuizen per methodiek. Het is daarbij vooral interessant in hoeverre met eDNA meer waarnemingen worden gedaan (vals positief). In de vorige paragraaf is de vals negatieve score al berekend (op basis van fase 1 en 2). Dat wordt hier buiten beschouwing gelaten.

In Fase 2 zijn 100 woningen bemonsterd met de eDNA-methoden (Tabel 3). Hiervan zijn er 7 afgevallen (3 geen toestemming, 4 vleermuiskasten op muur). Binnen de resterende 93 woningen zijn in 43 woningen eDNA-sporen waargenomen en 9 woningen met een vleermuisverblijf volgens het protocolonderzoek (Tabel 5). Op 36 adressen zijn wel eDNA-sporen aangetroffen, maar heeft het protocolonderzoek geen vleermuisverblijf opgeleverd (vals positieve score).

In totaal zijn er met protocolonderzoek 9 verblijfplaatsen van vleermuizen vastgesteld en met eDNA-bemonstering 43 (en in totaal 45 vleermuisverblijven). Dit is een factor 2,1 méér aan verblijfplaatsen met eDNA-bemonstering ten opzichte van protocolonderzoek. De trefkans van een vleermuisverblijf op basis van eDNA-bemonstering is dus twee keer zo hoog. Zoals te verwachten, laat de McNemar-test zien dat de resultaten van protocolonderzoek en eDNA-bemonstering significant van elkaar afwijken ($p < 0.001$).

Tabel 5 Vergelijking van resultaten met eDNA-bemonstering en protocolonderzoek

	PO: Verblijf aanwezig Fase 2	PO: Verblijf afwezig Fase 2
eDNA: Verblijf aanwezig	7	36
eDNA: Verblijf afwezig	2	48

4.2.3 Dichtheid woningen met vleermuisverblijven

In fase 2 heeft blind onderzoek plaatsgevonden met eDNA-bemonstering en protocolonderzoek. Deze gegevens lenen zich ook voor een berekening van de dichtheid van het aantal woningen met vleermuisverblijven. In Fase 2 zijn 100 woningen onderzocht met vleermuisprotocol en 97 woningen onderzocht op eDNA (3 afgevallen omdat hier geen toestemming is gegeven voor bemonstering).

Bij het vleermuisprotocol zijn 100 adressen geselecteerd, waarvan 50 in Geldrop en Gemert en de andere 50 in Leek en Zuidhorn. Daarvan waren 12 adressen met een vleermuisverblijf volgens het protocolonderzoek, waarvan 1 in Geldrop, 6 in Leek en 5 in Zuidhorn. Daarbij is sprake van een dichtheid van 12% aan vleermuisverblijven volgens het protocolonderzoek

Bij de eDNA-bemonstering zijn binnen de 97 onderzochte woningen in totaal 43 woningen met eDNA-sporen van vleermuizen. Uitgaande dat het hierbij gaat om woningen met vleermuisverblijven is sprake van een dichtheid van 44% aan vleermuisverblijven.

5 Conclusie, foutendiscussie en kennishiaten

5.1 Voorlopige conclusie

Uit het onderzoek kunnen de volgende conclusies worden getrokken met betrekking tot de toepassing van eDNA bemonstering bij na-isolatie van woningen om vleermuizen te kunnen detecteren.

1. *Er is geen effect gevonden van herhaaldelijke bemonstering met verschillende technieken*

In Fase 1 zijn drie bemonsteringstechnieken achter elkaar gebruikt, maar dit blijkt geen effect te hebben gehad op het vermogen het eDNA te bemonsteren en te analyseren. De steekproef was echter klein (n=10).

2. *De twee eDNA-analysemethoden zijn vergelijkbaar*

Op basis van deze data is er geen onderscheid te maken tussen de methoden van Sylphium en SGS op basis van effectiviteit van de detectie van vleermuisverblijven. Beide methoden vinden een groot aandeel verblijven, zowel op plekken waar het protocolonderzoek verblijfplaatsen heeft vastgesteld als daarbuiten.

3. *Het is aannemelijk dat alle vleermuissoorten aangetoond kunnen worden, maar nog niet bewezen*

De gebruikte methoden detecteren het DNA van alle in Nederland aanwezig vleermuissoorten. Dit betekent dat de gebruikte eDNA-detectiemethoden niet alleen geschikt zijn voor de in dit onderzoek aangetroffen soorten gewone dwergvleermuis, ruige dwergvleermuis en laatvlieger maar ook voor de andere, niet in dit onderzoek aangetroffen soorten.

De resultaten van de meta-barcoding om de soorten te benoemen, moeten voor Fase 2 nog opgeleverd worden. Indien kleinere soorten als de dwergvleermuizen voldoende eDNA achterlaten op gevels, mag worden verwacht dat grotere en zwaardere soorten, die meer en langer contact maken met de muur bij invliegplaatsen, minimaal net zoveel eDNA achterlaten, en daarmee ook goed detecteerbaar zijn.

Uiteraard dient ook de bemonsteringsmethode geverifieerd te worden voor de andere Nederlandse gebouwbezonende soorten vleermuizen. Om dit aan te tonen dienen bekende verblijfplaatsen van de andere gebouwbezonende soorten specifiek, op de hier beschreven wijze, bemonsterd worden. Op dit moment wordt hier onderzoek naar gedaan door Unitura in opdracht van het ministerie van BZK. De resultaten zullen in de volgende versie van dit rapport worden opgenomen.

4. *Niet bekend hoelang eDNA meetbaar is*

De verwachting is dat het eDNA in de loop van de tijd wordt afgebroken. De betrouwbaarheid van de eDNA-methode voor het aantonen van plekken die minder recent (enkele jaren geleden) zijn gebruikt, zal daarom geringer zijn. Het is momenteel niet bekend hoelang eDNA aanwezig blijft bij een verblijfplaats en hoelang dit eDNA nog detecteerbaar blijft met de hier toegepaste eDNA-bemonsterings- en analysemethoden. Het kan een jaar of langer duren voordat vleermuizen een bepaalde plek opnieuw gebruiken, bijvoorbeeld vanwege andere weersomstandigheden of wellicht de aanwezigheid van luizen of de ophoping van poepjes. Vleermuizen zijn dus afhankelijk van een netwerk van geschikte verblijfplaatsen. Daarom is het belangrijk om te weten hoelang het eDNA detecteerbaar blijft. Idealiter zou dit orde grootte 3-5 jaar zijn. Met een detectieperiode van 3 jaar zou naar verwachting meer dan 85% van de verblijven gedetecteerd kunnen worden (circa 68% bij een detectieperiode van 2 jaar, circa 42% bij een detectieperiode van 1 jaar). Bij een korte detectieperiode is het van belang in welk seizoen de bemonstering plaatsvindt en welke functies van de verblijven dan gemist zouden kunnen worden.

5. *eDNA meet een verblijfplaats, geen actuele aanwezigheid*

Met eDNA kan worden bepaald dat er een vleermuis aanwezig was op de plek van bemonstering. Daarmee weten we dat het een verblijfplaats is, of is geweest, maar dat betekent niet dat de verblijfplaats op het meetmoment ook in gebruik is. Juridisch gezien is dit overigens niet relevant. Ook vleermuisverblijven die niet meer in gebruik zijn, zijn wettelijk beschermd.

Afhankelijk van de betrouwbaarheid van bemonstering over de tijd, kan het een voordeel zijn dat de eDNA-bemonstering de potentie heeft om verblijfplaatsen over een langere periode te meten in tegenstelling tot het protocolonderzoek.

Verder dient bedacht te worden dat de eDNA-bemonstering geen informatie geeft over het type verblijfplaats.

Beide onderzoeksmethodieken zijn dus aanvullend op elkaar. De eDNA-bemonstering is een ideale methode voor het uitvoeren van vooronderzoek (hoge trefkans en waarschijnlijk langere detectieperiode). Vervolgens kan met protocolonderzoek¹ vastgesteld worden om welk type vleermuisverblijf het gaat.

6. Een klein percentage van de aanwezige verblijven kan worden gemist met eDNA

Ook met de eDNA-bemonstering kunnen verblijven worden gemist. In dit onderzoek zijn 2 van de 17 verblijfplaatsen uit het protocolonderzoek gemist (dit is bijna 14% van deze verblijven).

Gaan we echter uit van het aantal verblijfplaatsen dat met eDNA is aangetoond (43) dan vormen de 2 gemiste verblijven 4,4% van het totaal (45). Ter vergelijking: het protocolonderzoek miste in deze studie 36 van de 45 verblijven (80%).

Het is aan anderen (wellicht via jurisprudentie) om te bepalen wat acceptabel is: het missen van 4% van de verblijfplaatsen door de relatief nieuwe eDNA-bemonstering, of het missen van 80% van de verblijfplaatsen door het gangbare en geaccepteerde protocolonderzoek.

7. eDNA vindt meer verblijfplaatsen dan protocolonderzoek, beide methoden kunnen verblijven missen

We hebben geen verificatie of de verblijven die door eDNA zijn waargenomen maar niet door protocolonderzoek ook daadwerkelijk vleermuisverblijfplaatsen zijn. Als de verblijven enige tijd geleden zijn gebruikt, maar nu (tijdelijk?) verlaten zijn, is dit ook nu niet met onderzoek te bevestigen. Hoogstens zouden eventueel uitwerpselen waar te nemen zijn (ervan uitgaand dat die ook wat langer blijven liggen). Ervan uitgaand dat de positieve waarnemingen correct zijn (een verblijf aangeven dat in de afgelopen x jaar in gebruik is geweest), dan lijkt het erop dat eDNA veel meer verblijfplaatsen vindt dan protocolonderzoek: in 44% van de woningen met eDNA en in 12% van de woningen met protocolonderzoek. Het is al langer bekend dat met protocolonderzoek verblijven gemist worden; ook ten opzichte van visuele inspectie scoort protocolonderzoek aanzienlijk lager (Arcadis, 2020).

Beide methoden kunnen verblijfplaatsen missen, door toeval, technische problemen of andere redenen. Zie ook punt 6 hierboven. Op basis van de huidige eDNA-resultaten lijkt het erop dat protocolonderzoek méér een momentopname is dan werd aangenomen, en dat het netwerk van vleermuisverblijven omvangrijker is dan met protocolonderzoek alleen aangetoond kan worden (want een volgend protocolonderzoek is weer een momentopname).

¹ In mei 2024 hebben de ministeries van BZK (nu: VRO) en LNV, IPO en de VNG een tijdelijke landelijke aanpak (Landelijke aanpak Natuurvriendelijk Isoleren) afgesproken voor natuurvriendelijk isoleren. De tijdelijke aanpak voorkomt dat particulieren een ecologisch onderzoek moeten laten uitvoeren of een omgevingsvergunning moeten aanvragen voor zij de spouwmuren van hun huis mogen isoleren. Wel gelden de volgende voorwaarden:

- De aanpak geldt alleen voor grondgebonden koopwoningen;
- In de komende 3 jaar mag maximaal 6% van de koopwoningen per CBS-buurt worden geïsoleerd;
- De isolatie mag alleen worden uitgevoerd door een isolatiebedrijf dat de training natuurvriendelijk isoleren heeft gevolgd en werkt binnen de voorwaarden van NVI, waaronder de natuurkalender volgen en de woning voor isolatie natuurvrij maken (VNG, 2024).

5.2 Foutendiscussie

5.2.1 Vergelijking resultaten andere eDNA-studies

De conclusies over het gebruik van eDNA op basis van de hier gepresenteerde resultaten gelden voor de specifieke methoden die zijn gebruikt. Het is hier niet gedocumenteerd welke keuzes precies zijn gemaakt voor de eDNA-analyse met betrekking tot primers en PCR-condities en andere laboratorium-vereisten. Deels berust dit op het uitgangspunt van bedrijven dat ze hun marktpositie willen beschermen. Strikt genomen betekent dit dat resultaten kunnen verschillen als de analyse is uitgevoerd door een ander bedrijf, ook als de bemonsteringmethode gelijk is. Bij Sylphium en SGS waren de resultaten wel goed vergelijkbaar, ook op grond van controlemonsters en dubbele analyses, wat de resultaten robuuster maakt en vertrouwen geeft dat ook andere laboratoria vergelijkbare resultaten kunnen opleveren. Ring-analyses zijn aan te bevelen om de kwaliteit van de eDNA-analyses te borgen.

5.2.2 Interpretatie protocolonderzoek

Er blijkt uit de resultaten dat er nog ruimte zit in de interpretatie van de resultaten van het protocolonderzoek. Dit bleek bij het bekijken van de monitoringsresultaten van Biota (die van Staro waren nog niet beschikbaar). In de resultaten zijn namelijk ook de mededelingen van bewoners meegenomen. Als die een vleermuis in hebben zien vliegen, dan wordt dit ook meegeteld als verblijfplaats, terwijl overige waarnemingen in principe geen (of in ieder geval geen vast) onderdeel uitmaken van het protocolonderzoek.

Doordat alleen verblijfplaatsen zijn meegenomen als er ook daadwerkelijk tijdens het protocolonderzoek gezien werd dat vleermuizen in- of uitvlogen, is het aantal gevonden verblijven met het protocolonderzoek nog kleiner (namelijk 7 i.p.v. 12 voor Leek en Zuidhorn). 'Vliegend uit de richting van', 'mogelijk verblijf', aantikken en baltsend in de omgeving (maar bewoner heeft vleermuis vaak zien invliegen) zijn niet als verblijfplaats meegeteld. Het uitvoeren van een uitvliegtelling bij dergelijke waarnemingen had deze eenmalige waarnemingen kunnen ondersteunen, waardoor ze wellicht wel als verblijfplaats meegenomen hadden kunnen worden, dan wel kunnen uitsluiten.

Omdat het protocolonderzoek niet in het najaar is uitgevoerd, is niet bekend hoeveel paarverblijven zouden zijn gevonden, en of het aantal gevonden verblijven hoger zou zijn.

5.2.3 Missen van verblijfplaatsen

Met de eDNA-bemonstering zijn maximaal 4 en minimaal 2 van de 17 verblijven gemist. Dit is tenminste 12% van de verblijven die gevonden waren met het protocolonderzoek. Bij deze 2 resultaten zijn nog vraagtekens over in het 1e geval de analyse zelf (1 van de 3 analyses negatief), en in het 2e geval het protocolonderzoek (positieve waarneming met protocolonderzoek, maar 3 eDNA-analyses negatief). In totaal zijn er met de eDNA-bemonstering 45 verblijfplaatsen vastgesteld. De 2 gemiste verblijfplaatsen (waar we nu van uitgaan) zijn dan 4,4% van het waarschijnlijke aantal verblijven. Bij het protocolonderzoek zijn 36 van de 45 verblijven gemist, dit is 80%. Het missen van verblijven met het eDNA-onderzoek is dus wel mogelijk, maar aanzienlijk lager dan het aantal gemiste verblijfplaatsen met het protocolonderzoek in deze studie.

De mogelijkheid bestaat dat er verblijfplaatsen zijn gemist bij de bemonstering. Sommige openingen zoals tussen gevel en kozijn of andere openingen van mogelijke verblijfplaatsen zijn minder zichtbaar. Dit kan ook een verklaring zijn.

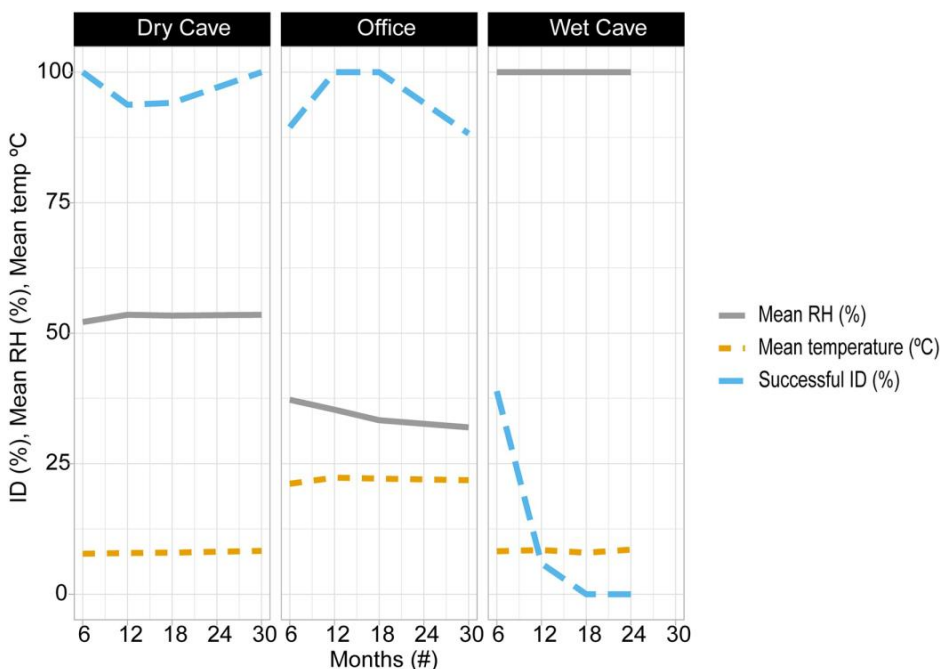
5.3 Kennishiaten

5.3.1 Houdbaarheid eDNA

De houdbaarheid van eDNA onder omstandigheden buiten op de woningen bepaalt hoeveel tijd er kan zitten tussen de aanwezigheid van een vleermuis en het kunnen aantonen van eDNA van die vleermuis op die plek. Daarmee staat ook een belangrijk voordeel van de eDNA-methode ten opzichte van het gangbare protocolonderzoek ter discussie: over welke periode integreert een eDNA-sample de aanwezigheid van vleermuizen? Bij protocolonderzoek wordt een moment-opname gemaakt: alleen de vleermuisverblijven die op dat moment in gebruik zijn, worden gedetecteerd. Een eDNA-sample heeft in principe de mogelijkheid om terug te kijken in het verleden: het aanwezig eDNA kan achtergelaten zijn door een vleermuis die nu gebruik maakt van de verblijfplaats, maar ook door een vleermuis die een of meer dagen, maanden of jaren geleden gebruik gemaakt heeft van die verblijfplaats.

Het is niet vooraf te bepalen hoelang eDNA op woningen intact blijft. Hierbij is onderscheid te maken tussen DNA in intacte cellen (langer intact) en DNA dat zich buiten cellen bevindt (minder lang intact). Verder verloopt de afbraak sneller bij een hoge temperatuur en hoge vochtigheidsgraad, en heeft te maken met de hogere activiteit van o.a. bacteriën en schimmels bij deze omstandigheden. De houdbaarheid van eDNA verschilt van uren buiten cellen in water tot 100.000-en jaren in cellen in permanent bevroren grond.

De houdbaarheid van eDNA van vleermuizen op woningen zal dan ook van plaats tot plaats kunnen verschillen: op een zuidmuur is de houdbaarheid waarschijnlijk korter vanwege de hogere temperaturen vergeleken met een muur op het noorden; op een open westmuur is de houdbaarheid waarschijnlijk korter vanwege de hogere vochtigheid (meer regen) ten opzichte van een muur onder een dakoverstek op het oosten. Onder een dakoverstek of kantpan blijft eDNA waarschijnlijk langer intact dan op een kale onbeschermd gevel. Walker et al (2019) onderzochten eDNA in uitwerpselen van vleermuizen in de tropen. Daar vonden ze dat de houdbaarheid sterk afnam gedurende 2,5 jaar onder vochtige omstandigheden (Figuur 2). De invloed van de temperatuur is door hen niet onderzocht.



Figuur 2 Effect van tijd en relatieve vochtigheid op de mogelijkheid om eDNA te detecteren in uitwerpselen van vleermuizen. Temperaturen varieerden van 8-18 °C (uit: Walker et al., 2019).

De verwachting is dat het eDNA in de loop van de tijd wordt afgebroken. Hoe langer de tijd tussen actuele bewoning en moment van de eDNA-bemonstering, hoe groter de kans dat het eDNA verdwenen of afgebroken is. Het is momenteel niet bekend hoelang eDNA aanwezig blijft bij een verblijfplaats en hoelang dit eDNA nog detecteerbaar blijft met de hier toegepaste eDNA-bemonsterings- en analysemethoden. Het kan een jaar of langer duren voordat vleermuizen een bepaalde plek opnieuw gebruiken, bijvoorbeeld vanwege andere weersomstandigheden of wellicht de aanwezigheid van luizen of de ophoping van poepjes. Vleermuizen zijn dus afhankelijk van een netwerk van geschikte verblijfplaatsen. Daarom is het belangrijk om te weten hoelang het eDNA detecteerbaar blijft.

Idealiter zou de houdbaarheid van eDNA op woningen in de orde-grootte 3-5 jaar zijn. De kans op het aantonen van verblijven kan worden geschat: stel dat over een periode van 5 jaar de vleermuizen in willekeurige jaren de verblijven gebruiken in een frequentie van 1-3 jaar per 5 jaar. Dan zou bij een detectieperiode van 3 jaar (het eDNA blijft 3 jaar aantoonbaar aanwezig op de gevel) in theorie meer dan 85% van de verblijfplaatsen in het netwerk aangetoond kunnen worden. Voor een kortere detectieperiode is dit percentage lager (circa 68% bij een detectieperiode van 2 jaar en circa 42% bij een detectieperiode van 1 jaar).

5.3.2 Volledigheid meting van soorten

Bij het protocolonderzoek is steeds maar het gebruik van een verblijfplaats door één soort vastgesteld. In de resultaten van de meta-barcoding door SGS is in twee gevallen (van de 8 samples waar deze methode op is toegepast) DNA gevonden van niet alleen de gewone dwergvleermuis (die in het protocolonderzoek was waargenomen) maar ook de laatvlieger. Ook in kerkzolders zijn met eDNA méér soorten waargenomen dan met visuele inspectie (Van den Tempel & Veldhuijzen Van Zanten, 2020).

6 Referenties

- Arcadis, 2020. Nulmeting gebouwbewonende soorten Wirdum, Delfzijl en Middelstum in 2018. Onderbouwing onderzoeksmethodiek en start monitoring SMP bouwkundig versterken. Rapport 083881456 0.4, maart 2020.
- SGS, 2024. Protocol monsterneming t.b.v. vleermuizenonderzoek in spouwmuren met behulp van e-DNA analyse. SGS Search, concept versie 3, januari 2024.
- Van den Tempel, C. & H. Veldhuijzen van Zanten, 2020. Kerkzolderonderzoek naar vleermuizen door middel van e-DNA. VLEN-Nieuwsbrief 81, 31-34.
- VNG. (2024, 24 mei). *Tijdelijke landelijke aanpak voor natuurvriendelijk isoleren*. <https://vng.nl/nieuws/tijdelijke-landelijke-aanpak-voor-natuurvriendelijk-isoleren>
- Walker FM, Tobin A, Simmons NB, Sobek CJ, Sanchez DE, et al. (2019) A fecal sequel: Testing the limits of a genetic assay for bat species identification. PLOS ONE 14(11): e0224969. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224969>

Bijlagen

Bijlage A. Samenstelling versnellingsteam

- Neuhof Haans Spouwmuurisolatie
- Rouwenhorst Isolatie
- Pluimers Isolatie
- Neopixels Insulation
- Knauf Insulation
- Insula Certificatie
- SKG-IKOB Certificatie
- Unitura
- SGS Search
- Sylphium molecular ecology
- Nederland Isoleert
- Spouwmuurisolatie Noord BV
- Technisol
- VENIN
- Arcadis
- NVDE

Bijlage B. Overzicht van resultaten protocolonderzoek en eDNA-analyse.

pm

Bijlage C. Technische details van bemonstering en analyse

C1. Bemonstering door Unitura

pm

C2. Opwerken en Analyseren van Vleermuis-DNA Filters door Sylphium

Isolatie

Na aankomst in het laboratorium zijn de monsters verwerkt volgens het protocol van de Environmental DNA Isolation Kit SYL002 van Sylphium (1). Een aanpassing op het standaardprotocol was een extra incubatiestap waarbij de monsters gedurende 2 uur bij 55°C werden geïncubeerd in lysisbuffer (S1) met proteïnase K. Na deze incubatie werd het lysaat verder verwerkt volgens het standaardprotocol van de kit. Om kruisbesmetting tussen monsters tijdens het isolatieproces uit te sluiten, werd parallel een procedure blanco uitgevoerd, die hetzelfde isolatieproces onderging maar geen monster bevatte.

Kwaliteitsbeoordeling van het Isolaat

De kwaliteit van de geïsoleerde DNA-monsters werd beoordeeld om vals-negatieve resultaten te voorkomen. De beoordeling gebeurde door het testen op storende factoren en de efficiëntie van de isolatie, waarbij xenobiotisch DNA uit de lysisbuffer werd gebruikt. De kwaliteitscontrole werd uitgevoerd met een qPCR-analyse op een BIO-RAD CFX96 real-time PCR-systeem, waarbij de IPC qPCR Quantification Kit (SYL113) van Sylphium werd gebruikt (2). Een monster werd goedgekeurd voor verdere analyse indien de CT-waarde niet meer dan 2 CT afweek van de standaard en het fluorescentiesignaal niet lager was dan 800 RFU. Monsters die niet aan deze eisen voldeden, werden opgeschoond met de EchoCLEAN Organic Solvent DNA CleanUP Kit van Bioecho (3). Daarna werd het monster opnieuw gecontroleerd.

Analyse

De analyse voor de aanwezigheid van vleermuis-DNA werd in duplo uitgevoerd op een BIO-RAD CFX96 real-time PCR-systeem met de eDNA qPCR Hot Start Mix (SYL1003) van Sylphium (4), met vleermuis-specifieke primers. Als controles werden de procedure blanco, acht PCR blanco's en een kalibratielijn in duplo meegenomen. Om vals-positieve resultaten te kunnen uitsluiten, moeten de procedure blanco en de acht PCR blanco's negatief zijn. Een monster werd als positief beschouwd indien in minimaal één van de duplo's een fluorescentiesignaal van minstens 500 RFU werd gedetecteerd en de CT-waarde lager was dan 37. Indien een monster niet aan deze criteria voldeed, werd het als negatief beschouwd. De templateconcentratie in het totale DNA-isolaat werd bepaald aan de hand van de kalibratielijn.

Referenties

1. Sylphium. *Environmental DNA Isolation Kit SYL002*.
<https://sylphium.com/webshop/product/syl002/>
2. Sylphium. *IPC qPCR Quantification Kit SYL113*.
<https://sylphium.com/webshop/product/syl113/>
3. Bioecho. *EchoCLEAN Organic Solvent DNA CleanUP Kit*.
<https://www.bioecho.com/EchoCLEAN-Organic-Solvent-DNA-CleanUp-Kit-50/020-002-040-05>
4. Sylphium. *eDNA qPCR Hot Start Mix SYL1003*.
<https://sylphium.com/webshop/product/syl1003/>

C3. Bemonstering door SGS

SGS heeft 2 methoden voor bemonstering toegepast:

1. Afzuigen van de spouw vanuit openingen onderaan de muur
2. Bemonstering met een roller
De roller-methode is een niet-invasieve methode waarbij een steriele roller wordt gebruikt om materiaal ter verzamelen van specifieke oppervlakken die mogelijk in contact zijn gekomen met vleermuizen of hun uitwerpselen. Met deze methode worden monsters genomen van de in- en uitgangen van de spouw en mogelijke andere contactpunten. Zie Figuur 3.

Zie verder: SGS (2024)



Figuur 3 Voorbeeld van monstername-plaatsen op de gevel van een grondgebonden woning. Bron: SGS, 2024.

C4. Analyse SGS

pm

Colofon

EDNA ALS METHODE VOOR HET DETECTEREN VAN VLEERMUISVERBLIJVEN
HULPMIDDEL BIJ HET ISOLEREN VAN WONINGEN GETEST

KLANT

Versnellingsteam eDNA Vleermuisvriendelijk Isoleren

AUTEUR

Arcadis

PROJECTNUMMER

30232970

ONZE REFERENTIE

D10064802:87

DATUM

24 september 2024

STATUS

Versie 2

GECONTROLEERD DOOR

Team Stadsnatuur

Over Arcadis

Arcadis is de leidende wereldwijd opererende datagedreven duurzame ontwerp-, advies- en consultancyorganisatie op het gebied van de natuurlijke en gebouwde omgeving. Wij zijn met 36.000 architecten, data-analisten, ingenieurs, projectplanners, water- en duurzaamheidexperts. Onze gedeelde passie is: Improving quality of life. Toewijding aan de strategie 'accelerating a planet positive future' onderschrijft onze wereldwijde samenwerking met klanten en hoe we hen helpen met duurzame projectkeuzes. We combineren digitale met mensgerichte innovaties en omarmen toekomstgerichte vaardigheden op het gebied van milieu, energie, water, gebouwen, transport en infrastructuur. We werken vanuit meer dan dertig landen en rapporteerden in 2023 een bruto omzet van 5 miljard euro. www.arcadis.com

www.arcadis.com

Arcadis Nederland B.V.

Postbus 264
6800 AG Arnhem
Nederland

T +31 (0)88 4261 261

Arcadis. Improving quality of life

Volg ons op

