A network diagram consisting of various-sized circles connected by thin lines, set against a blue background. The circles are arranged in a non-uniform, interconnected pattern, with some larger circles and some smaller ones. The lines connect the circles, creating a web-like structure.

KWR 2024.081 | Augustus 2024

## DNA Diatom Biosensor

Ontleutelen van milieukwaliteit op basis  
van diatomeeën



# Samenwerkingspartners



# Colofon

## DNA Diatom Biosensor

Ontsleutelen van milieukwaliteit op basis van diatomeeën

## KWR 2024.081 | Augustus 2024

### Opdrachtnummer

403341

### Projectmanager

Ton van Leerdam

### Samenwerkingspartners

KWR Water Research Institute, Naturalis Biodiversity Center, AQUON, BaseClear, Waterschap Brabantse Delta, Hoogheemraadschap van Delfland, Waterschap De Dommel, Wetterskip Fryslân, Waterschap Hollandse Delta, Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier, Waterschap Limburg, Hoogheemraadschap van Rijnland, Hoogheemraadschap Stichtse Rijnlanden, STOWA, Waterproef

### Auteurs

Michiel Hootsmans (KWR, hoofdstuk 1, 2, 3, 4, 7, 8), Kevin Beentjes (Naturalis, hoofdstuk 2, 3, 4, 5), Jako van der Wal (AQUON, hoofdstuk 6) en Herman van Dam (hoofdstuk 6)

### Kwaliteitsborger

Krijn Trimbos (CML) & Paul van der Wielen (KWR)

### Verzonden naar

Jako van der Wal (AQUON), Derek Butler (BaseClear), Marco Beers & Janne Brouwers (Waterschap Brabantse Delta), Joep de Koning (Hoogheemraadschap van Delfland), Mark Scheepens (Waterschap de Dommel), Harry Boonstra & Minke de Vries (Wetterskip Fryslân), Inge Terhaerd & Fred Kuipers (Waterschap Hollandse Delta), Gert van Ee & Sandra Roodzand (Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier), Bert Pex & Barend van Maanen (Waterschap Limburg), Kevin Beentjes (Naturalis Biodiversity Center), Bart Schaub (Hoogheemraadschap van

Rijnland), Brigitte Mangelaars (Hoogheemraadschap Stichtse Rijnlanden), Bas van der Wal (STOWA), Willie van den Berg, Arthur van Dulmen & Martin Wesseling (Waterproef), Krijn Trimbos (CML) en Herman van Dam (Adviseur Water & Natuur)

Deze activiteit is mede gefinancierd met PPS-financiering uit de Toeslag voor Topconsortia voor Kennis en Innovatie (TKI's) van het Ministerie van Economische Zaken en Klimaat en de resultaten zijn openbaar.

Werkwijzen, rekenmodellen, technieken, ontwerpen van proefinstallaties, prototypen en door KWR gedane voorstellen en ideeën alsmede instrumenten, waaronder software, die in het onderzoeksresultaat zijn opgenomen, zijn en blijven het eigendom van KWR. Ook alle rechten die voortvloeien uit intellectueel en industrieel eigendom, alsmede de auteursrechten, blijven bij KWR berusten en derhalve eigendom van KWR.

#### Keywords

DNA, diatomeeën, waterkwaliteit, KRW, kwaliteitsindex

Jaar van publicatie  
2024

#### Meer informatie

dr. Paul van der Wielen  
T 0625241293  
E paul.van.der.wielen@kwrwater.nl

PO Box 1072  
3430 BB Nieuwegein  
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511  
E info@kwrwater.nl  
I www.kwrwater.nl

# KWR

Augustus 2024 ©

Alle rechten voorbehouden aan KWR. Niets uit deze uitgave mag - zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van KWR - worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enig andere manier.

# Samenvatting

## *Inleiding*

Om de ecologische kwaliteit van Europese wateren op het gewenste niveau te krijgen en te houden moeten waterbeherende instanties uitgebreide monitoring- en maatregelenpakketten implementeren. Daarmee kunnen ze voldoen aan de Europese vereisten die worden gesteld door de Kaderrichtlijn Water (KRW). Diatomeeën vormen daarbij een belangrijke groep van biologische indicatororganismen. Ze reageren snel op veranderingen in hun milieu en van veel soorten zijn milieu-indicatiewaarden bekend. Ze vereisen echter wel hooggekwalificeerde taxonomische expertise om te kunnen worden geïdentificeerd. Daardoor zijn de analyses ook tamelijk kostbaar en kennen ze een relatief lange doorlooptijd. Verder kunnen determinatiefouten en determinatieverschillen tussen experts optreden, en daarmee zijn verkeerde conclusies over de ecologische waterkwaliteit niet uitgesloten.

## *DNA-detectie technieken*

De bovengenoemde problemen bij het gebruik van diatomeeën als indicatoren voor de waterkwaliteit in stromende en stilstaande wateren kunnen mogelijk worden ondervangen door gebruik te maken van de snelle ontwikkeling van nieuwe DNA-gebaseerde identificatiemethoden. In een DNA metabarcoding analyse kunnen DNA-barcodes van verschillende soorten in een monster geautomatiseerd worden geïdentificeerd met DNA-referentie databanken. Zo'n DNA-metabarcoding benadering biedt ook kansen om barcodes van diatomeeën te gebruiken voor een waterkwaliteitsbepaling zonder dat volledige identificatie tot op soortniveau nodig is: een taxonomie-vrije methode. Indien dat mogelijk is speelt de (nog) beperkte soortdekking van de barcode referentiebibliotheek bij het karakteriseren van de diatomeeëngemeenschap geen rol meer speelt.

## *Uitdaging*

Het doel van dit onderzoeksproject was om een DNA-detectiemethode te ontwikkelen, toe te passen en te vergelijken met de traditionele microscopische methode, om zo een op diatomeeën gebaseerde DNA-quickscan voor waterkwaliteit te realiseren. Dit is gedaan door milieu-indicatie waarden te vergelijken die gebaseerd zijn op traditionele monitoring met microscopie en op parallel daaraan verzamelde informatie uit op DNA-gebaseerde soortenlijsten. De gegevens zijn verzameld bij reguliere monsternames en bij ingebrachte pilotstudies van waterbeheerders naar onder meer effecten van aangepast landbouwkundig gebruik en waterbeheer, gericht op vermindering van eutrofiëring. De sequentieanalyse van het DNA is voor alle monsters uitgevoerd met een Novaseq sequencer; bij een deel van de monsters is ook met een Miseq sequencer verwerkt.

## *Resultaten*

De momenteel voor DNA-identificatie beschikbare barcode referentielijst voor diatomeeën beslaat slechts 7% van de taxa die voor microscopische analyse bekend zijn. Het aandeel soorten dat een 'goede' milieu-indicatiewaarde scoort in de DNA-lijst ligt significant lager. Dat maakt de het risico op een onderschatting van de waterkwaliteit met DNA groter dan met microscopie.

De DNA-detectie leverde resultaten op voor 94% van de 363 monsters die gedurende het project voor DNA-analyse zijn aangeleverd. In een DNA-Novaseq dataset (35 miljoen sequenties of 'reads') afkomstig van 148 van deze monsters verzameld in 2022 werden met de speciaal op diatomeeën-DNA gerichte analyse 1.719 unieke barcodes aangetroffen ('exact sequence variants', ESVs). Van alle barcodes behoorde 98,5% tot het fyllum Bacillariophyta (diatomeeën) en alleen deze sequenties zijn gebruikt voor verdere analyses. Hieruit blijkt dat de DNA-analyse dus heel specifiek was voor het amplificeren van DNA van diatomeeën. Van de 1.719 unieke barcodes konden 532 ESVs worden geïdentificeerd tot soortniveau, wat uiteindelijk resulteerde in het vinden van 185 verschillende diatomeeënsoorten met de DNA-methode (sommige morfologisch geïdentificeerde soorten omvatten meerdere

ESVs). Dit betrof 69% van alle aangetroffen barcodes in de dataset. Met microscopie werden in deze dataset 492 diatomeeënsoorten vastgesteld (535 taxa, als ook ondersoorten en variëteiten worden meegenomen; deze zijn met de beschikbare DNA-barcode referentielijst niet te onderscheiden).

De soorten/taxa samenstelling verschilt sterk tussen de analyse met de microscoop en met DNA. In de *totale* dataset van alle monsters met zowel een microscopische als een DNA-Novaseq analyse werden met de microscopische analyse ongeveer 2,5 maal meer soorten gevonden dan met DNA. Echter, *per monster* werden met DNA gemiddeld tweemaal zoveel soorten aangetroffen als met microscopie. Kennelijk levert de DNA-analyse deels een ander beeld op van de aanwezige soorten dan met de microscoop wordt waargenomen, en omgekeerd. Het verschil tussen beide methoden in het aantal waargenomen soorten voor alle monsters samen moet deels worden toegeschreven aan de veel kleinere DNA-referentiebibliotheek dan de referentiebibliotheek voor microscopie. Andere mogelijke oorzaken voor de verschillen zijn: het met DNA wel kunnen vaststellen van microscopisch lastig te identificeren (vaak kleine) taxa, het determineren van lege schaalpjes van dode cellen (die met DNA niet worden waargenomen) en foutieve identificaties met de microscoop. In ons onderzoek speelt het in Nederland gebruikelijke aantal van 200 per monster onder de microscoop beoordeelde schaalpjes tegenover gemiddeld 167.000 reads per monster met DNA-analyse waarschijnlijk ook een rol.

Met de voor 203 locaties beschikbare gepaarde DNA en microscopie datasets werden resultaten berekend voor de ook in Nederland gebruikte, op diatomee milieu-indicatie waarden gebaseerde IPS-waterkwaliteitsindex. Deze index loopt van 0 (slechte kwaliteit) tot 20 (zeer goede kwaliteit). Uit de gepaarde resultaten bleek een positieve correlatie tussen de beide datasets. Er was echter ook veel variatie, waarbij de IPS-waarden op basis van DNA-gegevens gemiddeld 1,7 IPS-eenheden lager waren dan die op grond van microscopie. Dat zal deels worden veroorzaakt door de bias in de DNA-referentiebibliotheek naar relatief meer soorten met een lagere IPS-score. Uit de wetenschappelijke literatuur bleek dat een bandbreedte van 1-2 (en vaak zelfs 4) IPS-eenheden bij microscopische analyse als normaal kan worden beschouwd, en de reproduceerbaarheid van de huidige microscopische methode haar beperkingen kent. De reproduceerbaarheid is met gebruik van DNA-barcodes heel goed.

Met de IPS-index is ook de KRW-waterkwaliteitsklasse bepaald conform de KRW. Deze heeft vijf klassen met elk een breedte van 4 IPS-eenheden. De resultaten van deze klasse-indeling voor DNA en microscopie waren voor 45% van de 203 locaties gelijk. Voor 35% lagen ze met DNA één klasse lager, voor 10% lagen ze met DNA één klasse hoger.

De taxonomie-vrije aanpak werd toegepast met een machine-learning techniek en de DNA-barcode samenstelling van de beschikbare locaties. Daarbij werd met 75% procent van deze locaties een model getraind om de KRW-waterkwaliteitsklasse-indeling zoals bepaald op grond van de microscopische gegevens te voorspellen op basis van de DNA-barcode samenstelling van de betreffende monsters. Vervolgens werd het model getest door de KRW-klasse-indeling voor de resterende 25% van de locaties op basis van hun DNA-barcode samenstelling te voorspellen. Dit gaf in 50% van de gevallen eenzelfde KRW-klasse indeling. Daarmee is deze aanpak vergelijkbaar met de niet taxonomie-vrije werkwijze waarbij soorten op grond van DNA-barcodes werden geïdentificeerd. Als de KRW kwaliteitsklassen 'ontoereikend' en 'matig', en de klassen 'goed' en 'zeer goed' werden samengenomen tot twee klassen die evenveel monsters bevatten, was de juistheid van de voorspelling 67%. In 85% van de gevallen werd ook het juiste watertype (M of R) bepaald.

Er treedt bij gebruik van onze taxonomie-vrije werkwijze met ESVs echter geen beduidend grotere verklaring op van de variatie in de dataset ten opzichte van de werkwijze met op DNA-gebaseerde soortenlijsten. Dat werd wel verwacht, doordat nu ook niet taxonomisch geïdentificeerde ESVs konden bijdragen aan de typering van een kwaliteitsklasse. Kennelijk draagt in onze studie de informatie uit de niet tot soort geïdentificeerde ESVs niet bij aan wat de taxonomisch geïdentificeerde ESVs in de eerder beschreven aanpak al hebben ingebracht.

Ongeveer 5% van de in dit onderzoek gevonden unieke diatomeeën-ESVs bleek indicatief voor één bepaalde KRW-kwaliteitsklasse, op grond van de met microscopie bepaalde indeling van locaties. Dit beperkte aandeel is mede het gevolg van de lage frequentie van individuele ESVs in de monsters (meer dan de helft zat in slechts één of twee monsters). Een kleine 8% van de ESVs heeft een voorspellende waarde voor de regio waar ze werden aangetroffen.

Het onderzoek heeft ook een historisch perspectief geleverd op doelstellingen, methoden en resultaten van de belangrijkste rapportages uit de laatste decennia, waarbij diatomeeën zijn gebruikt als indicatoren voor de waterkwaliteit. Meestal is de soortensamenstelling van monsters van natuurlijke substraten geanalyseerd door microscopisch onderzoek. De tamelijk grove KRW classificatie differentieert in het algemeen onvoldoende, maar met andere ecologische indicatiewaarden worden betere resultaten gemeld. De belangrijkste verschillen worden vooral geregistreerd voor zoutgehalte, saprobie (verontreiniging door organisch afbreekbaar materiaal) en aan nutriënten gerelateerde variabelen (eutrofiëring), en in sommige gevallen ook verdroging.

Ter illustratie van mogelijke toepassingen van milieu-informatie op basis van diatomeeën zijn gegevens van verschillende projecten gebruikt. Met DNA-analyses zijn resultaten berekend voor de IPS- en Van Dam-indexen. Hiermee wordt een divers palet aan voorbeelden geschetst van toepassingen van diatomeeën bij de inschatting van effecten van beheer en inrichting op de ecologische waterkwaliteit. De Van Dam-index maakt gebruik van de indicatiewaarden van diatomeeën voor zeven milieu-aspecten. Dit zijn pH, saliniteit, stikstof metabolisme, zuurstofmetabolisme, saprobie, trofiegraad, en vochtigheid. De Van Dam-indexen geven zo een meerdimensionaal beeld van de in diatomeeën besloten informatie over de ecologische waterkwaliteit in vergelijking met de IPS. De laatste index is vooral ontwikkeld als indicator voor organische stofbelasting waarbij voedselrijkdom (en dus trofiegraad) eveneens tot uitdrukking komen. Met de Van Dam aanpak kunnen dus meer milieu-aspecten worden beschouwd dan met alleen de IPS. Dat kan meer handvatten bieden om te komen tot een diagnose, indien een water niet de gewenste waterkwaliteit heeft. Een beschrijving van de relatieve bijdragen van de onderliggende Van Dam-indexwaarden aan de daaruit berekende gemiddelde waarde van een Van Dam-index geeft nog meer detail over de milieu-omstandigheden waar de op een locatie voorkomende soorten een indicatie voor zijn, en over de mate waarin locaties van elkaar verschillen. Dat geeft soms een beter diagnostisch inzicht dan alleen op basis van de gemiddelde Van Dam indexwaarden is af te leiden.

### *Conclusies en kansen*

Diatomeeën kunnen een grote hoeveelheid informatie verschaffen over aquatische milieu-omstandigheden. Door hun snelle levenscyclus bieden ze ook een relatief snelle en gevoelige thermometerfunctie, ook ten opzichte van andere organismen zoals waterplanten en vissen die minder snel reageren.

Voor acceptatie van de DNA-methode door beleidsmakers is het van belang dat DNA-identificatie gegevens vergelijkbare informatie opleveren ten opzichte van microscopie-data: dat zijn immers de nu bij iedereen bekende en vertrouwde databronnen. De resultaten van onze studie en van onderzoek elders laten zien dat de vergelijkbaarheid van milieu indicatiewaarden afgeleid uit gegevens verkregen met DNA-analyse en microscopie voldoende is, mede afgezet tegen de normale bandbreedte in indicatie waarden bij inzet van microscopie. Men moet wel accepteren dat beide benaderingen een iets ander beeld van de werkelijkheid geven, waarbij het niet eenvoudig is vast te stellen welk beeld 'goed' of 'beter' is. Het is dan ook denkbaar dat de DNA-data niet altijd tot een overeenkomstige waarde leiden voor kwaliteitsklassen berekend op basis van alleen microscopische data.

Dit mag zeker geen reden zijn om DNA-detectie nog langer alleen als pilot-instrument te zien. Ook de betrouwbaarheid van de traditionele benaderingswijze met microscopie geeft aanleiding tot serieuze vragen rond de mate van variatie en daarmee samenhangend de betrouwbaarheid van de daaruit voortkomende resultaten.

We concluderen uit ons onderzoek dat de DNA-aanpak geschikt is om de detectie van diatomeeën (weer) snel en laagdrempelig in allerlei waterkwaliteitsonderzoek in te zetten. Het is daarom aanbevelingswaardig om naast de



huidige microscopische methode ook de diatomeeëndetectie met DNA-analyses in te gaan zetten als routinematige monitoringsmethode alsook in waterkwaliteitsonderzoek. Zo kan de DNA Diatom Biosensor methode zowel in stromende als stilstaande wateren verder worden ontwikkeld om te komen tot een betere diagnose en beoordeling van de waterkwaliteit.

Omdat er voortdurend meer barcodes van diatomeeën worden geïdentificeerd zal de nu nog beperkte referentie bibliotheek voor DNA van diatomeeën naar verwachting snel verder in omvang toenemen. Reeds bestaande DNA-monsters kunnen als barcodelijsten later altijd weer opnieuw worden geanalyseerd met nieuwe referentielijsten, om zo in een terugblik de daarin aanwezige maar nu nog verborgen informatie alsnog te kunnen benutten.

Het lijkt waardevol om in vervolgstudies altijd te werken met ESVs, en deze ook los van hun eventuele taxonomische duiding, te koppelen aan milieu indicaties. Daarmee kunnen waarschijnlijk veel meer diatomeeën 'taxa' een rol spelen in de beoordeling van de waterkwaliteit en hoeven taxonomische vraagstukken de inzetbaarheid van milieu-informatie uit de wereld van diatomeeën niet te bemoeilijken.

De te verwachten kostenefficiëntie van de DNA-techniek maakt het voorstelbaar dat de ruimtelijke en temporele resolutie van DNA monitoring de complexiteit van onze aquatische ecosystemen goed kan beschrijven. Daarmee zal de diagnostiek van verslechterde waterkwaliteit verbeteren, zodat meer accurate maatregelen voor inrichting en beheer kunnen worden genomen. Het is bovendien gezien de dalende beschikbare capaciteit aan menskracht met kennis van zaken over met name diatomeeën identificatie van groot belang dat de huidige generatie specialisten haar kennis en kunde zo efficiënt mogelijk kan inzetten en overdragen. Daarbij is het nu voortvarend inzetten van DNA als detectiemethode essentieel.

# Summary

## *Introduction*

In order to achieve and maintain the ecological quality of European waters at the desired level, water management authorities must implement extensive packages for monitoring and measures. This allows them to meet the European requirements set by the Water Framework Directive (WFD). Diatoms are an important group of biological indicator organisms. They quickly respond to changes in their environment and environmental indication values are known for many species. However, they do require highly qualified taxonomic expertise to be identified. As a result, the analyses are also quite expensive and have a relatively long lead time. Furthermore, identification errors and differences between experts can occur, which means that incorrect conclusions about environmental indications cannot be ruled out.

## *DNA detection techniques*

The above-mentioned problems in using diatoms as water quality indicators in flowing and still waters can possibly be overcome by taking advantage of the rapid development of new DNA-based identification methods. In a DNA metabarcode analysis, DNA barcodes of different species in a sample can be identified automatically using DNA reference databases. Such a DNA metabarcode approach also offers opportunities to use barcodes of diatoms for water quality determination without the need for complete identification down to species level: a taxonomy-free method. If this is feasible, the (still) limited species coverage of the barcode reference library no longer plays a role in characterizing the diatom community.

## *Challenge*

The aim of this research project was to develop a DNA detection method, apply it and compare it with the traditional method using microscopy, in order to realize a diatom-based DNA quick scan for water quality. This was done by comparing environmental indication values based on traditional monitoring with microscopy and on information collected in parallel from DNA-based species lists. The data was collected during regular sampling and during pilot studies submitted by water managers, where they studied, amongst other things, the effects of adapted agricultural use and water management aimed at reducing eutrophication. DNA sequence analysis of all samples was performed with a Novaseq sequencer; some of the samples were also processed with a Miseq sequencer.

## *Results*

The diatom barcode reference list currently available for DNA identification covers only 7% of the taxa known for microscopic analysis. The share of species that score a 'good' environmental indication value in the DNA list is also significantly lower. This increases the risk of underestimating water quality with DNA compared with microscopy.

The DNA detection yielded results for 94% of the 363 samples submitted for DNA analysis during the project. In a DNA-Novaseq dataset (35 million sequences or 'reads') of 148 of these samples, collected in 2022, the analysis specifically aimed at diatom DNA found 1,719 unique barcodes ('exact sequence variants', ESVs). Of all barcodes, 98.5% belonged to the phylum Bacillariophyta (diatoms) and only these barcodes were used for further analysis. This shows that the DNA analysis was very specific for the amplification of diatom DNA. Of the 1,719 unique barcodes, 532 ESVs could be identified to species level, ultimately resulting in the discovery of 185 different diatom species using the DNA method (some morphologically identified species included multiple ESVs). This concerned 69% of all barcodes found in the dataset. Using microscopy, 492 diatom species were identified in this dataset (535 taxa, including subspecies and varieties; these cannot be distinguished with the available DNA barcode reference list).

The species/taxa composition differs greatly between analysis with the microscope and with DNA. In the *total* dataset of all 148 samples with both a microscopic and a DNA-Novaseq analysis, approximately 2.5 times more species were found with the microscopic analysis than with DNA. However, on average twice as many species were found *per sample* with DNA than with microscopy. Apparently DNA partly provides a considerably different perception of the species present than what is observed with the microscope, and vice versa. The difference between the two methods in the observed species number for all samples together must be partly attributed to the much smaller DNA reference library compared with the reference library for microscopy. Other possible causes for the differences are: the ability to identify microscopically difficult (often small) taxa with DNA, the identification of empty scales of dead cells (which cannot be observed with DNA) and incorrect identifications with the microscope. In our study, the for Dutch microscopy studies usual number of 200 scales assessed per sample compared to an average of 167,000 reads per sample in DNA analysis probably also plays a role.

Using the paired DNA and microscopy datasets available for 203 locations, results were calculated for the IPS water quality index, which is also used in the Netherlands and is based on diatom environmental indication values. This index ranges from 0 (poor quality) and 20 (very good quality). The paired results showed a positive correlation between the two data sets. However, there was also a lot of variation, with IPS values based on DNA data being on average 1.7 IPS units lower than those based on microscopy. This will partly be caused by the bias in the DNA reference library towards relatively more species with a lower IPS score. The scientific literature showed that a bandwidth of 1-2 (and often even 4) IPS units can be considered normal in microscopic analysis, and the reproducibility of the current microscopic method has its limitations. Reproducibility is very good with the use of DNA barcodes.

The IPS index also determines the WFD water quality class in accordance with the WFD. This has five classes, each with a width of 4 IPS units. The results of this classification for DNA and microscopy were the same for 45% of the 203 locations. For 35% they were one class lower with DNA, for 10% they were one class higher with DNA.

The taxonomy-free approach was applied with a machine learning technique and the DNA barcode composition of the available locations. A model was trained with 75% of these locations to predict the WFD water quality class classification as determined on the basis of the microscopic data based on the DNA barcode composition of the samples in question. The model was then tested by predicting the WFD class classification for the remaining 25% of the locations based on their DNA barcode composition. This gave the same WFD class classification in 50% of the cases. This taxonomy-free approach therefore is comparable to the method in which species were identified on the basis of DNA barcodes. If the WFD quality classes 'inadequate' and 'moderate', and the classes 'good' and 'very good' were combined into two classes containing the same number of samples, the accuracy of the prediction was 67%. In 85% of cases the correct water type (still or running) was also determined.

However, when using our taxonomy-free method with ESVs, there is no significantly larger explanation of the variation in the dataset compared to the method with DNA-based species lists. This was contrary to expectations, because now non-taxonomically identified ESVs could also contribute to the characterization of a quality class. Apparently in our case the information from the non-taxonomically identified ESVs does not supplement what the taxonomically identified ESVs have already contributed in the approach described earlier.

Approximately 5% of the unique diatom ESVs found in this study turned out to be indicative of one specific WFD quality class, based on the classification of locations determined by microscopy. This limited share is partly the result of the low frequency of individual ESVs in the samples (more than half were in only one or two samples). Just under 8% of the ESVs have a predictive value for the region where they were found.

The research has also provided a historical perspective on objectives, methods and results of the most important reports from the last decades using diatoms as indicators of water quality. Typically, the species composition of samples from natural substrates has been analyzed by microscopic examination. The rather coarse WFD classification generally differentiates insufficiently, but better results are reported with other ecological indication values. The most important differences are mainly recorded for salinity, saprobity (pollution by organically degradable material) and nutrient-related variables (eutrophication), and in some cases also desiccation.

Data from various projects have been used to illustrate possible applications of environmental information based on diatoms. Results were calculated for the IPS and Van Dam index using DNA analyses. This outlines a diverse range of examples of applications of diatoms in the assessment of the effects of management and restoration on ecological water quality. The Van Dam index uses the indicative values of diatoms for seven environmental aspects. These are pH, salinity, nitrogen metabolism, oxygen metabolism, saprobity, trophic state, and moisture. The Van Dam indexes thus provide a multi-dimensional picture of the information contained in diatoms regarding ecological water quality compared to the IPS. The latter index was mainly developed as an indicator for organic matter load, which also reflects nutrient richness (and therefore trophic state). More environmental aspects can therefore be considered with the Van Dam approach than by only using the IPS. This can provide more tools to arrive at a diagnosis if the water does not have the desired water quality. A description of the relative contributions of the underlying Van Dam index values to the calculated average value of a Van Dam index provides even more detail about the environmental conditions that are indicated by the species occurring at a location, and about the extent in which locations differ from each other. This sometimes provides better diagnostic insight than can be derived from the average Van Dam index values alone.

#### *Conclusions and opportunities*

Diatoms can provide a large amount of information about aquatic environmental conditions. Due to their rapid life cycle they provide a relatively fast and sensitive thermometer function, also compared to other organisms such as aquatic plants and fish that are less responsive.

For acceptance of the DNA method by policymakers, it is important that DNA detection data provide information that is comparable with microscopy data: after all, these are the now known and trusted data sources. The results of our study and of research elsewhere show that the comparability of environmental indication values derived from DNA analysis and microscopy is satisfactory, taking into account the normal bandwidth in indication values obtained when using microscopy. One must accept that both approaches provide a slightly different image of reality, and it is not easy to determine which image is 'good' or 'better'. It is therefore conceivable that DNA data do not always lead to a corresponding value for quality classes calculated on the basis of microscopic data alone.

This should certainly not be a reason to continue to see DNA detection only as a pilot instrument. The reliability of the traditional approach using microscopy also gives rise to serious questions about the degree of variation and, therefore, the reliability of the resulting results.

We conclude from our research that the DNA approach is suitable for (again) using diatom detection quickly and easily in all kinds of water quality research. It is therefore recommended to start using diatom detection with DNA analyzes together with the current microscopic method as a routine method for water quality monitoring and research. Thus, the DNA Diatom Biosensor method can be further developed both in running and standing waters, in order to arrive at a better diagnosis and assessment of water quality.

As more diatom barcodes are continually identified, the currently limited reference library for DNA of diatoms is expected to rapidly increase in size. Existing DNA samples stored as barcode lists can always be re-analyzed later with new reference lists, so that the currently hidden information can still be used in retrospect.

It seems valuable to always work with ESVs in follow-up studies and to link them to environmental indicator values, regardless of their possible taxonomic interpretation. This will probably allow many more diatom 'taxa' to play a role in the assessment of water quality and taxonomic issues do not have to complicate the usability of environmental information from the world of diatoms.

The expected cost-efficiency of the DNA technique makes it conceivable that the spatial and temporal resolution of DNA monitoring can properly describe the complexity of our aquatic ecosystems. This will improve the diagnostics of deteriorating water quality, leading to more accurate measures for restoration and management. Moreover, given the decreasing availability of manpower with expertise in diatom identification, it is very important that the current generation of specialists can use and transfer their knowledge and skills as efficiently as possible. The energetic use of DNA as a detection method is now essential.

# Inhoud

<b>Samenwerkingspartners</b>	<b>2</b>
<b>Colofon</b>	<b>3</b>
<b>Samenvatting</b>	<b>5</b>
<b>Summary</b>	<b>9</b>
<b>Inhoud</b>	<b>13</b>
<b>1 Inleiding</b>	<b>15</b>
<b>2 Materiaal en Methoden</b>	<b>17</b>
2.1 Locaties	17
2.2 Bemonstering en monsterverwerking	19
2.3 DNA-extractie	20
2.4 Sequentie analyse en bio-informatica	21
2.5 Data-analyse en index berekening	22
<b>3 De IPS-index en referentielijsten</b>	<b>25</b>
3.1 Vergelijking lijsten IPS-indicatiewaarden voor microscopie en DNA-analyse	25
3.1.1 Referentie lijsten voor taxon indicatiewaarden IPS-s en IPS-v	25
3.1.2 Aangetroffen aantallen taxa in de beschikbare monsters	26
3.2 Vergelijking overlap soortenlijsten bepaald met DNA en microscopie	28
3.3 Discussie	33
<b>4 Relatie tussen IPS-waarden gebaseerd op morfologische en DNA-barcoding veldgegevens</b>	<b>36</b>
4.1 Inleiding	36
4.2 IPS-resultaten bepaald met ethanol- en schraapmonsters	37
4.3 Gebruik van relatieve abundantie in plaats van aan- of afwezigheid	40
4.4 Vergelijking IPS-waarden bepaald met DNA en microscopie	41
4.5 Variatie bij de bepaling van indicatiewaarden met microscopie – een beknopt review	45
4.6 Discussie	47
<b>5 Taxonomie-vrije analyse</b>	<b>50</b>
5.1 Inleiding	50

5.2	Resultaten	50
5.3	Discussie	53
<b>6</b>	<b>Historisch perspectief op ervaringen met het bepalen van ecologische kwaliteit met diatomeeën</b>	<b>55</b>
6.1	Samenvatting	55
6.2	Inleiding	55
6.3	Diatomeeën	55
6.4	Determinatie	56
6.5	Toepassing	57
6.6	Indicatiewaarden	57
6.7	Groevormen	60
6.8	Misvormingen	61
6.9	Perspectieven	62
<b>7</b>	<b>Case studies met IPS en Van Dam indexen</b>	<b>63</b>
7.1	Inleiding	63
7.2	Relaties tussen Van Dam-indexen en de IPS-index	64
7.3	Brabantse Delta	66
7.4	Delfland	71
7.5	De Dommel	73
7.6	Fryslân	75
7.7	Hollandse Delta	76
7.8	Limburg	81
7.9	Rijnland	84
7.10	Stichtse Rijnlanden	86
7.11	Discussie en conclusies	93
<b>8</b>	<b>Algemene conclusies en aanbevelingen</b>	<b>95</b>
8.1	IPS-index en referentielijsten	95
8.2	Vergelijking IPS-waarden gebaseerd op microscopische en moleculaire analysegegevens	95
8.3	Taxonomie-vrije analyse	96
8.4	Historisch perspectief	97
8.5	Case studies	97
8.6	Aanbevelingen	97
<b>9</b>	<b>Referenties</b>	<b>99</b>
<b>I</b>	<b>Locaties, IPS en Van Dam index gegevens</b>	<b>104</b>
<b>II</b>	<b>Indicatoren analyse van alle ESVs</b>	<b>105</b>

# 1 Inleiding

Om de ecologische kwaliteit van Europese wateren op het gewenste niveau te krijgen en te houden moeten waterbeherende instanties uitgebreide monitoring- en maatregelenpakketten implementeren. Daarmee kunnen ze voldoen aan de Europese vereisten die worden gesteld door de Kaderrichtlijn Water (KRW).

Diatomeeën vormen daarbij een belangrijke groep van biologische indicatororganismen. Ze reageren snel op veranderingen in hun milieu en van veel soorten zijn milieu-indicatiewaarden bekend (zoals voor pH, stikstof en zuurstofhuishouding, trofie en saprobie; Van Dam et al., 1994). Ze geven daarmee een geïntegreerd beeld van milieucondities op een locatie over een periode van enkele weken tot maanden (zie bijvoorbeeld Van Zuilichem et al., 2016 en Van Dam & Mertens, 2020). Voor deze aspecten bestaan geen goede alternatieve (biologische) methoden. In 21 van de 27 EU-landen vormen diatomeeën onderdeel van een KRW-kwaliteitsindex voor stromende wateren. In negen EU-landen worden ze voor stilstaande wateren toegepast (Poikane et al., 2016). Vaak is de gebruikte maatlat gebaseerd op de *Indice de Polluosensitivité Spécifique* (IPS; Coste, 1982; Kelly, 2013; Poikane et al., 2016), die ook onderdeel is van de Nederlandse KRW-maatlat (Van der Molen et al., 2018).

Diatomeeën zijn in Nederland wel opgenomen in de KRW beoordeling van stromende wateren, maar niet van stilstaande wateren. In de laatste is vooralsnog gekozen voor waterplanten en het optreden van algenbloei als alternatief. Voor stromende wateren is dat niet mogelijk. Kelly (2013), Kelly et al. (2014) en Poikane et al. (2016) merken op dat diverse EU-staten geen fytobenthos index voor meren hebben, zonder dat ze onderbouwen waarom ze met macrofyten voldoende uit de voeten kunnen.

De morfologische determinatie van diatomeeën middels microscopie vereist hooggekwalificeerde taxonomische kennis. Daardoor zijn de analyses ook tamelijk kostbaar en kennen ze een relatief lange doorlooptijd. Verder kunnen determinatiefouten en -verschillen tussen experts optreden, en daardoor zijn verkeerde conclusies over milieu-indicaties niet uitgesloten. Deze problemen bij het gebruik van diatomeeën als indicatoren voor de waterkwaliteit in stromende en stilstaande wateren kunnen worden ondervangen door gebruik te maken van de snelle ontwikkeling van nieuwe op DNA gebaseerde identificatiemethoden (zie Beentjes, 2020, voor een algemene toelichting op DNA detectiemethoden). Er wordt dan gebruikt gemaakt van korte DNA-fragmenten waarvan de sequentie in de meeste gevallen specifiek is voor een bepaalde soort (uitzonderingen daargelaten met soortcomplexen). Deze sequenties worden DNA-barcodes genoemd. In een zogenaamde DNA-metabarcodes analyse kunnen de DNA-barcodes van verschillende soorten in een monster geautomatiseerd worden geïdentificeerd met behulp van DNA referentie databanken.

Een DNA-metabarcodes benadering biedt ook kansen om barcodes van diatomeeën te gebruiken voor een waterkwaliteitsbepaling zonder dat volledige identificatie tot op soortniveau nodig is (zie bijvoorbeeld Apothéloz-Perret-Gentil et al., 2017, 2021, en Gregersen et al., 2023). In zo'n aanpak, hier kortweg 'taxonomie-vrije' benadering genoemd, kunnen de DNA-barcodes van de niet taxonomisch geïdentificeerde diatomeeën uit een monster gekoppeld worden aan de ecologische indicatie score van dat monster gebaseerd op fysisch-chemische waarnemingen en/of op basis van de daarin voorkomende, wél op naam gebrachte diatomeeën. Bij voldoende van dergelijke koppelingen kunnen zo ook deze niet-taxonomisch geïdentificeerde diatomee barcodes worden voorzien van een eigen ecologische indicatiewaarde, zodat ze in toekomstige monsters direct kunnen worden gebruikt.



Door de in de toekomst naar verwachting lagere kosten per metabarcoding-analyse dan via morfologische identificatie kunnen meer monsters in ruimte en tijd worden genomen, en kan de al beschikbare gedetailleerde ecologische kennis over indicatiewaarden van diatomeeën gemakkelijker en dus ook breder worden ingezet. En dan beslist niet alleen bij reguliere KRW monitoring, die vaak gericht is op de grotere wateren zoals rivieren, kanalen en meren van meer dan 50 ha. De toepassing kan juist ook zinvol zijn bij de bepaling van het succes van inrichtings- en beheersmaatregelen op diverse ruimtelijke en temporele schaalniveaus, gericht op waterkwaliteitsverbeteringen in het waterbeheer en het aanpalende landelijke gebied. Daarbij kunnen ook de zogenaamde 'overige wateren', waarvoor volgens de KRW een inspanningsverplichting geldt voor het bereiken van een goede waterkwaliteit, aandacht krijgen met zo'n relatief snelle vorm van ecologische effectbepaling.

Het hier gerapporteerde TKI-samenwerkingsproject beoogde bij deze ontwikkeling een hefboom te zijn. Het doel was om een biosensor te ontwikkelen en te beproeven gebaseerd op DNA monitoring van diatomeeën (de DNA Diatom Biosensor). Hiermee kan in principe een objectief, ruimtelijk dekkend beeld worden verkregen van allerlei ecologische waterkwaliteitsinformatie gebaseerd op milieu-indicatiewaarden van diatomeeën tegen dezelfde of zelfs lagere kosten in vergelijking met bestaande methoden. Dit biedt eindgebruikers en marktpartijen kansrijke nieuwe mogelijkheden voor de ontwikkeling van een efficiënt instrumentarium voor monitoring, diagnose en beoordeling van waterkwaliteit en van de effectiviteit van maatregelen voor en door waterbeheerders en watergebruikers, nationaal en internationaal.

Om dit doel te bereiken zijn de volgende deeldoelen gedefinieerd en nader uitgewerkt in het onderzoek:

- (1) Het ontwikkelen van een procedure voor de detectie en identificatie van DNA van diatomeeën (hoofdstuk 2 en 3);*
- (2) Het vaststellen van de vergelijkbaarheid van scores voor ecologische waterkwaliteit gebaseerd op morfologische identificatie dan wel op basis van DNA barcodes (hoofdstuk 4);*
- 3) Het ontwikkelen en beoordelen van een taxonomie-vrije benadering bij het gebruik van DNA barcodes van diatomeeën bij het bepalen van ecologische waterkwaliteit (hoofdstuk 5);*
- 4) Het genereren van een historisch perspectief op ervaringen met het bepalen van ecologische kwaliteit gebaseerd op indicatiewaarden van diatomeeën (hoofdstuk 6).*

Aan de hand van een aantal case studies is ook een beeld geschetst van de toepassing van een tweetal bestaande diatomeeën indexen met inzet van met DNA verkregen soortenlijsten (hoofdstuk 7).

Voor de bovenstaande werkzaamheden hebben de deelnemende waterbeherende projectpartners diverse locaties geselecteerd en daaruit gegevens verzameld gericht op de ontwikkeling en validatie van de DNA Diatom Biosensor voor het bepalen van de impact van maatregelen op de waterkwaliteit. De bemonsteringen werden uitgevoerd door de deelnemende laboratoria (AQUON, Waterproef, Wetterskip Fryslân en Waterschap Limburg). De aansluitende microscopische analyses en identificaties zijn door diezelfde laboratoria gedaan. De ontwikkeling en uitvoering van de DNA detectiemethode is gedaan door Naturalis in samenwerking met BaseClear. De daaropvolgende data analyse is gedaan door Naturalis en KWR. Het historisch perspectief op inzichten gebaseerd op milieu-indicaties van diatomeeën is uitgevoerd door AQUON in samenwerking met het adviesbureau van Herman van Dam.

## 2 Materiaal en Methoden

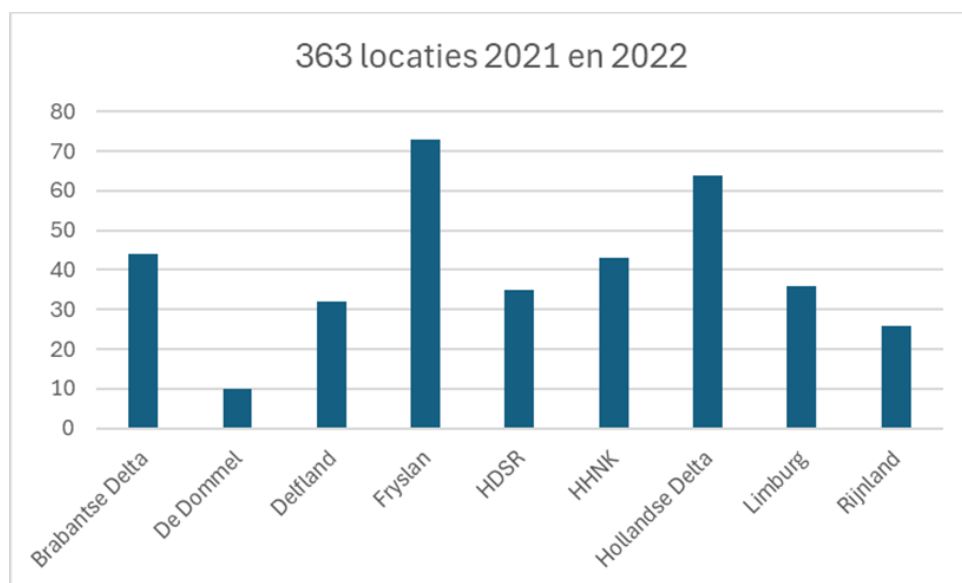
### 2.1 Locaties

In Figuur 2.1 zijn de negen aan het TKI-samenwerkingsproject deelnemende waterschappen weergegeven. In 2021 en 2022 zijn door deze waterschappen diatomee-monsters aangeleverd van in totaal 363 locaties voor een latere DNA analyse door Naturalis in samenwerking met BaseClear. Daarnaast zijn van 279 van de 363 locaties door de betrokken waterschapslaboratoria ook diatomee-monsters geteld en morfologisch taxonomisch geïdentificeerd met de microscoop. Van 84 locaties zijn de diatomee-monsters alleen geanalyseerd met DNA als demonstratie bij een aantal case studies.



*Figuur 2.1 Geografische ligging van de negen deelnemende waterschappen.*

In Figuur 2.2 staan de aantallen onderzochte locaties per waterschap. Tabel 2.1 geeft een overzicht van de verdeling van de ingebrachte locaties over KRW-watertypen en overige watertypen. Ook staat hier per watertype het aantal monsters met een beschikbare DNA-analyse. Voor een algemene karakterisering van de KRW-watertypen en overige watertypen wordt verwezen naar Evers et al. (2018) en Van der Molen et al. (2013, 2018).



Figuur 2.2. Verdeling van de 363 onderzochte locaties over de negen deelnemende waterschappen.

Tabel 2.1. Verdeling van de ingebrachte monster locaties over KRW-watertypen en overige watertypen (de laatste zijn aangegeven met \*), en het aantal monsters hieruit met een DNA resultaat (DNA) per watertype. M: stilstaande wateren; R: stromende wateren.

watertype	n totaal	DNA	watertype	n totaal	DNA
M1	14	13	R2b *	2	2
M1a	36	33	R3 *	5	5
M1b	12	12	R4	15	15
M2	2	2	R4a	19	18
M3	19	18	R5	39	32
M6a	19	16	R6	16	16
M6b	4	4	R8	2	2
M7a	1	1	R13	4	4
M7b	2	2	R17	6	6
M8	22	22	R18	5	5
M10	13	13	R19	6	6
M11 *	23	19	<b>subtotaal</b>	<b>119</b>	<b>111</b>
M12	21	20			
M13 *	8	8			
M14	7	6			
M16 *	10	10			
M20	6	6			
M25 *	3	3			
M26 *	2	2			
M30	17	17			
M31	3	3			
<b>subtotaal</b>	<b>244</b>	<b>230</b>	<b>Totaal</b>	<b>363</b>	<b>341</b>

## 2.2 Bemonstering en monsterverwerking

De bemonstering en analyse van diatomeeën voor de morfologische taxonomische identificatie is door AQUON uitgevoerd voor de monsterlocaties van Rijnland, Delfland, Hollandse Delta, Stichtse Rijnlanden, Brabantse Delta en Dommel. Dit gebeurde volgens de werkvoorschriften V HYB 005 “Bemonstering diatomeeën” en V HYB 003 “Prepareren en determineren van bentische diatomeeën”. Deze voorschriften zijn zover als mogelijk conform de geldende NEN normen 9409 en 13946. De diatomeeën worden in het veld verzameld door materiaal te verzamelen in potten en te conserveren met zoutzuur. Dit materiaal bestaat uit afschraapsel, of delen van substraten die zoveel mogelijk in contact staan met het te beoordelen water. In het laboratorium worden de diatomeeën van het materiaal gescheiden en schoongemaakt middels zuren en waterstofperoxide. Een deel van de schoongemaakte diatomeeën wordt op een permanent preparaat aangebracht en geanalyseerd onder de microscoop. Determinaties zijn gedaan met een vergroting van minimaal 1000x. Voor elk preparaat is een soortenlijst opgesteld door van een deel van het preparaat de soorten te determineren. Vervolgens is een telling, willekeurig over het preparaat, van 200 schaaldelen uitgevoerd.

Bij Wetterskip Fryslân is de morfologische taxonomische identificatie van diatomeeën uitgevoerd volgens interne voorschriften gebaseerd op Stowa (2010) voor monsternamen en NEN 9409 voor de analyse. Bij de monsternamen worden ongeveer 5-8 rietstengels, op een diepte van 15 tot 20 cm onder het wateroppervlak afgeknipt. Bij afwezigheid van de rietstengels worden er andere planten geknipt of wordt schraapsel van een hard oppervlak bemonsterd. Het bemonsterd materiaal wordt in een pot meegenomen naar het lab en bewaard in de vriezer (ca. -18 °C). Voor de analyse van de monsters worden de potjes met materiaal uit de vriezer gehaald, ontdooid en gevuld met 10% zoutzuur. De potjes blijven zo minimaal twee dagen staan. Daarna wordt de vloeistof afgegoten in een buis en gewassen (door bezinken, afhevelen en demiwater toevoegen). Een deel van het gewassen materiaal wordt met waterstofperoxide geoxideerd. Na nog een wasstap wordt van het materiaal een vast preparaat gemaakt. Dit wordt met een microscoop en een vergroting van 1000x geanalyseerd. Het preparaat wordt eerst gescreend op soorten waarna random 200 schaaldelen worden gedetermineerd.

Waterproef voerde voor Hollands Noorderkwartier de bemonstering en analyse van diatomeeën uit volgens de interne voorschriften V7010 (gebaseerd op Stowa, 2010) en A7010, gebaseerd op NEN 9409. Voor de bemonstering worden op elke locatie ongeveer 10 rietstengels verzameld die op 15-20 cm onder het wateroppervlak zijn afgeknipt. Als er geen riet aanwezig is, kunnen ook andere (water)planten worden verzameld of wordt hard substraat afgeschraapt, mits dit met het open water in contact staat. Op het lab wordt het verzamelde materiaal in potten met 10% HCl geconserveerd. Voor het verwerken van het materiaal wordt eerst het zoutzuur enkele malen uitgewassen (door bezinking en afhevelen van de bovenstaande vloeistof), waarna de diatomeeënschaaltjes worden schoongemaakt met behulp van waterstofperoxide. Nadat ook het waterstofperoxide is uitgewassen, wordt een deel van de suspensie van schoongemaakte diatomeeën gebruikt om een vast preparaat te maken door de schaaltes in een hars (Naphrax) in te bedden. In dit preparaat worden bij een vergroting van 1000x in een aantal willekeurig gekozen beeldvelden 200 schaaldelen geteld. De determinatie van de verschillende soorten gebeurt meestal bij 1000x of 2000x vergroting.

Waterschap Limburg hanteerde voor monsternamen en conservering van materiaal voor microscopische analyse een met de hierboven beschreven procedures vergelijkbare werkwijze. Er werd echter voor conservering gewerkt met formaline in plaats van zoutzuur, vanwege de hoge mangaan-gehalten in het materiaal.

Voor DNA-monsternamen is door alle instanties op dezelfde manier materiaal in het veld verzameld als voor de latere microscopische analyse. Vervolgens werd direct in het veld aan het verzamelde materiaal 96% ethanol toegevoegd in plaats van zoutzuur dan wel formaline.

## 2.3 DNA-extractie

Alle aangeleverde potten met diatomeeënmonsters zijn bij Naturalis verwerkt voor DNA-extractie en sequencing. Voor de DNA-extractie werd gebruik gemaakt van de DNeasy PowerSoil Pro kit (QIAGEN), grotendeels volgens het protocol van de leverancier. De voorbereiding van de monsters voorafgaand aan de DNA-extractie gebeurde op twee verschillende manieren:

- Eerst werd de pot met het monster in 96% ethanol, zoals aangeleverd door de waterbeheerders, een halve minuut hard geschud aangezien al te zien was dat een deel van de epifyten was losgekomen in het ethanol. Na het schudden werd 2 ml van het ethanolmengsel afgepipetteerd en in een eppendorf buis gedaan. Door de eppendorf buis af te draaien, vormde het biologisch materiaal een pellet onderin de buis, waarna het ethanol kon worden afgegoten. De pellet werd daarna geresuspendeerd in de DNA-lysisbuffer van de DNeasy PowerSoil Pro kit. Deze monsters worden hierna in dit rapport als ethanolmonsters aangeduid.
- Daarna werden voor zover mogelijk, de resterende epifyten afgeschraapt van de rietstengels of ander substraat dat was aangeleverd,. Met een scalpel werd het oppervlak langs de gehele lengte van de stengels (of ander substraat) afgeschraapt, van in totaal drie verschillende stengels per pot. Het materiaal dat op de scalpel werd verzameld, werd losgeschud in een eppendorf buis met daarin 2 ml schone ethanol. Hierna werden deze monsters eveneens afgedraaid, het ethanol afgegoten, en de pellet opnieuw geresuspendeerd in de DNA-lysisbuffer. Deze monsters worden hierna in dit rapport schraapmonsters genoemd.

Voor sommige monsters was het schrapen niet mogelijk, omdat deze monsters geen substraat bevatten (bijvoorbeeld een monster van een kadewand), of omdat het substraat uit zachte planten/wieren bestond. Voor een aantal andere monsters (uit 2021) is het ethanolmonster en het schraapmonster al voor de DNA-extractie samengevoegd, in verband met het totaal aantal monsters dat meegenomen kon worden in de DNA-analyse. Het grootste deel van de monsters uit 2021, en alle monsters uit 2022 zijn als twee submonsters verwerkt tijdens het proces in het lab. Voor de meeste monsters is dus zowel een ethanol- als een schraapmonster geanalyseerd. Via Bijlage I is een overzicht te vinden van welke monsters met welke methode zijn verwerkt.

Voor de identificatie van de diatomeeën in het monster middels DNA is gebruikt gemaakt van DNA in het chloroplast genoom, namelijk het voor het enzym ribulose 1-5 bifosfaat carboxylase coderende Large subunit gen (rbcL). Dit fragment is uit het DNA extract geamplificeerd in een PCR reactie met behulp van een primerpaar dat specifiek gericht is op het amplificeren van diatomeeën; rbcL\_708F (AGGTGAAGTTAAAGTTCATACTTDA; Stoof-Leichsenring et al., 2012) en rbcL\_R3 (CCTTCTAATTTACCAACAACCTG; Bruder & Medlin, 2007). Hierdoor is de DNA barcode 263 basenparen lang, met een gevalideerde en goed onderhouden referentie database die online beschikbaar is: Diat.barcode v11.1 (Rimet et al, 2019).

De keuze voor de rbcL primers met bijbehorende barcode is met name bepaald door de beschikbaarheid van de goede publieke referentie database (Rimet et al., 2016, 2019). Bovendien komen deze rbcL barcodes goed uit een aantal vergelijkende studies. Hamsher (2011) vergeleek vijf verschillende 5 primerparen op verschillende genen, en adviseerde het rbcL primerpaar boven de primerparen voor het LSU, CO1 en ITS2 gen van diatomeeën. Guo et al. (2015) vergeleken vier mogelijke markergenen waaronder 18S en rbcL. Deze twee markergenen leken volgens hen redelijk vergelijkbaar in prestatie. Baillet et al. (2020) vonden ook dat barcodes van het rbcL gen beter vergelijkbaar waren met lichtmicroscopische data dan barcodes verkregen met primers voor de V4 regio van het 18S rRNA gen.

Na de amplificatie zijn de monsters verder opgewerkt om deze klaar te maken voor het sequencen, volgens het protocol als beschreven in Beentjes et al. (2019), waarbij elk monster een eigen, unieke, DNA index kreeg zodat de barcode data later makkelijk uit elkaar gehaald kon worden. Het sequencen zelf werd gedaan door BaseClear, waarbij gebruik is gemaakt van twee verschillende technieken; de Illumina Miseq methode voor de monsters uit 2021, en de Illumina Novaseq methode voor de monsters uit beide jaren samen. Beide technieken zijn in essentie

hetzelfde, maar op een Novaseq wordt ongeveer tien keer meer data gegenereerd, zodat er makkelijker meer monsters tegelijkertijd kunnen worden geanalyseerd. De ruwe data is door BaseClear weer naar Naturalis gestuurd voor verdere analyse. Beentjes (2024) geeft een gedetailleerde beschrijving van de complete procedure.

## 2.4 Sequentie analyse en bio-informatica

Voor het verwerken van de ruwe sequentie data tot bruikbare barcodes die vergeleken kunnen worden met de referentiedatabase is gebruik gemaakt van de APSCALE bio-informatica pijplijn (Buchner et al., 2022). In deze pijplijn is de ruwe data uitgesplitst naar de verschillende monsters op basis van de unieke indexen die elk monster in het lab had meegekregen, en zijn de sequenties geclusterd tot zogenaamde 'exact sequence variants' (ESVs), waarbij alle sequenties die volledig identiek zijn bij elkaar zijn gegroepeerd tot één ESV (als term tegenwoordig vaak gebruikt in plaats van het identieke begrip 'barcode'). De in DNA onderzoek ook gebruikte term 'OTU' (operational taxonomic unit) is niet hetzelfde als een ESV: een OTU bestaat uit de barcodes van alle ESVs die voor een groot deel (vaak 97% of meer) aan elkaar gelijk zijn. Bij het in een OTU samennemen van ESVs verdwijnt dus het onderscheid tussen de unieke onderliggende ESVs. Daar is in dit onderzoek niet voor gekozen

Het resultaat van deze twee stappen is een zogenaamde ESV tabel, waarin per monster voor elke ESV is aangegeven hoeveel reads (het aantal keren dat deze ESV is afgelezen door de Miseq of Novaseq) aanwezig waren in de sequencing data. Hierna zijn per monster alle ESVs verwijderd die minder dan 0,05% van het totaal aantal reads representeerde van het monster, om te voorkomen dat er vals-positieven werden meegenomen in de data. Deze ontstaan door minieme kruisbesmettingen tussen de monsters gedurende het laboratoriumproces. Ook alle monsters met in totaal minder dan 2000 reads zijn verwijderd uit de dataset. Voor deze monsters geldt immers dat met een filter van 0,05% op de ESVs er nooit iets kan worden weggefilterd, aangezien 0,05% van minder dan 2000 minder dan één read is. Normaliter wordt één read voor een ESV (ook wel een singleton genoemd) als twijfelachtig beschouwd.

Voor het op naam brengen van de ESVs werd de eerder genoemde publiek beschikbare referentiedatabase Diat.barcode v11.1 gebruikt (Rimet et al., 2019). Deze bevat barcodes van diatomeeën wereldwijd, en ongeveer een kwart van de soorten die gebruikt worden voor de Nederlandse KRW-maatlat is hierin vertegenwoordigd. Voor de vergelijking met de referentie werd het BLAST algoritme gebruikt, in combinatie met een Lowest Common Ancestor (LCA) analyse, volgens Beentjes et al. (2019). Een identificatie op soortniveau werd gedaan als er een match was van tenminste 98% similariteit tussen de ESV in het monster en in de referentiedatabase. Voor de ESVs waarbij geen match was op soortniveau werd met de LCA analyse een identificatie gedaan op een hoger taxonomisch niveau. Een deel van de barcodes kon niet worden geïdentificeerd. Dit betreft deels waarschijnlijk soorten die niet in de referentiedatabase zijn opgenomen, maar ook een kleine bijvangst van andere soortgroepen (dus geen diatomeeën; zie paragraaf 3.2 voor de betreffende resultaten). Er is bovendien internationaal nog veel werk te verrichten aan het goed koppelen van correcte morfologische identificaties aan bijbehorende DNA-barcodes.

In een aantal gevallen waren er meerdere soorten die een tenminste 98% match hadden met de betreffende ESV. Voor deze gevallen zijn de resultaten handmatig nagelopen om uiteindelijk voor elke ESV slechts één soortnaam over te houden (of in een aantal gevallen een combinatie van namen). De volgende regels werden (in de aangegeven volgorde) gehanteerd om hier keuzes in te maken:

1. Soorten die niet in Nederland voorkomen zijn verwijderd. Jako van der Wal (AQUON) heeft de verkregen soortenlijst hierop gescreend.
2. Soorten uit de referentiedatabase die wel een genusnaam maar geen soortnaam hadden zijn verwijderd (bijvoorbeeld *Discostella sp.*), evenals soorten die in de referentiedatabase stonden als een complex (bijv. *Nitzschia cf sublinearis*).

3. Als er meerdere soorten zijn, is degene met het hoogste match-percentage behouden.
4. Als er meerdere soorten zijn met een zelfde match percentage, werden de soorten opgezocht in de IPS-scorelijst, om te zien of deze soorten een verschil hadden in kwaliteitsindicatiewaarden voor de IPS. Als dat niet het geval was, werd de bovenste soort uit de lijst van soorten die bij de betreffende ESV pasten geselecteerd, omdat dit voor het berekenen van de kwaliteitsindex geen invloed zou hebben.
5. Als er wél een verschil was in de indicatiewaarden tussen soorten met hetzelfde match percentage voor de betreffende ESV, werd geen van de soorten geselecteerd, en werd de ESV als "niet geïdentificeerd" meegenomen. Op basis van DNA was dan immers niet te beslissen welke de 'juiste' identificatie was, terwijl de keuze van invloed zou zijn op de berekening van de kwaliteitsindex. Dit was echter maar voor een heel klein aantal ESVs het geval. Bijvoorbeeld bij *Nitzschia acicularis* (indicatiewaarde IPS-s=2) versus *Nitzschia gracilis* (IPS-s=3), waarvan de rbcL barcodes 100% identiek zijn. Dit is een voorbeeld van een situatie waarbij waarschijnlijk een barcode is gegenereerd op basis van een onjuiste morfologische determinatie. Deze twee soorten zijn makkelijk uit elkaar te houden (mond. med. Jako van der Wal, AQUON).

Naast de bovengenoemde DNA-referentiedatabase speciaal voor diatomeeën is een deel van de aangetroffen ESVs ook vergeleken met rbcL identificaties uit de GenBank referentiebibliotheek. Dit betrof ESVs waarbij geen enkele identificatie mogelijk was met de diatomee DNA-database. GenBank bevat mogelijk meer referentie barcodes, alsmede ook rbcL data van andere taxonomische groepen. Maar deze database bevat voor een deel ook barcodes waar geen validatie op gedaan is, en die dus mogelijk onbetrouwbaar zijn. De vergelijking met GenBank is alleen gebruikt om een indruk te krijgen van de identificatie van de 892 ESVs waar geen matches mee werden gevonden in de diatomeeën database (zie verder in paragraaf 3.2).

## 2.5 Data-analyse en index berekening

Met behulp van R zijn de barcodes uit de eerder genoemde ESV tabel vertaald naar de taxonomische namen die nodig zijn voor de analyse met de IPS en Van Dam indexen. Alle ESVs die minder dan 0,05% van het totale monster vertegenwoordigen werden daarbij verwijderd, zoals hierboven beschreven.

Daarna werden alle ESVs in de ESV tabel gekoppeld met de bijbehorende identificatie op soortniveau (voor de indexen wordt alleen gekeken naar data die op soortniveau is gedetermineerd). ESVs met alleen een determinatie op basis van DNA op een hoger taxonomisch niveau zijn voor deze stap buiten beschouwing gelaten. Het kwam voor dat meerdere ESVs met dezelfde soorten matchen, omdat de barcodes kunnen variëren binnen een soort, en we met de BLAST een ondergrens aangehouden hadden van 98% overeenkomst. De reads van ESVs die met dezelfde soorten matchen zijn per soort bij elkaar opgeteld, zodat in de uiteindelijke tabel elke soort slechts werd vertegenwoordigd door één regel.

De voor DNA-barcodering beschikbare taxonlijsten gaan over *soorten*. De voor de microscopist beschikbare taxonlijsten gebaseerd op morfologische kenmerken bevatten voor diverse taxa vaak nog diepere taxonomische niveaus (ondersoorten, variëteiten). Deze hebben soms ook nog hun eigen indicatiewaarden voor kwaliteitsindexen. Een zeer veel gebruikte uitgebreide referentiebibliotheek met indicatiewaarden is Omnidia (Lecoine et al., 1993). Deze database met software tool waarmee met taxonlijsten vele verschillende indexen kunnen worden berekend wordt regelmatig bijgewerkt en op kwaliteit geborgd door de beheerders. De in ons onderzoek gebruikte indicatiewaardenlijst voor de berekening van de IPS- en Van Dam-indexen is een hiervan door AQUON afgeleide en voor Nederland gecureerde versie van 6 oktober 2023 (mond. med. Jako van der Wal, AQUON). Vanzelfsprekend is deze taxonomische referentielijst dynamisch, maar er is na 6 oktober 2023 door ons geen aanpassing meer doorgevoerd in de gebruikte taxonlijsten.

In het hier beschreven onderzoek is de IPS index gebruikt om de diatomee-taxonlijsten, verkregen met morfologische identificatie middels microscopie en met de barcode identificatie middels DNA-analyses, op een handzame manier samen te kunnen vatten in één getal. Daarmee kunnen we de resultaten van beide werkwijzen met elkaar vergelijken.

De IPS wordt berekend als een gewogen gemiddelde van twee waarden per taxon. In de IPS-index is een taxon een soort, of soms zelfs een ondersoort of variëteit. De waarde voor de gevoeligheid ( $s_i$ ; hierna ook aangeduid met IPS-s) geeft een maat voor de organische en/of nutriëntenbelasting (van 1=belast naar 5=onbelast). De indicatiewaarde ( $v_i$ ; hierna ook aangeduid met IPS-v) geeft de bandbreedte aan waarin het betreffende taxon zich kan bevinden rond zijn optimum voor IPS-s. De indicatiewaarde IPS-v loopt van 1 (grote bandbreedte) naar 3 (smalle bandbreedte van voorkomen). De naamgeving van de gebruikte taxa volgt de Taxa Waterbeheer Nederland (TWN). De IPS is een getal tussen 0 en 20 (van slechte naar zeer goede waterkwaliteit) en wordt berekend met de volgende formule, waarbij de IPS waarde op één cijfer achter de komma werd afgerond (van der Molen et al., 2018):

$$IPS = 4,75 * \frac{\sum_{i=1}^n a_i * s_i * v_i}{\sum_{i=1}^n a_i * v_i} - 3,75$$

Hierin is  $a_i$  de relatieve abundantie van het  $i$ -de taxon in een monster;  $s_i$  is de gevoeligheid IPS-s en  $v_i$  de indicatiewaarde IPS-v van het  $i$ -de taxon en  $n$  is het totaal aantal taxa in het monster. In onze berekeningen van de IPS met DNA gegevens hebben we de relatieve abundantie van een soort berekend op basis van het aantal aangetroffen reads van de DNA barcode van die soort in het monster. Dat is analoog aan de in Nederland gebruikte werkwijze voor microscopisch geanalyseerde monsters waarbij gewerkt wordt met het getelde aantal individuen van een taxon in een monster van 200 diatomee schaaltes in een microscopisch preparaat (mond. med. Jako van der Wal). Op de keuze voor het gebruik van barcodes als abundantie schatting wordt nader ingegaan in paragraaf 4.3.

De IPS-scores zijn berekend voor alle DNA-monsters, dus zowel de ethanol- als de schraapmonsters. Wanneer van een monster voor beide monstertypen (ethanol- en schraapmonsters) resultaten waren, is daarnaast ook een IPS-score berekend voor de combinatie. Voor de berekening van de IPS-waarden voor de microscopisch bepaalde taxonlijsten zijn enkele taxa waarvan het aantal als '0' was geregistreerd verwijderd uit de lijst.

Voor zowel de microscopie als de DNA-resultaten zijn de IPS-waarden ook berekend op basis van aan-/afwezigheid, waarbij de formule is aangepast om de abundanties buiten beschouwing te laten:

$$IPS = 4,75 * \frac{\sum_{i=1}^n s_i * v_i}{\sum_{i=1}^n v_i} - 3,75$$

Voor alle monsters zijn tevens de verschillende Van Dam-indices berekend (Van Dam et al., 1994). De Van Dam-index bestaat uit een verzameling van zeven indexen, die gebruik maken van de indicatiewaarden van diatomeeën voor zeven milieu-aspecten. Dit zijn pH, saliniteit, stikstof metabolisme, zuurstof metabolisme, saprobie, trofiegraad, en vochtigheid. Met deze aanpak kunnen dus meer milieu-aspecten worden beschouwd dan met alleen de IPS. Dat kan wat meer handvatten bieden om te komen tot een diagnose, indien een waterlichaam niet de gewenste waterkwaliteit heeft. Tabel 7.1 in hoofdstuk 7 geeft een overzicht van de zeven Van Dam-indexen en de betekenis van de diverse scores per index.

Een Van Dam-index wordt net als de IPS bepaald met een naar de abundantie gewogen gemiddelde waarde van de indicatiewaarden voor die index van alle individuen van de in een monster aangetroffen diatomee-taxa. Voor de DNA gegevens werden daarvoor alle readaantallen van aangetroffen soorten per betreffende categorie bij elkaar



opgeteld. Vervolgens is zo een naar abundantie gewogen gemiddelde indicatiewaarde berekend. De indexen voor pH en voor trofie maken naast hun min of meer lineaire schaal ook nog gebruik van een uitzonderingswaarde (bij pH de waarde 6, voor taxa die geen specifieke voorkeur voor een pH waarde hebben; bij trofie de waarde 7, voor taxa die geen specifieke voorkeur voor een bepaalde trofiegraad vertonen). Deze twee klassewaarden zijn uit de berekeningen van de gemiddelde index-waarde weggelaten, aangezien anders het gewogen gemiddelde onterecht naar boven zou kunnen worden getrokken (zie ook Stowa, 2010, voor meer informatie over de berekening van de Van Dam-index).

Om meer inzicht in de diatomeeënsamenstelling van de monsterlocaties te krijgen zijn in R zogenaamde Venn diagrammen gemaakt waarin de totale soortenlijsten op basis van alle ethanolmonsters, alle schraapmonsters, de combinaties daarvan, en de microscopie resultaten met elkaar zijn vergeleken. Hiervoor is alleen gekeken naar *soorten*, en niet naar ondersoorten en variëteiten. Voor alle monsters met resultaten voor zowel de ethanol- als schraapmonsters (of waar deze voor de DNA extractie al gecombineerd waren) en waarvoor ook met microscopie verkregen taxonomische soortenlijsten beschikbaar waren, is tevens een directe vergelijking gemaakt van de overlap van deze twee soortenlijsten per monster. Ook zijn NMDS-plots gemaakt in R met het pakket “VEGAN” (Oksanen et al., 2022), om zo locaties op grond van hun soortensamenstelling te vergelijken op basis van de zogenaamde Bray-Curtis similariteit. Hierin zijn ook weer de readaantallen als relatieve abundanties meegenomen.

Voor de taxonomie-vrije benadering zijn twee type analyses gedaan. Hiervoor is alle ESV-data gebruikt, niet alleen de ESV-data die tot op soortniveau kon worden geïdentificeerd. Voor de toedeling van de monsters aan KRW waterkwaliteitsklassen is gebruik gemaakt van de IPS-waarden op basis van de morfologische identificatie middels microscopie, aangezien dat momenteel de standaard is. Met de analyses is onderzocht of de samenstelling van de ESV-gemeenschap in de monsters voorspellende waarde heeft voor de toedeling aan de KRW-kwaliteitsklassen, zonder de vertaling te maken naar taxonomische soorten. Deze aanpak is succesvol gebleken bij onder andere diatomeeën, waarbij de taxonomie-vrije DNA-methoden overeenkomstige beoordelingen opleverden in vergelijking met DNA-analyses die tot een taxonomische soortenlijst werden herleid (Cordier et al., 2018; Gregersen et al., 2023).

Ten eerste is een zogeheten indicatoren analyse gedaan in R met het pakket “INDICESPECIES” (Cáceres & Legendre, 2009), om te testen of bepaalde ESVs indicatief zouden zijn voor KRW-kwaliteitsklassen. Dit werkt door de ESV-tabel aan te bieden aan het programma, in combinatie met de indeling van de monsters in standaard KRW-klassen voor natuurlijke wateren (Van der Molen et al., 2018) op basis van de IPS-waarden: ‘zeer goed’, ‘goed’, ‘matig’ en ‘ontoereikend’ (de categorie ‘slecht’ kwam niet voor). Onze studie maakt dus géén gebruik van de formeel geldende, door de waterbeheerder afgeleide KRW doelen. De uitkomst is een lijst van ESVs die indicatief zijn voor één of meerdere klassen, met daarbij de waarden voor de specificiteit (de kans dat een monster tot een bepaalde klasse behoort als deze ESV gevonden wordt) en de sensitiviteit (de kans dat een ESV wordt gevonden in een monster van een bepaalde klasse).

Ten tweede is onderzocht of de gehele samenstelling van ESVs in een monster een voorspellende waarde heeft voor de bijbehorende KRW kwaliteitsklassen. Daarvoor is machine-learning toegepast in R met het pakket “CARET” (Kuhn, 2008). Hierbij is gebruik gemaakt van dezelfde ESV-tabel en informatie over de indeling van de monsters in KRW kwaliteitsklassen als bij de indicatoren analyse. Het machine-learning algoritme probeert de monsters te clusteren aan de hand van de met microscopische analyse bepaalde KRW-kwaliteitsklassen. Door een deel van de data (25%) weg te laten bij deze ‘training’ van het algoritme, kan daarna met deze resterende 25% data in een validatie getest worden hoe goed deze monsters op basis van het model in de ‘juiste’ klasse worden ingedeeld. Het model voorspelt op basis van alleen de ESVs in een monster wat de meest waarschijnlijke KRW-kwaliteitsklasse van dat monster is.

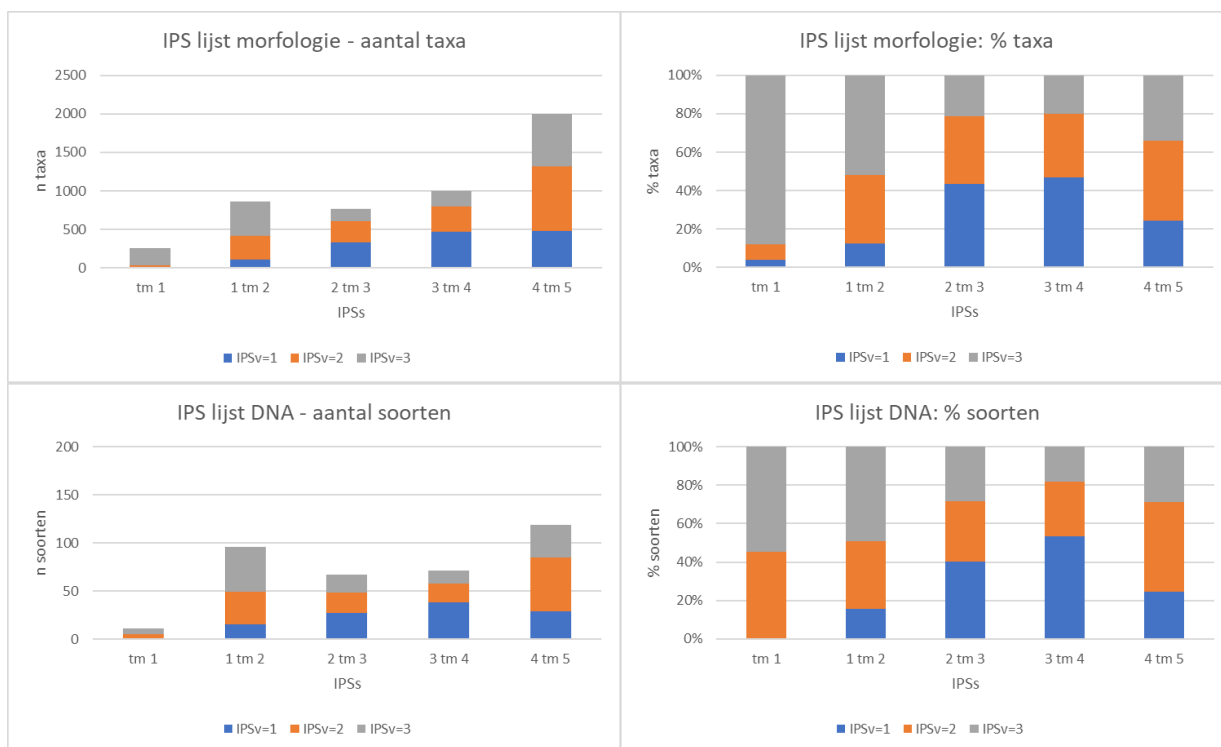
### 3 De IPS-index en referentielijsten

#### 3.1 Vergelijking lijsten IPS-indicatiewaarden voor microscopie en DNA-analyse

Bij de vergelijking van resultaten uit de IPS berekeningen gebaseerd op de twee taxonlijsten voor morfologische identificatie met microscopie en voor barcode-identificatie met DNA is het ook van belang om inzicht te hebben in de mate waarin de voor beide datasets beschikbare referentielijsten overeenkomen in hun verdeling van taxa over de bijbehorende IPS-indicatiewaarden IPS-s en IPS-v (zie paragraaf 2.5). Als daarin grote verschillen bestaan, kan dat bij voorbaat leiden tot verschillende IPS-index schattingen voor beide benaderingswijzen. In dit hoofdstuk wordt dit niet alleen onderzocht voor de twee referentielijsten maar ook voor de twee taxonlijsten die konden worden gemaakt op basis van de veldgegevens na identificatie van de diatomeeën in 363 monsters met microscopie en met DNA. Het zou immers kunnen dat de in het veld gevonden taxonlijsten voor beide methoden een vergelijkbare verdeling van taxa over de beide IPS-indicatiewaarden hebben, ook als de twee referentielijsten daarin zouden verschillen.

##### 3.1.1 Referentie lijsten voor taxon indicatiewaarden IPS-s en IPS-v

Figuur 3.1 geeft de verdeling van de morfologisch identificeerbare taxa met microscopie uit de door ons gebruikte Omnidia referentie lijst over de indicatie waarden IPS-s en IPS-v. De lijst omvat in totaal 4.884 taxa. Ten opzichte van de andere IPS-s klassen lijkt de klasse s= tm 1 (sterk organisch verontreinigde wateren) een relatief laag aantal taxa te bevatten. Tegelijkertijd blijken relatief veel taxa indicatief voor zeer goede waterkwaliteit (s=4 tm 5). De indicatiewaarden v=1 en v=2, die aangeven dat een taxon weinig tot matig aan een bepaalde s-waarde is gekoppeld, zijn vooral weinig vertegenwoordigd bij s=tm 1. Relatief weinig taxa komen onder dergelijke verontreinigde condities voor maar hebben er wel een sterke band mee (v=3). Vanaf s=1 tm 2 neemt het relatieve aandeel taxa dat weinig tot matig (v=1 en v=2) aan een gevoeligheidswaarde is gekoppeld toe, om voor s=4 tm 5

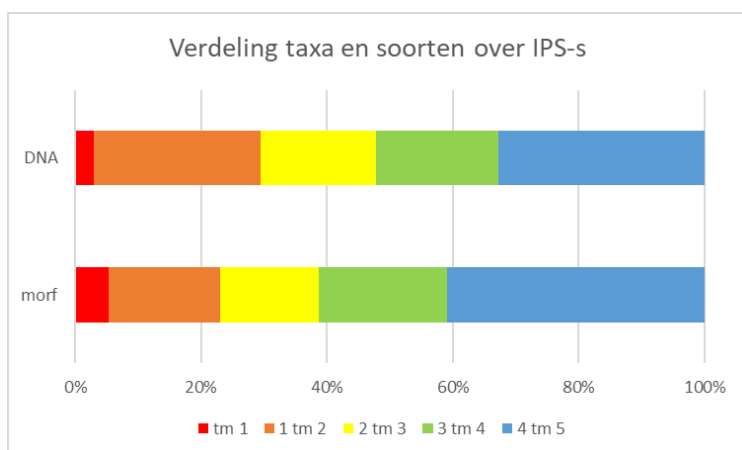


Figuur 3.1. Verdeling van taxa (morfologie; boven) en soorten (DNA; onder) uit de beschikbare referentielijst over IPS-s en IPS-v indicatiewaarden. Links: absolute aantallen. Rechts: relatieve aantallen.

weer te dalen. De taxa die sterk aan s=4 tm 5 zijn gekoppeld (dus met v=3) nemen hier weer toe ten opzichte van de situatie bij s=2 tm 3 en s=3 tm 4.

Figuur 3.1 geeft ook de verdeling van de met DNA identificeerbare soorten over de referentielijst voor IPS-s en IPS-v. Dit betreft maar 364 soorten (7% van de taxa uit de voor morfologie beschikbare referentielijst). De verdeling van de aantallen soorten over de v-waarden binnen de s-waarden lijkt sterk op die van de taxonlijst gebaseerd op morfologische identificatie met microscopie; per niveau van IPS-s verschilt de aantalsverdeling over de IPS-v waarden niet significant ( $\chi^2$  test,  $p > 0,05$ ). Er is dus geen verschil tussen beide referentielijsten in de mate waarin taxa aan een bepaalde s-klasse zijn gebonden.

De relatieve verdeling van de soorten en taxa over de s-klassen (Figuur 3.2) laat voor s=4 tm 5 wel een ondervertegenwoordiging zien van de diatomeeënsoorten op basis van de DNA analyse ten opzichte van de diatomeeëntaxa met de microscopische analyse. Voor s=1 tm 2 is er een oververtegenwoordiging. Deze twee relatieve verdelingen verschillen significant ( $\chi^2$  test,  $p < 0,001$ ), en er zal dus voor barcode-identificatie met de DNA methode afhankelijk van het aanwezige soortenpalet een onderschatting van de IPS index kunnen optreden ten opzichte van de morfologische identificatie met de microscopische methode.

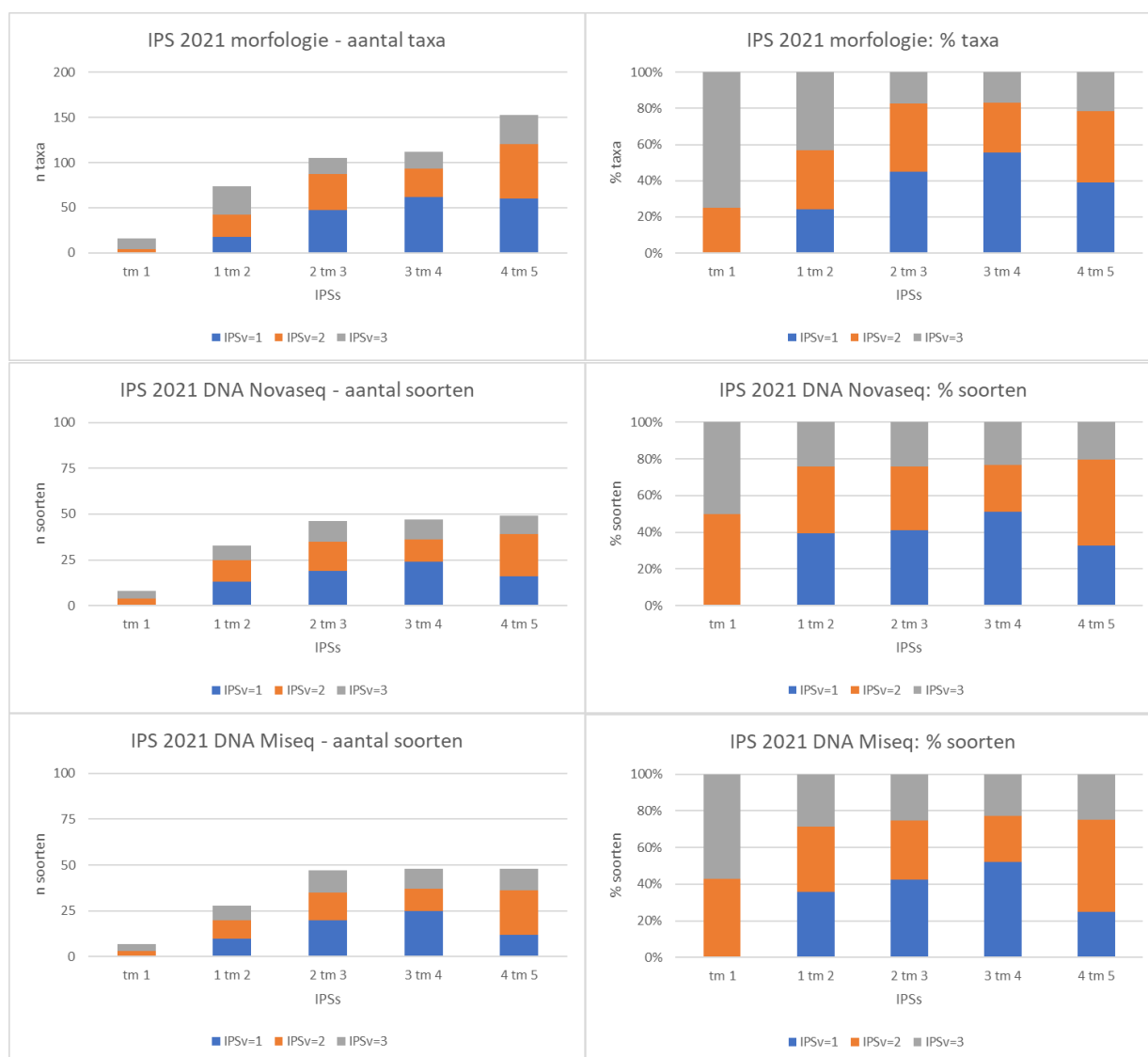


Figuur 3.2. Relatieve verdeling van taxa (morfologie; morf) en soorten (DNA) uit de beschikbare referentielijst over IPS-s indicatiewaarden.

### 3.1.2 Aangetroffen aantallen taxa in de beschikbare monsters

De lijsten met daadwerkelijk in het veld aangetroffen soorten (DNA) dan wel taxa (microscopie) zijn op dezelfde manier geanalyseerd als de beide referentielijsten in paragraaf 3.1.1. De DNA-sequentieanalyse is uitgevoerd met twee verschillende machines voor sequentie analyse (Miseq in 2021, Novaseq in 2021 en 2022). Deze beide sets aan resultaten worden apart vergeleken.

Figuur 3.3 geeft de resultaten van de morfologische identificatie met microscopie en voor de barcode-identificatie met de Novaseq of Miseq machine voor 2021. Er zijn in totaal 460 taxa aangetroffen met de microscoop, 183 soorten met de Novaseq machine en 178 soorten met de Miseq machine. Het aantal morfologisch geïdentificeerde taxa ligt zoals verwacht veel lager dan het totaal aantal beschikbare taxa in de referentie lijst. De frequentie verdelingen van de drie verschillende methodieken zijn goed overeenkomstig met elkaar, en met die voor de beide referentielijsten uit Figuur 3.1. Er werden geen significante verschillen gevonden in de aantalsverdeling over de IPS-v waarden per IPS-s niveau tussen de drie datasets ( $\chi^2$  test,  $p > 0,05$ ). Ook nu ligt het aantal soorten in de s-klasse 4 tm 5 lager met beide DNA analyses ten opzichte van de microscopische analyse. De verdelingen voor de Novaseq en Miseq machines verschillen onderling wat dit betreft niet noemenswaardig.

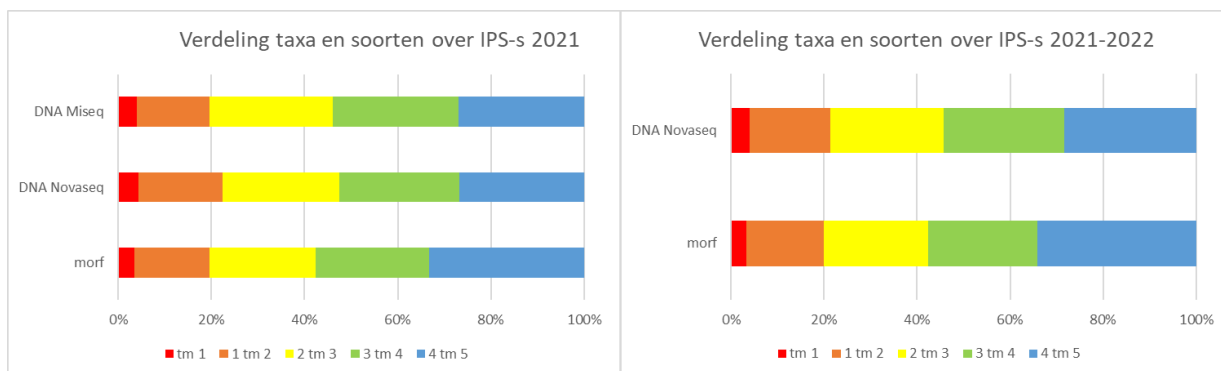


Figuur 3.3. Verdeling van taxa (morfologie; boven) en soorten (DNA; midden Novaseq, onder Miseq) uit de veldmonsters van 2021 over IPS-s en IPS-v indicatiewaarden. Links: absolute aantallen. Rechts: relatieve aantallen.

Figuur 3.4 geeft de resultaten van 2021 en 2022 samen, voor microscopie en Novaseq. Er zijn in totaal 535 taxa aangetroffen met de microscoop en 197 soorten met de Novaseq. Het aantal microscopisch geïdentificeerde taxa ligt ook hier weer veel lager dan het totaal aantal beschikbare taxa in de referentie lijst. De beide frequentie verdelingen zijn goed overeenkomstig met elkaar en met die voor de beide referentielijsten uit Figuur 3.1 (een  $\chi^2$  test liet geen significante verschillen zien). Opnieuw ligt het aantal soorten in de s-klasse 4 tm 5 een stuk lager voor de DNA lijst ten opzichte van de morfologie lijst.



**Figuur 3.4.** Verdeling van aangetroffen taxa (morfologie; boven) en soorten (DNA Novaseq; onder) uit de veldmonsters van 2021 en 2022 over IPS-s en IPS-v indicatiewaarden. Links: absolute aantallen. Rechts: relatieve aantallen.



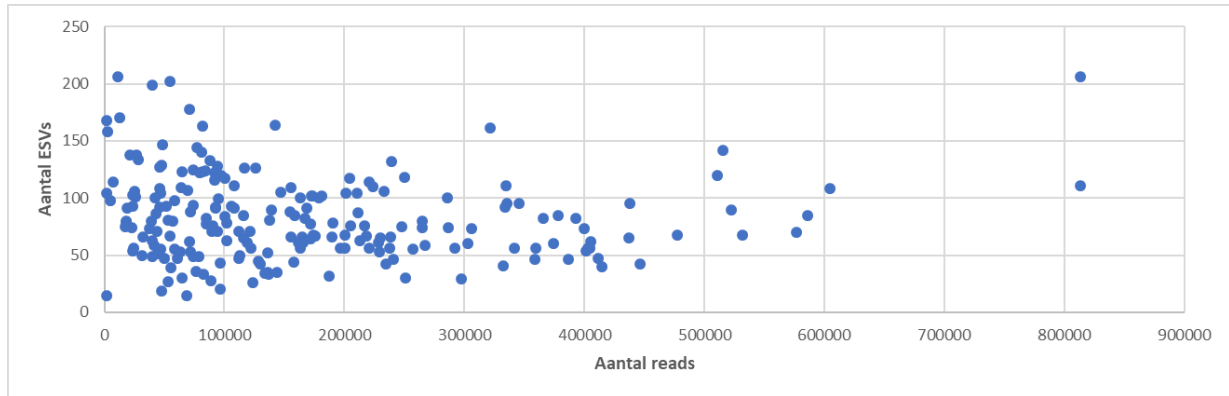
**Figuur 3.5.** Relatieve verdeling van aangetroffen taxa (morfologie; morf) en soorten (DNA) uit de veldmonsters over IPS-s indicatiewaarden. Links: gegevens voor 2021, behaald met microscopie, Miseq en Novaseq. Rechts: gegevens voor 2021 en 2022 samen, behaald met microscopie en Novaseq.

Figuur 3.5 laat de relatieve verdelingen zien van de soorten dan wel taxa over de verschillende IPS-s klassen voor de beide perioden. Zowel voor 2021 als voor de periode 2021-2022 verschillen de betreffende relatieve verdelingen niet significant ( $\chi^2$  test;  $p > 0,05$ ). Niettemin worden er ook in de velddata met DNA relatief minder soorten gevonden die indicatief zijn voor de hoogste kwaliteitsklasse (IPS-s=4 tm 5), wat kan leiden tot een onderschatting van de IPS-index met de DNA-analyse ten opzichte van de microscopische methode.

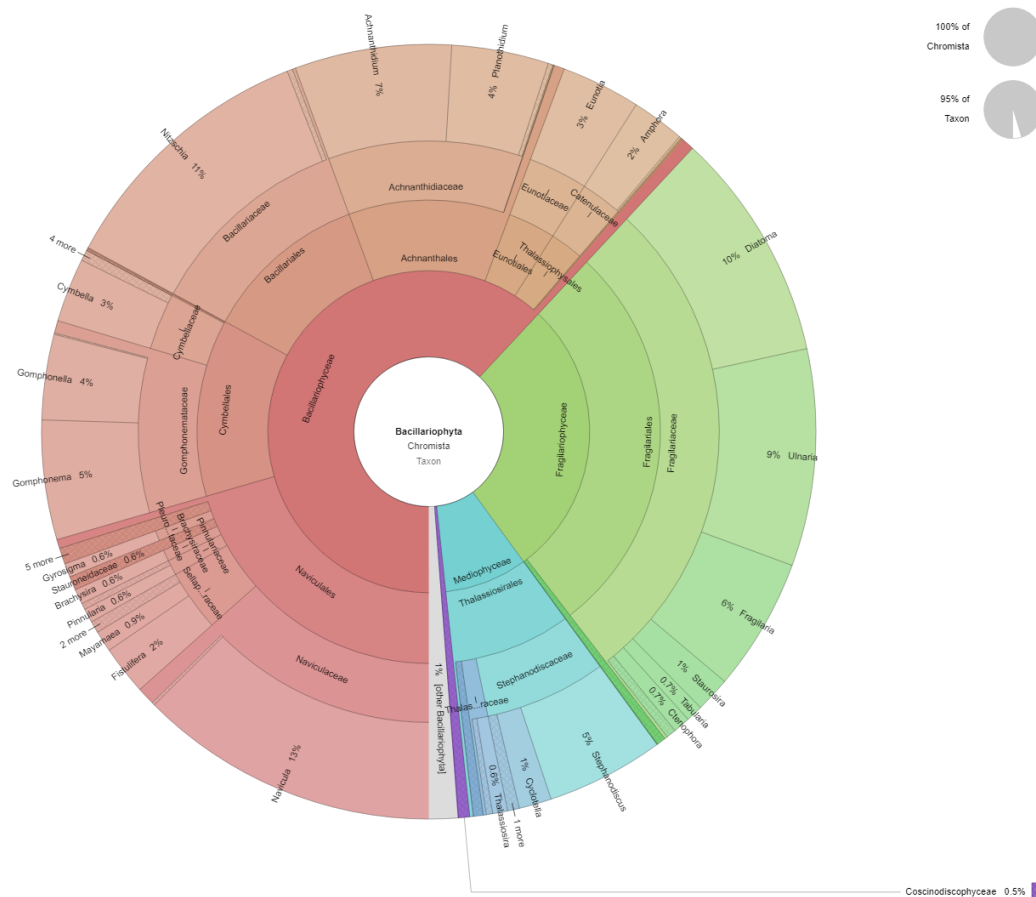
### 3.2 Vergelijking overlap soortenlijsten bepaald met DNA en microscopie

Bij de nu volgende vergelijking van soortenlijsten tussen DNA en microscopie zijn alléén de 148 monsters meegenomen waarvoor de DNA resultaten met de Novaseq machine beschikbaar waren, van zowel de ethanol- als de schraapmonsters.

Gemiddeld werden per monster in de Novaseq analyse 167.000 reads gedetecteerd (minimaal 2.066, maximaal 813.736). Deze reads vertegenwoordigden gemiddeld 82,6 ESVs (minimaal 15, maximaal 206). Er was geen verband tussen het aantal reads per monster en het aantal ESVs (zie Figuur 3.6), wat betekent dat monsters met minder reads niet ook consequent minder ESVs hebben.



Figuur 3.6. Vergelijking aantal reads versus aantal ESVs voor de Novaseq analyse.



Figuur 3.7. Krona diagram op basis van de 827 geslaagde taxonomische identifiaties van de gedetecteerde ESVs.

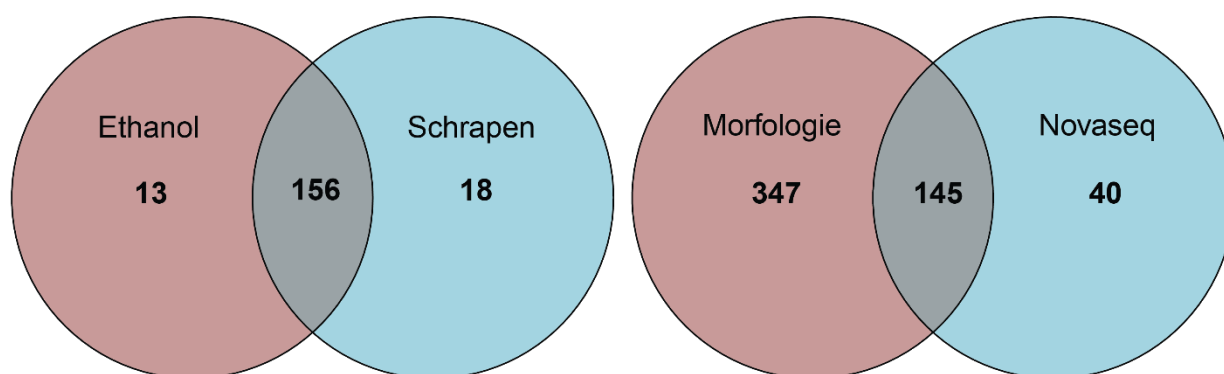
Bij 827 ESVs (48,1% van alle 1.719 ESVs en 95% van alle reads) was een identificatie mogelijk met de Diat.barcode v11.1 database, op fyllum niveau of lager (Figuur 3.7). In totaal konden 532 ESVs tot op soortniveau worden gedetermineerd. Hoewel dit maar 30,9% van alle vastgestelde ESVs omvat, vertegenwoordigen deze 532 ESVs wel 69,0% van de totale dataset wat betreft readaantallen.

De verdeling van de identificaties was als volgt:

Niveau	ESVs	Reads
Fylum	827 (48,1%)	33.436.262 (95,3%)
Klasse	781 (45,4%)	33.025.600 (94,2%)
Orde	747 (43,5%)	32.827.716 (93,6%)
Familie	720 (41,9%)	32.490.708 (92,6%)
Genus	689 (40,1%)	31.917.844 (91,0%)
Soort	532 (30,9%)	24.197.379 (69,0%)
Geen ID	892 (51,9%)	1.637.720 (4,7%)

De 892 ESVs zonder identificatie (5% van alle reads) zijn met GenBank nader onderzocht om te controleren of deze ESVs op die manier nog geïdentificeerd konden worden tot fyllumniveau of lager. Van deze 892 ESVs werden alsnog 497 ESVs ingedeeld als Bacillariophyta (diatomeeën), die samen 1.239.344 reads vertegenwoordigden (dus 75,7% van de reads zonder identificatie). De rest werd ingedeeld als Chlorophyta (67 ESVs, 62.142 reads), Rhodophyta (2 ESVs, 287 reads) en Cyanobacteria (1 ESV, 141 reads). De overgebleven 325 ESVs (335.806 reads) konden niet worden geïdentificeerd, maar zij vertegenwoordigden maar 1,7% van de gehele dataset aan reads. De DNA detectie was dus heel specifiek voor de amplificatie van DNA van diatomeeën.

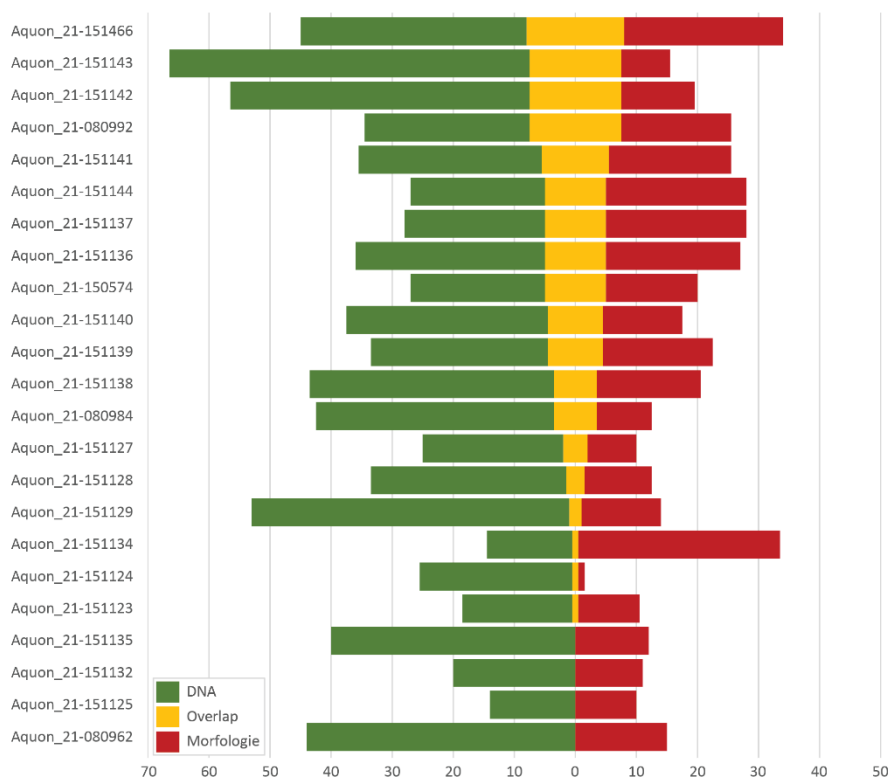
Een deel van de ESVs werd gedetermineerd tot dezelfde soort, en in een aantal gevallen kon geen onderscheid gemaakt worden tussen meerdere soorten, omdat deze op DNA niet te onderscheiden zijn (bijvoorbeeld *Neidium dubium* en *Neidium productum*). In de Novaseq data werden in totaal 185 verschillende soorten gevonden in de 532 ESVs die tot op soort gedetermineerd konden worden. De meeste soorten werden in zowel de ethanol- als schraapmonsters gevonden, met respectievelijk slechts 13 en 18 soorten uniek voor de ethanol- of schraapmonsters (zie Figuur 3.8). De met microscopie vastgestelde soortenlijst bevatte 492 soorten (zonder subsoorten en variëteiten), waarvan 145 soorten ook met DNA methoden werden gevonden (27,0%). Met de Novaseq machine werden 40 soorten gevonden die niet met microscopie werden gedetecteerd (Figuur 3.8).



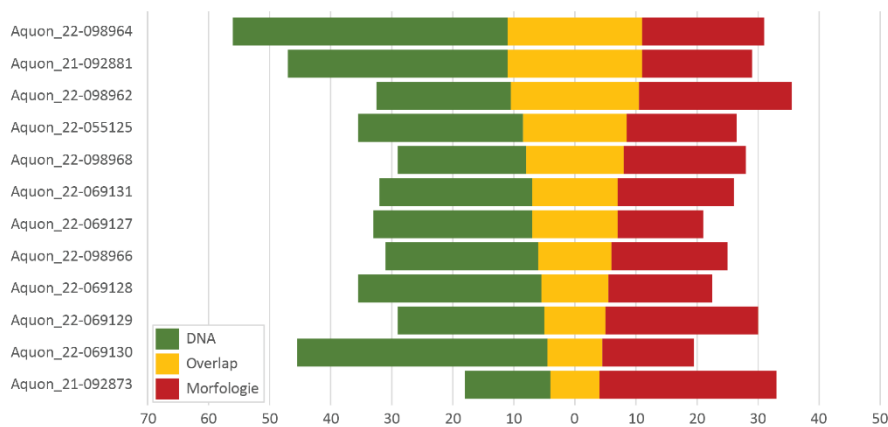
**Figuur 3.8.** Venn diagrammen met de vergelijking van de complete soortenlijsten gevonden in de Novaseq DNA data in de ethanol- en schraapmonsters (links) en de vergelijking van de voor alle monsters samen gevonden soortenlijst op basis van de morfologische identificatie (morfologie) en op basis van de Novaseq DNA dataset (rechts).

Bij de vergelijking van de soortenlijsten voor de individuele monsters komt echter het beeld naar voren dat met de DNA-methode per monster over het algemeen méér soorten worden gevonden dan met de microscopische analyse (Figuren 3.9 tot en met 3.15). Gemiddeld worden dan met de DNA analyse 29,4 soorten gevonden (minimaal 8, maximaal 62), terwijl er met de microscopische analyse gemiddeld 16,4 soorten in een monster zijn aangetroffen (minimaal 1, maximaal 35). De overlap is gemiddeld 9,6 soorten (maximaal 22), en in een aantal gevallen is er zelfs

helemaal geen overlap tussen de DNA soorten en de microscopisch bepaalde lijst (zie vier monsters van Brabantse Delta en drie monsters van Fryslan).

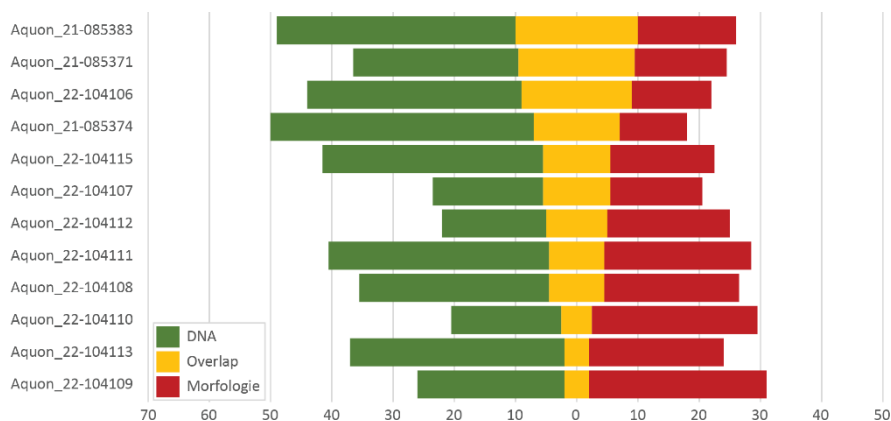


Figuur 3.9. Overlap tussen DNA soortenlijsten en morfologische soortenlijsten van de monsters van Brabantse Delta.

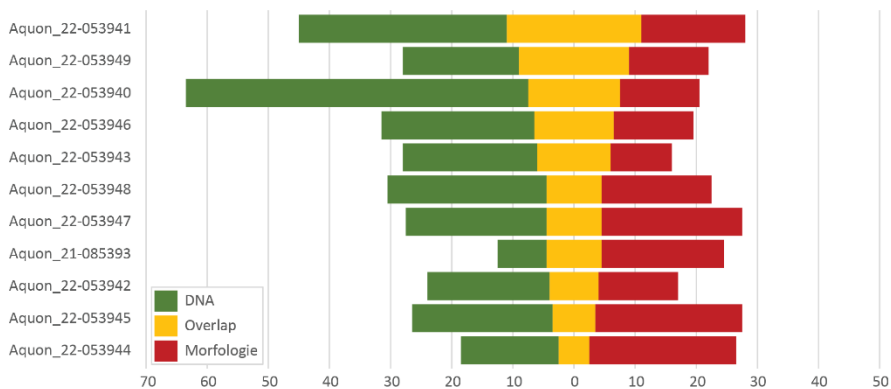


Figuur 3.10. Overlap tussen DNA soortenlijsten en morfologische soortenlijsten van de monsters van Delfland.

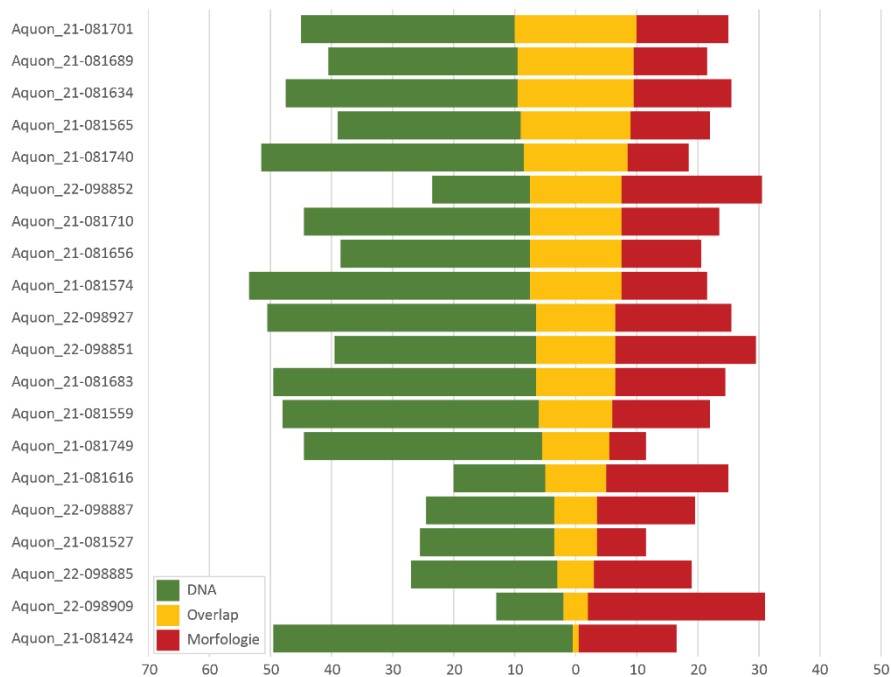




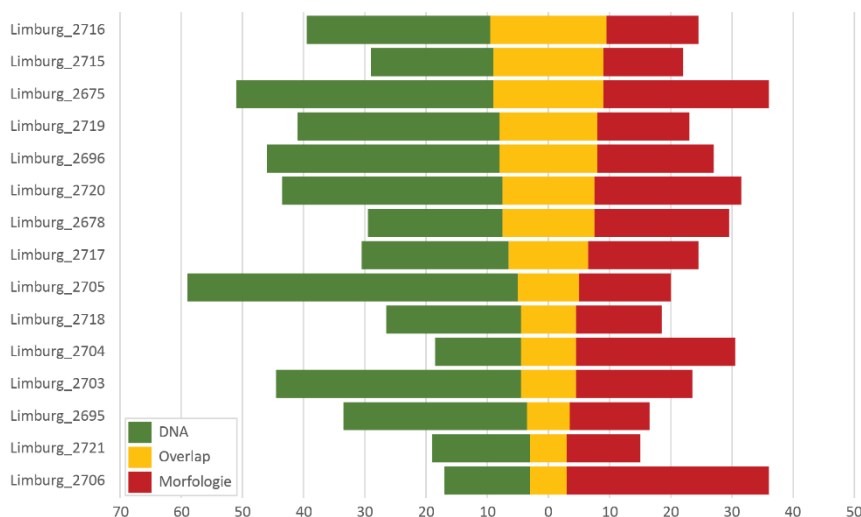
Figuur 3.11. Overlap tussen DNA soortenlijsten en morfologische soortenlijsten van de monsters van Rijnland.



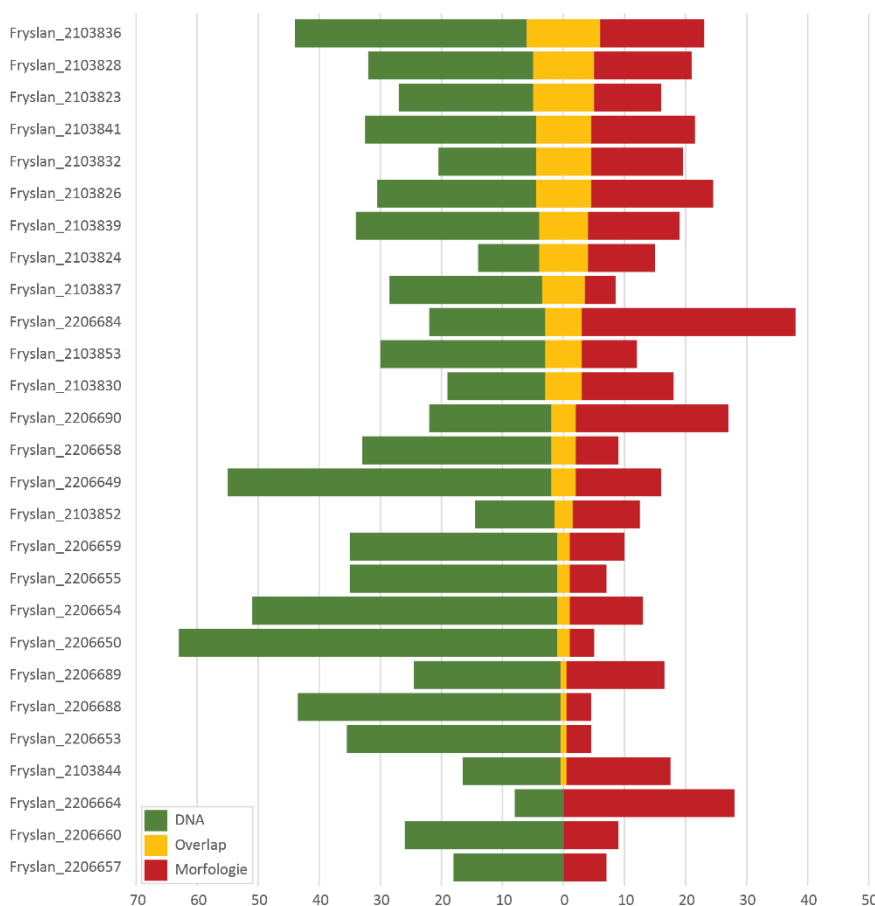
Figuur 3.12. Overlap tussen DNA soortenlijsten en morfologische soortenlijsten van de monsters van Stichtse Rijnlanden.



Figuur 3.13. Overlap tussen DNA soortenlijsten en morfologische soortenlijsten van de monsters van Hollandse Delta.



Figuur 3.14. Overlap tussen DNA soortenlijsten en morfologische soortenlijsten van de monsters van Limburg.



Figuur 3.15. Overlap tussen DNA soortenlijsten en morfologische soortenlijsten van de monsters van Fryslan.

### 3.3 Discussie

De resultaten van de bovenstaande analyse van de referentielijsten tonen aan dat er momenteel een duidelijk lager aantal soorten met een ‘goede’ milieu-indicatiewaarde (IPS-s=5) voor de DNA detectie beschikbaar is, waarmee de trefkans voor dergelijke soorten bij de DNA analyse lager zal zijn dan bij de microscopische analyse. Dat kan tot een lagere IPS-index waarde leiden voor een monster op basis van de DNA-analyse ten opzichte van de microscopische

methode. Het is echter de vraag of deze beperking een belangrijke rol speelt bij de betrouwbare bepaling van een indexwaarde. Kelly et al. (2020) berekenden voor elk van 1714 locaties de correlatie tussen indexwaarden van de Britse Trophic Diatom Index (TDI; zie voor een beschrijving van de TDI Kelly et al., 2008) met steeds twee microscopisch geïdentificeerde taxalijsten per monster. De ene lijst betrof het volledige aantal aangetroffen taxa en de andere maakte alleen gebruik van taxa die ook beschikbaar waren in de rbcL DNA database. De correlatie was significant en zeer sterk ( $p < 0,05$ ;  $r^2 = 0,98$ ), hetgeen aangeeft dat de voor DNA geldende beperking in aantal te identificeren taxa in ieder geval in de grote dataset van die studie niet heel veel invloed had op de TDI-indexwaarde. Ook wij vonden voor de microscopisch bepaalde taxa gegevens een goede correlatie tussen de IPS op basis van de microscopische IPS referentielijst en de IPS bepaald op basis van alleen de taxa beschikbaar in de DNA IPS referentielijst ( $p < 0,05$ ;  $r^2 = 0,84$ ; niet getoond).

Het aantal aangetroffen diatomeeënsoorten met DNA-barcoding in onze totale set aan veldgegevens is ook lager dan met de microscopische analyse op basis van morfologie. Maar er is tussen de DNA-analyse en microscopische analyse van deze dataset geen significant verschil in de verdeling van aangetroffen aantallen soorten over de vijf IPS-s klassen. Wel is ook hier het aandeel soorten in de klasse IPS-s=5 relatief lager met de DNA-analyse dan met de microscopie methode. Het is aannemelijk dat dit is gekoppeld aan het vergelijkbare, significante verschil in die verdeling voor de referentielijsten. Dit kan voor individuele locaties alsnog een effect hebben op de IPS-waardebepaling. Niettemin is het is voor de inzet van DNA-detectie van diatomeeënsoorten hoopgevend dat de verdeling van beschikbare soorten uit de DNA-lijst over de IPS-s en IPS-v indicatiewaarden voor de veldgegevens niet significant verschilt tussen de beide DNA methoden (Miseq en Novaseq), en ook niet significant verschilt van de microscopische methode.

Het totale palet aan diatomeeën soorten/taxa verschilt sterk tussen de analyse met DNA en de microscoop. In de totale dataset van alle monsters met een microscopische analyse en een complete DNA-Novaseq analyse werden met de microscopische analyse ongeveer 2,5 maal meer soorten gevonden dan met DNA (zie Figuur 3.8). Echter, per monster werden met DNA gemiddeld tweemaal zoveel soorten aangetroffen dan met microscopie (zie de Figuren 3.9-3.15). Dit verschil is te verklaren door de grotere variatie in soortensamenstelling tussen monsters die wordt aangetroffen met de microscopische analyse, zelfs zonder de subsoorten, variëteiten of groeivormen in acht te nemen (aangezien deze met DNA-barcoding niet te determineren zijn). De soorten die met de microscopische analyse zijn aangetroffen, werden gemiddeld in 15,0 monsters gevonden, terwijl de soorten die werden gedetecteerd met de DNA methoden gemiddeld in 38,5 monsters werden aangetroffen. Het verschil tussen beide methoden in hun totale soortenaantal voor alle monsters samenkomt vooral door de veel kleinere DNA referentie bibliotheek, die maar een klein deel omvat van de soorten die de microscopist kan onderscheiden.

Het relatief lage percentage van 27% soortenoverlap per monster dat werd waargenomen voor beide methoden komt overeen met wat andere onderzoekers in eerdere studies hebben gevonden. Rivera et al. (2018) hadden voor 66 monsters in de oeverzone van een diep Frans meer een overlap in soorten van 16% tussen soorten geïdentificeerd met DNA of microscopie. Pérez-Burillo et al. (2020) vonden voor 164 monsters uit Catalaanse rivieren een soortenoverlap van 27% met beide methoden, terwijl Borrego-Ramos et al. (2021) in 22 meren in Noordwest-Spanje voor diatomeeënsoorten een overlap van 20% vonden. In een onderzoek met 55 fytoplankton monsters uit vier alpiene meren was de overlap gevonden in aangetroffen soorten tussen DNA en microscoop met 18% ook klein (Nicolosi Gelis et al., 2024). Al deze auteurs wijten de beperkte overlap aan meerdere redenen: (i) de beperkte DNA-referentiebibliotheek, (ii) het met DNA wel kunnen vaststellen van microscopisch lastig te identificeren (vaak kleine) taxa, (iii) het determineren van lege schaaltsjes van dode cellen (die met DNA niet worden waargenomen) en (iv) foutieve identificaties met de microscoop. In ons onderzoek speelt, naast bovengenoemde redenen, het in Nederland standaard beoordeelde aantal van 200 schaaltsjes per monster bij microscopie tegenover gemiddeld 167.000 reads per monster met DNA waarschijnlijk ook een rol. Verweij et al. (2015) vonden in een steekproefanalyse dat bij het tellen van 200 schaaltsjes gemiddeld ongeveer 50% van de diatomeeëntaxa wordt aangetroffen die met een telling van 1000 schaaltsjes aanwezig blijkt. De steekproef uit de totale aanwezigige

hoeveelheid diatomeeën in het monster is met DNA reads beduidend groter, waarmee dus ook een meer representatieve soortenlijst wordt verkregen.

De toepassing van DNA-barcoding levert dus een andere perceptie op van het aanwezige soortenpalet dan met de microscoop wordt waargenomen. Het is dan ook denkbaar dat DNA-data niet altijd tot een overeenkomstige waarde leiden voor KRW-kwaliteitsklassen zoals berekend op basis van microscopische data. Omdat er voortdurend meer DNA-barcodes van diatomeeënsoorten worden geïdentificeerd, zal de momenteel nog beperkte referentiebibliotheek voor DNA naar verwachting snel verder in omvang toenemen. Reeds bestaande DNA monsters in de vorm van barcode lijsten kunnen later altijd weer opnieuw worden geanalyseerd met bijgewerkte barcode referentielijsten, om zo in een terugblik de aanwezige nu nog verborgen informatie alsnog te kunnen benutten.

## 4 Relatie tussen IPS-waarden gebaseerd op morfologische en DNA-barcoding veldgegevens

### 4.1 Inleiding

In dit hoofdstuk worden de met DNA-analyse en uit microscopische analyse verkregen IPS-gegevens met elkaar vergeleken. Elk geanalyseerde DNA-monster bestaat in principe uit een schraapmonster en een ethanolmonster die worden gecombineerd tot een totaal resultaat ('IPS combi') voor de IPS-bepaling. In Tabel 4.1 staat een overzicht van alle monsters en de beschikbare DNA-resultaten. Niet in alle 363 monsterlocaties is het gelukt om DNA-barcodes van diatomeeën te verkrijgen. De oorzaken daarvan zijn niet duidelijk, maar liggen waarschijnlijk aan onbekende storende factoren voor DNA-isolatie en PCR in de betreffende watersamenstelling zoals ijzer en humuszuren. In de DNA-extractieprocedure wordt getracht zoveel mogelijk van deze remmende stoffen te verwijderen, maar dat is nooit in 100% van de gevallen succesvol. De monsters uit 2021 zijn zowel met de Miseq als met de Novaseq machine geanalyseerd zodat er voor sommige monsters meerdere DNA-resultaten beschikbaar zijn gekomen. Dat was behulpzaam in gevallen waarbij één van beide DNA-analyses geen resultaat opleverde. In sommige gevallen leverde slechts één van beide deelmonsters per locatie (schrapen cq ethanol) een DNA-resultaat op. Dat werd regelmatig mede veroorzaakt doordat het materiaal in het monster te zacht was om te kunnen worden afgeschraapt. Opmerkelijk is dat de monsters van HHNK alleen op de Miseq goede resultaten hebben opgeleverd. Ondanks herhaalde pogingen is het niet gelukt om met de Novaseq eveneens DNA-resultaten uit deze monsters te verkrijgen.

*Tabel 4.1. Overzicht per waterschap van het aantal bemonsterde locaties en de bijbehorende aantallen beschikbare IPS bepalingen. Morf: IPS op basis van microscopische identificatie; Miseq, Novaseq: IPS met behulp van DNA-gegevens (via Miseq cq Novaseq waarbij zowel een schraap- als ethanolmonster kon worden gecombineerd); DNA: IPS met een combi DNA-monster (hetzij van Novaseq, hetzij van Miseq); geen combi: monsters waarbij een ethanol- of schraapmonster ontbrak; wel schraap: monsters waarvan geen ethanol monster is maar wel een schraap monster (hetzij Novaseq, hetzij Miseq); wel ethanol: monster waarvan geen schraapmonster maar wel een ethanolmonster beschikbaar is (hetzij Novaseq, hetzij Miseq); geen info: geen DNA-gegevens verkregen.*

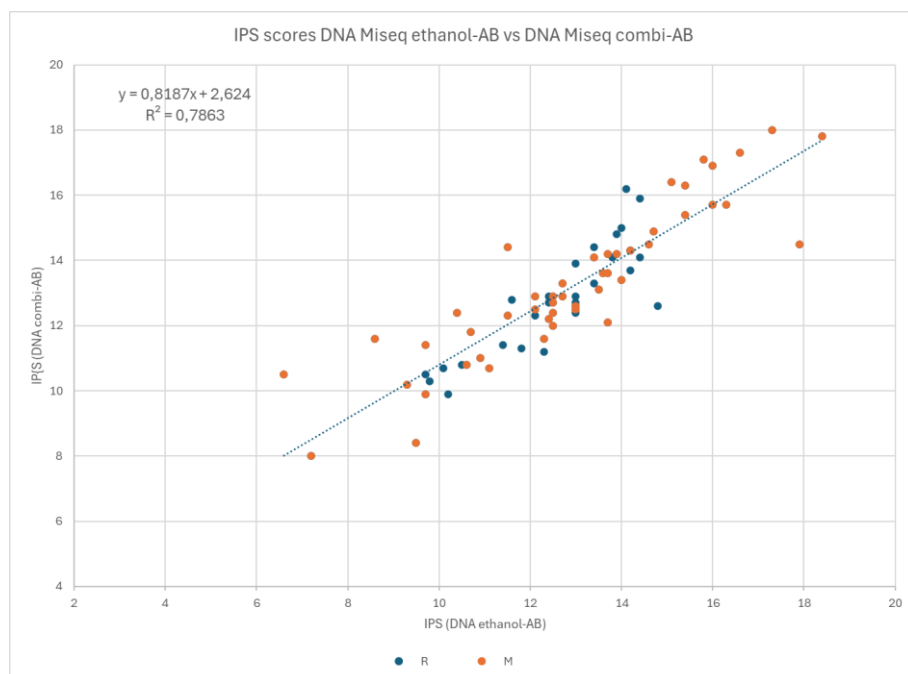
					Nova en Miseq samen				
	locaties	morf	Miseq	Novaseq	DNA	geen combi	wel schraap	wel ethanol	geen info
Brabantse Delta	44	35	7	32	38	6	1	4	1
De Dommel	10	0	0	9	9	1	1	0	0
Delfland	32	19	2	23	24	8	1	7	0
Fryslan	73	40	20	52	53	20	12	0	8
HDSR	35	22	8	28	31	4	1	3	0
HHNK	43	43	29	0	29	14	8	2	4
Hollandse Delta	64	59	13	33	36	28	10	10	8
Limburg	36	36	20	16	22	14	1	13	0
Rijnland	26	25	10	17	22	4	1	2	1
<b>Totaal</b>	<b>363</b>	<b>279</b>	<b>109</b>	<b>210</b>	<b>264</b>	<b>99</b>	<b>36</b>	<b>41</b>	<b>22</b>

Uit Tabel 4.1 volgt dat 264 (73%) van de 363 locaties een compleet 'combi' monster opleverden (DNA-gegevens voor zowel het schraap- als het ethanolmonster). Voor 77 (21%) locaties was er wel hetzij een schraap dan wel een ethanolmonster beschikbaar. Voor de resterende 22 (6%) locaties is uiteindelijk geen DNA-informatie verkregen.

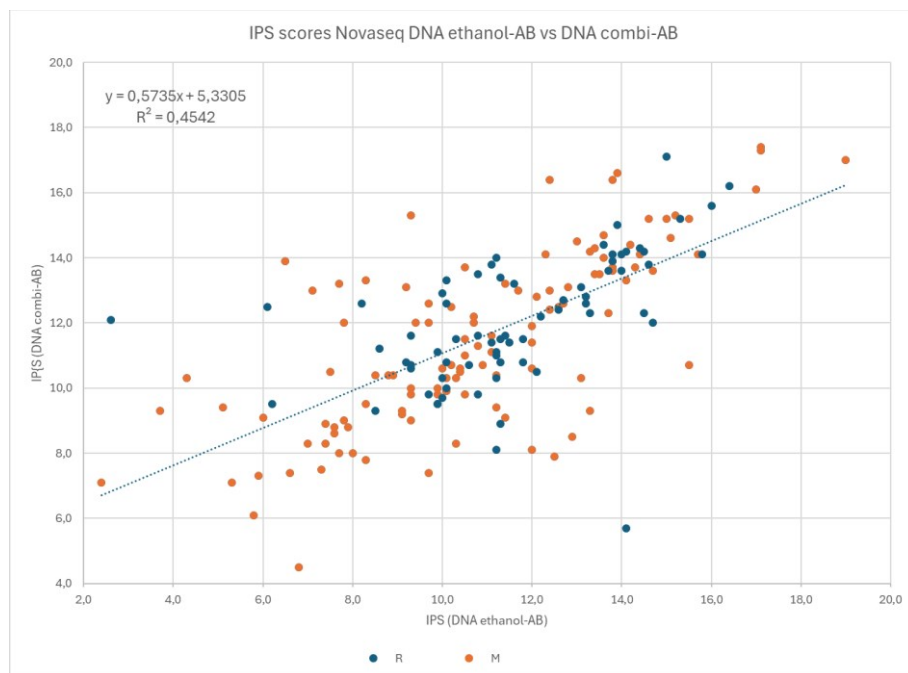
## 4.2 IPS-resultaten bepaald met ethanol- en schraapmonsters

Omdat niet in alle gevallen een combimonster is verkregen, is eerst onderzocht in hoeverre de IPS schatting voor een DNA-monster ook kan worden afgeleid uit hetzij alleen een ethanolmonster, hetzij alleen een schraapmonster. Indien een van beide deelmonsters ontbreekt, kan bij een redelijk goede correlatie het andere deelmonster toch een representatieve IPS-combi schatting opleveren. Als een IPS bepaald met alleen een ethanolmonster voldoende sterk correleert met een IPS-combi schatting, kan bovendien voor de toekomst worden overwogen om het meer tijdrovende laboratorium werk aan afschrapen en analyseren van een schraapmonster niet uit te voeren.

In Figuur 4.1 staat de Pearson lineaire correlatie tussen de IPS-waarden voor ethanolmonsters en de IPS-waarden van de combimonsters, bepaald met de 75 hiervoor beschikbare Miseq datapunten uit 2021. Figuur 4.2 geeft deze correlatie voor de 181 met Novaseq verkregen datapunten uit de periode 2021-2022. De correlatie voor Miseq data is significant en relatief sterk te noemen ( $p < 0,05$ ;  $r^2 = 0,79$ ). Voor Novaseq data is de correlatie ook significant maar relatief zwakker ( $p < 0,05$ ;  $r^2 = 0,45$ ). Er is geen duidelijk verschil voor de relaties tussen de stilstaande en stromende wateren in deze dataset.

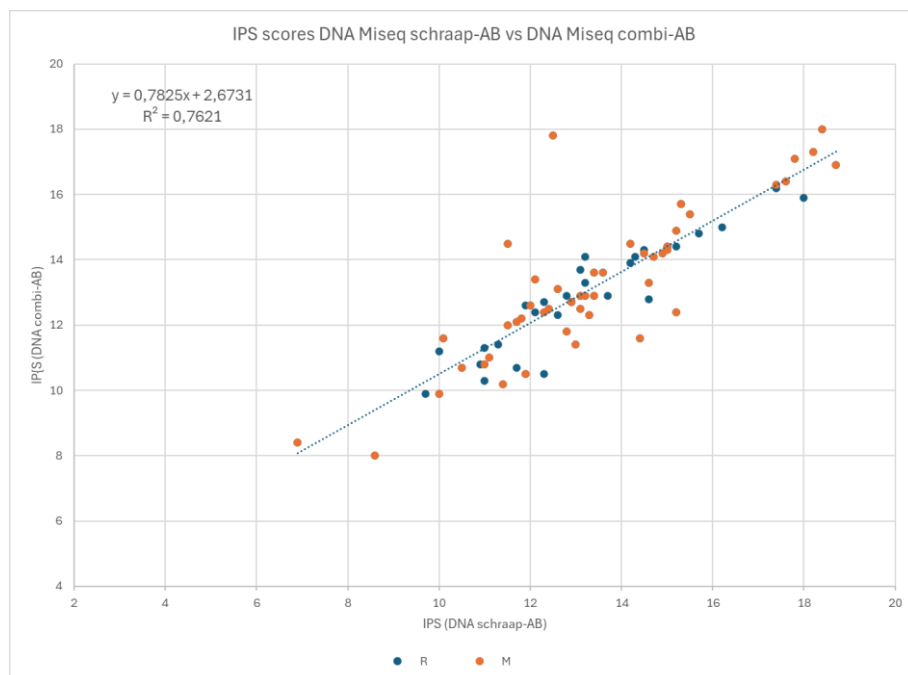


*Figuur 4.1. Pearson lineaire correlatie tussen 75 IPS-waarden berekend voor de ethanolmonsters (DNA ethanol AB) en de bijbehorende IPS-combi waarden bepaald uit het combimonster (ethanol+schraap; DNA combi-AB), op basis van Miseq-DNA gegevens uit 2021. Alle IPS-berekeningen zijn gedaan met gebruik van relatieve abundantie (AB). R=stromend water; M= stilstaand water. De lineaire regressie betreft alle locaties.*

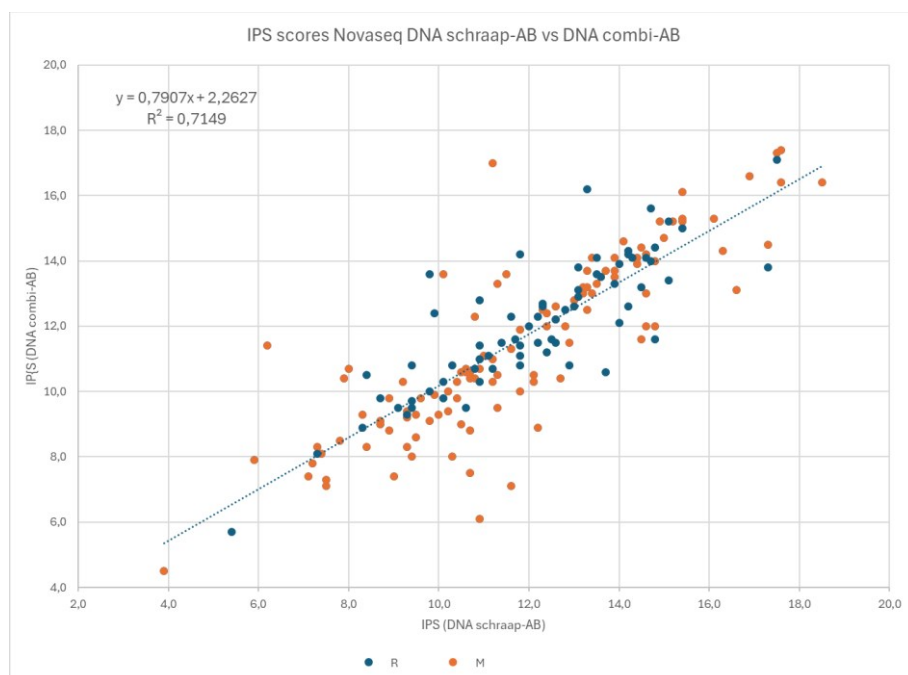


Figuur 4.2. Pearson lineaire correlatie tussen 181 IPS-waarden berekend voor de ethanolmonsters (DNA ethanol-AB) en de bijbehorende IPS-combi waarden bepaald uit het combimonster (ethanol+schraap; DNA combi-AB), op basis van Novaseq DNA-gegevens uit 2021 en 2022. Alle IPS-berekeningen zijn gedaan met gebruik van relatieve abundantie (AB). R=stromend water; M= stilstaand water. De lineaire regressie betreft alle locaties.

In Figuur 4.3 staat de Pearson lineaire correlatie tussen de IPS-waarden van de schraapmonsters en de IPS van de combimonsters, eveneens bepaald met de 75 hiervoor beschikbare Miseq datapunten uit 2021. Figuur 4.4 geeft deze correlatie voor de 181 Novaseq datapunten uit de periode 2021-2022.



Figuur 4.3. Pearson lineaire correlatie tussen 75 IPS-waarden berekend voor de schraapmonsters (DNA schraap-AB) en de bijbehorende IPS-combi waarden bepaald uit het combimonster (ethanol+schraap; DNA combi-AB), op basis van Miseq DNA gegevens uit 2021. Alle IPS-berekeningen zijn gedaan met gebruik van relatieve abundantie (AB). R=stromend water; M= stilstaand water. De lineaire regressie betreft alle locaties.

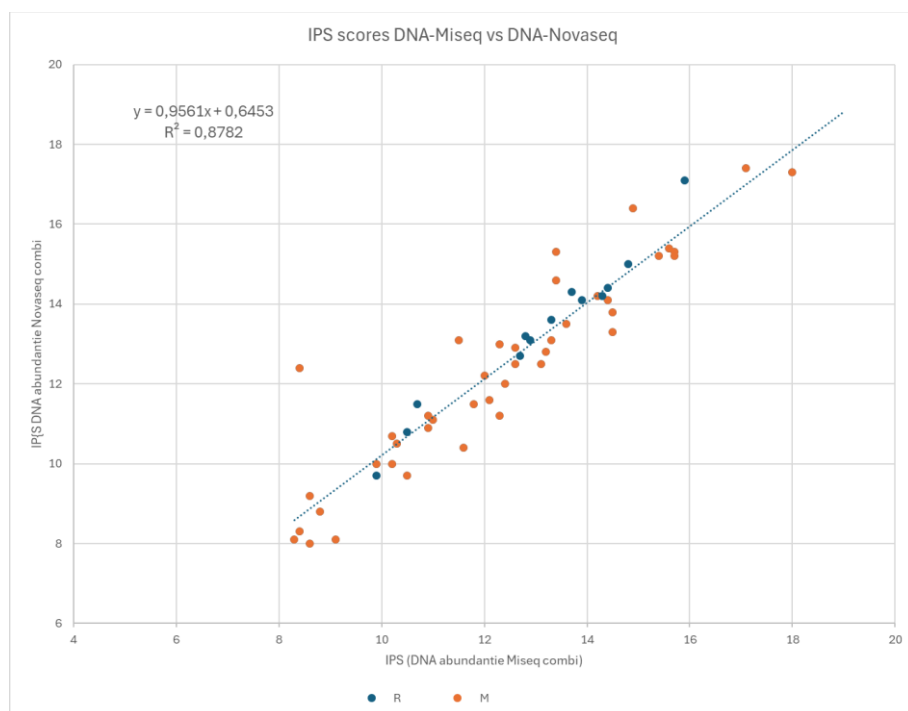


*Figuur 4.4. Pearson lineaire correlatie tussen 181 IPS-waarden berekend voor de schraapmonsters (DNA schraap-AB) en de bijbehorende IPS-combi waarden bepaald uit het combimonster (ethanol+schraap; DNA combi-AB), op basis van Novaseq DNA-gegevens uit 2021 en 2022. Alle IPS-berekeningen zijn gedaan met gebruik van relatieve abundantie (AB). R=stromend water; M= stilstaand water. De lineaire regressie betreft alle locaties.*

De correlatie voor de Miseq data van de schraap- en combimonsters is significant en relatief sterk ( $p < 0,05$ ;  $r^2 = 0,79$ ), en dit is ook voor de Novaseq data het geval ( $p < 0,05$ ;  $r^2 = 0,71$ ). Er is ook voor de gegevens van de schraapmonsters geen duidelijk verschil voor de correlaties tussen de stilstaande en stromende wateren in deze dataset. Het is wel duidelijk dat de combinatie van de ethanol- en schraapmonsters nog een eigen bijdrage levert aan de waarde van IPS-combi: de  $r^2$ -waarden van de bovenstaande vier correlaties zijn immers niet 100%. Maar voor situaties waarin één van beide deelmonsters ontbreekt, kan de IPS-combiwaarde redelijk tot goed worden geschat met behulp van de hier gevonden correlaties, zij het minder betrouwbaar met de IPS-waarden van de Novaseq ethanolmonsters.

Tenslotte geeft Figuur 4.5 nog de Pearson lineaire correlatie tussen de 55 IPS-combiwaarden verkregen met de Novaseq data en de Miseq data. Deze correlatie was significant met een zeer sterk verband ( $p < 0,05$ ;  $r^2 = 0,88$ ). De beide analyse methoden leveren dus zeer vergelijkbare schattingen voor de IPS-combiwaarden op, en kunnen dus als uitwisselbaar worden beschouwd indien voor een monster uit 2021 alleen één van beide analyse methoden een DNA-resultaat heeft opgeleverd.



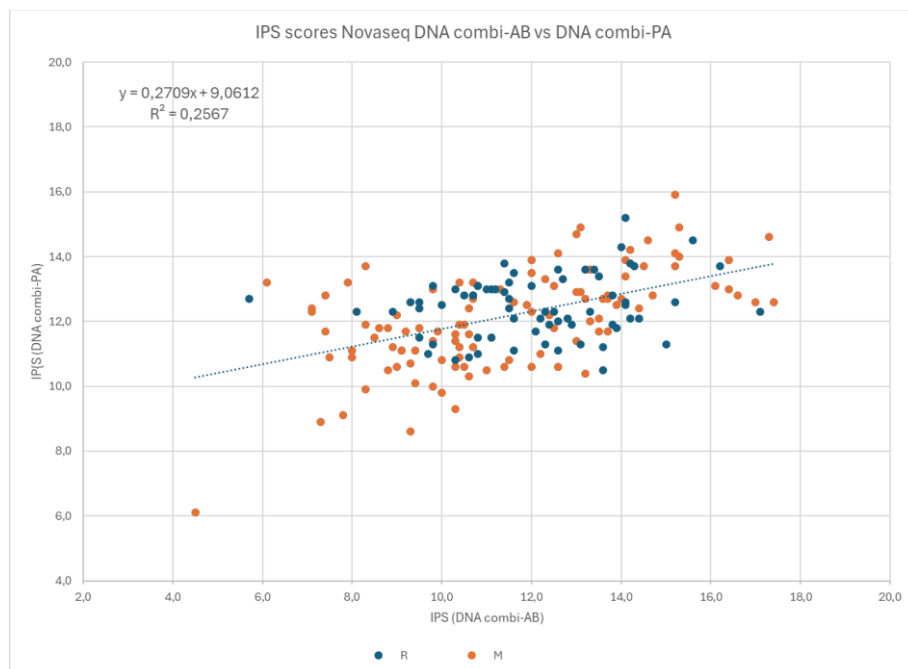


*Figuur 4.5. Pearson lineaire correlatie tussen de 55 IPS-combiwaarden berekend met Miseq combimonsters en met Novaseq combimonsters uit 2021. Alle IPS-berekeningen zijn gedaan met gebruik van relatieve abundantie (AB). R=stromend water; M= stilstand water. De lineaire regressie betreft alle locaties.*

### 4.3 Gebruik van relatieve abundantie in plaats van aan- of afwezigheid

In bovenstaande analyses is bij de berekening van de IPS-index steeds gebruik gemaakt van de relatieve barcode verdeling van soorten in een monster als vervanging voor het relatieve aantal diatomee-schaaltjes in een monster zoals gebruikt in de traditionele berekening van de IPS. Hiermee wordt de aanname gedaan dat elke diatomeeënsoort of -cel een gelijkwaardig aantal rbcl barcode kopieën in zich heeft. Het is bekend dat dit niet zonder meer het geval is. Vasselon et al. (2018) gebruikten een door hen gevonden lineaire relatie tussen het aantal rbcl kopieën en het bijbehorende celvolume om zo een correctiefactor te bepalen voor verschillen in celvolume. Men werkte daarbij met acht soorten diatomeeën uit reïncultures. Deze aanpak leidde in hun dataset met een mock community van deze acht soorten tot een goede overeenkomst tussen de relatieve abundanties van de diatomeeën soortensamenstelling bepaald met microscopie of met DNA. Wij hebben de door hen gevonden relatie toegepast op de Miseq-data uit 2021, maar zagen daarmee geen enkel effect op de gevonden correlatie tussen IPS-waarden op grond van DNA en op grond van microscopie. Daarom hebben we besloten om geen biovolume correctie conform Vasselon et al. (2018) toe te passen.

We hebben ook het effect van het vervangen van een relatieve abundantie schatting door een simpele aan- of afwezigheid in de IPS-indexberekening onderzocht. Daarmee zou immers het vraagstuk van een goede abundantieschatting zijn opgelost. In Figuur 4.6 staat de Pearson correlatie tussen de IPS-combiwaarden van de 181 Novaseq datapunten uit 2021-2022, waarbij de IPS-combiwaarden zowel met relatieve abundantie als met aan- of afwezigheid zijn berekend. De correlatie tussen deze twee parameters was significant, maar het verband was zwak ( $p < 0,05$ ;  $r^2 = 0,26$ ). De beide berekeningswijzen leveren sterk verschillende schattingen op voor de IPS-combiwaarden, en kunnen dus niet uitwisselbaar worden beschouwd. Ook de bandbreedte van de IPS-combiwaarden gebaseerd op alleen aan- of afwezigheid is sterk verminderd. Bij gebruik van relatieve abundantie is het berekende IPS-spectrum veel breder, en in redelijk goede overeenkomst met de bandbreedte van de resultaten voor de met microscopische gegevens berekende IPS-waarden (zie paragraaf 4.4 hierna). We hebben daarom



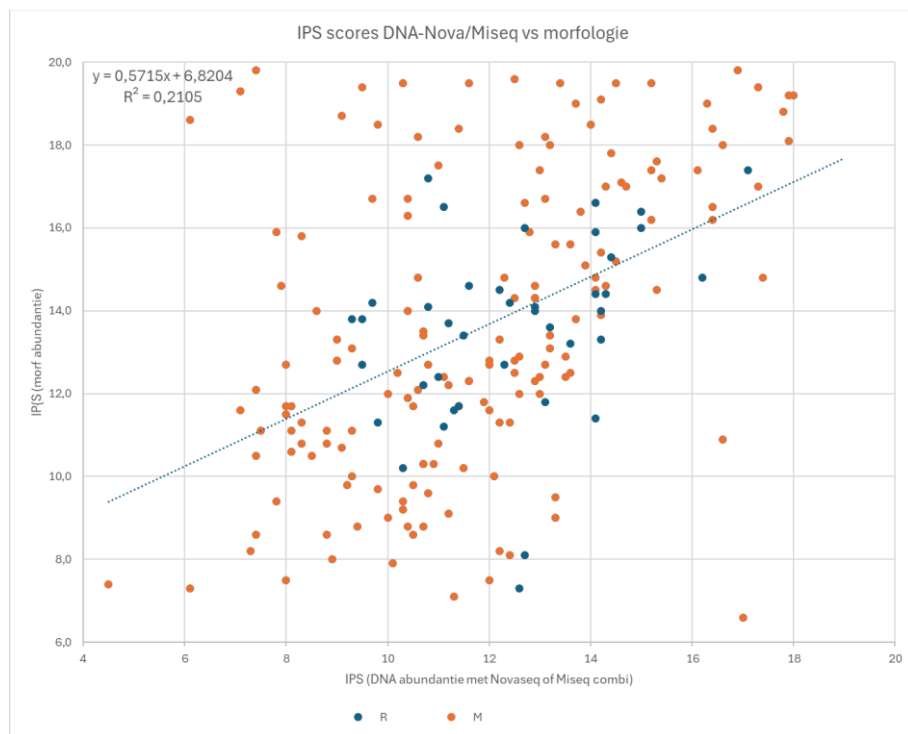
*Figuur 4.6. Pearson correlatie tussen 181 IPS-combiwaarden berekend met relatieve abundantie van DNA-barcodes (AB) of met aan- of afwezigheid van DNA-barcodes (PA). De IPS-waarden zijn berekend met de Novaseq combi monsters uit 2021-2022. R=stromend water; M=stilstaand water. De lineaire regressie betreft alle locaties.*

besloten om de relatieve barcode verdeling in een monster te gebruiken als abundantie schatting in de IPS berekeningen.

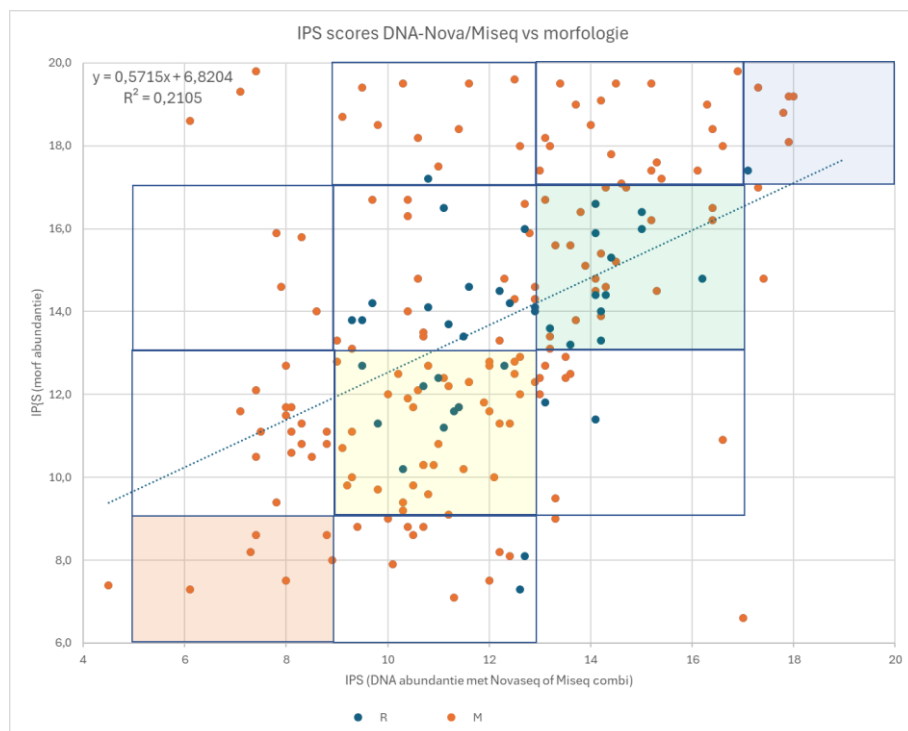
#### 4.4 Vergelijking IPS-waarden bepaald met DNA en microscopie

In deze paragraaf wordt onderzocht hoe vergelijkbaar de IPS-waarden zijn tussen de microscopische analyses en de DNA-analyses. Daarbij is gebruik gemaakt van alle 203 monsters waarvoor zowel een ethanolmonster als een schraapmonster beschikbaar was, en dus een IPS-combi bepaling kon worden gedaan op basis van de meest complete DNA-dataset. Daarbij zijn Miseq-data gebruikt indien Novaseq-data ontbraken, op grond van de in paragraaf 4.2 aangetoonde grote mate van overeenkomst tussen de resultaten van beide sequencers (Figuur 4.5).

In Figuur 4.7 staan de IPS-combiwaarden bepaald met de microscopische data uitgezet tegen de IPS-combi waarden bepaald met DNA-barcoding data. Er is een significant lineair verband, maar het verband was zwak ( $p < 0,05$ ;  $r^2 = 0,21$ ). De correlatie voor stromende wateren is zwakker ( $r^2 = 0,11$ ) dan voor stilstaande wateren ( $r^2 = 0,22$ ).



Figuur 4.7. Pearson lineaire correlatie tussen de 203 beschikbare IPS-combiwaarden bepaald met microscopie (verticaal) en met DNA (horizontaal; Miseq combiwaarde gebruikt indien er geen Novaseq combiwaarde beschikbaar was). Alle IPS-berekeningen zijn gedaan met gebruik van relatieve abundantie (AB). R=stromend water; M= stilstaand water. De lineaire regressie betreft alle locaties.



Figuur 4.8. Verdeling van de data uit Figuur 4.7 over KRW kwaliteitsklassen. Zie de tekst.

Als vervolgstap is in Figuur 4.8 over dezelfde gegevens een rooster geplaatst dat de verschillende niveaus (kwaliteitsklassen) van de KRW deelmaatlat voor fyto-benthos voor natuurlijke wateren weergeeft. De IPS-scores (met waarden van 0-20) kunnen met de KRW deelmaatlat voor fyto-benthos (Van der Molen et al., 2018) worden

vertaald naar waarden voor de Ecologische Kwaliteit Ratio (EKR; tussen 0 en 1). Voor wateren met de status natuurlijk heeft de KRW klasse ‘Slecht’ (EKR=0-0,2) een IPS van 0 tot en met 5. ‘Ontoereikend’ (EKR>0,2-0,4) loopt van IPS>5 tot en met 9. ‘Matig’ (EKR>0,4-0,6) loopt van IPS>9 tot en met IPS=13. ‘Goed’ (EKR>0,6-0,8) loopt van IPS>13 tot en met IPS=17. ‘Zeer goed’ (EKR>0,8-1,0) loopt vanaf IPS>17 tot en met IPS=20. In Tabel 4.2 wordt de verdeling over deze kwaliteitsklassen weergegeven van de monsters op basis van hun IPS-waarde volgens beide methoden, waarbij de klasse ‘Slecht’ maar in één geval (voor een DNA monster) is opgetreden.

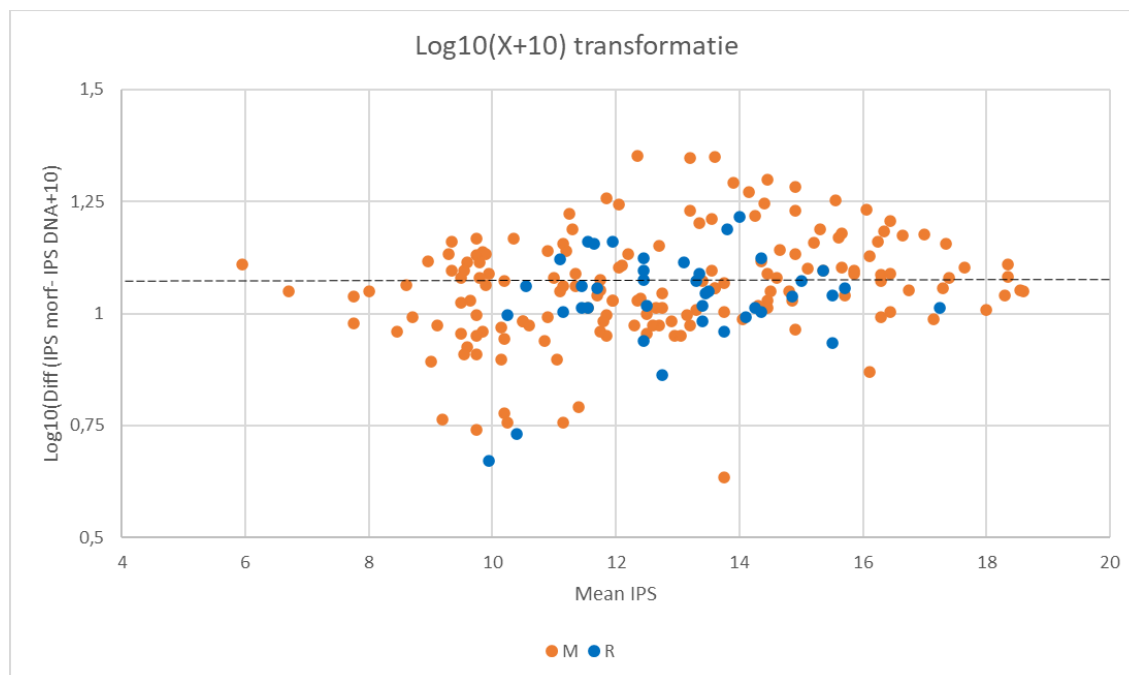
Tabel 4.2. Verdeling van de 203 monsters over hun KRW-kwaliteitscore: van boven naar beneden op grond van de IPS bepaald met microscopie (IPS morf), van links naar rechts op basis van de IPS bepaald met DNA (IPS DNA). De afwijking tussen de KRW-kwaliteitscore volgens DNA en de KRW-kwaliteitscore volgens microscopie is samengevat in de rechterhelft van de tabel; als voorbeeld: de regel met ‘EKR+1’ betekent dat 22 locaties volgens DNA één KRW-kwaliteitsklasse hoger uitkomen dan de KRW-kwaliteitsklasse op grond van microscopie. De regel ‘EKR-3’ geeft aan dat bij DNA slechts drie locaties drie KRW-kwaliteitsklassen lager scoren dan de KRW-kwaliteitsklasse op grond van microscopie.

	IPS DNA					ntot		n	%
slecht (0,0-0,2)	0	0	0	0	0	0	EKR+3	0	0%
ontoereikend (0,2-0,4)	1	6	12	2	0	21	EKR+2	2	1%
matig (0,4-0,6)	0	17	49	8	0	74	EKR+1	22	11%
goed (0,6-0,8)	0	5	29	33	2	69	EKR+0	94	46%
zeer goed (>0,8)	0	3	11	19	6	39	EKR-1	66	33%
							EKR-2	16	8%
ntot	1	31	101	62	8	203	EKR-3	3	1%

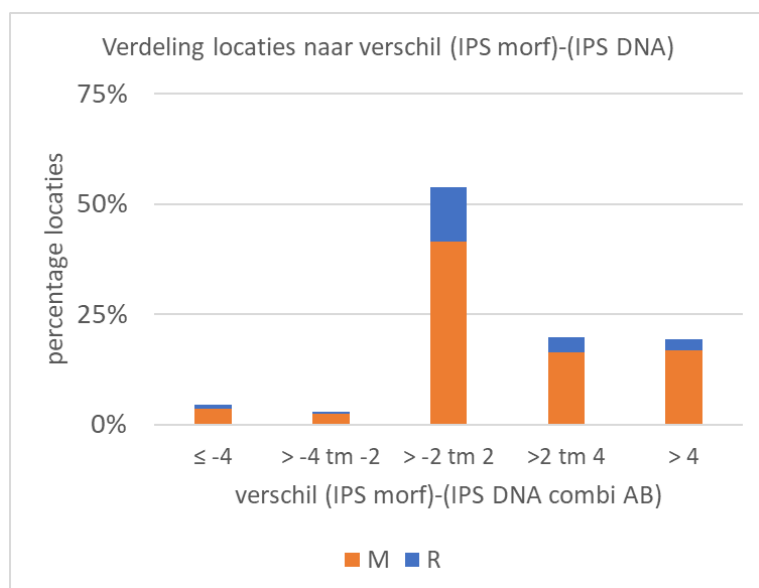
Zo’n 45% van de locaties krijgt op grond van de DNA-analyse dezelfde KRW-kwaliteitsklasse als verkregen met de microscopische analyse, ongeveer 35% van de met DNA bepaalde KRW-kwaliteitsklasse ligt één klasse lager dan de klasse verkregen met de microscopische analyse, zo’n 10% van de met DNA bepaalde klassen ligt één klasse hoger dan de klasse verkregen met de microscopische analyse en zo’n 10% van de met DNA bepaalde klassen ligt twee klassen of meer lager dan de klasse verkregen met de microscopische analyse. De met DNA bepaalde KRW-kwaliteitsklasse is voor ongeveer 80% gelijk of één klasse lager dan de beoordeling met de microscoop. Dat is een verschil van maximaal vier IPS-eenheden (op de IPS-schaal van 0-20).

Voor alle 203 locaties met een IPS DNA-combiwaarde is ook het verschil berekend tussen de IPS-waarde op basis van DNA-analyses en de IPS-waarde op basis van microscopische identificatie. In Figuur 4.9 zijn de zo verkregen verschilwaarden uitgezet tegen de gemiddelde IPS-waarde van beide methoden. Het verschil bedraagt soms tot 10 IPS-eenheden, vandaar dat een log(x+10) transformatie is uitgevoerd. Bij een perfecte gelijkwaardigheid van beide methoden zouden alle verschilwaarden dan uitkomen op de getransformeerde waarde 1. Er is echter duidelijk een verschil zichtbaar waarbij de IPS-DNA waarde gemiddeld 1,7 IPS eenheden lager ligt dan de IPS-waarde op basis van microscopie. Dit gemiddelde verschil is significant (gepaarde t-test, p<0,05).

Tenslotte staat in Figuur 4.10 de verdeling van de locaties over vijf verschil klassen voor de beide IPS-schattingen. De IPS op basis van microscopie verschilt in 75% van de gevallen tussen -2 en +4 IPS-eenheden van de IPS op basis van DNA-analyse. Het is zinvol om nader te achterhalen wat een dergelijk verschil betekent ten opzichte van de bandbreedte die bij met microscopie bepaalde IPS-waarden wordt gevonden als gevolg van diverse bronnen van variatie. Dat is gedaan in paragraaf 4.5.



Figuur 4.9. Relatie tussen gemiddelde IPS-waarde op grond van DNA en microscopie (horizontaal) en de  $\log(x+10)$  getransformeerde waarde van het verschil tussen beide IPS-waarden. De stippellijn geeft de waarde van het gemiddelde verschil aan. De Miseq-combiwaarde is gebruikt indien geen Novaseq-combiwaarde beschikbaar was. Alle IPS-berekeningen zijn gedaan met gebruik van relatieve abundantie (AB). R=stromend water; M= stilstaand water.



Figuur 4.10. Verdeling van de 203 locaties met een DNA IPS-combiwaarde over vijf klassen van verschil tussen hun IPS-microscopie (IPS morf) en IPS DNA-waarde (IPS DNA combi AB). De Miseq-combiwaarde is gebruikt indien er geen Novaseq-combiwaarde beschikbaar was. Alle IPS-berekeningen zijn gedaan met gebruik van relatieve abundantie (AB). R=stromend water; M= stilstaand water.

## 4.5 Variatie bij de bepaling van indicatiewaarden met microscopie – een beknopt review

Bij het tot stand komen van een op diatomeeën gebaseerde index waarde hebben diverse bronnen van variatie hun invloed op het uiteindelijke resultaat. Allereerst speelt natuurlijk de keuze voor een representatief geachte monsterlocatie in een waterlichaam een rol bij de samenstelling van de diatomeeën gemeenschap die later zal worden vastgesteld in het monster, evenals het type substraat dat daarbij wordt bemonsterd. Ook het moment in het jaar waarop wordt gemonsterd is van invloed op de aangetroffen diatomeeën gemeenschap. Vervolgens is de wijze waarop het genomen monster wordt geconserveerd van belang en hoe dit wordt voorbereid voor microscopische identificatie. Tenslotte heeft natuurlijk de werkwijze en de kennis en ervaring van de analist die de identificatie uitvoert een bepalende rol. De geregeld veranderende taxonomische inzichten maken de realisatie van een betrouwbare lijst met taxa en hun relatieve abundantie in het monster van een onderzochte locatie niet eenvoudiger. Uit de vrij beperkt beschikbare literatuur over dit onderwerp hebben we vooral informatie kunnen verzamelen over de mate waarin traditioneel bepaalde indexwaarden variatie vertonen. Dat geeft deels antwoord op de vraag hoe de in eerdere studies vastgestelde variatie zich verhoudt tot de aangetroffen variatie tussen onze resultaten gebaseerd op microscopisch bepaalde indexwaarden versus de met DNA bepaalde indexwaarden.

Prygiel et al. (2002) werkten met 24 analisten, die elk drie monsters uit dezelfde locatie verzamelden, drie preparaten maakten en van elk preparaat drie monsters van 400 schaaltes identificeerden. Daarbij werd gewerkt met de Franse Biological Diatom Index (BDI, Lenoir & Coste, 1996; een index met een ten opzichte van de IPS sterk beperkte lijst van diatomeeën taxa, met een schaal van 0-20, net als bij de IPS). Ze concluderen dat 80% van de variatie wordt veroorzaakt door de analist, 10% door de bemonstering in het veld, 5% komt van de variatie tussen preparaten en 5% komt van variatie binnen een preparaat. De bandbreedte van de variatie in de BDI schattingen was 1,5-2,0 eenheden (zo'n 10% van de schaal van de BDI-index; vertaald naar de schaal van de IPS-index komt dat neer op 2 IPS-eenheden). Ook Lavoie et al. (2005) concluderen dat de bijdrage van variatie door verschillen tussen preparaten van één monster en binnen een preparaat klein is ten opzichte van de variatie tussen en binnen de bemonsterde locaties.

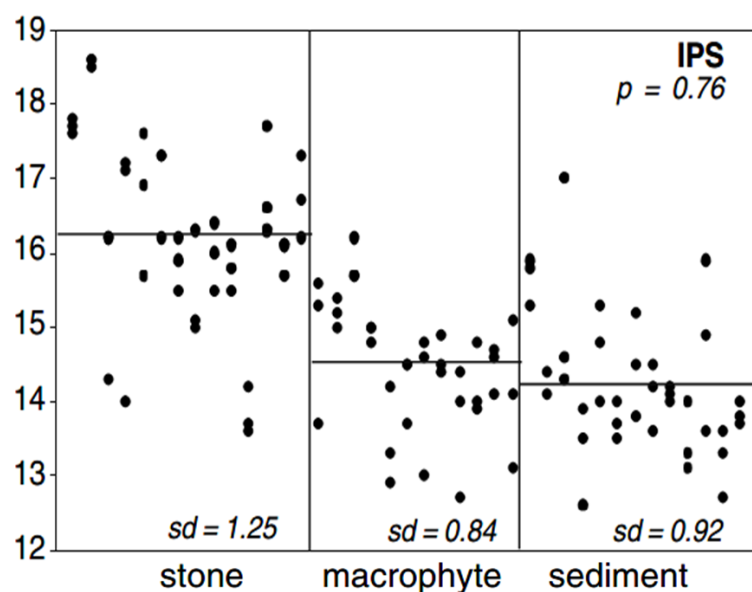
Kelly et al. (2002) bestudeerden het effect van de analyse van één preparaat door 21 analisten op de resulterende index-schatting voor drie diatomee indexen (zonder de IPS). De bandbreedte van de variatie in de waarde van de onderzochte drie indexen was 10-20% van de schaal van de betreffende indexen (vertaald naar de schaal van de IPS komt dat neer op 2-4 IPS-eenheden). De variatie tussen de 21 taxalijsten (soortenaantal en abundantie) was overigens beduidend hoger. Het meer beperkte effect op de indexwaarde wordt door Kelly et al. (2002) verklaard doordat zeldzame taxa die gemakkelijker worden gemist, relatief veel effect hebben op de taxalijsten maar minder effect op de uiteindelijke indexwaarde door de weging naar relatieve abundantie. Een vergelijkbare conclusie wordt getrokken door Kelly et al. (2009), Kahlert et al. (2012) en Almeida et al. (2014) waarbij de auteurs toch ook het belang van harmonisering van identificaties tussen verschillende analisten benadrukken.

Besse-Lototskaya et al. (2006) geven veel informatie over bronnen van variatie bij de bepaling van diverse indexwaarden waaronder de IPS. De bronnen van variatie die werden meegenomen zijn verschillen tussen twee locaties in dezelfde rivier, tussen drie substraten, tussen elk van tien partners, tussen partner en auditor, en tussen drie replica monsters per locatie-substraat-partner combinatie. Tenslotte werd ook nog de variatie in de analyse van replica preparaten van twee monsters onderzocht. De diverse gebruikte indexwaarden werden berekend met Omnidia (Lecoine et al., 1993) en uitgewerkt op een standaardschaal van 0 tot 20. Een deel van Tabel 4 uit Besse-Lototskaya et al. (2006) is hier weergegeven in Tabel 4.3 voor de IPS-index. Deze geeft een overzicht van de standaardafwijkingen voor de zeven niveaus van variatie, op afnemende volgorde van de waarde van de standaardafwijking. De auteurs interpreteren dit als de volgorde van relatieve bijdragen aan de totale variatie. Verschillen tussen de waargenomen standaardafwijkingen zijn echter niet optelbaar en daarmee niet geschikt voor deze rangorde bepaling. Verschillen tussen varianties van de verschillende bronnen zijn dat wel. Daarom zijn de standaardafwijkingen uit Besse-Lototskaya et al. (2006) hier in Tabel 4.3 gekwadrateerd. Daarmee kunnen de

procentuele bijdragen van de verschillende bronnen van variatie aan de totale variantie worden achterhaald. Het substraat (steen, plant of sediment) blijkt de grootste bijdrage te leveren aan de totale variantie (31%), gevolgd door locatie (28%), variatie tussen partners (13%) en replica monsters (12%). Het effect van identificatie verschillen met de auditor (4%) en tussen replica preparaten (5%) is relatief klein. Overigens is deze volgorde van naar relatieve bijdragen van deze bronnen anders dan zoals gesteld door Besse-Lototskaya et al. (2006) op grond van hun standaardafwijkingen. De bevindingen laten ook zien dat de variatie in de resultaten door verschillen tussen analisten (=bronnen 'partner' en 'audit') beduidend kleiner was dan de 80% zoals gevonden door Prygiel et al. (2002). De door Besse-Lototskaya et al. (2006) gerapporteerde IPS waarden bleken behoorlijke verschillen te vertonen (zie Figuur 4.11), met een bandbreedte van 2-4 IPS eenheden.

Tabel 4.3. Schatting van de bijdragen van genestelde bronnen van variatie bij bepaling van de IPS index. De som van alle deelbijdragen per stap is gelijk aan de totale variantie (1,9321). Bron standaardafwijkingen: Besse-Lototskaya et al. (2006).

	totaal	site	partner	substraat	audit	repl monster	repl preparaat
standaardafwijking	1,39	1,34	1,12	1	0,64	0,57	0,32
variantie	1,93	1,80	1,25	1	0,41	0,32	0,10
Deelbijdrage per stap	0,14	0,54	0,25	0,59	0,08	0,22	0,10
percentage per stap	7%	28%	13%	31%	4%	12%	5%



Figuur 4.11. Schatting van IPS waarden voor drie verschillende sedimenten op twee naastliggende locaties door tien laboratoria. De p-waarde geeft de kans dat de gemiddelde IPS resultaten voor de drie substraten significant verschillen. Zie ook de tekst. Uit Besse-Lototskaya et al. (2006).

Kahlert et al. (2009) analyseerden de resultaten van zes monsters verwerkt door 24 analisten. De bandbreedte in IPS-score per locatie was 1-2 IPS eenheden wanneer alleen de tien resultaten werden gebruikt van deelnemers die meer dan 60% overeenkwamen met de resultaten van twee auditors. Voor alle 24 deelnemers samen was de bandbreedte 2-6 IPS eenheden. Overigens kon een clusteranalyse de zes verschillende locaties toch nog goed van elkaar onderscheiden, ondanks deze variatie. De auteurs concluderen dat niet zozeer ervaring maar harmonisatie en afstemming tussen analisten leidt tot beperking van variatie in taxonlijsten.

Verweij et al. (2015) deden onder meer een heranalyse van drie oude diatomee-monsters. Zij werkten hierbij met steekproeven van tien monsters van 200 schaaltes, elk samengesteld uit trekkingen van een groot aantal eerder geïdentificeerde microscoopbeelden afkomstig uit een voorafgaand uitgewerkt monster van 1000 schaaltes. In

deze aanpak zit dus alleen de variatie als gevolg van het random trekken van deelmonsters uit het bekende monster van 1000 schaalpjes. Uit hun resultaten kan worden afgeleid dat er voor de IPS-waarden een bandbreedte bestond van 0,5-0,75 IPS-eenheden.

Werner et al. (2016) lieten 40 analisten werken met vier diatomee-monsters. De meeste resultaten (uitgedrukt in een Duitse diatomee-index) bleven wel binnen dezelfde KRW-kwaliteitsklasse, maar de resultaten lagen verspreid over de hele bandbreedte van die klasse. In IPS-termen was de bandbreedte dus vier IPS eenheden.

## 4.6 Discussie

De door ons verzamelde dataset vertoont een forse variatie tussen de met DNA en met microscopie bepaalde waarden voor de IPS-index, met een  $r^2=0,21$  voor 203 data paren. Voor ruim 50% van de data gold dat het verschil tussen de IPS bepaald met DNA en de IPS bepaald met microscopie -2 tot +2 IPS eenheden bedroeg. Voor zo'n 20% van de data lag de IPS bepaald met DNA 2 tot 4 IPS eenheden lager, en voor een restgroep van zo'n 20% was de IPS DNA meer dan 4 IPS eenheden lager ten opzichte van de IPS bepaald met microscopie (zie Figuur 4.10). Borrego-Ramos et al. (2021) werkten met de TDI index in 22 meren in NW Spanje. Zij vonden een  $r^2=0,01$  voor de relatie tussen de TDI index bepaald met DNA of microscopie, maar een  $r^2=0,23$  na toepassing van een celvolume correctie zoals voorgesteld door Vasselon et al. (2018). Andere onderzoeken met de hier gebruikte rbcl barcode laten voor dergelijke datasets vaak betere correlaties zien. Apothéloz-Perret-Gentil et al. (2017) werkten met 85 monsters en de Zwitserse diatomee-index, en vonden een  $r^2=0,57$ . In een later onderzoek met 112 monsters, vonden Apothéloz-Perret-Gentil et al. (2021) een  $r^2=0,85$ . Vasselon et al. (2017) vonden voor 80 monsters op het Franse tropische eiland Mayotte een  $r^2=0,52$  voor de IPS-index. Keck et al. (2018) werkten met 139 monsters uit Franse stromende wateren; ze vonden bij een vergelijking van IPS-waarden een  $r^2=0,48$ . Mortágua et al. (2019) vonden voor 88 locaties in Portugal een  $r^2=0,36$  voor de IPS-index. Kelly et al (2020) vonden in een dataset van 1714 locaties een  $r^2=0,79$  voor de TDI-index. Pérez-Burillo et al. (2020) werkten met 164 rivier monsters uit Catalonië en vonden voor de IPS-index een  $r^2=0,81$ .

De oorzaak voor de door ons gevonden tamelijk lage correlatie tussen IPS-index verkregen met DNA of microscopie is niet duidelijk. Oorzaken kunnen liggen in een beperkte DNA referentie bibliotheek (maar dit lijkt te worden ontkracht door Kelly et al. (2020), zie paragraaf 3.3), door de bias in de DNA referentiebibliotheek naar relatief meer soorten met een lagere IPS score, en identificatie problemen bij (vaak kleine) taxa met microscopie. Bij de door ons gebruikte verwerkingsmethode van schraapsel en ethanol apart, is het mogelijk dat de soortensamenstellingen van beide deelmonsters niet altijd op een zelfde manier invloed hebben gehad in de bepaling van het gecombineerde monster en dus op de IPS- cq Van Dam-waarden. Er was echter weinig verschil in soortenpalet tussen alle schraapsel- en ethanolmonsters samen (zie Figuur 3.8) maar dit kan per locatie mogelijk verschillen. Het is te overwegen om bij toekomstige inzet het schraapsel van al het materiaal in de pot te verzamelen, daarna dit goed te homogeniseren met al het losgeschudde materiaal en tenslotte een verzamelmonster af te pipetteren. In dit onderzoek bleek echter ook dat niet alle verzamelde substraat goed 'schraapbaar' was, en dat schrapen tamelijk arbeidsintensief is.

Uit de review (paragraaf 4.5) is gebleken dat de bandbreedte voor microscopisch bepaalde IPS-waarden uit de literatuur (1-2, geregeld tot 4 IPS-eenheden of meer) niet afwijkt van wat wij vonden als bandbreedte van het verschil tussen op DNA en op microscopie bepaalde IPS waarden (2-4 IPS eenheden; zie Figuur 4.10). De reproduceerbaarheid van de huidige microscopische methode kent dus haar beperkingen. De reproduceerbaarheid is met gebruik van DNA-barcodes heel goed. In Nederland wordt om kostentechnische redenen een lager aantal diatomeeschaaltjes geïdentificeerd en geteld dan in Europa gebruikelijk is: 200 in plaats van 400-500 (Stowa, 2010). Dat lagere aantal zal de variatie in met microscopie vastgestelde IPS waarden in Nederland waarschijnlijk hoger doen zijn dan in andere landen (zie bijvoorbeeld Verweij et al., 2015).



Kelly et al. (2020) constateren dat de relatieve abundanties van de diatomeeëntaxa in hun veldmonsters, geschat op grond van cellellingen en op grond van barcodes, slecht met elkaar correleerden. Dit leek bovendien te worden beïnvloed door het aantal chloroplasten of de grootte van de cel, maar niet erg eenduidig. Dit is in tegenspraak met de door Vasselon et al. (2018) gevonden goede relatie tussen celvolume en aantal barcode kopieën van het *rbcl*-gen voor acht reïncultures. Het bevestigt dat wij bij het gebruik van de door Vasselon et al. (2018) gevonden relatie géén verbetering zagen in de relatie tussen de IPS berekend met DNA-gegevens en met microscopische bepaalde waarden. Ook Apothéloz-Perret-Gentil et al. (2021) vond geen effect van de toepassing van deze relatie van Vasselon et al. (2018) op de door hen gevonden correlatie tussen de Zwitserse index waarde bepaald met beide methoden. Mortágua et al. (2019) vonden slechts een kleine verbetering in de correlatie door toepassen van deze correctie ( $r^2$  steeg van 0,36 naar 0,41). Pérez-Burillo et al. (2020) vonden ook nauwelijks een verbetering in de correlatie tussen de waarden voor IPS-DNA en de IPS gebaseerd op microscopische data, maar wel een verslechtering in de overeenkomst tussen de KRW-classificaties van de monsters. Borrego-Ramos et al. (2021) vonden een verbetering van  $r^2=0,01$  naar 0,23 door de inzet van deze correctie. Op grond van onze bevindingen en die uit eerdere studies lijkt het gebruik van deze celvolume correctiemethode bij het gebruik van DNA niet erg zinvol.

Kahlert et al. (2021) beargumenteren dat het gebruik van aan- en afwezigheid van diatomeeënsoorten in plaats van relatieve abundantie (afgeleid van barcode aantallen) de invloed van zeer zeldzame soorten/taxa (sterk) verhoogt ten nadele van meer algemene taxa. Daarmee werkt mogelijk het effect van het gebruik van aan- en afwezigheid meer versturend op de index resultaten dan de betrouwbaarheid van barcode abundantie als vervanger voor cel aantallen. Dit is een ondersteuning voor onze keuze om gebruik te maken van relatieve abundanties in de IPS-berekeningen.

In onze dataset had zo'n 45% van de locaties dezelfde KRW-klasse, en lag 30% van de locaties op grond van DNA-data één klasse lager dan volgens de microscopische indeling; 10% werd met DNA-data één KRW-klasse hoger ingedeeld. Een dergelijk resultaat werd ook gevonden door Kelly et al. (2020), met behulp van TDI-waarden. Bij hen lag de in totaal 30% afwijking met één KRW-klasse bepaald met DNA of microscopie wel meer verdeeld over zowel één KRW-klasse lager als één KRW-klasse hoger. Apothéloz-Perret-Gentil et al. (2017) vonden in hun dataset ongeveer 45% overeenstemming, en 40% met maximaal één KRW-klasse verschil. Mortágua et al. (2019) hadden ongeveer 55% overeenstemming in KRW-klasse bepaald met DNA of microscopie, en 40% met maximaal één KRW-klasse verschil. Pérez-Burillo et al. (2020) hadden een overeenstemming van 69%. Borrego-Ramos et al. (2021) vonden met DNA in 59% van de gevallen een indeling in de vijf KRW-kwaliteitsklassen die overeenkwam met op microscopie gebaseerde resultaten. Onze resultaten passen redelijk goed in dit meer algemene beeld voor overeenkomsten en verschillen tussen de KRW-klasse indeling op grond van microscopische en op DNA-gebaseerde gegevens. Wij vermoeden dat de bias in de IPS-DNA referentiebibliotheek naar relatief minder soorten met een hoge IPS-s indicatiewaarde in ons geval een oorzaak kan zijn voor de regelmatig wat lagere KRW klasse schatting met DNA dan met microscopie. Verder zou hier ook een waarnemingseffect een rol kunnen spelen, waarbij schaaltes van zeldzame 'goed' scorende soorten met microscopie relatief vaker worden herkend dan schaaltes van minder goed identificeerbare, en mogelijk ook minder 'goed' scorende soorten. Met DNA kan dat effect niet optreden.

Kelly et al. (2009) en Almeida et al. (2014) constateren dat er bij microscopische analyses van diatomeeën veel variatie bestaat voor de indeling van locaties met kwaliteitsscores die liggen in de range van de KRW klassen 'matig' en 'goed'. Ook uit onze Figuur 4.9 lijkt dit beeld op te doemen: de regio IPS 11-15 (overgangszone kwaliteitsklasse 'matig' naar 'goed') vertoont meer grotere verschillen tussen IPS bepaald met DNA of met microscopie dan de regio daarbuiten. Kelly et al. (2009) verklaren dit grotere verschil doordat onder die omstandigheden zowel gevoelige als wat minder gevoelige soorten beide (al dan niet samen) kunnen voorkomen. Helaas geven deze auteurs geen kwantitatieve waarden voor de achterliggende IPS- of andere indexwaarden. Kelly et al. (2009) concluderen ook dat voor een betrouwbare KRW-kwaliteitsschatting tenminste zes monsters nodig zijn verdeeld over 2-3 jaren. Heel

veel meer moeite steken in één monster door meer schaaltes tellen, cq nog meer verfijnde taxonomische inzichten toepassen, weegt daar volgens hen niet tegen op. Meer dekking in ruimte en tijd is volgens deze auteurs bepalend voor het krijgen van een betrouwbaar beeld van de waterkwaliteit. Deze bevinding ondersteunt ook de keuze om in diatomee monitoring (veel) meer gebruik te maken van DNA detectie, omdat daarmee deze dekking in ruimte en tijd naar verwachting in de nabije toekomst tegen relatief lagere kosten kan worden bereikt dan met morfologische identificatie middels microscopie. Daarnaast kan mogelijk de geautomatiseerde verwerking van digitaal vastgelegde microscopische preparaten in de toekomst een oplossing bieden voor het vraagstuk van verschillen in interpretatie en expertise tussen analisten

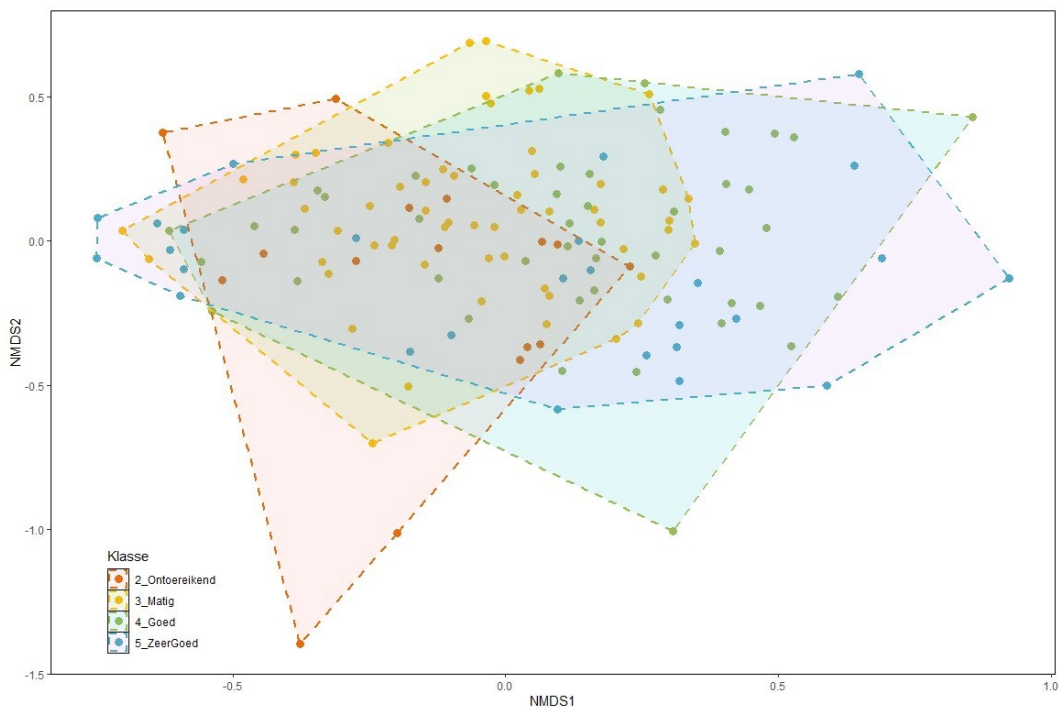
## 5 Taxonomie-vrije analyse

### 5.1 Inleiding

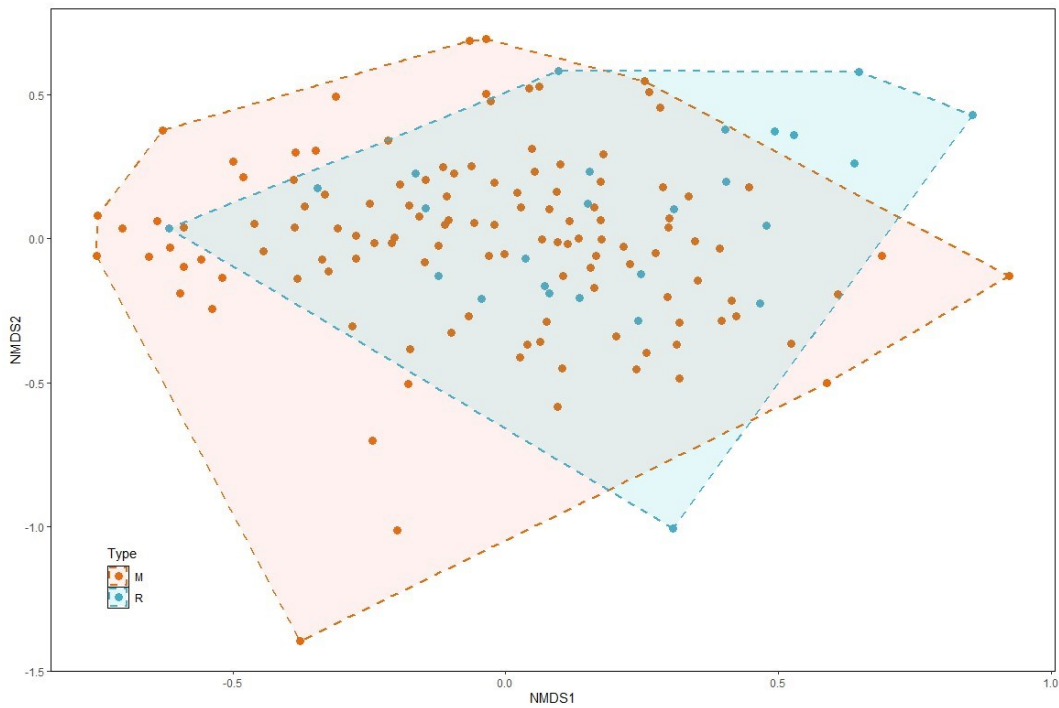
In dit hoofdstuk wordt ingegaan op mogelijkheden voor een taxonomie-vrije benadering bij het gebruik van DNA barcodes van diatomeeën voor het bepalen van ecologische waterkwaliteit. Bij de op taxonomie gebaseerde identificatie van DNA-barcodes worden data van DNA-barcodes die niet op naam kunnen worden gebracht weggelaten in de verdere analyses. Niettemin vertegenwoordigen deze codes mogelijk nog veel informatie gerelateerd aan diatomeeën waarvan de barcode (nog) niet is geïdentificeerd en daardoor niet in de referentiedatabank is opgenomen. Deze organismen kunnen wellicht wel in verband gebracht worden met de ecologische indicatie op grond van (groepen van) wél taxonomisch geïdentificeerde barcodes. De vraag die in dit hoofdstuk wordt opgepakt is in hoeverre een taxonomie-vrije aanpak informatie toevoegt aan een uitsluitend op taxonomische identificatie gebaseerde benadering. Daarbij is gebruik gemaakt van een machine-learning aanpak (zie paragraaf 2.5) waarbij alle ESVs werden gebruikt om de KRW-kwaliteit van een monster te leren voorspellen op grond van de KRW-kwaliteit van de monsters zoals bepaald met taxonomisch geïdentificeerde soorten.

### 5.2 Resultaten

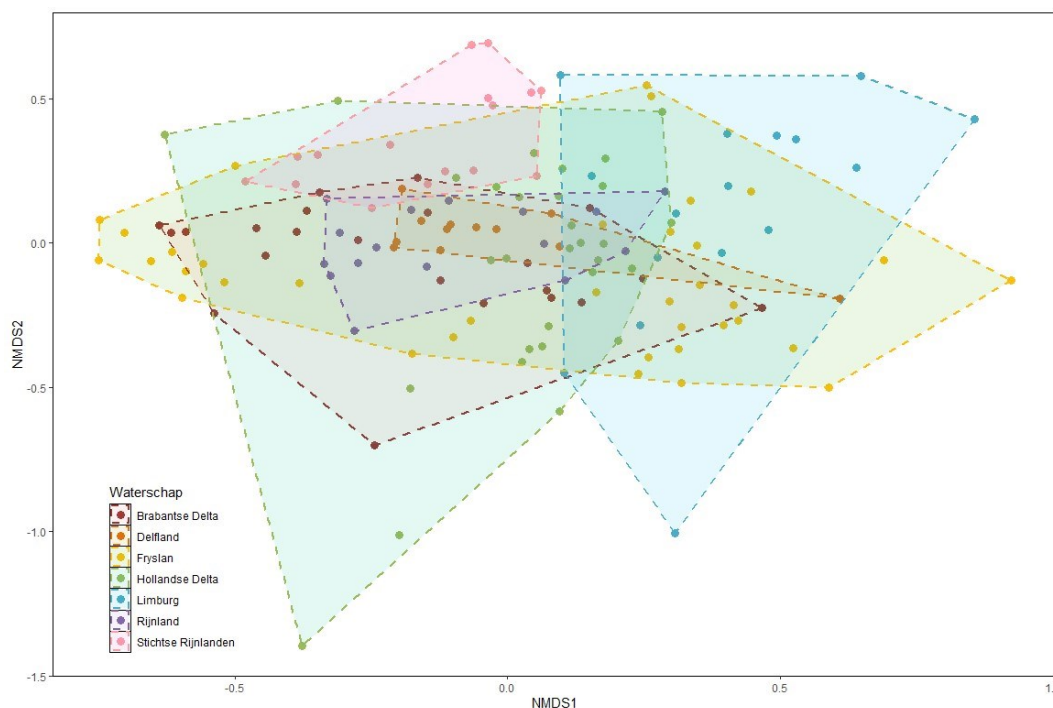
Alle 1.719 ESVs uit de Novaseq-resultaten zijn in de analyse meegenomen. Er waren niet evenveel monsters uit elke KRW-waterkwaliteitsklasse. De klassen zijn weer bepaald op basis van de IPS scores, conform Van der Molen et al. (2018) voor natuurlijke wateren. In de onderstaande NMDS-plots, welke een twee-dimensionele weergave zijn van de overeenkomst van de monsters op basis van ESV-samenstelling, is geen duidelijke clustering te zien van de locaties naar de kwaliteitsklassen. Een clustering op basis van het watertype (meren versus rivieren) is ook niet waargenomen (Figuur 5.1 en 5.2). Er is wel enige clustering te zien naar waterschappen waar de monsters zijn verzameld (Figuur 5.3), hoewel deze niet heel duidelijk is.



Figuur 5.1. NMDS plot met daarin in kleur de verschillende KRW-kwaliteitsklassen aangeduid.



Figuur 5.2. NMDS plot met daarin in kleur de typen stromend (R) en stilstaand water (M) aangeduid.



Figuur 5.3. NMDS plot met daarin in kleur de verschillende waterschappen aangeduid.

De resultaten van de indicatoren-analyse lieten zien dat 91 van de 1.719 ESVs als significant indicatief werden aangeduid voor één van de vier in de data beschikbare KRW-kwaliteitsklassen. De resultaten zijn bijgevoegd in Bijlage II.

Deze indicatoren analyse is ook toegepast om te onderzoeken of bepaalde ESVs indicatief zijn voor een bepaald waterschap. Hier werden 136 van de 1.719 ESVs gevonden met een significant indicatieve waarde voor een van de waterschappen (data niet inbegrepen in Bijlage II).

Met de machine-learning methode is gekeken naar alle 148 beschikbare locaties met een op microscopie gebaseerde KRW-kwaliteitsklasse en waarvan zowel het DNA-ethanol- als het DNA-schraapmonster gelukt was. In Tabel 5.1 zijn de resultaten te zien van de voorspellingen gedaan voor 25% van de data, wanneer de overige 75% werd gebruikt voor het trainen van het model. De voorspellingen zijn uitgezet tegen de KRW-kwaliteitsklasse van de monsters zoals bepaald op basis van de microscopische analyse. De juistheid van de voorspelling was 46%. Ongeveer 17% wordt één klasse te hoog geschat, 23% één klasse te laag, 12% wordt twee of drie klassen te hoog ingeschat en 3% twee klassen te laag. Als de kwaliteitsklassen 'ontoereikend' en 'matig', en de klassen 'goed' en 'zeer goed' werden samengenomen tot twee klassen die evenveel monsters bevatten, was de juistheid van de voorspelling 67%. Bij het gebruik van stromend (R) of stilstaand (M) watertype als classificatie van de locaties, was het model in staat om bij 85% van de monsters het juiste watertype te voorspellen.

Tabel 5.1. Voorspelling van KRW-kwaliteitsklassen met machine-learning ten opzichte van de bijbehorende microscopisch bepaalde KRW-kwaliteitsklassen voor een validatie set van ongeveer 25% van de 148 beschikbare monsters. De afwijking tussen de KRW kwaliteitsscore volgens het machine-learning model DNA en de KRW kwaliteitsscore volgens microscopie is samengevat in de rechterhelft van de tabel; als voorbeeld: de regel met 'EKR+1' betekent dat 6 locaties volgens machine-learning één KRW kwaliteitsklasse hoger uitkomen dan de KRW kwaliteitsklasse op grond van microscopie. De regel 'EKR-2' geeft aan dat bij machine-learning slechts één locatie twee KRW kwaliteitsklassen lager scoort dan de KRW kwaliteitsklasse op grond van microscopie.

		Referentie						
		0	1	2	3	ntot	n	%
Voorspelling	ontoereikend (0,2-0,4)	0	0	0	0	0	EKR+3	2 6%
	matig (0,4-0,6)	2	10	6	1	19	EKR+2	2 6%
	goed (0,6-0,8)	0	2	3	2	7	EKR+1	6 17%
	zeer goed (>0,8)	2	2	2	3	9	EKR+0	16 46%
<i>ntot</i>		4	14	11	6	35	EKR-1	8 23%
							EKR-2	1 3%
							EKR-3	0 0%

### 5.3 Discussie

Uit de NMDS plots bleek dat er geen duidelijke structuur in de ESV dataset was te koppelen aan bepaalde kwaliteitsklassen. Op grond van machine-learning werd dit beeld anders en bleek dat voor 46% van de locaties de KRW-kwaliteitsklasse overeenkomstig werd voorspeld zoals deze was er een bepaald op basis van de microscopische data. Bij gebruik van de data van alleen de ethanolmonsters per locatie (niet getoond) bleef de voorspellende waarde vrijwel gelijk; het weglaten van de informatie uit het schraapmonster gaf dus geen verlies in voorspellend vermogen.

Al eerder werd in dit onderzoek gevonden dat de overeenkomst in de indeling van de locaties in KRW-kwaliteitsklassen op basis van de microscopische en DNA-data ongeveer 45% was (zie paragraaf 4.4). De taxonomie-vrije aanpak geeft dus een daarmee vergelijkbare klasse-indeling. Er treedt bij gebruik van onze taxonomie-vrije werkwijze met ESVs echter geen grotere verklaring op van de variatie in de dataset ten opzichte van de werkwijze met op DNA gebaseerde soortenlijsten. Dat werd wel verwacht doordat met de taxonomie-vrije werkwijze ook niet taxonomisch geïdentificeerde ESVs konden bijdragen aan de typering van een kwaliteitsklasse. Kennelijk draagt in onze studie de informatie uit de niet tot soort geïdentificeerde ESVs niet bij aan wat de taxonomisch geïdentificeerde ESVs in de eerder beschreven aanpak al hebben ingebracht. De verdeling van de niet overeenkomstig geïdentificeerde monsters is met machine-learning wel meer in balans (soms een overschatting, soms een onderschatting) dan met de taxonomisch gebaseerde indeling waarbij de KRW-kwaliteitsklasse van 30% van de monsters op grond van DNA één klasse werd onderschat (zie Tabel 4.2 in paragraaf 4.4).

Apothéloz-Perret-Gentil et al. (2021) vonden met een vergelijkbare machine learning aanpak op basis van diatomeeën gemeenschappen een verklaarde variatie van 85% voor de indeling van locaties in een Zwitsers waterkwaliteitssysteem. Feio et al. (2020) probeerden met machine learning een taxonomie-vrije diagnostiek voor diatomeeën te ontwikkelen zonder gebruik te maken van morfologisch gebaseerde indexwaarden of kwaliteitsoordelen. Daarmee hoopte men het probleem van niet op naam te brengen barcodes met een incomplete referentie bibliotheek te omzeilen. Men maakte gebruik van een dataset van als hoge milieukwaliteit ('referentie') beoordeelde stromende wateren uit Portugal. De voorspelling van KRW-kwaliteitsklassen met de gevonden relaties tussen gemeenschappen op basis van DNA-barcodes en omgevings- en drukvariabelen was echter matig ( $r^2=0,3$ ).

Cordier et al. (2018) lieten zien dat gebruikmakend van DNA barcodes en los van taxonomie ook een prima biologische indicatie kan worden gegenereerd voor een monster. Ze vergeleken de effectiviteit van een machine-learning model dat met vijf markers (één voor bacteriën, een voor foraminiferen en drie voor eukaryoten) werd getraind om de impact van organische belasting te bepalen van zalmkwekerijen in Noorwegen op basis van DNA-data. Hun aanpak maakte gebruik van combinaties van indicerende barcodes; een dergelijke aanpak zou ook met diatomeeën kunnen worden uitgewerkt.

Ook Gregersen et al. (2023) slaagden er in om een taxonomie-vrije aanpak te ontwikkelen voor de bepaling van waterkwaliteit met diatomeeën uit bodem sediment van 89 meren in Nieuw Zeeland. De index maakte gebruik van correlaties tussen aangetroffen diatomeeën ESVs (zonder taxonomische identificatie) en zeven op stikstof-, fosfor- en chlorofylgehaltes gebaseerde waterkwaliteitsklassen van de onderzochte meren. Daarmee kon de op deze drie aspecten gebaseerde waterkwaliteitsindex goed worden voorspeld ( $r^2=0,85$ ).

Er lijkt een groter effect van de geografische locatie van het monster op de samenstelling van de diatomeeën gemeenschap te zijn dan van de KRW klasse-indeling (7,9% van de ESVs was voorspellend voor het waterschap waar ze genomen waren). Ook zijn er meer ESVs gevonden (in totaal 136) die indicatief waren voor een bepaald waterschap dan indicatief voor een bepaalde kwaliteitsklasse (namelijk 91, dat is 5,3% van het totaal aantal ESVs).

Om een voorspellende waarde te hebben voor een kwaliteitsklasse (of een andere indeling van monsters), is het nodig dat een ESV in het merendeel van de monsters uit die bepaalde klasse terug te vinden is, maar meer dan de helft van de ESVs zat in slechts één of twee monsters. De verwachting is dat het aantal ESVs dat indicatief is voor de waterkwaliteit in de toekomst zal toenemen, doordat steeds vaker diatomeeën-analyses met DNA zullen worden uitgevoerd. Binnen dit onderzoek is in ieder geval een begin gemaakt met een gekoppelde lijst van ESVs en KRW-waterkwaliteitsklassen (zie Bijlage II). Daarin is een groot deel van de aangetroffen waterkwaliteit indicerende ESVs ook te herleiden tot een microscopisch bekende soort, slechts een klein deel (nog) niet.

Een andere conclusie uit de resultaten is dat de menging van M en R typen wateren in de dataset voor KRW-kwaliteitsklassen zorgt voor extra ruis, aangezien het model redelijk goed met de ESVs kon voorspellen welk van beide type water het betrof. In dit onderzoek is geen machine-learning analyse gedaan met alleen monsters van een bepaald waterschap of watertype (M dan wel R) om te zien of de voorspellende waarde hiermee hoger werd, omdat het aantal monsters dat nodig zou zijn voor een dergelijke analyse niet beschikbaar was. Dit zou in de toekomst wel kunnen plaatsvinden indien er meer DNA-analyses beschikbaar komen.

Hoewel bij de verdeling van soorten over locaties was te zien dat in de DNA-data meer soorten zaten die vaker werden gevonden dan in de microscopie gegevens (paragraaf 3.3), werd dat niet waargenomen wanneer alleen naar de ESV-data gekeken wordt. ESVs zaten gemiddeld in 10 monsters, terwijl een soort uit de microscopische analyse in gemiddeld 9 monsters voorkwam. Er waren 26 ESVs die in meer dan de helft van de monsters zaten (dit was bij geen van de microscopische soorten het geval), en 987 (57,4%) van de ESVs zaten in maar één of twee monsters. Het aantal van dergelijke 'zeldzame soorten' in de microscopische data was ook ongeveer de helft (206 van 439 soorten, 46,9%). Omdat een groot deel van de ESVs niet gedetermineerd kon worden op soortniveau, blijven directe vergelijkingen lastig. Maar voor het deel van de ESVs waar wel een soortnaam aan gekoppeld kon worden, lieten Venn diagrammen duidelijk zien dat er weinig overlap bestaat tussen de microscopie resultaten en de DNA data (zie paragraaf 3.2).

## 6 Historisch perspectief op ervaringen met het bepalen van ecologische kwaliteit met diatomeeën

*De tekst van dit hoofdstuk is ook gepubliceerd in [H2O Online](#), onder de titel 'Snel inzicht in de ecologische waterkwaliteit met diatomeeën', met als auteurs Jako van der Wal, Joep de Koning en Herman van Dam.*

### 6.1 Samenvatting

Diatomeeën (kiezelwieren) zijn een diverse groep micro-organismen die in aangroei van water- en oeverplanten in alle watertypen voorkomen. Ze bieden snel inzicht in de ecologische waterkwaliteit, vanwege hun gevoeligheid voor veranderingen in het milieu. Diatomeeën kunnen als indicator dienen voor factoren als zoutgehalte, zuurgraad, organische belasting en toxische stoffen. Recente ontwikkelingen in DNA-technologie maken snellere en goedkopere identificatie mogelijk, waardoor diatomeeën een waardevol instrument blijven voor waterkwaliteitsbeheerders en -gebruikers. Hun toepassing biedt inzicht in zowel actuele als historische watercondities en helpt bij effectief reageren op milieuveranderingen.

### 6.2 Inleiding

Waterbeheerders willen de ecologische toestand van hun water weten. Hiervoor bestaat een breed palet aan monitoringstechnieken en methodes met soortgroepen als waterplanten, vissen, macrofauna en diatomeeën. Benthische (op de bodem, op oevers en water- en oeverplanten levende) diatomeeën zijn sinds de jaren tachtig van de vorige eeuw een bekende groep in de gevestigde monitoring en werden als indicatoren voor saprobie, trofie, zuur- en zoutkarakter in onder meer sloten en kanalen opgenomen in de STOWA-beoordelingssystemen (Franken et al., 2006). Deze systemen zijn in onbruik geraakt na de publicatie van de KRW-maatlatten, waarin voor het kwaliteitselement 'macrofyten en overige waterflora' in de meeste watertypen alleen invulling wordt gegeven met de macrofyten (Van der Molen et al., 2018). Dit artikel beoogt meer zicht te geven op de potenties van diatomeeën voor de waterkwaliteitsbeoordeling, op grond van recent verzamelde kennis en methoden. Zo is het aantal soorten met ecologische indicatiewaarden in de EBEO 2.0 Database Ecologische Beoordeling (Stowa, 2024) ten opzichte van 1994 ruim verdubbeld en zijn er nu methoden voor determinatie aan de hand van DNA-profielen in ontwikkeling.

### 6.3 Diatomeeën

Diatomeeën vormen een van de grootste groepen organismen op aarde. Ze zijn verantwoordelijk voor 40 tot 45 procent van de primaire productie van de oceanen. Dat is meer dan alle regenwouden van de wereld bij elkaar (Serôdio et al., 2020). Daarnaast staan ze aan het begin van de voedselketen. Voor veel dierlijk plankton (zoöplankton), insecten en (jonge) vissen vormen diatomeeën een belangrijke voedselbron.

Diatomeeën komen in alle soorten water voor (o.a. oceanen, estuaria, rivieren, meren, petgaten, vennen, moerassen) maar ook op kliffen en in vochtig mos en zelfs op de veren van watervogels, schilden van schildpadden en huid van zeezoogdieren. In totaal zijn er tienduizenden soorten, die enkele micrometers tot een millimeter groot zijn (Figuur 6.1, links). Ze zijn te herkennen aan hun vorm, grootte en ornamentatie van hun verkiezelde celwand. Diatomeeën leven vrij zwevend (fytoplankton) of aangehecht aan water- en oeverplanten (Figuur 6.1, rechts), vaste substraten of op de waterbodem (fytobenthos). Voor elk type water en waterkwaliteit zijn er diatomeeën, die daar



hun leefomgeving hebben. In Nederland zijn een paar duizend verschillende kiezelwiersoorten te vinden, met allemaal hun eigen voorkeursmilieu (Stowa, 2024).



*Figuur 6.1. Links: lichtmicroscopische foto van levende diatomeeëncellen in brak water (Foto: Dr. Oliver Skibbe, Research Group Diatoms, BO Berlin). Rechts: onderwaterfoto van diatomeeën op rietstengels (Foto W. Kolvoort)*

Benthische diatomeeën zijn belangrijke indicatororganismen. Anders dan fytoplankton, vissen en macrofauna zitten ze aangehecht op een oppervlak en kunnen ze zich niet tot nauwelijks verplaatsen; daarmee kunnen effecten op de waterkwaliteit lokaal worden aangetoond. Van veel soorten is bekend bij welke milieucondities ze voorkomen en vanwege hun hoge reproductiesnelheid (dagen) reageren ze snel (vaak binnen enkele weken) op veranderingen in hun milieu (Van Zuilichem et al., 2016). Dat is veel sneller dan veel andere ecologische indicatoren. Voor waterkwaliteitsbeheerders is dit een fijne eigenschap om te nemen maatregelen te onderbouwen of het effect van genomen maatregelen aan te tonen.

Na de aanwezigheid van water is de belangrijkste milieufactoor het zoutgehalte (saliniteit), gevolgd door de alkaliniteit (zuurbufferend vermogen) en de zuurgraad (pH). Daarnaast reageert de soortensamenstelling van de kiezelwieren onder andere op de aanwezigheid van biologisch afbreekbaar materiaal (saprobie), zuurstofgehalte, nutriëntenconcentraties, stroomsnelheid en de aanwezigheid van toxische stoffen.

Aan de andere kant bieden kiezelwieren inzicht in de historische toestand van wateren, omdat de kiezelwandjes fossiliseren en in sedimenten worden bewaard. Zo is de geschiedenis van de verzuring in vennen en de eutrofiëring van wielen gereconstrueerd (Klink, 1983; Kirilova, 2009). De aangehechte kiezelwieren van herbariummateriaal van waterplanten bieden inzicht in de vroegere nutriëntenstatus van laagveenplassen (Van Dam & Mertens, 1993). Vergelijking van 100 jaar oude, geconserveerde monsters met recente monsters uit vennen documenteert invloeden van verzuring, vermesting en verdroging (Van Dam et al., 2018).

In 21 van de 27 EU-landen (waaronder Nederland) zijn diatomeeën onderdeel van een Kaderrichtlijn Water (KRW)-kwaliteitsindex voor stromende wateren. In negen EU-landen worden ze voor stilstaande wateren toegepast (Poikane et al., 2016). Vaak is de gebruikte maatlat gebaseerd op de *Indice de Polluosensitivité Spécifique* (IPS), die ook onderdeel is van de Nederlandse KRW-maatlat (Van der Molen et al., 2018).

## 6.4 Determinatie

Van oudsher worden diatomeeën gedetermineerd met optische microscopen, aan de hand van morfologische kenmerken, zoals grootte, vorm en ornamentaties van de verkiezelde celwand. Deze determinatie met handboeken (Lange-Bertalot et al., 2017) vereist veel specialistische kennis en is tamelijk tijdrovend en daarmee kostbaar. Daar staat tegenover dat de er veel informatie verkregen wordt waarop we later in dit artikel verder ingaan.

De ontwikkeling van op DNA gebaseerde identificatiemethoden kan het gebruik van diatomeeën als indicatoren voor waterkwaliteit een stimulans geven. Door lagere kosten per DNA-analyse kunnen meer monsters in ruimte en tijd worden genomen en kan de ecologische kennis over diatomeeën gemakkelijker en breder worden ingezet. DNA-technieken om diatomeeën te analyseren lenen zich uitstekend om ecologische effectbepaling toe te passen op de vele grote en kleinere wateren die ons land rijk is. Zo ontstaan er meer mogelijkheden voor diagnose en beoordeling voor waterbeheerders en watergebruikers.

In Nederland is binnen het project Hydrochip al ruim tien jaar geleden een begin gemaakt met het herkennen van diatomeeën met DNA-technologie (Jaspers et al., 2012). In Europees kader is binnen het DNAqua-Net consortium de technologie voor diatomeeën en andere waterorganismen ('metabarcoding') verder ontwikkeld en uitgekristalliseerd in een handboek (Bruce et al., 2021). De resultaten van de DNA-determinaties en de microscopische determinaties en de daaruit berekende indices correleren goed met elkaar (Hootsmans et al., 2021; Kahlert et al., 2021).

Met de op DNA gebaseerde identificatiemethoden is op den duur veel tijdwinst te behalen en ze geven daardoor vaak snel inzicht in de waterkwaliteit en de veranderingen hierin. Uitgebreidere analyse van het ecologische systeem vergt vaak microscopisch onderzoek waarbij ook naar populatieopbouw en gezondheid wordt gekeken. Dit inzicht kan een DNA-analyse niet geven.

## 6.5 Toepassing

Benthische diatomeeën hebben diverse eigenschappen waardoor ze vaak geschikter als indicatoren zijn voor de ecologische waterkwaliteit dan bij bijvoorbeeld planten, fytoplankton of macrofauna. In waterlichamen die niet het hele jaar water voeren zijn diatomeeën bij uitstek geschikt om de waterkwaliteit lokaal vast te stellen. Ook op andere locaties waar andere indicatorgroepen zich niet optimaal kunnen ontwikkelen zijn diatomeeën een stabiele groep. Denk hierbij aan wateren met scheepvaart, golfslag of waar regelmatig wordt geschoond/gebaggerd. Hierdoor kan de plantengemeenschap zich niet of slecht ontwikkelen wat ook weer een negatief effect heeft op bijvoorbeeld macrofauna omdat de habitat is aangetast. De afwezigheid van die soortgroepen zegt dan vrij weinig over de waterkwaliteit op zichzelf. Daarnaast reageren diatomeeën veel sneller dan waterplanten, macrofauna en vis op veranderingen in de waterkwaliteit. Er zal sneller een gemeenschap ontstaan die is aangepast aan de veranderde omstandigheden.

Tabel 6.1 geeft een samenvatting van de doelstellingen, methoden en resultaten van de belangrijkste rapportages uit de laatste decennia waarbij diatomeeën zijn gebruikt als indicatoren voor de waterkwaliteit. Meestal is de soortensamenstelling van monsters van natuurlijke substraten geanalyseerd met microscopisch onderzoek. De ecologische kwaliteitsratio (EKR) differentieert in het algemeen niet voldoende, maar met de ecologische indicatiewaarden (Van Dam et al., 1994) worden betere resultaten gemeld. De belangrijkste verschillen worden vooral geregistreerd voor zoutgehalte, saprobie (verontreiniging door biologisch afbreekbaar materiaal), aan nutriënten gerelateerde variabelen en in sommige gevallen ook verdroging.

## 6.6 Indicatiewaarden

### Vochtgehalte

De aanwezigheid van water is de belangrijkste factor voor het voorkomen van diatomeeën. Hoewel ze vooral in oppervlaktewateren voorkomen hebben diatomeeën zich aangepast aan milieus met heel weinig water; of (sterk) wisselende omstandigheden. Daarmee zijn wisselende waterstanden en (tijdelijk) droogvallen aan te tonen.

### Saliniteit (halobie, zoutgehalte)

Het zoutgehalte en vooral de daarmee gepaard gaande osmotische druk is de tweede belangrijke milieufactoor voor het voorkomen van diatomee soorten. In tegenstelling tot andere groepen van organismen komen er in brak water juist veel verschillende soorten diatomeeën voor. Het zijn goede indicatoren voor verzilting.

Tabel 6.1. Samenvatting van sinds 1978 verschenen studies over diatomeeën als indicatoren voor de waterkwaliteit in Nederlandse oppervlaktewateren. N = aantal studies, STOWA = STOWA-beoordelingssystemen (Franken et al., 2006), EKR = Ecologische Kwaliteit Ratio (Van der Molen et al., 2018), VDI = Van Dam Index (Van Dam et al., 1994).

Doelstellingen	N	Methoden	Resultaten	Gebieden	Watertypen
Routinemeetnetten	13	STOWA, EKR, diversiteit, bijzondere soorten, VDI, ecol. groepen	matige kwaliteit wordt veelal niet gehaald, EKR differentieert niet voldoende, ecologische karakterisering monsterpunten	Rijkswateren, Noorderzijlvest, Delfland, Holl. Delta, Brab. Delta, Dommel	varia
Typologie, achterhalen relevante milieuv variabelen	7	multivariate analyse, VDI, diversiteit, zeldzaamheid, groeivormen, ecologische gilden	zout, herkomst water, pH, alkaliniteit, nutriënten, zuurstof, (ijzerrijke) kwel, seizoen, morfologie, bodemsoort, isolatie, afvoer, habitatdiversiteit, graasdruk macrofauna	Overijssel, Zuiderzeeland, Amsterdam, Noorderkwartier, Zuid-Holland, Limburg	varia, incl. stadswateren en bronnen
Effecten effluenten / overstorten	3	VDI, EKR, multivariate analyse, diversiteit, zeldzaamheid	duidelijke effecten op trofie en saprobie	Nederland, Tholen, Aa en Maas	varia
Effecten onderwater-drainage en flexibel peilbeheer	1	diversiteit, ecologische groepen, autecologie, misvormingen	kwaliteit ontoereikend-laag, verbetert misschien iets	Stichtse Rijnlanden	sloten
Effecten bufferstroken	1	kunstmatige substraten, translocatie, VDI, multivariate analyse, zeldzaamheid	kunstmatig substraat bruikbaar, nutriëntengehalten herkenbaar in soortensamenstelling	Twente, kunstbeek, aquaria	beken

Effecten zware metalen	1	kunstmatig substraat, fotosyntheseremming, soortensamenstelling	duidelijke invloed metalen, soorten kunnen zich aanpassen	Dommel stroomgebied	beken
Trendanalysen	5	STOWA, VDI, multivariate analyse, diversiteit, zeldzaamheid, EKR, ecologische groepen	Cl, nutriënten, saprobie, lichte afname of geen trend of sterke verbetering, herstelmaatregelen effectief	Friesland, Rijnland, Delfland, Dommel, Limburg	varia
Vergelijken vooroorlogse en huidige toestand	3	VDI, pH-optima, multivariate analyse, diversiteit, zeldzaamheid	achteruitgang kwaliteit tot ca 1980, daarna vaak verbetering, maatregelen tegen verzuring, eutrofiëring en verdroging effectief	Drenthe, Veluwe, Nieuwkoop	beken, vennen, laagveen-plassen
Eutrofiërings-geschiedenis	1	boorkernen, transferfuncties	fosfaatconcentraties hoog, afhankelijk van rivier- en landgebruik	Rivierengebied, Utrecht	wielen, zand-winplassen
Geschiedenis verzuring sinds 1800	2	boorkernen, transferfuncties	tijdlijnen pH	Drenthe, Veluwe, Noord-Brabant	vennen
Referentiemeetnet 1978-2022	3	VDI, multivariate analyse, diversiteit, zeldzaamheid	invloed verzuring, eutrofiëring, klimaatverandering, herstel	Drenthe, Veluwe, Noord-Brabant	vennen
Herstelplan	1	ecologische groepen, zeldzaamheid	verzuring, droogte, saprobie	Utrechtse Heuvelrug	sprengen
Evaluatie herstel	2	autecologie, zeldzaamheid, diversiteit, VDI	sterke verbetering waterkwaliteit	Naardermeer, Park van Luna	voedselrijke meren

Een lijst van alle voor deze tabel geraadpleegde bronnen is beschikbaar via deze [link naar H2O online](#).

### Zuurgraad

Na het zoutgehalte zijn de zuurgraad (pH) en de daaraan vaak gekoppelde alkaliniteit (zuurbufferend vermogen) de belangrijkste milieufactoren voor de kiezelwieren. Sommige diatomeeën komen tot bloei in extreem zure milieus, anderen verdwijnen juist, van veel soorten zijn de ranges waarbinnen ze voorkomen bekend. Hierbij is er een verschil in soortensamenstelling tussen van nature zure en antropogeen verzuurde wateren. Indicatiewaarden voor in Nederland voorkomende soorten, die veel zijn gebruikt in studies van verzuring van vennen, zijn vermeld in Van Dam et al., (1994).

### **Zuurstofverzadiging**

De zuurstofverzadiging wordt vaak gelijkgesteld aan saprobie (belasting met biologisch afbreekbaar materiaal) en biologisch zuurstofverbruik (de hoeveelheid zuurstof die in een bepaalde tijdseenheid wordt omgezet door het afbreken van organische deeltjes). Als er genoeg zuurstof in het water wordt opgelost, hoeft de organische belasting geen probleem te zijn. Van veel diatomeeën is bekend of ze continu een hoge tot lage zuurstofverzadiging vereisen. Samen met de parameter voor organische belasting ontstaat daarmee een beeld van de waterkwaliteit.

### **Organische belasting (saprobie)**

De saprobie (belasting met biologisch afbreekbaar materiaal) is van oudsher de meest onderzochte milieueconditie waarvan diatomeeën veranderingen snel aan het licht kunnen brengen. Naast de index van Van Dam (Van Dam et al., 1994) is ook de Indice de Polluosensitivité Spécifique (Coste, 1982) van belang. Om tot de KRW-maatlat voor de Nederlandse stromende wateren te komen is een afgeleide van de IPS gebruikt (Van der Molen et al., 2018).

### **Voedselrijkdom (trofie)**

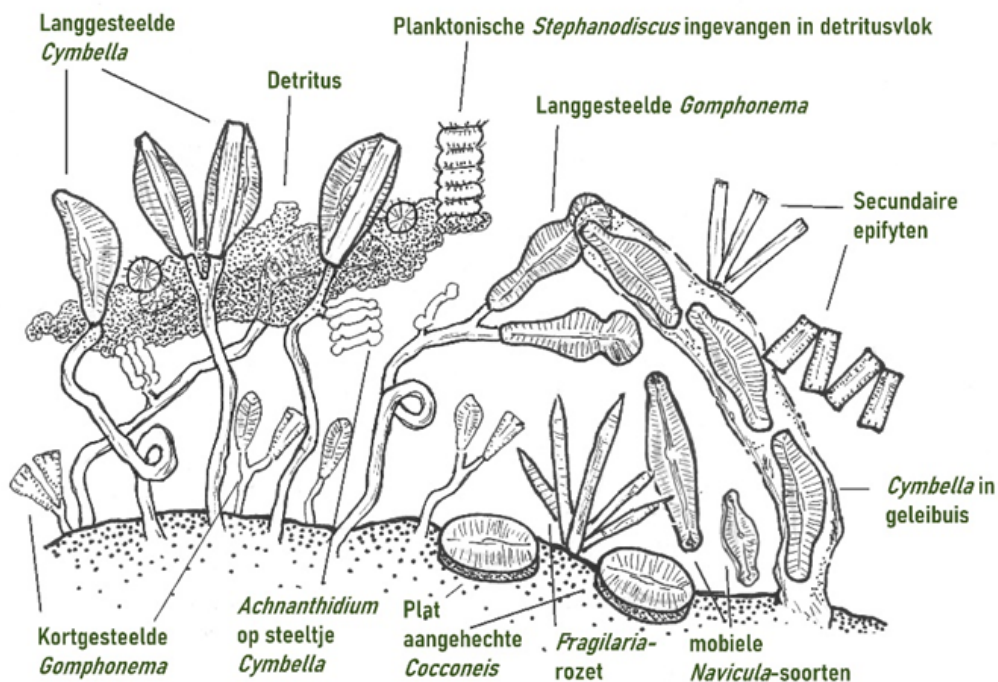
Veel wateren zijn verrijkt met nutriënten (vermesting) waardoor planten met een voorkeur voor hoge voedselrijkdom domineren of juist afwezig zijn door algenbloei. Met diatomeeën op de stengels van water- en oeverplanten en beschoeiingen kunnen veranderingen in voedselbeschikbaarheid dan nog goed worden aangetoond.

### **Temperatuur**

In het vroege voorjaar is er in sloten en kanalen een sterke ontwikkeling van het soortenaantal en de biomassa. Later in het jaar nemen biomassa en soortenaantal weer af. Op een geologische tijdschaal is reconstructie van (pre)historische temperaturen mogelijk door gebruik te maken van bekende temperatuur optima van voorkomende soorten (Lotter et al., 2010). Door lozingen van koelwater en klimaatverandering is er een gestage opmars van (sub)tropische soorten in Nederland en de rest van Europa Coste & Ector, 2000).

## **6.7 Groeivormen**

Naast de verschillende soortensamenstellingen en de daaraan gerelateerde ecologische indices, zeggen groeivormen en vervormingen van diatomeeën ook veel. Groeivormen van diatomeeën kunnen worden omschreven als aangehecht, kort gesteeld, lang gesteeld, mobiel en levend in slijmtubes (Figuur 6.2). Elke groeivorm heeft zijn voordelen. Zo zijn kort aangehechte diatomeeën moeilijker te begrazen en komen lang gesteelde diatomeeën met meer water in contact waar ze vervolgens stoffen uit kunnen opnemen. Daarnaast kunnen die meer licht opvangen als er daarvoor veel concurrentie is. Mobiele diatomeeën kunnen zich met veranderende omstandigheden aanpassen door bijvoorbeeld te migreren van oppervlakte naar ondergrond en andersom. Diatomeeën in slijmtubes zijn moeilijker te prederen en reageren langzamer op veranderingen in het milieu.



Figuur 6.2. De architectuur van het diatomeeënaangroei (aangepast naar Munteanu, 2023).

Hoewel er in de internationale literatuur veel aandacht is voor de bruikbaarheid van groeivormen voor waterkwaliteitsdiagnoses (Passy, 2007; Poulíčková & Manoylov), heeft dit nog niet geresulteerd in een algemeen toepasbaar systeem. In Noord-Hollandse sloten en kanalen zijn de mobiele en kort aangehechte soorten het meest algemeen, als reactie op het veranderlijke en zeer voedselrijke milieu (Goldenberg et al., 2014). Door de aanwezigheid van verschillende pesticiden nemen vooral de lang gesteelde diatomeeën sterk af (Rimet & Bouchez, 2011).

## 6.8 Misvormingen

Bij de aanwezigheid van toxische stoffen worden vaak misvormingen waargenomen (Figuur 6.3), vooral door presentie van zware metalen. In de laatste decennia is ook geconstateerd dat pesticiden, naast andere stressfactoren, de oorzaak van misvormingen kunnen zijn (Falasco et al., 2021). Recent zijn er ook aanwijzingen dat sommige vervormingen worden veroorzaakt door hoge stikstofconcentraties. De gevoeligheden zijn soortspecifiek. Door vervormingen te registreren en dit te koppelen aan de gevoeligheid van soorten kan er een uitspraak worden gedaan over de mate van verstoring.



Figuur 6.3. Twee schaaltes van *Navicula radiosa*. De rechter toont misvormingen aan het streepjespatroon (Foto: J. van der Wal, AQUON).

## 6.9 Perspectieven

Diatomeeën zijn een belangrijke bouwsteen van het watersysteem. Zoals hierboven aangegeven zijn het indicatoren voor verschillende milieuv variabelen, maar ze produceren ook zuurstof en ze staan aan de basis van het voedselweb. Ze zijn voedsel voor veel zoöplankton, macrofauna en (jonge) vis. De begrazing is een stressfactor voor de diatomeeën en heeft naast andere stressfactoren, zoals verstoring door droogval, slootschoning of plotseling harde stroming, invloed op de soortensamenstelling en de ruimtelijke structuur van het diatomeeënaangroei. Het zal nog veel onderzoek vergen om de invloed van al die factoren te ontrafelen.

Doordat diatomeeën van veel milieufactoren afhankelijk zijn en hun korte reproductietijd (afhankelijk van de beschikbaarheid van voedingsstoffen kan een andere diatomeeëngemeenschap ontstaan in 4 tot 8 weken) kunnen met diatomeeën snel effecten op de ecologische waterkwaliteit worden aangetoond, niet alleen van lozingen of andere incidenten, maar ook van een doelbewuste ingreep in het watersysteem.

Het combineren van de met DNA-analyses verkregen taxonlijsten, zoals onderzocht in het project DNA Diatom Biosensor, met verschillende indices is een snelle en goedkope methode om inzicht te krijgen in de waterkwaliteit. De eerste resultaten (Hootsmans et al., 2021) tonen aan dat de IPS een vergelijkbaar beeld geeft middels DNA en microscopische analyse. De verwachting is dat andere indices ook een vergelijkbaar beeld zullen geven. Hiermee zal DNA techniek naar verwachting op den duur een goede methode zijn om de effecten van relevante milieuv variabelen in beeld te brengen. Vooralsnog zijn de kosten van de DNA analyses vergelijkbaar met die van microscopische analyse, zoals die door diverse laboratoria worden uitgevoerd, maar dan altijd nog 80 procent goedkoper dan de standaard macrofaunamonsters.



## 7 Case studies met IPS en Van Dam indexen

### 7.1 Inleiding

Dit onderzoek was gericht op het ontwikkelen van een op DNA detectie gebaseerde methode waarmee diatomee taxa lijsten kunnen worden gerealiseerd en dus op diatomeeën gebaseerde beoordelingen kunnen worden uitgevoerd. Het gebruikmaken en interpreteren van de informatie zoals die besloten ligt in milieu-indicatie waarden van diatomeeën is natuurlijk niet exclusief aan DNA-detectie gebonden; zie immers het overzicht van allerlei toepassingen in hoofdstuk 6. Deze worden door DNA-detectie wel (weer) gemakkelijker mogelijk gemaakt. Om de mogelijkheden van diatomeeën voor beoordeling en diagnostiek te illustreren is met name in 2022 door de betrokken waterbeheerders materiaal bemonsterd en aangeleverd voor DNA-analyse. Dit betrof groepen van locaties waar mogelijke effecten van bepaalde maatregelen of omstandigheden op de ecologische waterkwaliteit misschien zouden kunnen worden vastgesteld met behulp van indicatiewaarden van diatomeeën. We hebben hierbij gewerkt met zowel de IPS- als de Van Dam-index; zie paragraaf 2.5 voor de wijze van berekening. Tabel 7.1 geeft een overzicht van de zeven Van Dam-indexen en de betekenis van de diverse scores per index.

Tabel 7.1 Van Dam-indexen met hun bijbehorende scoringswaarden en betekenis (naar Van Dam et al., 1994).

<b>(R) pH</b>				
1	acidobiontic	optimal occurrence at pH < 5.5		
2	acidophilous	mainly occurring at pH < 7		
3	circumneutral	mainly occurring at pH-values about 7		
4	alkaliphilous	mainly occurring at pH > 7		
5	alkalibiontic	exclusively occurring at pH > 7		
6	indifferent	no apparent optimum		
<b>(H) Salinity</b>				
		Cl <sup>-</sup> (mg/l)	Salinity (‰)	
1	fresh	< 100	< 0.2	
2	fresh-brackish	< 500	< 0.9	
3	brackish-fresh	500-1000	0.9 - 1.8	
4	brackish	1000-5000	1.8 - 9.0	
<b>(N) Nitrogen uptake metabolism</b>				
1	nitrogen-autotrophic taxa, tolerating very small concentrations of organically bound nitrogen			
2	nitrogen-autotrophic taxa, tolerating elevated concentrations of organically bound nitrogen			
3	facultatively nitrogen-heterotrophic taxa, needing periodically elevated concentrations of organically bound nitrogen			
4	obligately nitrogen-heterotrophic taxa, needing continuously elevated concentrations of organically bound nitrogen			
<b>(O) Oxygen metabolism</b>				
1	continuously high (about 100% saturation)			



2	fairly high (above 75% saturation)		
3	moderate (above 50% saturation)		
4	low (above 30% saturation)		
5	very low (about 10% saturation)		
<b>S (saprobity)</b>			
		O <sub>2</sub> sat (%)	BOD <sub>5</sub> <sup>20</sup> (mg/l)
1	oligosaprobous	> 85	< 2
2	beta-mesosaprobous	70 - 85	2 - 4
3	alpha-mesosaprobous	25 - 70	4 - 13
4	alpha-meso-/polysaprobous	10 - 25	13 - 22
5	polysaprobous	< 10	> 22
<b>(T) Trophic state</b>			
1	oligotraphentic		
2	oligo-mesotraphentic		
3	mesotraphentic		
4	meso-eutraphentic		
5	eutraphentic		
6	hypereutraphentic		
7	oligo- to eutraphentic (hypereutraphentic)		
<b>M (Moisture)</b>			
1	never, or only very rarely, occurring outside water bodies		
2	mainly occurring in water bodies, sometimes on wet places		
3	mainly occurring in water bodies, also rather regularly on wet and moist places		
4	mainly occurring on wet and moist or temporarily dry places		
5	nearly exclusively occurring outside water bodies		

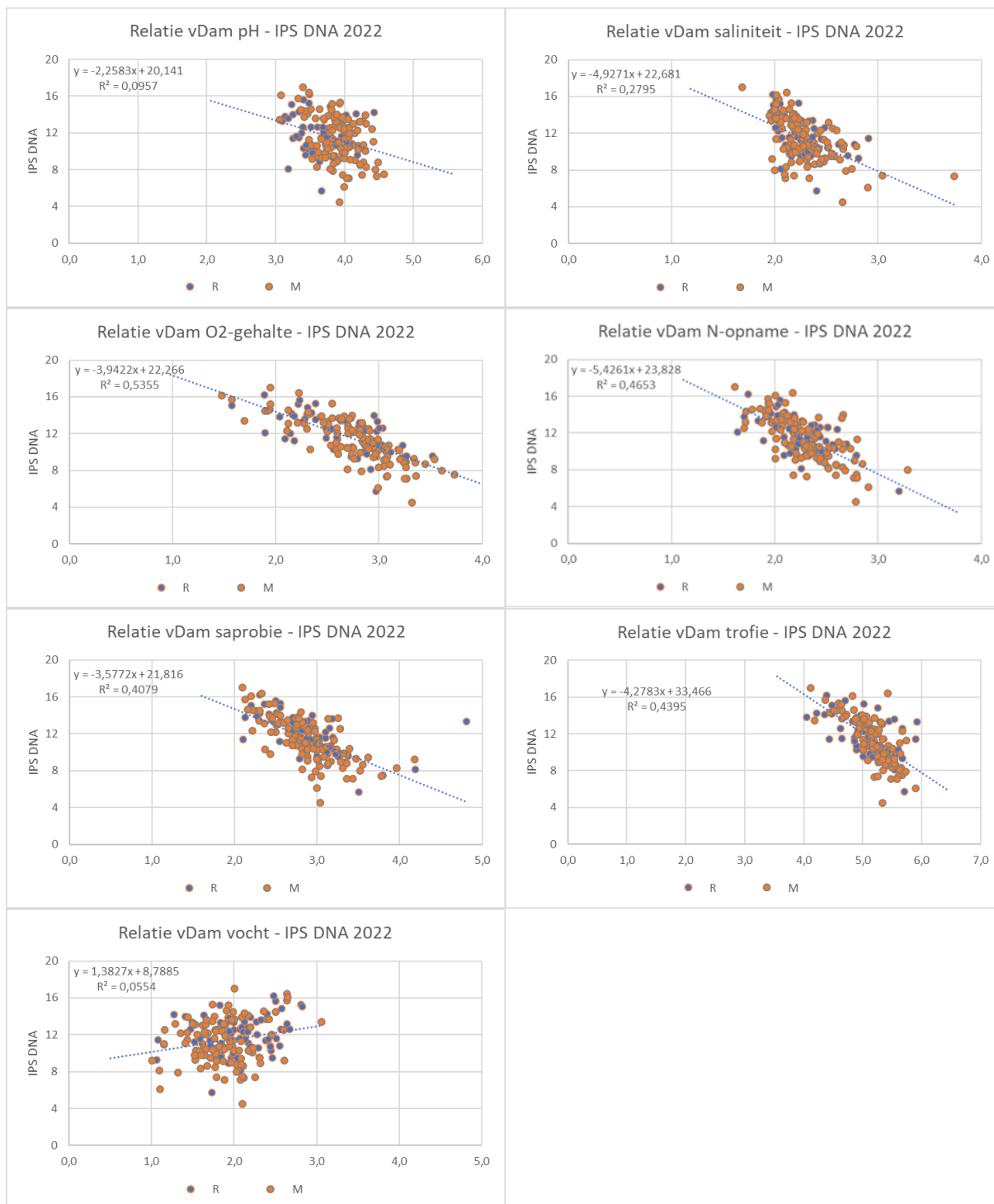
De relatieve bijdragen van de taxa aan de diverse scoringswaarden per Van Dam index kunnen ook in een histogram worden uitgezet. Daarmee worden deze relatieve bijdragen, en eventuele verschillen of veranderingen daarin, beter zichtbaar dan in de naar relatieve abundantie gewogen gemiddelde indexwaarde. Dat kan aanvullende informatie geven indien verschuivingen in de verdeling optreden die door een gemiddelde waarde kunnen worden gemaskeerd. Het aantal grafieken voor een beschrijving van de resultaten neemt daarmee wel fors in omvang toe. We hebben ons dan ook beperkt tot twee voorbeelden hiervan (zie paragraaf 7.8 – Roode Beek in Limburg, rond een beverdam, en paragraaf 7.10 – landgoed Oostbroek bij de Kromme Rijn).

## 7.2 Relaties tussen Van Dam-indexen en de IPS-index

De Van Dam-indexen geven een meerdimensionaal beeld van de in diatomeeën besloten informatie in vergelijking met de IPS. De laatste is vooral ontwikkeld als indicator voor organische stofbelasting waarbij voedselrijkdom (en dus trofiegraad) eveneens tot uitdrukking komt. Ter illustratie zijn in Figuur 7.1 relaties weergegeven tussen elk van de zeven Van Dam-indexen en de IPS-index. Hiervoor zijn de 173 beschikbare DNA-datasets uit 2022 gebruikt. De gebruikte soortenlijsten zijn samengesteld op basis van de Novaseq analyses, en er spelen dus geen effecten van verschillen tussen jaren op de getoonde resultaten. Locaties waarvan een van beide DNA-deelanalyses (ethanol dan wel schrapen) in 2022 niet tot een resultaat leidde, hebben een geschatte IPS-combiwaarde gekregen op basis van de eerder gevonden relaties tussen IPS-waarden verkregen van ethanol dan wel schrapen enerzijds en de IPS-

combiwaarden anderzijds (zie hoofdstuk 4). De soortenlijsten gebaseerd op de beschikbare DNA-deelanalyse van een dergelijke locatie zijn rechtstreeks gebruikt voor de bepaling van de bijbehorende Van Dam-indexwaarden.

Er zijn duidelijke verschillen te zien in de mate waarin de beide indexen met elkaar relateren. Daarbij moet worden opgemerkt dat een 'lage'  $r^2$  alleen maar betekent dat het verband tussen beide indexen zwak is. Dat valt vooral op



**Figuur 7.1.** Relaties tussen IPS-waarden verkregen met DNA en elk van de zeven Van Dam-indexwaarden bepaald met de beschikbare 173 locaties uit 2022. Alle berekeningen zijn gedaan met gebruik van Novaseq-data en relatieve abundantie. R=stromend water; M= stilstaand water. De lineaire regressie betreft steeds alle locaties. Op de x-as staat de Van Dam index.

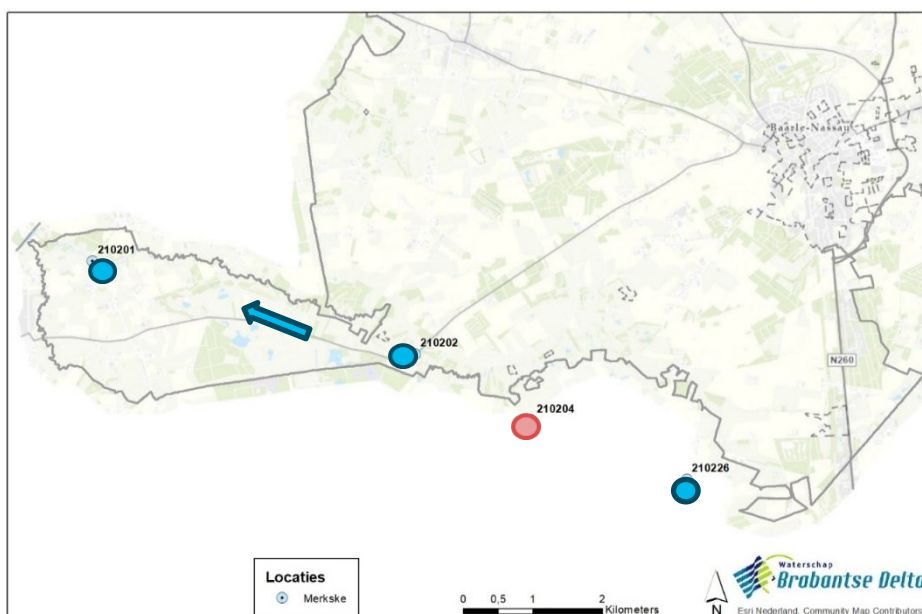
bij de indexen voor pH, saliniteit en voor vochtgehalte van het milieu. De vier andere indexen laten een sterker verband zien met de IPS. Deze vier Van Dam-indexen laten zien wat de samenstelling van de diatomeeëngemeenschap zegt over verschillen in organische belasting, voedselrijkdom en daarmee samenhangende zuurstofcondities en wijze van organische stikstofopname. Een lagere Van Dam-indexwaarde voor organische belasting betekent vaak, maar niet altijd, een lagere voedselrijkdom, minder beschikbare organische stikstof en een hoger zuurstofgehalte. En deze factoren leiden alle vier tot een hogere IPS indexwaarde.

De hierna besproken case studies zijn ter inspiratie en hebben een sterk beschrijvend karakter. Er is bij de betreffende waterbeheerders meer achtergrond informatie beschikbaar, waarmee een nadere verklaring van de waargenomen kwaliteitsscores wellicht beter mogelijk wordt.

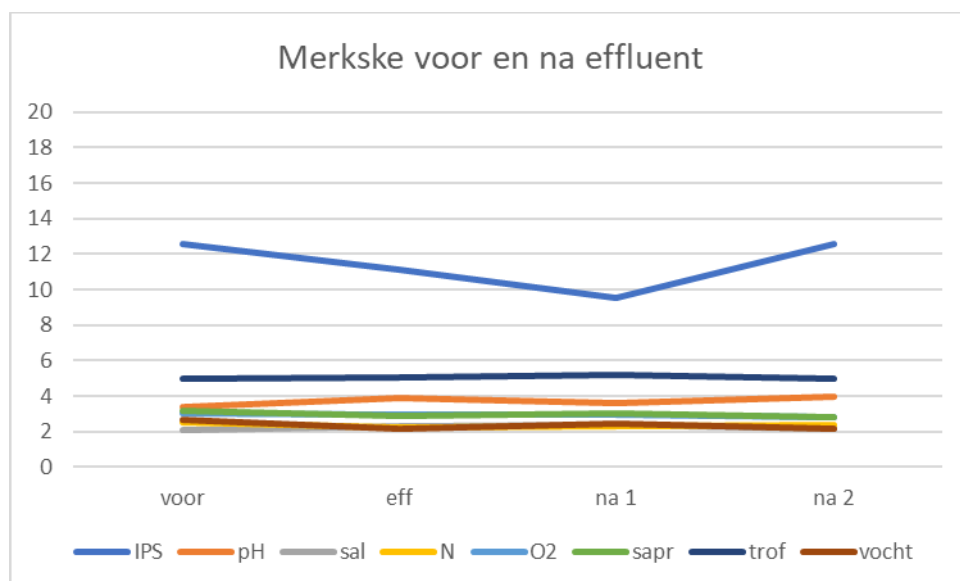
### 7.3 Brabantse Delta

#### Het Merkske

Het Merkske is een natuurlijk meanderende grensbeek in het zuiden van West-Brabant. Deze stroomt van zuidoost naar noordwest (Figuur 7.2). Mogelijke oorzaken voor eventuele verschillen tussen de vier aangeboden locaties zijn een lozing van een RWZI of boerderij, of invloed van landbouwkundig gebruik.



Figuur 7.2. Het Merkske: vier locaties waarvan één met een effluentlozing (rood). De pijl geeft de stroomrichting aan.



Figuur 7.3. Het Merkske, 2022. Verloop van de zeven Van Dam-indexen en de IPS-index in stroomafwaartse richting. Van Dam-indexen: pH=zuurgraad; sal=saliniteit; N=organische stikstofbelasting; O2=zuurstofverzadiging, vocht=indicatie voor mate van droogval.

In Figuur 7.3 laten de diverse Van Dam-indexen een stabiel beeld zien, waaruit geen duidelijke invloed van de effluentlozing valt af te leiden. De IPS vertoont een kleine daling bij het eerste punt ná de lozing, en deze daling lijkt al te zijn ingezet bij het lozingspunt. De KRW-kwaliteitscore is volgens de IPS 'matig', de Van Dam-indexen wijzen op een pH rond of boven 7, een chloride gehalte <500 mg/l, met soms wat organische stikstofbelasting, meestal boven 50% zuurstofverzadiging, matig organisch belast en eutroof. De vochtindicatie duidt niet op periodiek droogvallen, behalve voor het meest bovenstroomse punt, waar wel soorten voorkomen die ook tegen droogvallen bestand zijn.

### Aa of Weerijds bij Breda

Het riviertje Aa of Weerijds stroomt met een aantal meanders vanuit het zuiden door Breda en mondt via de singels van Breda uit in de Mark. Vijf locaties zijn bemonsterd in 2022 (volgorde van bron tot monding; zie Figuur 7.4):

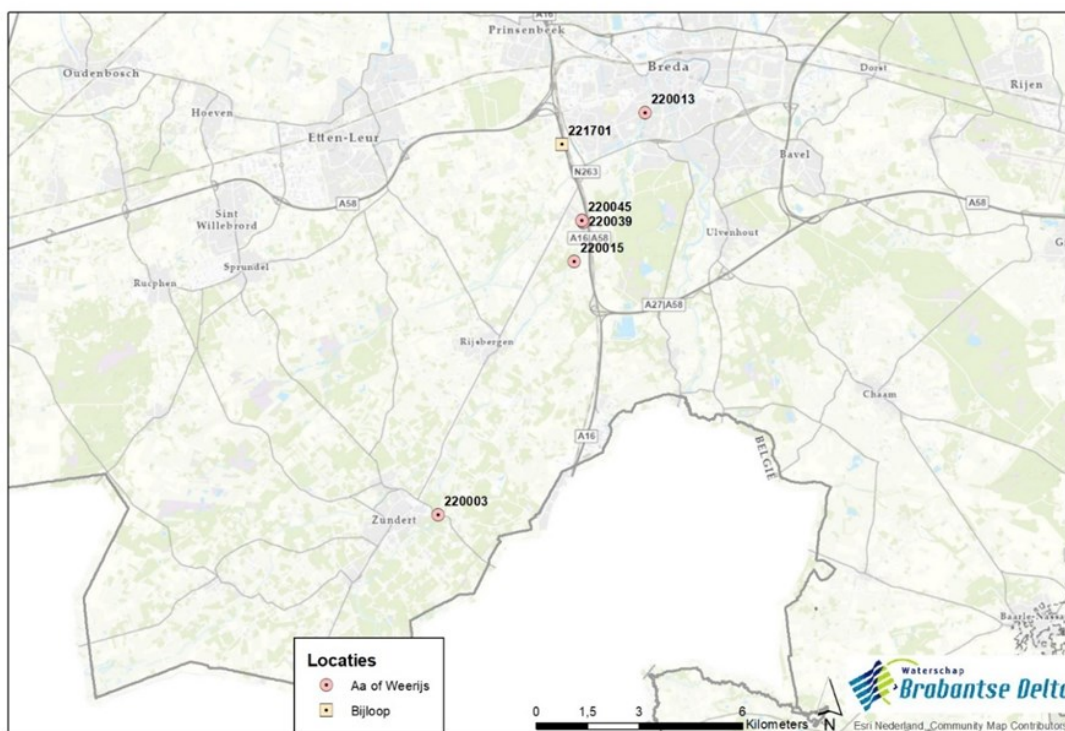
**220003** Laarbrug bij Zundert; bovenstroomse referentie van hierop volgende nevengeulen

**220015:** kleine meander aan de oostkant van de hoofdstroom, ten oosten van natuurgebied Krabbebossen (met duikers in verbinding met Aa of Weerijds)

**220039:** meestromende meander uitmondend bij Effen iets ten zuiden van brug Effenseweg

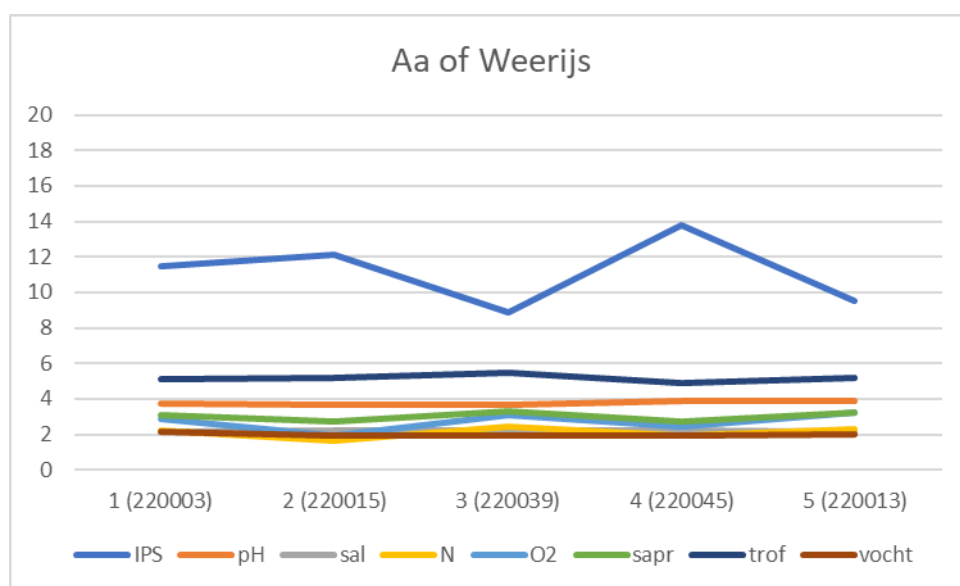
**220045:** brug Effenseweg; hoofdloop van Aa of Weerijds

**220013:** bij brug in Julianalaan, Breda; input stedelijk gebied



Figuur 7.4. Aa of Weerijds bij Breda met de vijf geanalyseerde locaties.

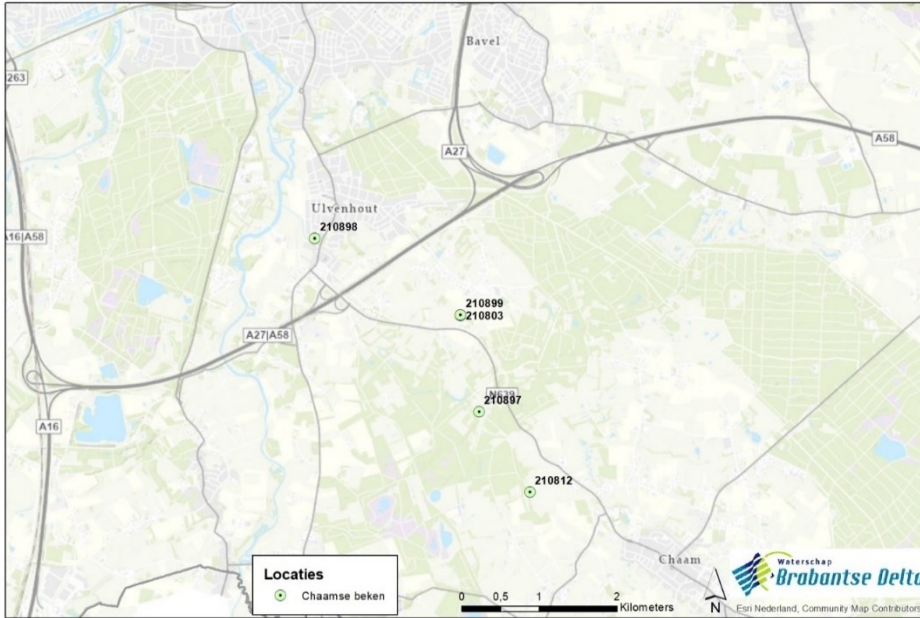
In Figuur 7.5 laten de diverse Van Dam-indexen een stabiel beeld zien, zonder duidelijke beïnvloeding. De IPS vertoont een kleine daling in de meestromende meander (locatie 3), die in de hoofdstroom (locatie 4) weer verdwijnt. Het laatste punt in stedelijk gebied toont ook een verlaging van de IPS. De KRW-kwaliteitscore is volgens de IPS ‘matig’ (behalve voor locatie 4, ‘goed’), de Van Dam-indexen wijzen op een pH rond of boven 7, een chloridegehalte iets boven de 500 mg/l, met soms wat organische stikstofbelasting, meestal boven 50% zuurstofverzadiging (boven 75% op locatie 2), licht tot matig organisch belast, en eutroof. De vochtindicatie duidt niet op periodiek droogvallen.



Figuur 7.5. Aa of Weerijds, 2022. Verloop van de zeven Van Dam-indexen en de IPS-index, in stroomafwaartse richting. Van Dam-indexen: pH=zuurgraad; sal=saliniteit; N=organische stikstofbelasting; O2=zuurstofverzadiging, vocht=indicatie voor mate van droogval.

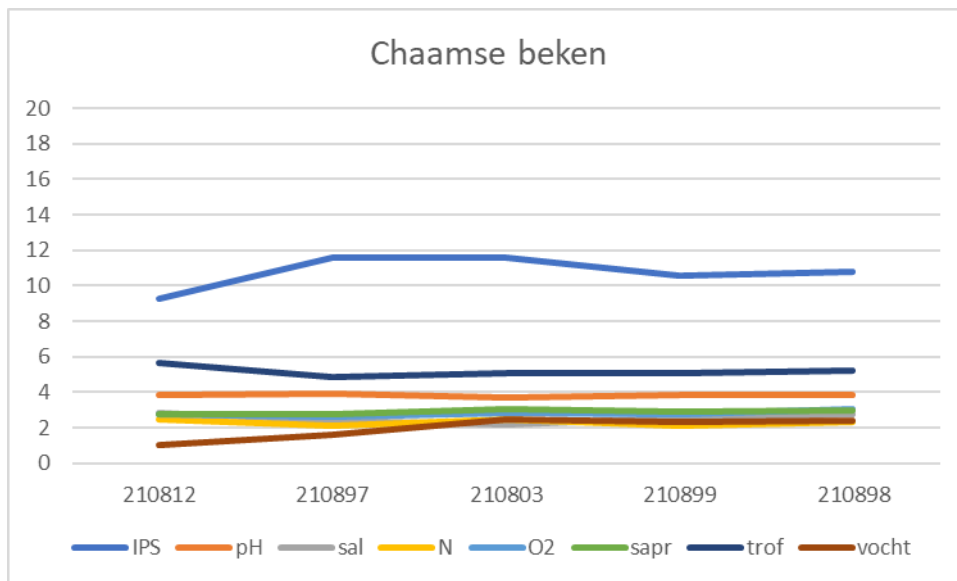
### Chaamse beken

De Chaamse beken vormen een afwisselend stelsel van diverse bovenlopen die voorbij Chaam samenkomen in een gezamenlijke benedenloop. Over dit systeem is bij de beheerder veel bekend; in een van de bovenlopen is al behoorlijk wat herinrichting gepleegd. Voor de vijf aangeleverde locaties (Figuur 7.6) laten de diverse indexen voor de diatomeeëngemeenschap een vrij stabiel beeld zien (Figuur 7.7).



Figuur 7.6. Chaamse beken met de vijf geanalyseerde locaties.

De KRW-kwaliteitscore is volgens de IPS ‘matig’, de Van Dam-indexen wijzen op een pH rond of boven 7, een chloridegehalte iets boven de 500 mg/l, met een lichte organische stikstofbelasting, meestal boven 50% zuurstofverzadiging, licht tot matig organisch belast, en eutroof. Het meest bovenstroomse punt is het meest voedselrijk en heeft de laagste IPS-score. De vochtindicatie duidt niet op periodiek droogvallen.

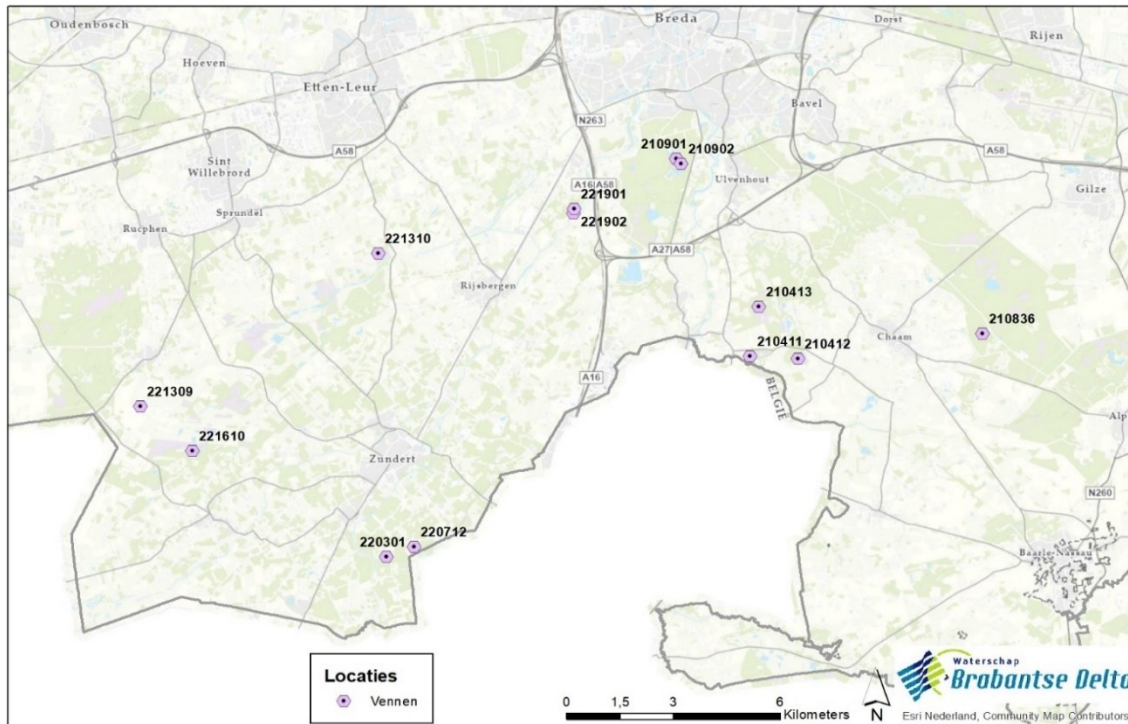


Figuur 7.7. Chaamse beken, 2022. Verloop van de zeven Van Dam-indexen en de IPS-index, in stroomafwaartse richting. Van Dam-indexen: pH=zuurgraad; sal=saliniteit; N=organische stikstofbelasting; O2=zuurstofverzadiging, vocht=indicatie voor mate van droogval.

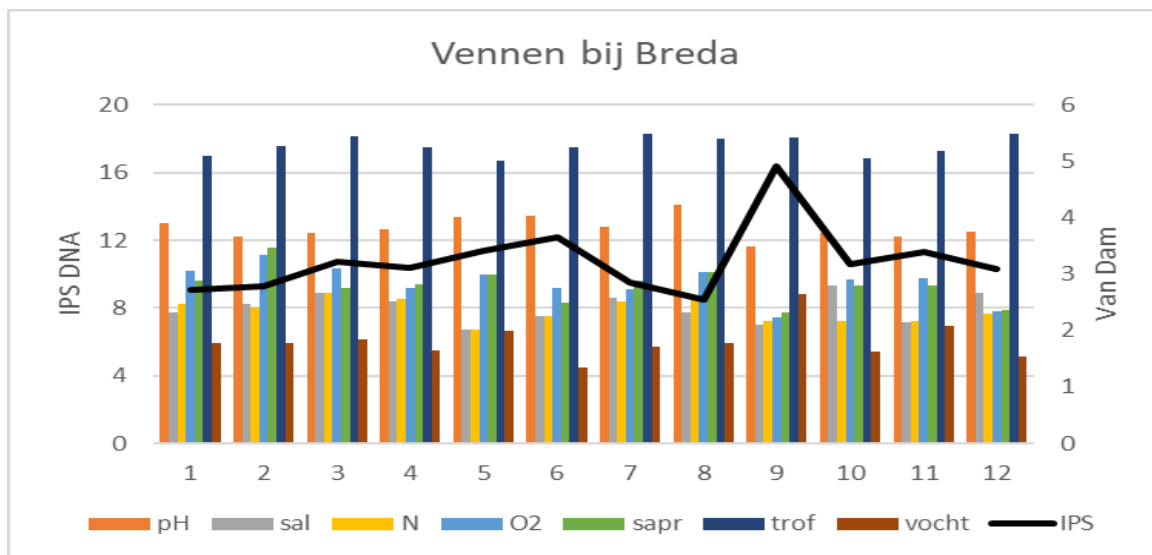


### Vennen

In 2022 zijn ten zuiden van Breda dertien vennen gemonitord (Figuur 7.8). De locaties 221901 en 221902 zijn type M13 (ondiepe zure vennen; dit type valt onder overige wateren). De elf andere vennen zijn type M12 (zwakgebufferde vennen). Van locatie 221310 zijn geen DNA resultaten verkregen.



Figuur 7.8. Vennen ten zuiden van Breda; de locatie codes met DNA gegevens zijn 210411, 210412, 210413, 210836, 210901, 210902, 220301, 220712, 221309, 221610, 221901, 221902 (in deze volgorde genummerd als 1 tot en met 12 in Figuur 7.9).



Figuur 7.9. Vennen ten zuiden van Breda, 2022. Verloop van de zeven Van Dam-indexen en de IPS index. Nummering volgens de volgorde van de locatiecodes in het bijschrift van Figuur 7.8. Van Dam-indexen: pH=zuurgraad; sal=saliniteit; N=organische stikstofbelasting; O2=zuurstofverzadiging, vocht=indicatie voor mate van droogval.

De index-scores staan in Figuur 7.9. De KRW-kwaliteitscore is volgens de IPS meestal ‘matig’ (punt 9, locatie 221309, scoort ‘goed’ en ligt daarmee duidelijk hoger dan de andere vennen), de Van Dam indexen wijzen op een pH rond of boven 7, een chloride gehalte rond of boven de 500 mg/l, met een lichte organische stikstofbelasting,

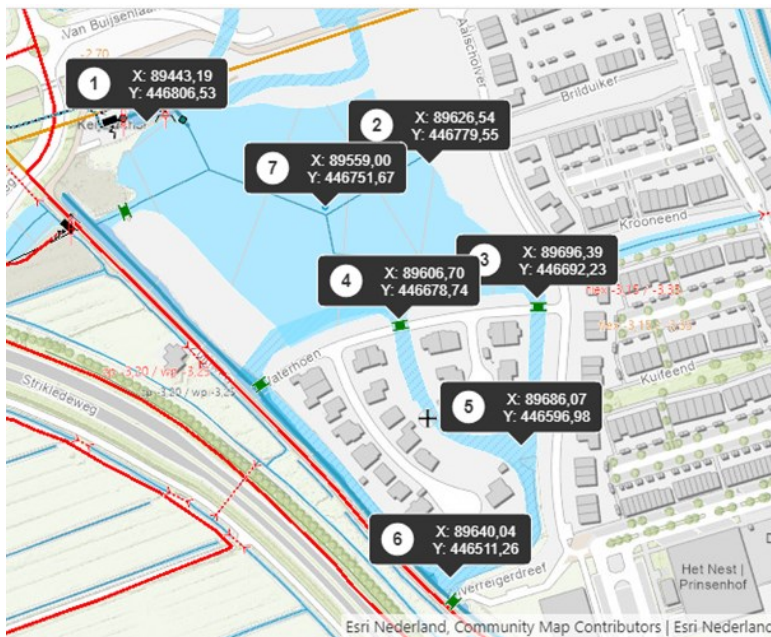
meestal boven 50% zuurstofverzadiging (locatie 9 en 11 richting 75%), licht tot matig organisch belast, en eutroof. De vochtindicatie duidt niet op periodiek droogvallen, behalve punt 9 waar meer soorten daar op duiden.

## 7.4 Delfland

### Plas van Buysen: thermische energie uit oppervlaktewater

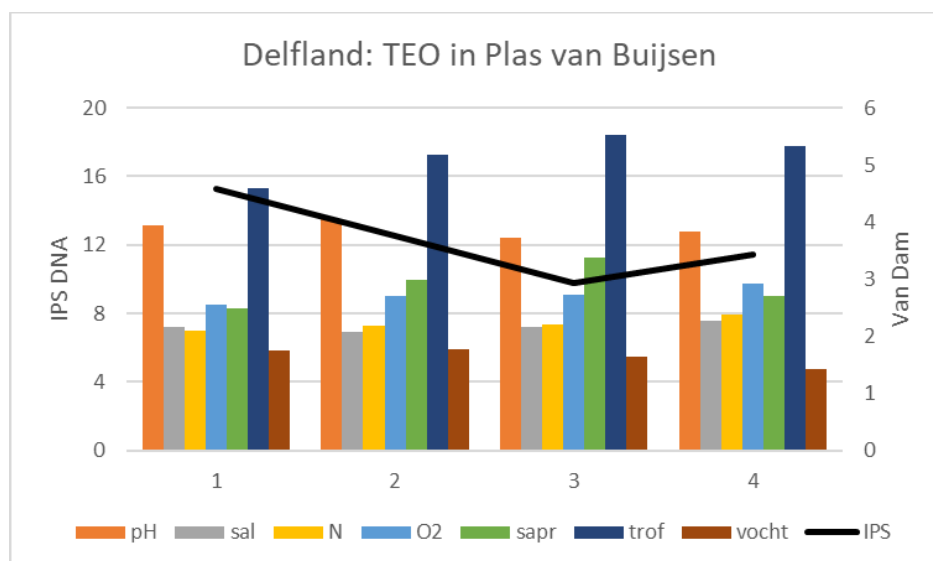
In de Plas van Buysen in Pijnacker is in 2024 een installatie in gebruik genomen voor een koude/warmtewisselaar (TEO) ten behoeve van een nieuwbouwwijk. De verwachte verblijftijd van het water in de plas wordt hierdoor veel korter (vijf dagen in plaats van jaren). Het afgekoelde water komt via een sloot weer terug in de plas. Er is in 2022 op vier locaties een DNA-monster voor de diatomeeën analyse genomen. Deze zijn aangegeven in Figuur 7.10. Helaas is de uitlaat locatie niet bemonsterd. De resultaten kunnen worden gezien als een bepaling van de uitgangssituatie (zie Figuur 7.11).

De KRW-kwaliteitsscore volgens de IPS-index is 'goed' voor de inlaat naar de plas; deze daalt naar 'matig' bij de inname locatie en de twee watergangen die de woonwijk ingaan. De Van Dam-index voor pH wijst op een pH waarde boven de 7. Dat is te verwachten voor ondiepe polderwateren met veel watervegetatie en algengroei. De Van Dam-index voor saliniteit wijst op een chloridegehalte rond 500-750 mg/l. Er is een lichte organische stikstofbelasting en rond de 50-75% zuurstofverzadiging. De locaties hebben een matige organische belasting, en de trofiegraad is eutroof (waarbij de inlaat naar de plas wat minder eutroof scoort). De vochtindicatie duidt op permanente watervoerendheid van de locaties.



Figuur 7.10. Monsterlocaties rond een TEO installatie in de Plas van Buysen. Er zijn in 2022 vier locaties bemonsterd voor DNA-analyse: OW213B035 (1; inlaat van plas), OW213BEX02 (2; inlaat TEO), OW213B031 (3), OW213B032 (4).





Figuur 7.11. TEO installatie in de Plas van Buysen, 2022. 1: inlaat van plas; 2: inlaat TEO; 3, 4: toegang tot woonwijk; zie Figuur 7.10 voor de ligging van deze locaties. Van Dam-indexen: pH=zuurgraad; sal=saliniteit; N=organische stikstofbelasting; O2=zuurstofverzadiging, vocht=indicatie voor mate van droogval.

### Individuele behandeling van afvalwater

In 2022 zijn in het voorjaar op 14 locaties bij vijf installaties voor individuele behandeling van afvalwater (IBA) monsters genomen van het effluent voor kwaliteitsanalyses. Van dezelfde locaties zijn ook monsters beschikbaar voor DNA-detectie van diatomeeën. Het cluster bestaat in totaal uit enkele tientallen IBA's die lozen op de Gaag.

Er zijn drie gebieden bemonsterd met een of meer IBA's:

- *Het oppervlaktewater van de Gaag:*  
OW028-006 (noordzijde IBA cluster), OW028-004 (in IBA cluster), OW028-007 (zuidzijde IBA cluster)
- *Kerkpolder-zuid*, ten oosten van de Gaag en ten noorden van de IBA's in de Klaas Engelbrechtspolder:  
IBA OW112EX04, met drie omringende sloten: OW112EX03, OW112EX05 en OW112EX06
- *Klaas Engelbrechtspolder* ten westen van de Gaag en ten zuiden van de Kerkpolder-zuid:  
IBA OW113EX03 (op grotere afstand ten westen van de Gaag), IBA OW113EX04 (direct west van de Gaag), met uitlaat OW113EX06 naar de Gaag, IBA OW113EX05 (direct west van de Gaag) met uitlaat OW113EX07 naar de Gaag), en het poldergemeal OW113-001 in de Klaas Engelbrechtspolder ten westen van de Gaag.
- Apart hiervan is nog een IBA bemonsterd in de *Lage Abtswoudsche polder*: OW208EX07.

De waarden van de IPS en de verschillende Van Dam-indexen staan in Tabel 7.2. De KRW-kwaliteitscore op basis van de IPS-waarden is voor het cluster Kerkpolder vaak 'goed'; voor het cluster Klaas Engelbrechtspolder is de KRW-kwaliteitsklasse 'matig' (IPS <13). De IBA in de Abtswoudschepolder scoort 'goed'. De Gaag als ontvangend water laat een verbetering van de waterkwaliteit zien van net aan 'matig' in het zuiden naar bijna 'goed' in het noorden. De Van Dam-index voor pH wijst op een pH waarde boven de 7. De Van Dam-index voor saliniteit wijst op een chloride gehalte rond 500-750 mg/l. Er is overal een lichte organische stikstofbelasting (maar wat hoger voor het zuidelijke punt 3 in de Gaag) en rond de 50-75% zuurstofverzadiging. De locaties hebben een matige organische belasting (wat hoger bij locatie 3 in de Gaag en locatie 10 bij een IBA), en de trofiegraad is vrijwel overal ongeveer gelijk (eutroof tot sterk eutroof). De vochtindicatie duidt op permanente watervoerendheid van de locaties. Er is uit de resultaten geen duidelijk patroon te zien dat duidt op een negatief effect van de IBA's op de waterkwaliteit wanneer de diatomeeëngemeenschap wordt beschouwd.

Tabel 7.2. Veertien locaties rondom IBA's bij de Gaag bij Schipluiden, 2022. Resultaten van de IPS-index en de zeven Van Dam-indexen; pH=zuurgraad; sal=saliniteit; N=organische stikstofbelasting; O2=zuurstofverzadiging, vocht=indicatie voor mate van droogval. Grijs: ontvangend waterlichaam; geel: noordelijk cluster Kerkpolder; groen: zuidelijk cluster Klaas Engelbrechtspolder; blauw: IBA polder Abtswoud.

meetpunt	locaties	IPS	pH	pH	sal	N	O2	sapr	trof	trof	vocht
OW028-004	1 Gaag nrd	13,0	4,1	4,1	2,3	2,2	2,8	2,8	5,1	4,9	1,9
OW028-006	2 Gaag mid	12,2	4,0	4,0	2,3	2,0	2,5	2,4	5,5	5,2	1,7
OW028-007	3 Gaag zuid	7,1	4,1	4,1	2,1	2,8	3,3	3,4	5,5	5,5	2,1
OW112EX03	4 sloot 1	14,1	3,6	3,5	2,2	2,1	2,3	2,5	5,4	4,7	2,2
OW112EX04	5 IBA	13,7	4,0	4,0	2,1	2,1	2,7	2,7	4,9	4,9	2,4
OW112EX05	6 sloot 2	13,0	4,3	4,3	2,2	2,2	2,5	2,5	5,1	5,1	1,6
OW112EX06	7 sloot 3	12,8	3,9	3,9	2,2	2,1	2,7	2,8	5,1	5,0	2,2
OW113-001	8 gemaal	10,3	4,0	4,0	2,4	2,3	3,0	3,1	5,3	5,2	2,0
OW113EX03	9 IBA	12,0	4,1	4,1	2,2	2,2	2,7	2,7	4,9	4,9	2,5
OW113EX04	10 IBA	9,4	3,6	3,6	2,3	2,2	2,9	3,6	5,5	5,5	2,1
OW113EX05	11 IBA	9,5	3,8	3,8	2,5	2,3	3,1	3,1	5,3	5,3	2,3
OW113EX06	12 uitlaat EX04	10,5	4,1	4,1	2,4	2,4	2,9	2,9	5,4	5,3	1,8
OW113EX07	13 uitlaat EX05	12,6	3,8	3,8	2,2	2,1	2,9	3,3	5,1	5,1	2,6
OW208EX07	14 IBA	13,1	3,9	3,9	2,2	2,0	2,3	2,5	5,4	5,1	1,7

## 7.5 De Dommel

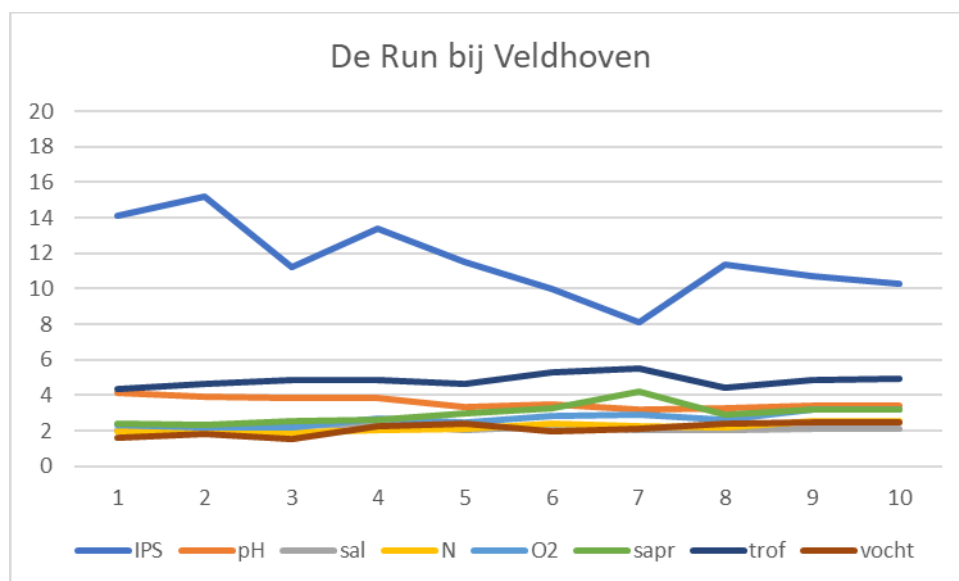
### De Run

In een gedeelte van het riviertje de Run ten zuiden van Veldhoven is in 2021 beekherstel uitgevoerd, met versmalling en verondieping van de bedding. De stroomsnelheid is hierdoor sterk toegenomen (van 0-10 cm/s naar 50 cm/s) en de in mei 2022 genomen macrofaunamonters uit het herstelde gebied laten ook een duidelijke verbetering zien van stromingscondities (zie Van der Lee et al., 2024). Op hetzelfde moment zijn in mei 2022 op tien locaties ook monsters verzameld voor DNA-analyse van diatomeeën (zie Figuur 7.12). De index-scores staan in Figuur 7.13.



Figuur 7.12. Bemonsterde locaties in de rivier de Run. Vanaf locatiecode 252201 tot vóór 252206 is het herstelwerk uitgevoerd; 525205 is niet aangeleverd. Locatie 252197 staat net buiten de kaart, ten westen van 252198. Oranje symbolen zijn weggehaalde stuwen; rood symbool is een geplaatste hoogwaterstuw.

De KRW-kwaliteitsscore is volgens de IPS 'goed' tot en met locatie 4 (code 252200), en daalt daarna naar 'matig' voor de resterende locaties. De Van Dam-indexen wijzen op een pH rond of boven 7, een chloride gehalte iets boven de 500 mg/l, met een lichte organische stikstofbelasting, meestal boven 50% zuurstofverzadiging (maar deze daalt vanaf punt 9 (code 252206) tot onder 50%), matig organisch belast (maar sterk belast op locatie 7, code 252203), en eutroof (met name op punt 6, code 252202, en 7, code 252203). De vochtindicatie duidt niet op periodiek droogvallen. De diatomeeën-indexen laten geen duidelijk positief effect zien van de verbeterde stromingscondities. Het signaal uit de diverse indexen laat zien dat de milieucondities in het herstelde gebied volgens de diatomeeën gelijk zijn gebleven of wat verslechterd lijken te zijn ten opzichte van het bovenstroomse deel. De verklaring hiervoor is onduidelijk, maar dit voorbeeld met macrofauna en diatomeeën laat wel zien dat 'de' ecologische waterkwaliteit vanuit het perspectief van verschillende organismen anders kan worden ervaren. Bij keuzes voor inrichting en beheer van waterlichamen is het daarom van belang om de ecologische waterkwaliteit met meerdere soortgroepen te bepalen.

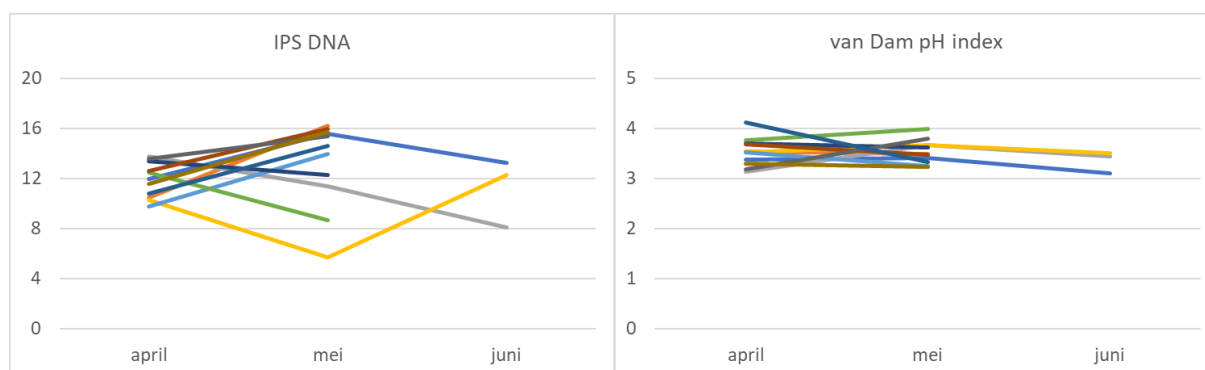


Figuur 7.13. De Run bij Veldhoven, 2022. Verloop van de zeven Van Dam-indexen en de IPS-index. Nummering volgt de locatiecodes uit Figuur 7.12, in stroomafwaartse richting. Beekherstel heeft in 2021 plaatsgevonden vanaf locatie 5 tot en met locatie 8. Van Dam-indexen: pH=zuurgraad; sal=saliniteit; N=organische stikstofbelasting; O2=zuurstofverzadiging, vocht=indicatie voor mate van droogval.

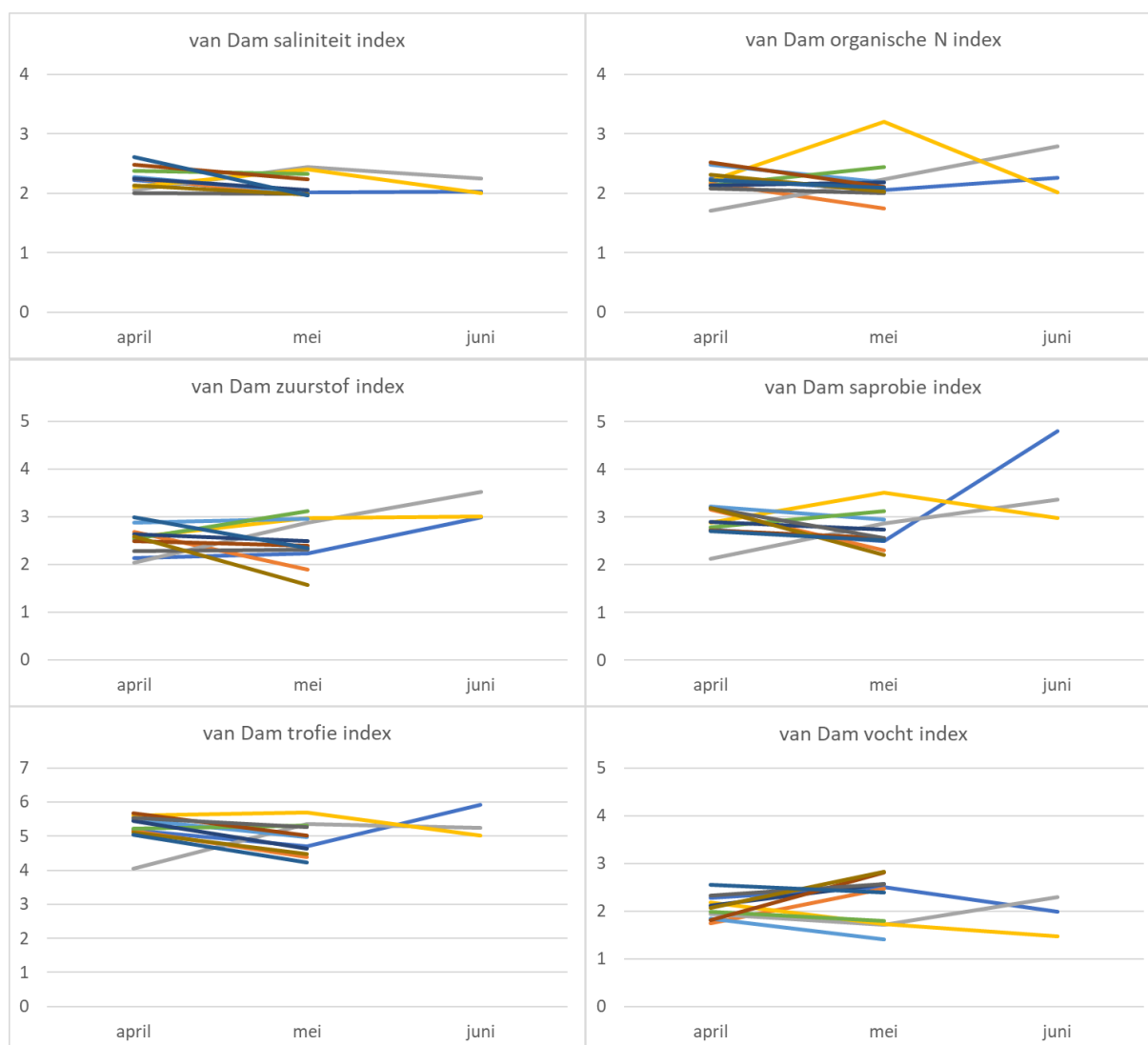
## 7.6 Fryslân

### Friese beken: effect van tijd op diatomeeën flora

Er zijn in 2022 in elf Friese beken in zowel april, mei als juni monsters genomen voor DNA-analyse van de diatomeeëngemeenschap. De vraag was of er over de tijd een constant beeld zichtbaar is voor de diverse indexwaarden. In dat geval kan voor de planning van de reguliere diatomeeënmonitoring een langere periode worden gehanteerd. Van de elf monsters uit juni hebben er helaas acht zonder duidelijke oorzaak geen bruikbare DNA-resultaten opgeleverd. In april en mei werden wel bij alle monsters bruikbare DNA-resultaten verkregen. De resultaten van de elf verschillende beken zijn per index weergegeven in Figuur 7.14 als een eerste indruk. Het algemene beeld lijkt dat sommige Van Dam-indexen constant blijken over de tijd (zoals indexen voor pH en saliniteit). De Van Dam-indexen voor organische stikstof belasting en saprobie laten voor veel beken een constant beeld zien, maar ook voor enkele beken behoorlijke fluctuaties. De IPS laat wel veranderingen zien over de tijd, waarbij zowel een daling als stijging zichtbaar is. Het voerde voor dit onderzoek te ver om verklaringen te vinden voor de verschillen tussen beken of de invloed van seizoen op sommige indexen. Het resultaat geeft wel aan dat ook over een relatief korte periode, de diatomeeënindexen geschikt zijn om veranderingen in milieu condities te laten zien. Dergelijke veranderingen kunnen aanleiding zijn voor een nadere studie om een diagnose te stellen welke factoren verantwoordelijk zijn voor deze veranderingen.



Figuur 7.14. Elf beken in Fryslân, bemonsterd in april, mei en juni 2022. IPS en zeven Van Dam-indexen. Kleuren verwijzen naar de elf beken.



Figuur 7.14. Vervolg. Elf beken in Fryslân, bemonsterd in april, mei en juni 2022. IPS en zeven Van Dam-indexen. Kleuren verwijzen naar de elf beken.

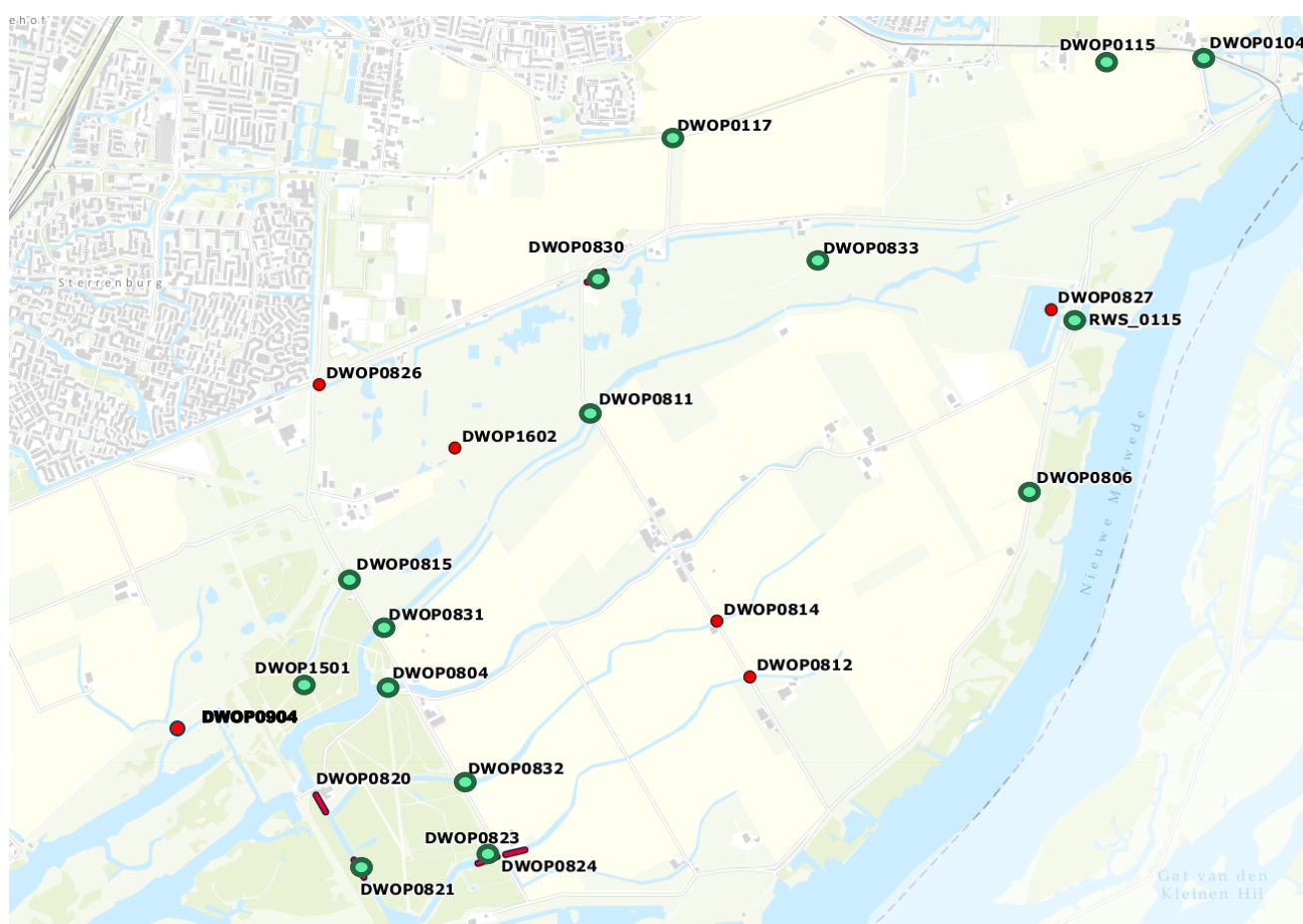
## 7.7 Hollandse Delta

### Nieuwe Dordtse Biesbosch

In het gebied van de Nieuwe Dordtse Biesbosch (Figuur 7.15) wordt in een nieuwe opzet sinds 2019 water ingelaten bij de oostelijk gelegen locatie RWS\_015 (Oosthaven). Dit stroomt door een bezinkvijver (DWOP0827) naar het zuidwesten. Een deelstroom loopt via de zuidelijk gelegen landbouwpolder De Biesbosch. Een tweede deelstroom gaat via een ten noorden hiervan gelegen natuurontwikkelingsgebied in het Noorderdiep. Een derde deelstroom voert naar noordelijk gelegen stedelijk gebied. De verwachting is dat hiermee een verbetering van de waterkwaliteit kan worden gerealiseerd. Een uitgebreide beschrijving van de plannen voor dit gebied is te vinden in Stolk et al. (2021). Figuur 7.15 geeft een beeld van de locaties en het gebied. Van de in 2022 genomen monsters op 23 locaties hebben 15 een geslaagde DNA analyse opgeleverd. Voor de overige acht locaties zijn in de analyse hierna de op morfologie gebaseerde resultaten gebruikt om toch een zo compleet mogelijk beeld te schetsen. Tabel 7.3 geeft een overzicht van de verdeling van de locaties over de drie deelgebieden, en de bijbehorende resultaten voor de indexen.

De KRW-kwaliteitscore stijgt volgens de IPS van 'matig' bij de inname naar 'zeer goed' in het bezinkbekken. Een goede tot zeer goede KRW-kwaliteitscore blijft behouden voor de meeste locaties in de drie deelgebieden, die onderling geen opmerkelijke verschillen laten zien. Binnen het landbouwgebied treedt soms een verslechtering op naar 'matig'.

De Van Dam-indexen wijzen op een pH rond of boven 7, een chloride gehalte iets boven de 500 mg/l, met een lichte organische stikstofbelasting, vaak boven de 75% zuurstofverzadiging. De locaties zijn licht tot matig organisch belast, waarbij de bezinkplas een duidelijke daling laat zien ten opzichte van het innamepunt (vermoedelijk door bezinking van zwevend materiaal). De trofiegraad blijft wel overal ongeveer gelijk (eutroof). De vochtindicatie duidt op mogelijk af en toe een wat lage waterstand.



*Figuur 7.15. De Nieuwe Dordtse Biesbosch. Groen: DNA-gegevens beschikbaar. Rood: geen DNA-gegevens beschikbaar, wel morfologie. Vanaf de oostelijke inlaat (RWS\_0115) en de bezinkvijver (DWOP0827) stroomt water naar het noorden richting stedelijk gebied via DWOP0830 en DWOP0826. Een tweede stroom gaat door een natuurontwikkelingsgebied (DWOP0833, DWOP1602, DWOP0815, DWOP1501, DWOP0904). Een derde stroom voedt de overige locaties in de landbouwpolder aan de zuidkant.*

Tabel 7.3. Verdeling van de locaties in de Nieuwe Dordtse Biesbosch over drie deelgebieden, en bijbehorende index resultaten. RWS\_0115=inlaat, DWOP0827=bezinkvijver. Groene markering: locaties in natuurontwikkelingsgebied. Oranje: locaties richting stedelijk gebied. Grijs: locaties in landbouwgebied. Analyse: met DNA dan wel met microscopie (morf) verkregen index resultaten. Van Dam-indexen: pH=zuurgraad; sal=saliniteit; N=organische stikstofbelasting; O2=zuurstofverzadiging, vocht=indicatie voor mate van droogval.

meetpunt	analyse	IPS	pH	sal	N	O2	saprobie	trofie	vocht
RWS_0115	DNA	9,6	4,2	2,7	2,1	3,3	3,0	5,0	1,8
DWOP0827	morf	17,2	3,9	2,0	1,7	1,4	1,8	5,0	2,7
DWOP0833	DNA	14,0	3,9	2,2	2,7	2,7	2,6	5,0	1,8
DWOP1602	morf	16,0	3,6	2,0	2,1	1,8	2,1	4,0	2,4
DWOP0815	DNA	14,0	3,8	1,9	1,9	2,7	2,8	4,7	2,1
DWOP1501	DNA	14,9	3,8	2,1	1,9	1,9	2,3	4,6	2,0
DWOP0904	morf	18,9	3,8	2,0	1,9	1,3	2,1	4,7	2,8
DWOP0830	DNA	13,4	3,1	2,0	2,1	1,7	2,3	4,2	3,1
DWOP0104	DNA	15,7	3,3	2,0	1,9	1,6	2,1	4,4	2,6
DWOP0115	DNA	14,9	3,4	2,0	1,9	1,9	2,3	4,6	2,5
DWOP0117	DNA	14,7	3,4	2,0	1,7	2,3	2,8	4,4	2,1
DWOP0826	morf	18,5	3,8	2,0	2,0	1,4	2,0	4,8	2,9
DWOP0811	DNA	12,4	4,0	2,3	2,3	2,7	2,9	5,1	1,8
DWOP0806	DNA	11,3	3,5	2,5	2,8	2,9	3,2	5,7	1,9
DWOP0812	morf	16,1	3,8	2,0	2,1	1,6	2,3	4,9	2,9
DWOP0814	morf	19,1	3,9	2,0	1,8	1,1	1,8	4,1	2,9
DWOP0823	morf	19,1	3,7	2,0	2,0	1,2	2,0	4,9	2,9
DWOP0824	DNA	10,7	3,5	2,3	2,4	2,5	2,7	5,0	1,8
DWOP0820	morf	18,9	3,8	2,0	2,0	1,3	2,1	4,8	2,9
DWOP0821	DNA	12,2	3,9	2,6	1,7	2,3	2,6	4,9	1,2
DWOP0804	DNA	14,6	3,6	2,0	1,8	2,1	2,2	4,5	2,4
DWOP0832	DNA	13,1	3,9	2,5	1,7	2,2	2,6	5,0	1,3
DWOP0831	DNA	15,1	3,5	2,1	1,9	1,9	2,2	4,8	1,9



### Locaties met wisselend zoutgehalte

Er zijn op de Zuid-Hollandse eilanden diverse locaties waar het zoutgehalte over het seizoen toeneemt. De diatomeeënanalyse op basis van DNA-barcodes is gebruikt om te onderzoeken of er verschillen zijn tussen locaties met een jaarlijks constant of toenemend zoutgehalte. In 2021 zijn voor tien locaties (diverse KRW-typen) zowel voorjaars- als najaarsmonsters voor DNA-analyse genomen. Tabel 7.4 geeft een overzicht van de resultaten voor de indexen.

Tabel 7.4. Tien locaties met een constant (const) of over het jaar toenemend zoutgehalte (wissel); vj=voorjaar, nj=najaar. Van Dam-indexen: pH=zuurgraad; sal=saliniteit; N=organische stikstofbelasting; O2=zuurstofverzadiging, vocht=indicatie voor mate van droogval.

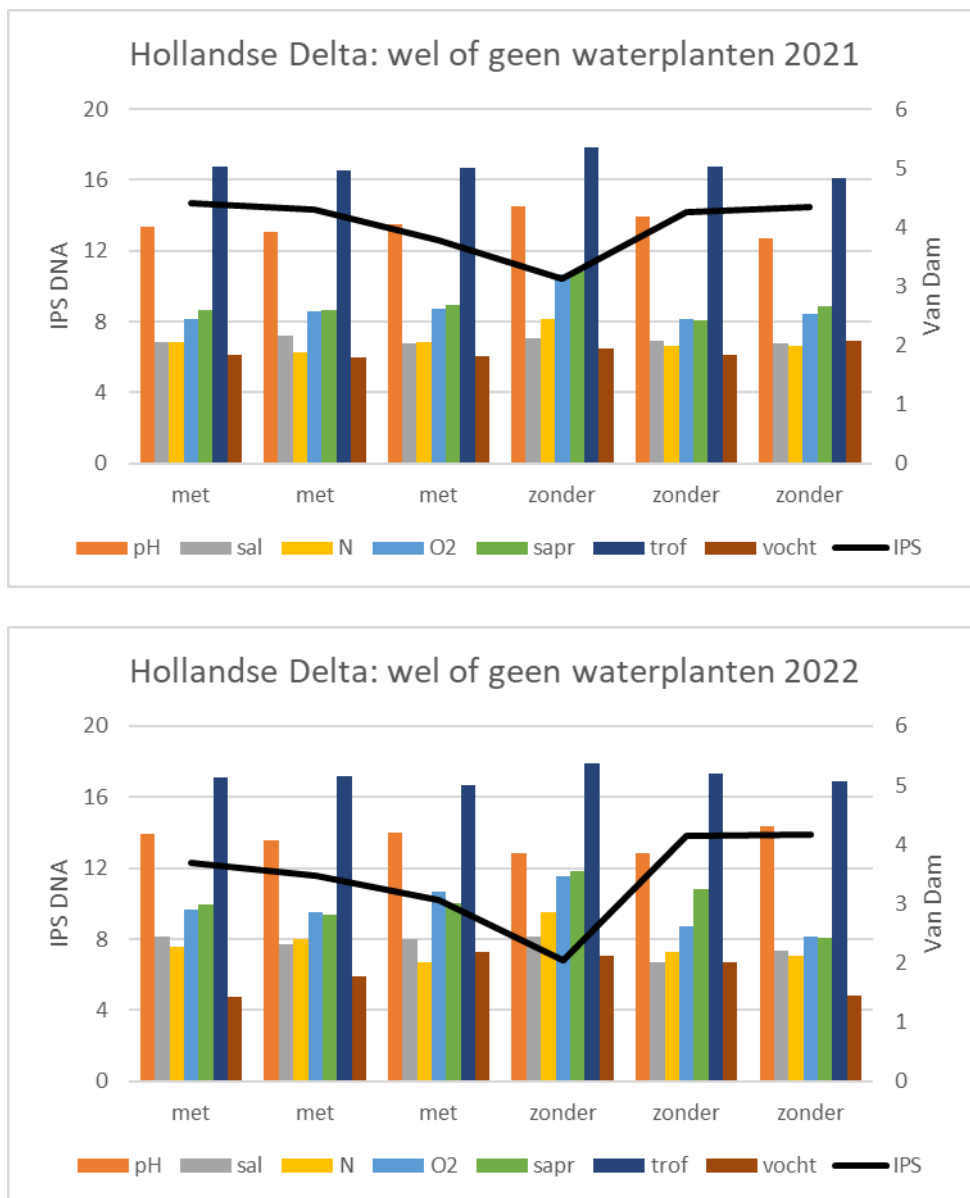
meetpunt	regime	IPS	pH	sal	N	O2	sapr	trof	vocht	KRW type
BO_68	const, vj	8,0	4,4	3,4	1,6	2,2	2,8	4,6	1,8	M31
BO_68	const, nj	6,1	4,5	3,6	1,7	2,8	2,6	4,6	2,1	M31
FOP_0409	const, vj	10,0	3,9	2,1	2,1	2,9	3,2	5,1	1,9	M1b
FOP_0409	const, nj	10,8	4,0	2,1	2,4	3,2	3,1	5,0	2,0	M1b
GOP_0105	const, vj	11,4	4,0	3,0	2,0	3,0	3,0	5,0	1,1	M30
GOP_0105	const, nj	10,4	4,0	2,3	1,8	2,3	2,7	4,7	1,6	M30
HOP_0102	const, vj	14,2	4,2	2,1	2,0	2,5	2,4	5,0	1,8	M6a
HOP_0102	const, nj	7,7	4,0	2,8	2,8	3,2	3,1	3,1	5,0	M6a
HOP_0434	const, vj	14,1	4,2	2,2	2,1	2,4	2,5	4,7	1,7	M30
HOP_0434	const, nj	12,4	4,2	2,3	2,1	2,4	2,8	5,1	2,0	M30
FOP_0306	wissel, vj	10,0	4,2	2,6	2,3	3,2	3,2	5,3	1,7	M30
FOP_0306	wissel, nj	10,2	3,9	2,5	2,1	2,7	2,5	5,1	1,8	M30
FOP_0601	wissel, vj	8,7	4,4	2,2	2,7	3,4	3,5	5,6	2,2	M30
FOP_0601	wissel, nj	12,2	3,9	2,2	2,2	2,7	2,8	5,1	2,2	M30
FOP_0901	wissel, vj	12,0	4,1	2,7	2,1	2,9	2,9	5,0	1,3	M30
FOP_0901	wissel, nj	7,4	3,8	2,3	2,5	3,1	3,3	5,2	2,4	M30
GO_08	wissel, vj	11,6	4,1	2,5	2,3	3,3	2,8	5,2	1,9	M30
GO_08	wissel, nj	12,5	3,8	2,3	1,8	2,2	2,9	5,2	1,9	M30
GOP_0301	wissel, vj	9,3	3,7	2,2	2,5	3,2	3,6	5,3	2,3	M1b
GOP_0301	wissel, nj	11,0	3,9	2,4	2,1	2,5	2,6	5,3	1,7	M1b

De KRW-kwaliteitsscore volgens de IPS-index laat verandering over de tijd zien maar deze correleren niet eenduidig met een veranderend zoutgehalte. De meeste locaties scoren volgens de waarde 'matig'. De Van Dam-indexen wijzen op een pH boven 7, een chloridegehalte rond 500-750 mg/l, met een lichte organische stikstofbelasting, en rond de 50% zuurstofverzadiging. De locaties zijn licht tot matig organisch belast. De trofiegraad is overal ongeveer gelijk (eutroof). De vochtindicatie duidt vrijwel altijd op permanente watervoerendheid van de locaties. Het najaarsmonster van de locatie HOP\_0102 (constant zoutgehalte regime) is zeer opmerkelijk met een vochtindicatie van 5,0: er zijn met DNA alleen diatomeeënsoorten gevonden die vrijwel uitsluitend buiten het aquatisch milieu leven. Het microscopische monster geeft een vochtindicatie van 2,2 en dat lijkt meer waarschijnlijk.



**Locaties met en zonder waterplanten**

Binnen het beheergebied van Hollandse Delta komen diverse M6a-locaties voor mét en zónder ondergedoken waterplanten. Dit zijn grote, ondiepe kanalen zonder scheepvaart (zie ook Evers et al., 2018). In 2021 en 2022 zijn in totaal twaalf M6a locaties bemonsterd waarvan zes met en zes zonder waterplanten. Alle locaties hadden oevervegetatie. Figuur 7.16 geeft een overzicht van de resultaten voor de indexen.



Figuur 7.16. Twaalf M6a-locaties met en zonder ondergedoken waterplanten. Boven: 2021. Onder: 2022. Van Dam-indexen: pH=zuurgraad; sal=saliniteit; N=organische stikstofbelasting; O2=zuurstofverzadiging, vocht=indicatie voor mate van droogval.

De over beide jaren samen gemiddelde waarden voor de situaties met en zonder waterplanten verschillen voor geen van de indexen significant ( $p > 0,05$ , t-test). De IPS-index laat verschillen tussen de locaties zien maar deze correleren niet eenduidig met de aan- of afwezigheid van waterplanten. Wel valt op dat de laagste IPS-score in beide jaren wordt gemeten in een locatie zonder waterplanten, en dit valt samen met de hoogste waarden voor de Van Dam-indexen voor organische stikstofopname, zuurstofverzadiging en saprobie. Maar in 2022 worden juist ook de hoogste scores voor indexen gemeten voor locaties zonder waterplanten. Vijf van alle locaties scoren de KRW-kwaliteitsklasse ‘matig’, zes locaties scoren ‘goed’ en één locatie scoort ‘ontoereikend’. De Van Dam-indexen wijzen op een pH boven 7, een chloridegehalte rond 500 mg/l, met een lichte organische stikstofbelasting, en een

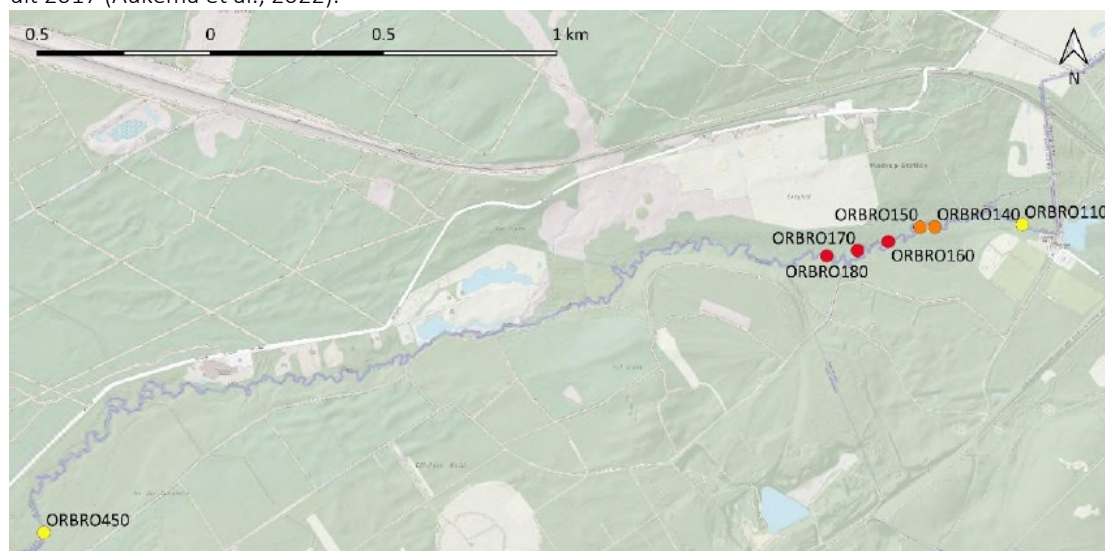
zuurstofverzadiging tussen 50 en 75%. De locaties zijn matig organisch belast. De trofiegraad is overal ongeveer gelijk (eutroof). De vochtindicatie duidt vrijwel altijd op permanente watervoerendheid van de locaties.

## 7.8 Limburg

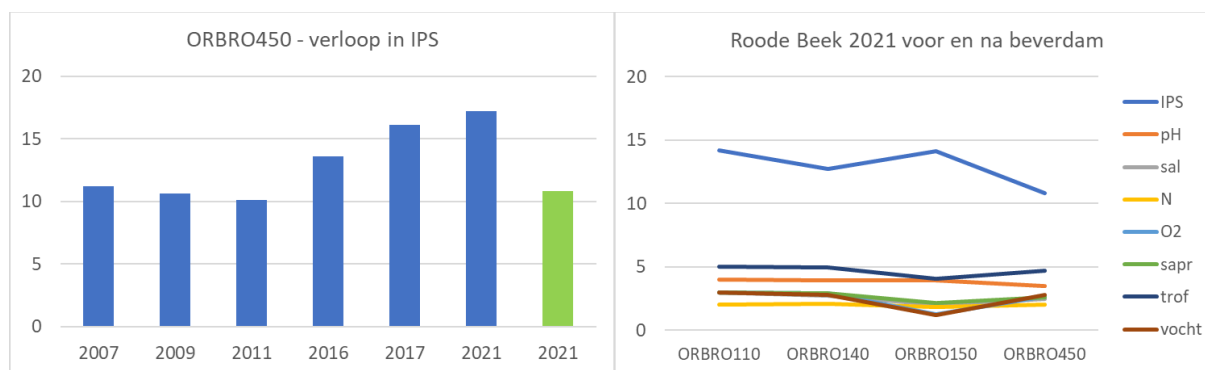
### Beverdam in de Roode Beek

Sinds 2012 hebben zich bevers gevestigd in de Roode Beek, een grensbeek tussen Nederland en Duitsland in het Meinweg gebied in Limburg. De effecten zijn in opdracht van het waterschap en de provincie onderzocht in de periode 2017-2021 (zie Aukema et al., 2022). Door het bouwen van een beverdam wordt de stroomsnelheid direct bovenstrooms van de dam wat vertraagd. Benedenstrooms van de dam neemt die weer toe. De activiteit van de dieren leidt naast wijzigingen in stromingspatronen ook tot veranderende sedimentatie en erosie. Bovenstrooms in het bevermeer ligt beduidend meer organisch materiaal dan benedenstrooms. In 2017 is ook een analyse gedaan van de diatomeeën flora met microscopie. In 2021 zijn in het kader van ons onderzoek vier locaties opnieuw bemonsterd voor DNA analyse van diatomeeën. Figuur 7.17 geeft een beeld van de ligging van deze vier onderzoekslocaties rond een van de beverdammen.

Voor locatie ORBRO450 zijn IPS scores beschikbaar uit de periode 2007-2021 op basis van microscopische analyses (zie Figuur 7.18). De KRW-kwaliteitsklasse op basis van de IPS is vanaf 2016 van 'matig' naar 'zeer goed' gestegen. In 2021 is er wel een behoorlijk verschil tussen de IPS op basis van DNA of op basis van microscopie. De IPS-score op basis van DNA is op deze locatie beduidend lager dan de met microscopie bepaalde IPS-score. De waarde van de IPS-DNA valt buiten de betrouwbaarheidsrange van 2-4 IPS-eenheden zoals die voor met microscopie bepaalde IPS-waarden bekend is (zie paragraaf 4.5). Dit kan zijn veroorzaakt door de beperkingen in de DNA-barcode referentiebibliotheek. Voor locatie ORBRO140 is in 2021 een beperkter verschil gevonden tussen IPSscore verkregen met DNA (12,7) en microscopie (16,0), en dit verschil valt wel binnen de bandbreedte van 2-4 IPS-eenheden. Voor de twee andere locaties (ORBRO110 en ORBRO150) komen de IPS-waarden volgens beide detectiemethoden goed overeen. Mogelijk speelt ook hier weer de beperkte omvang van de DNA-referentiebibliotheek een rol. De met DNA berekende IPS-waarden voor 2021 voor de eerste drie locaties ORBRO110, ORBRO140 en ORBRO150 lijken sterk op de IPS-resultaten voor deze locaties bepaald met microscopie uit 2017 (Aukema et al., 2022).



*Figuur 7.17. Locaties langs de Roode Beek (uit Aukema et al., 2022). De in de 2021 met DNA-analyse onderzochte locaties zijn ORBRO110 (bovenstrooms van het door een beverdam gevormde meertje), ORBRO140 (direct voor deze dam), ORBRO150 (direct na deze dam) en ORBRO450 (buiten de invloed van het beverdammencomplex). De kleurcodes geven aan welke soort data er door Aukema et al. (2022) zijn verzameld (geel: diatomeeën en macrofauna; oranje: diatomeeën, macrofauna en vis; rood: vis)*



Figuur 7.18. Links: verloop in IPS-waarde voor locatie ORBRO450 in de Roode Beek tussen 2007 en 2021. Blauw: op basis van microscopie. Groen: op basis van DNA-analyse. Rechts: diverse indexwaarden langs de Roode Beek in 2021 op basis van DNA-analyse. Van Dam-indexen: pH=zuurgraad; sal=saliniteit; N=organische stikstofbelasting; O2=zuurstofverzadiging, vocht=indicatie voor mate van droogval.

Figuur 7.18 geeft ook een overzicht van de resultaten op basis van DNA-gegevens voor de IPS en Van Dam-indexen langs de vier locaties. De KRW-kwaliteitscore volgens de IPS-index is 'goed' op het eerste monsterpunt. In het bevermeer voor de dam is de kwaliteit 'matig', na de dam weer 'goed' en voor de het laatste monsterpunt 'matig' (maar 'zeer goed' op basis van microscopie). De Van Dam-indexen wijzen op een pH boven 7 (rond pH van 7 op locatie ORBRO450) en een chloridegehalte rond 500 mg/l. Er is een lichte organische stikstofbelasting (het laagst direct na de dam), tussen de 50 - 75% zuurstofverzadiging (maar richting 100% direct na de dam). De locaties hebben een matige organische belasting, behalve direct na de dam waar de organische belasting licht is. De trofiegraad is eutroof, maar richting mesotroof direct beneden de dam. De vochtindicatie duidt op permanente watervoerendheid van de locaties (vooral direct beneden de dam).

De beverdam lijkt slechts beperkt invloed te hebben op de milieucondities geschat met de indexen van de diatomeeën gemeenschappen op basis van DNA-analyse. Direct benedenstreams van de dam is er volgens de Van Dam-indexen wel een hogere zuurstofverzadiging, lagere organische belasting en lagere trofiegraad. Dat past goed bij de daar optredende verhoogde stroomsnelheid.

### De Eyserbeek voor en na een RWZI effluent lozing

De RWZI Simpelveld loost haar effluent op de Eyserbeek. In 2021 zijn monsters voor DNA analyse genomen op een locatie vóór én twee locaties ná het lozingspunt. Tabel 7.5 geeft een overzicht van de resultaten op basis van DNA gegevens voor de IPS en Van Dam indexen langs deze drie locaties.

Tabel 7.5. De Eyserbeek vóór en ná lozing van RWZI effluent, en voor het confluent met de Geul (Cartils). Resultaten voor diverse indexwaarden in 2021 op basis van DNA analyse. Van Dam-indexen: pH=zuurgraad; sal=saliniteit; N=organische stikstofbelasting; O2=zuurstofverzadiging, vocht=indicatie voor mate van droogval.

meetpunt	locaties	IPS	pH	sal	N	O2	sapr	trof	vocht
OEIJS300	voor	13,2	4,07	2,10	2,18	2,71	2,72	4,94	2,40
OEIJS500	na	11,5	3,99	2,06	2,33	2,96	3,12	5,28	2,37
OEIJS890	Cartils	15,0	4,03	2,61	2,06	2,69	2,76	4,90	2,67

De KRW-kwaliteitscore volgens de IPS index is 'goed' op het eerste monsterpunt. Na de effluentlozing daalt deze naar 'matig', en is weer 'goed' kort voor het confluent met de Geul. De Van Dam-indexen zijn vrij constant en wijzen op een pH boven 7 en een chloridegehalte rond 500 mg/l. Er is een lichte organische stikstofbelasting (iets hoger na de effluent lozing), tussen de 50 - 75% zuurstofverzadiging (meer richting 50% direct na de effluentlozing). De locaties hebben een lichte organische belasting, behalve direct na de lozing (matige organische belasting). De trofiegraad is eutroof (iets verhoogd na de lozing). De vochtindicatie duidt op permanente watervoerendheid van de locaties. Alle veranderingen kunnen worden toegeschreven aan de invloed van de effluentlozing.



*Figuur 7.19. De Eyserbeek vóór en ná lozing van RWZI effluent, en voor het confluent met de Geul (Cartils). Voor elk van de zeven Van Dam-indexen zijn de relatieve bijdragen van de onderliggende indexwaarden aan de totale index weergegeven. Het getal boven elk staafdiagram is de gemiddelde indexwaarde. Voor de betekenis van de samenstellende Van Dam-index scores, zie Tabel 7.1.*

Ter illustratie zijn in Figuur 7.19 voor alle Van Dam-indexen uit Tabel 7.5 de relatieve bijdragen van de betreffende onderliggende Van Dam-indexwaarden weergegeven. Met zo’n presentatie kan meer in detail worden vastgesteld welke milieumomstandigheden door de op een locatie voorkomende soorten worden geïndiceerd, en in hoeverre locaties daarin van elkaar verschillen. Dat geeft soms een meer diagnostisch inzicht dan alleen op basis van de gemiddelde indexwaarden is af te leiden.

De Van Dam-index voor pH is gemiddeld onveranderd voor de drie locaties, maar laat op het lozingspunt een relatieve toename zien van de bijdrage van soorten die alleen voorkomen bij een pH boven 7. Vermoedelijk is de pH van het effluent meestal groter dan 7. Deze verschuiving is bij Cartils weer verdwenen.

De Van Dam-index voor saliniteit laat op het lozingspunt geen verandering zien, maar wel in de buurt van het confluent: de bijdrage van soorten die een indicatie zijn voor een chloride gehalte tussen 500-1000 mg/l zijn hier dominant geworden. Kennelijk is er na de locatie van de effluent lozing nog een influx van ander water dat het zoutgehalte heeft verhoogd.

De Van Dam-index voor organische stikstofbelasting vertoont op het lozingspunt een toename van bijdrage van diatomeeënsoorten die periodiek een verhoogde organische stikstofconcentratie nodig hebben voor hun stikstofbehoefte. Deze bijdrage verdwijnt weer voor een groot deel bij Cartils.

De Van Dam-index voor zuurstofverzadiging heeft op het lozingspunt een verhoogde bijdrage van soorten die indiceren voor een wat lage zuurstofverzadiging van tussen 30-50%. Deze bijdrage is weer afgenomen bij Cartils. Daar wordt ook een lichte bijdrage duidelijker van soorten die 100% verzadiging vragen.

De Van Dam-index voor organische belasting laat bij het lozingspunt een duidelijke toename zien van soorten van sterk tot zeer sterk belaste milieus. Dat zal te maken hebben met organisch materiaal dat overvloedig aanwezig is in het effluent dat wordt geloosd. Bij Cartils is deze bijdrage verdwenen.

De Van Dam-index voor trofiegraad is overal ongeveer gelijk (eutroof), maar op het lozingspunt wordt de waarde mede bepaald door soorten die hypertrofe omstandigheden indiceren. Dit effect is bij Cartils weer verdwenen.

De Van Dam-index voor vochtindicatie duidt op permanente watervoerendheid van de locaties, maar wordt bij Cartils vooral bepaald door soorten die zowel voorkomen onder natte of vochtige omstandigheden als in permanente waterlichamen. Kennelijk kan de waterstand hier lokaal laag worden.

## 7.9 Rijnland

### **Vergelijking van IPS en Van Dam index waarden op natuurlijk en kunstmatig substraat met DNA en microscopie**

In 2021 zijn op drie locaties dobbers met stukken rietstengel uitgezet (Stowa, 2010). Deze zijn na een incubatie periode van zes weken weer opgehaald. Op de oogstdatum zijn ook monsters genomen van natuurlijk substraat in de directe omgeving. Met DNA- en met microscopische analyse zijn indexwaarden berekend voor de IPS en de zeven Van Dam-indexen. Het betrof de locaties RO553 (M1), ROP11102 (M1b) en RO140 (M7b); voor RO553 is voor het natuurlijk substraat monster helaas geen geslaagde DNA-analyse beschikbaar.

De resultaten zijn weergegeven in Tabel 7.6. Het gemiddelde verschil in indexwaarde tussen de beide substraattypen per index is per analyse methode (DNA of microscopie) getoetst met een t-test. De resultaten daarvan lieten voor zowel DNA- als microscopische analyse geen significant verschil zien tussen het resultaat met een dobber of met natuurlijk substraat.

Met deze dataset van vijf monsters voor elke index is ook het gemiddelde verschil berekend tussen de met DNA en met microscopische analyse bepaalde indexwaarden (zoals op grotere schaal is gedaan in hoofdstuk 4). Er bleek hier geen statistisch significant verschil te zijn tussen de index bepaald met DNA-analyse en de index bepaald met de microscopische analyse (t-test,  $p < 0,05$ ).

Samenvattend betekent dit dat er voor de bepaling van deze indexen geen effect is gevonden van het gebruikte substraat of de gebruikte detectie methode. Beide substraat typen leveren dus vergelijkbare resultaten over de waterkwaliteit op basis van diatomeeën indicatiewaarden, en de analyse kan zowel met DNA als microscopie plaatsvinden.

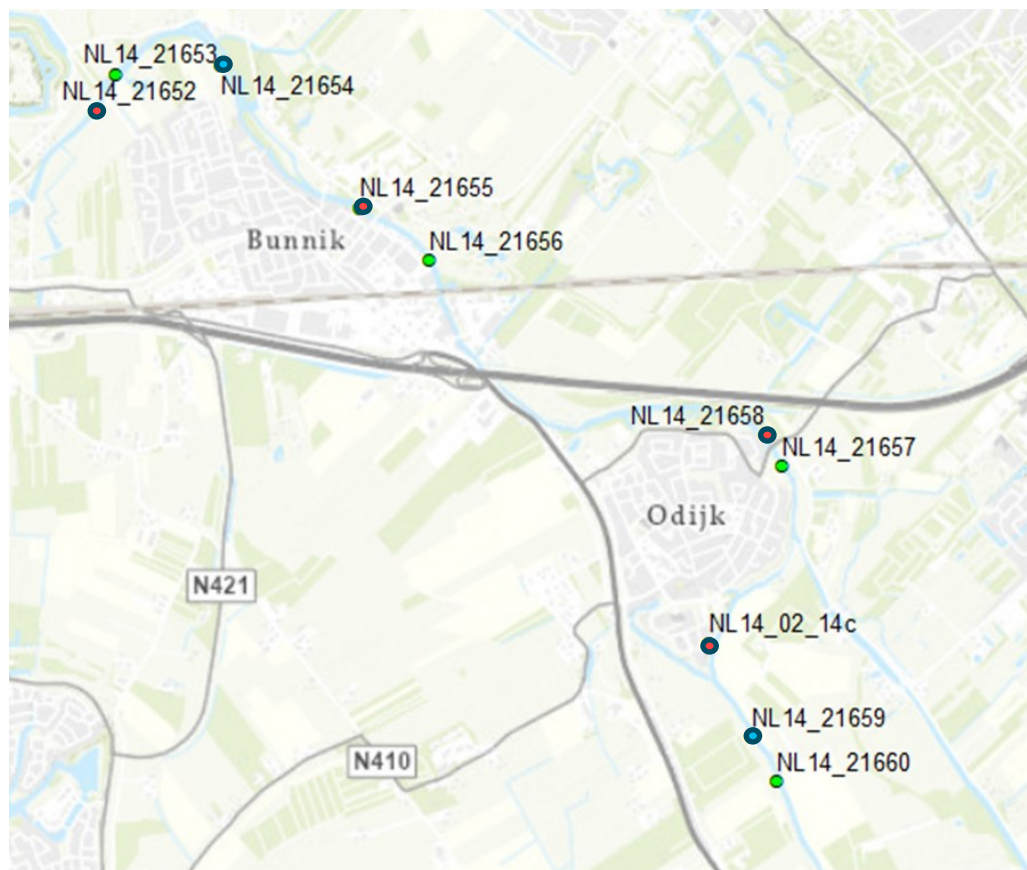
Tabel 7.6. Drie locaties bij Rijnland. IPS en Van Dam-indexen bepaald met DNA-analyse ('DNA'; boven) en met microscopische analyse ('Morf', onder) op zes weken geïncubeerde rietstengels aan een drijver ('dobber') en op natuurlijk substraat ('stengels'); na=niet beschikbaar. Van Dam-indexen: pH=zuurgraad; sal=saliniteit; N=organische stikstofbelasting; O2=zuurstofverzadiging, vocht=indicatie voor mate van droogval.

DNA	substraat	IPS	pH	sal	N	O2	sapr	trof	vocht
RO140	dobber	12,5	4,10	2,32	2,14	2,91	2,89	5,08	1,90
RO140	stengels	13,5	4,41	2,19	2,07	2,49	2,58	4,88	1,57
RO553	dobber	11,1	4,11	2,04	2,29	2,79	2,86	5,12	1,97
RO553	stengels	na	na	na	na	na	na	na	na
ROP11102	dobber	11,6	3,95	2,25	2,22	3,27	3,46	3,46	4,99
ROP11102	stengels	9,4	3,97	2,39	2,38	3,17	3,08	5,28	2,02
Morf	substraat	IPS	pH	sal	N	O2	sapr	trof	vocht
RO140	dobber	8,1	4,31	2,27	3,25	3,33	3,33	5,43	1,91
RO140	stengels	12,4	4,13	2,39	2,50	2,96	2,84	4,97	2,26
RO553	dobber	12,4	4,09	2,01	2,80	2,59	2,77	5,18	2,05
RO553	stengels	10,9	4,21	2,15	2,78	2,95	3,01	5,18	1,93
ROP11102	dobber	8,2	4,06	2,61	2,81	3,36	3,28	5,18	2,19
ROP11102	stengels	8,8	4,07	2,57	2,94	3,36	3,14	5,12	2,03

## 7.10 Stichtse Rijnlanden

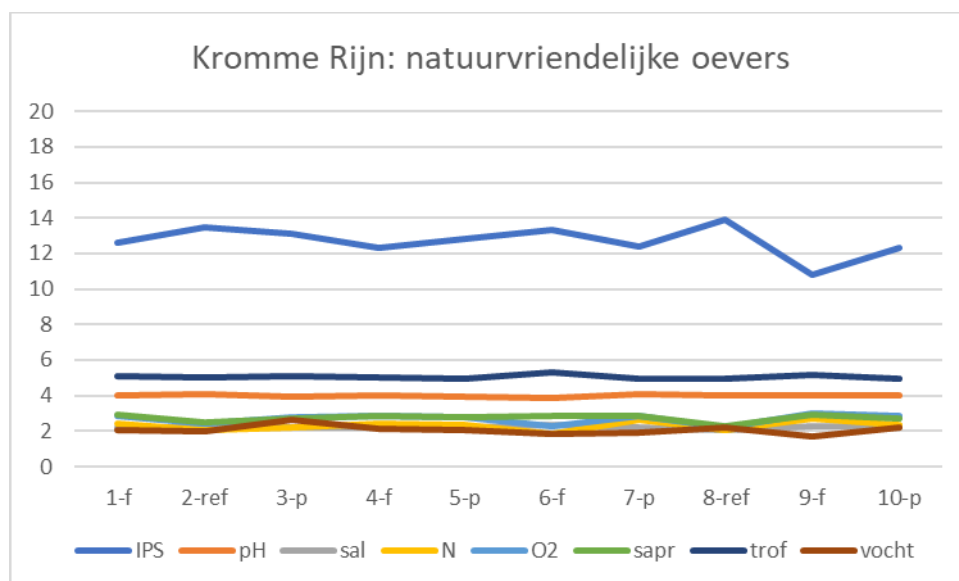
### Natuurvriendelijke oevers langs de Kromme Rijn

Langs de oevers van de Kromme Rijn liggen tien locaties die eerder zijn onderzocht op effecten van twee verschillende oevertypen voor juveniele vis (plas-dras, vier locaties, en flauw hellend talud, met vier locaties; zie Kleppe, 2021). Als referentie diende een tweetal normaal beschoeide oevers. Dezelfde tien locaties zijn in 2022 ook bemonsterd voor DNA-analyse van de aanwezige diatomeeën gemeenschap (zie Figuur 7.20).



Figuur 7.20. Bemonsterde locaties langs de Kromme Rijn. Groen: flauw talud; rood: plasberm; blauw: referentie.





Figuur 7.21. De Kromme Rijn, 2022. Verloop van de zeven Van Dam-indexen en de IPS-index langs diverse oeverlocaties. Nummering volgt de locatiecodes uit Figuur 7.20, in stroomafwaartse richting; f=flauw talud, p=plasberm; ref=referentie. Van Dam-indexen: pH=zuurgraad; sal=saliniteit; N=organische stikstofbelasting; O2=zuurstofverzadiging, vocht=indicatie voor mate van droogval.

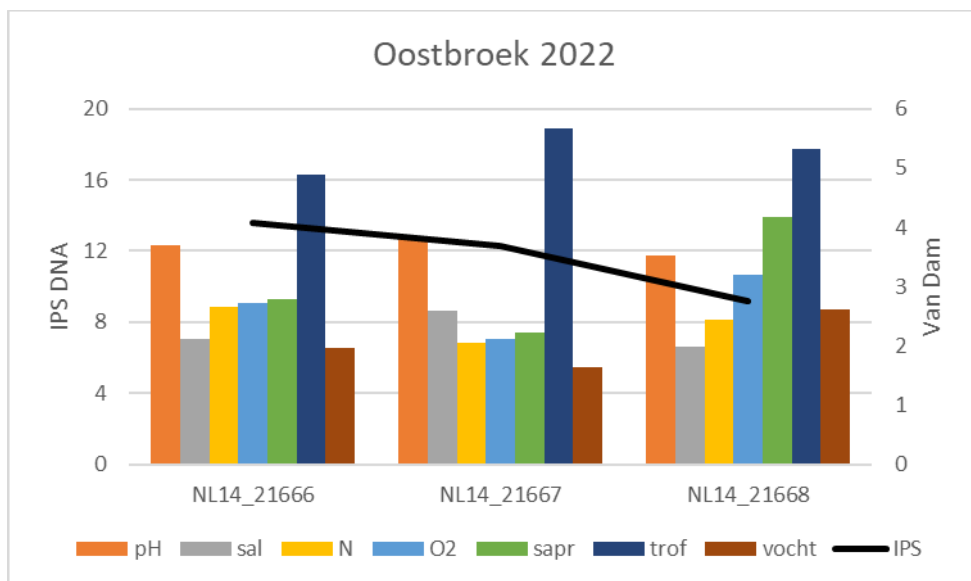
De KRW-kwaliteitscore is volgens de IPS 'matig' tot 'goed'. De Van Dam-indexen wijzen op een pH boven 7, een chloridegehalte iets boven de 500 mg/l, met een lichte organische stikstofbelasting (wat lager bij de twee referentie locaties), met een zuurstofverzadiging tussen de 50-75%, matig organisch belast (opnieuw wat lager bij de twee referentie locaties, en eutroof (met name op punt 6 en 7). De vochtindicatie duidt niet op periodiek droogvallen. De diatomeeën indexen laten geen effect zien van de natuurvriendelijke oevers op de ecologische waterkwaliteit. De in beide referenties wat lagere indicatie voor organische stikstof belasting en saprobie suggereert dat de natuurvriendelijke oevers een minder turbulent milieu hebben waarin organisch materiaal wat langer blijft liggen. Dat is een gunstig milieu voor juveniele vispopulaties, die daar dan ook beduidend hogere dichtheden hebben dan op de referentie locaties (zie Kleppe, 2021).

### Landgoed Oostbroek

Landgoed Oostbroek ligt in het Kromme Rijnlandschap en is gevormd door de voorlopers van de Rijn. Delen van Oostbroek staan onder invloed van kwel. Met name in de voormalige rivierarmen in het zuiden speelt kwel nog een rol. In het zuidwestelijke graslandperceel van Oostbroek ligt bijvoorbeeld een kwelsloot, met kwelindicerende flora (holpijp, waterviolier en rode waterereprijs). De oostelijk aangrenzende broekbossen staan ook onder invloed van kwel, wat te zien is aan de aanwezigheid van bacterie- en olievliesjes. In het centrale, natste en open deel van dit broekbos groeit veel holpijp. De uitgegraven meander wordt deels gevoed door kwel. Aan de oostzijde groeit veldrus, een indicator van stromend grondwater. Daarnaast zijn naaldwaterbies en holpijp, beide kwelindicatoren, gevonden. Toch is de meander waarschijnlijk voedselrijk, wat geïndiceerd wordt door de dominante waterplant smalle waterpest. Vroeger herbergde de meander een watervegetatie die bestond uit gewoon kransblad (*Chara vulgaris*), tenger fonteinkruid, gewoon sterrekroos, zannichellia, smalle waterpest (alle met een lage tot zeer lage bedekking) en op drie plaatsen spitsbladig fonteinkruid (zie verder het monitoringplan van Stichtse Rijnlanden; Dijkstra, 2022). In dit gebied zijn in 2022 drie locaties bemonsterd voor DNA-analyse van diatomeeënsoorten: NL14\_21666 (de oude arm van de Kromme Rijn), NL14\_21667 (de kwelsloot in een open terrein) en NL14\_21668 (in het broekbos).

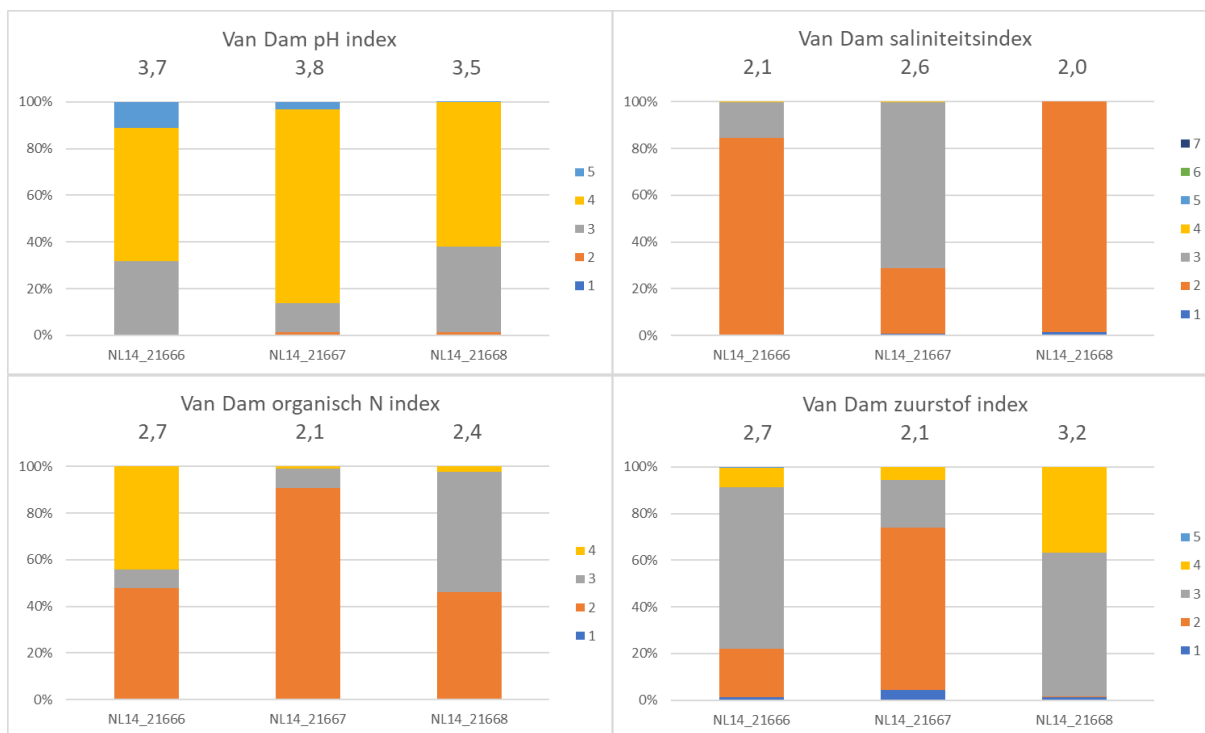
Figuur 7.22 geeft een overzicht van de resultaten voor de indexen. De KRW-kwaliteitscore volgens de IPS index is voor het broekbos nog net niet 'slecht', voor de kwelsloot net niet 'goed' en voor de oude rivierarm net wel 'goed'. De Van Dam-indexen wijzen op een pH boven 7, een chloridegehalte rond 500-750 mg/l, waarbij het broekbos en



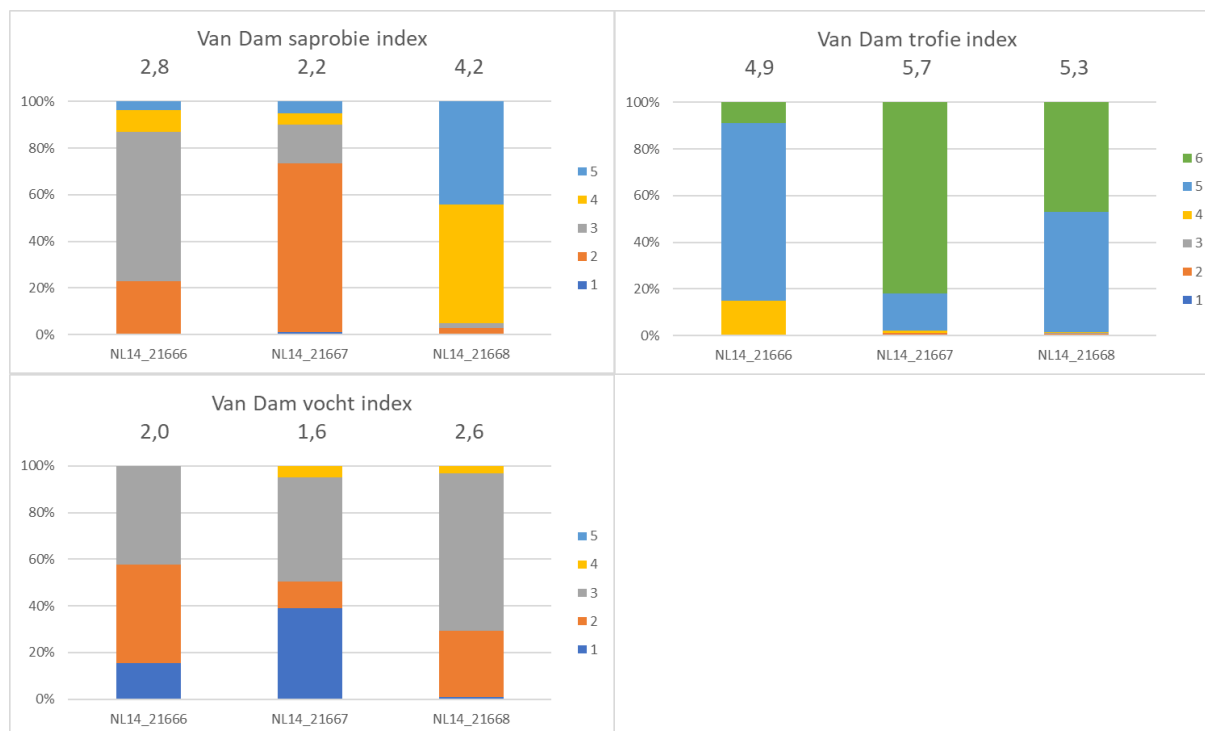


Figuur 7.22. Drie locaties in landgoed Oostbroek, 2022: van links naar rechts een oude arm van de Kromme Rijn, een kwelsloot in weiland, en een broekbos. Van Dam indexen: pH=zuurgraad; sal=saliniteit; N=organische stikstofbelasting; O2=zuurstofverzadiging; vocht=indicatie voor mate van droogval.

de rivierarm wat zoeter zijn dan de kwelsloot. Er is een lichte organische stikstofbelasting (het laagst in de kwelsloot), en rond de 50 - 75% zuurstofverzadiging (het hoogst in de kwelsloot, het laagst in het broekbos). De locaties verschillen nogal in mate van organische belasting, waarbij dit in het broekbos hoog ligt en in de kwelsloot relatief laag. De trofiegraad is overal ongeveer gelijk (eutroof). De vochtindicatie duidt op permanente watervoerendheid van de locaties.



Figuur 7.23. Drie locaties in landgoed Oostbroek, 2022. Voor elk van de zeven Van Dam-indexen zijn de relatieve bijdragen van de onderliggende indexwaarden aan de totale index weergegeven. Per paneel steeds van links naar rechts de oude arm van de Kromme Rijn, de kwelsloot in weiland, en het broekbos. Het getal boven elk staafdiagram is de gemiddelde indexwaarde. Voor de betekenis van de samenstellende Van Dam-index scores, zie Tabel 7.1.



*Figuur 7.23. Vervolg. Drie locaties in landgoed Oostbroek, 2022. Voor elk van de zeven Van Dam-indexen zijn de relatieve bijdragen van de onderliggende indexwaarden aan de totale index weergegeven. Per paneel steeds van links naar rechts de oude arm van de Kromme Rijn, de kwelsloot in weiland, en het broekbos. Het getal boven elk staafdiagram is de gemiddelde indexwaarde. Voor de betekenis van de samenstellende Van Dam-index scores, zie Tabel 7.1.*

Ter illustratie zijn in Figuur 7.23 voor alle Van Dam-indexen uit Figuur 7.22 ook weer de relatieve bijdragen van de betreffende onderliggende Van Dam-indexwaarden weergegeven.

De Van Dam-index voor pH in de kwelsloot wordt vooral bepaald door soorten die met name voorkomen bij een pH boven 7, terwijl in de rivierarm ook een beduidende bijdrage is van soorten die alleen bij pH-waarden boven 7 worden gevonden. Dat suggereert dat de pH in de rivierarm in de periode voor de bemonstering zelden of nooit onder de 7 zal zijn gekomen, terwijl dit in de beide andere locaties nog wel het geval kan zijn geweest. Mogelijk is fotosynthese door fytoplankton in de rivierarm hier de oorzaak voor, want daardoor kan de pH matig tot sterk verhoogd worden.

De Van Dam-index voor saliniteit heeft voor de kwelsloot een aanzienlijke bijdrage van soorten die voorkomen tussen 500-1000 mg/l chloride. Deze komen niet of nauwelijks voor bij de andere locaties die dus meer zoet zijn. Kennelijk worden de beide andere locaties meer door regenwater beïnvloed, of minder door kwelwater met een wat hoger chloridegehalte.

De Van Dam-index voor organische stikstofbelasting in de rivierarm heeft een sterke bijdrage van soorten die een continu verhoogde organische stikstofconcentratie nodig hebben voor hun stikstofbehoefte. In de kwelsloot komen daarentegen voornamelijk soorten voor die de organische stikstof belasting wel kunnen verdragen maar het niet nodig hebben. Het broekbos heeft naast dergelijke soorten ook soorten die periodiek organische stikstof nodig hebben. Er lijkt dus een gradiënt te zijn in organische stikstofbelasting, laag in de kwelsloot via matig in het broekbos naar hoog in de rivierarm.

De Van Dam-index voor zuurstofverzadiging heeft in de kwelsloot de laagste waarde, vooral opgebouwd uit bijdragen van soorten die een indicatie zijn voor een zuurstofverzadiging boven 75% of die zelfs 100% zuurstofverzadiging nodig hebben. In de rivierarm stijgt de bijdrage van soorten die een zuurstofverzadiging van boven de 50% kunnen verdragen. In het broekbos wordt de bijdrage belangrijker van soorten die bestand zijn tegen een zuurstofverzadiging vanaf 30%. Dit duidt op een gradiënt in zuurstofverzadiging vanuit het broekbos (vrij laag) via de rivierarm naar de kwelsloot (vrij hoog).

De Van Dam-index voor organische belasting wordt in het broekbos voornamelijk bepaald door soorten van sterk tot zeer sterk organisch belaste milieus. Dat wordt waarschijnlijk veroorzaakt door bladmateriaal dat hier overvloedig aanwezig is. In de rivierarm dragen vooral soorten uit matig organisch belaste milieus bij aan de indexwaarde. In de kwelsloot verschuift dit verder naar soorten die een indicatie zijn voor licht organisch belaste omstandigheden.

De Van Dam-index voor trofiegraad is overal ongeveer gelijk (eutroof). In de rivierarm wordt de waarde vooral bepaald door soorten die eutrofe omstandigheden indiceren. In de kwelsloot dragen juist soorten bij van hypertrofe omstandigheden, en in het broekbos dragen beide groepen in gelijke mate bij aan de indexwaarde. Ondanks de hoge voedselrijkdom blijft de zuurstofverzadiging in de kwelsloot volgens de diatomeeën dus hoog, wat duidt op een goede doorstroming.

De Van Dam-index voor vochtindicatie duidt op permanente watervoerendheid van de locaties, maar vooral in het broekbos dragen soorten van permanent ondergedoken milieus maar heel weinig bij aan de index en is het waarschijnlijk dat de waterstand periodiek erg laag kan worden.

### Polder de Lange Weide: onderwaterdrainage

In de polder de Lange Weide nabij Driebruggen is in 2018 en 2019 een systeem van in totaal 450 kilometer buizen voor waterinfiltratie aangelegd. Het gaat om 310 hectare in één peilgebied tussen de Enkele en de Dubbele Wiericke. De proef heeft als doel de bodemdaling te beperken, en daarmee CO<sub>2</sub> uitstoot te verminderen en de waterkwaliteit te verbeteren. Daarnaast stijgen de peilbeheerskosten minder en mogelijk ontstaan er effectievere productieomstandigheden voor de landbouw. Lange Weide wordt door het waterschap uitgebreid gemonitord op verschillende gebieden. Focus is daarbij op de invloed van deze grootschalige onderwaterdrainage in combinatie met dynamisch peilbeheer en aanvullende maatregelen op de waterkwaliteit en ecologie.

Voor de algemene monitoring zijn door HDSR tien meetpunten geselecteerd, zie Tabel 7.7 en Figuur 7.24. Hiervan liggen vier meetpunten (nr. 9, 7, 4, 8 en 3, rode stip) in primaire watergangen. De wateraanvoer verloopt voornamelijk via punt 9, waarna water richting 7 en 4 gaat. Punt 3 ontvangt water uit het zuiden van de polder. Daarnaast zijn er vier meetpunten in tertiair water (nr. 2, 5, 6 en 10, groene stip). Meetpunt 1 (blauwe stip) ligt in een deel van de polder waar geen onderwaterdrainage is aangelegd.

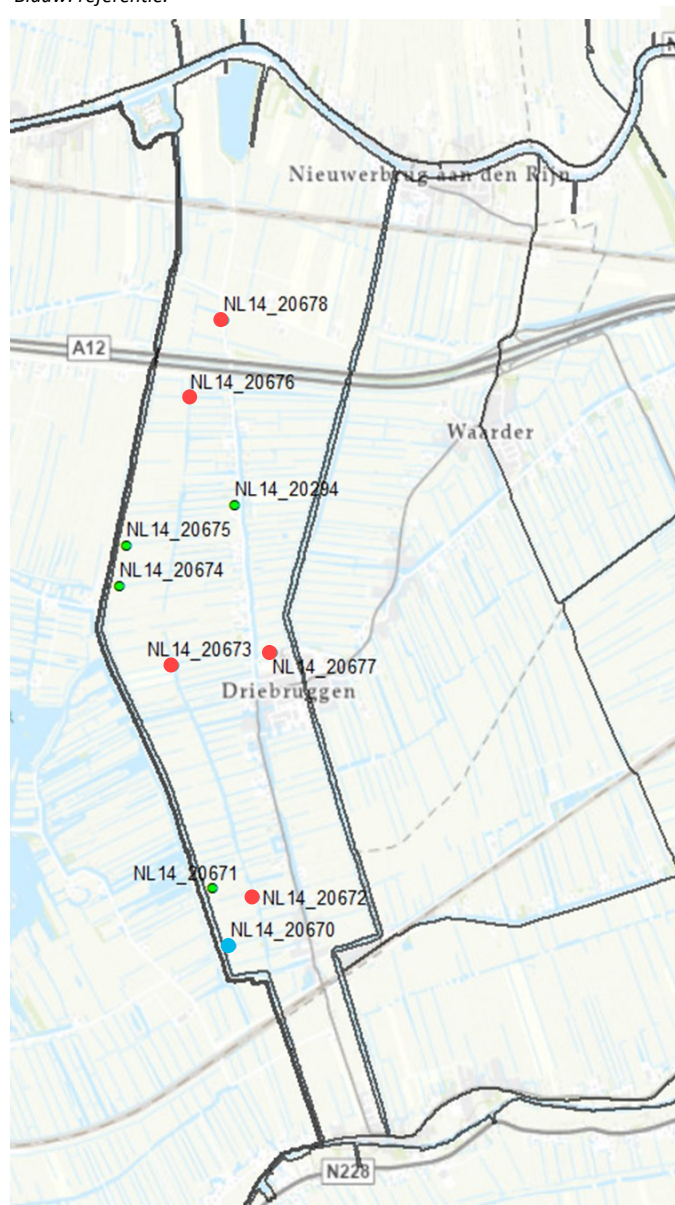
Tabel 7.7. De tien monitoring locaties in polder de Lange Weide

HDSR code	Meetpunt nr en naam	KRW type
NL14_20670	1. Referentie, Tertiair Zuid 2	M8
NL14_20671	2. Tertiair Zuid 1	M8
NL14_20672	3. Achtervliet Zuid	M10
NL14_20673	4. Achtervliet Midden	M10
NL14_20674	5. Tertiair Noord 2	M8
NL14_20675	6. Tertiair Noord 1	M8
NL14_20676	7. Achtervliet Noord	M10
NL14_20677	8. Sportvelden	M8
NL14_20678	9. Weijpoort	M8
NL14_20294	10. Tertiair wb30 sloot	M10

Uit de algemene monitoring resultaten tot en met 2023 bleken geen negatieve of positieve effecten (zie ook Mandemakers, 2024). Ook de diatomeeënsamenstelling, geanalyseerd met microscopie, liet daarin geen relaties zien, maar leek in voorkomen wel lokale verschillen te vertonen, ondanks dat het inlaatwater overall een dominante rol speelt.

Op dezelfde tien locaties zijn zowel in 2021 als in 2022 ook monsters genomen voor DNA-detectie van diatomeeën. De resultaten voor de IPS-index en de diverse Van Dam-indexen staan voor beide jaren in Tabel 7.8. Net als uit de analyse in Mandemakers (2024) zijn geen duidelijke relaties te vinden tussen indexen en locaties. Ook zijn geen duidelijke trends tussen de beide jaren te zien. De niet door onderwater drainage beïnvloede locatie 1 wijkt niet duidelijk af van de andere locaties. De KRW-kwaliteitscore op basis van de IPS-waarden is voor vrijwel alle locaties 'matig', alleen locatie 9 scoort in 2022 net aan 'goed'.

Figuur 7.24. Ligging monsterlocaties in polder de Lange Weide; zie ook Tabel 7.7. Rood: primaire watergang. Groen: tertiaire watergang. Blauw: referentie.



Tabel 7.8. Tien locaties in polder de Lange Weide, resultaten uit 2021 en 2022. Van Dam-indexen: pH=zuurgraad; sal=saliniteit; N=organische stikstofbelasting; O2=zuurstofverzadiging, vocht=indicatie voor mate van droogval. Locaties: zie Tabel 7.7 en Figuur 7.24.

meetpunt	type	locaties	IPS		pH		sal		N	
			2021	2022	2021	2022	2021	2022	2021	2022
NL14_20672	aanvoer	3	9,2	7,5	4,57	4,57	2,00	2,10	2,75	2,79
NL14_20673	aanvoer	4	8,1	9,1	4,64	4,08	2,11	2,63	2,82	2,20
NL14_20676	aanvoer	7	11,5	10,4	4,24	4,01	2,10	2,12	2,52	2,33
NL14_20677	aanvoer	8	12,6	11,9	4,02	4,07	2,21	2,28	2,45	2,42
NL14_20678	aanvoer	9	11,9	13,5	4,37	4,05	2,11	2,23	2,56	2,07
NL14_20670	ref	1	8,8	7,4	4,45	3,97	2,03	2,19	2,82	2,59
NL14_20671	tertiair	2	8	8,3	4,79	4,31	2,00	2,32	2,82	2,66
NL14_20674	tertiair	5	10,5	8	4,21	4,45	2,05	2,00	2,83	3,29
NL14_20675	tertiair	6	7,8	8,8	4,46	4,49	2,08	2,44	2,92	2,49
NL14_20294	tertiair	10	10,7	10,3	3,93	3,95	2,30	2,08	2,48	2,74

meetpunt	type	locaties	O2		sapr		trof		vocht	
			2021	2022	2021	2022	2021	2022	2021	2022
NL14_20672	aanvoer	3	3,48	3,73	3,48	3,79	5,60	5,67	2,01	2,10
NL14_20673	aanvoer	4	3,83	3,07	3,73	3,02	5,58	5,42	1,89	1,87
NL14_20676	aanvoer	7	3,31	2,70	3,24	2,95	5,42	5,17	2,22	1,89
NL14_20677	aanvoer	8	2,89	2,81	2,86	2,74	2,86	4,92	4,84	1,89
NL14_20678	aanvoer	9	3,16	2,63	3,19	2,64	3,19	5,01	4,94	1,74
NL14_20670	ref	1	3,60	3,08	3,75	3,78	5,52	5,60	2,16	1,79
NL14_20671	tertiair	2	3,67	3,26	3,75	3,31	5,75	5,65	1,86	1,59
NL14_20674	tertiair	5	3,29	3,61	3,46	3,52	5,45	5,34	2,31	2,03
NL14_20675	tertiair	6	3,65	3,24	3,58	3,14	5,43	5,54	2,13	2,09
NL14_20294	tertiair	10	3,12	3,08	3,11	3,24	4,88	5,00	2,67	2,18

Locatie 10 heeft een iets lagere Van Dam-indexwaarde voor de pH dan de andere punten, maar de index wijst op een pH-waarde boven de 7. Dat is te verwachten voor ondiepe polderwateren met veel watervegetatie en algengroei (Mandemakers, 2024). De Van Dam-index voor saliniteit wijst op een chloridegehalte rond 500-750 mg/l. De andere Van Dam-indexen laten zien dat er een lichte organische stikstofbelasting is en een zuurstofverzadiging van rond de 50%, een matige organische belasting, en een trofiegraad die vrijwel overall ongeveer gelijk is (eutroof). Opvallend is een indicatie voor mesotrofe omstandigheden op locatie 8 in 2021, maar in 2022 is het daar ook eutroof. De Van Dam-index voor vochtindicatie duidt op permanente watervoerendheid van de locaties. De locaties 8 en 9 hebben in 2021 een sterke bijdrage van diatomeeënsoorten gebonden aan vochtige of tijdelijk droogvallende omstandigheden; dat is in 2022 weer verdwenen.

## 7.11 Discussie en conclusies

De vele voorbeelden in dit hoofdstuk geven een uitgebreide indruk van mogelijke diagnostische toepassingen van de milieu-informatie zoals die door diatomeeën kan worden ontsloten. De inzet van de DNA-analyse geeft daarbij in principe een grote versnelling van de doorlooptijd tussen monsternamen en beschikbaar komen van de gegevens.

Voor alle cases volgen nu samengevatte conclusies.

*Merkske*: er is geen zichtbaar effect van effluentlozing van een boerderij of diffuse input van omringende landbouwgebieden. Blijkbaar zijn de effecten van deze bronnen in totaal niet erg onderscheidend tussen de verschillende monsterlocaties, en is het effluent niet zwaar belastend voor de diatomeeënflora.

*Aa of Weerij*s: ook hier is een gelijkmatig beeld, zonder opmerkelijke veranderingen in indicatiewaarden. Dit is een voorbeeld waaruit blijkt dat de vijf grove KRW-kwaliteitsklassen een onvoldoende beeld geven van de feitelijke situatie; het gebruik van de feitelijke waarde van de achterliggende EKR-ratio geeft hierin al meer inzicht.

*Chaamse beken*: een gelijkmatig beeld van een 'matige' waterkwaliteit, en ook hier wordt wat meer detail zichtbaar door de indexwaarden ten opzichte van de grove KRW klassen.

*Vennen bij Breda*: een gelijkmatig beeld bij de Van Dam indexen, met een duidelijk hogere IPS-score voor één van de twaalf locaties. Deze verdient wellicht een nadere inspectie om de oorzaak te achterhalen.

*Plas van Buysen*: weer een stabiel beeld van de Van Dam-indexen, waarbij de inlaat naar de plas wel een betere kwaliteit laat zien.

*IBA's bij Delft*: geen negatieve effecten zichtbaar op de waterkwaliteitsindexen gebaseerd op de diatomeeënpopulatie.

*Run*: de diatomeeëindexen laten geen effect zien van een verbetering van de stroomsnelheid in de beek na de herstelmaatregelen, in tegenstelling tot de hier ook onderzochte macrofauna-indexen. Dit is een voorbeeld van het belang van een beoordeling van de waterkwaliteit op basis van meer dan één groep van indicatororganismen.

*Friese beken*: De IPS- en de Van Dam-indexen laten veranderingen zien over een relatief korte periode van enkele weken tot twee maanden, waarbij zowel een daling als stijging zichtbaar is. Deze kunnen aanleiding zijn voor een nadere studie om een diagnose te stellen voor de fluctuerende ecologische waterkwaliteit.

*Dordtse Biesbosch*: er treedt een duidelijke verbetering op van de waterkwaliteit, bepaald met de indexen voor de diatomeeënflora, door een bezinkvijver waaruit het water naar de achterliggende polders wordt verdeeld. Deze kwaliteit loopt in het landbouwgebied soms weer wat terug maar blijft in het natuurontwikkelingsgebied behouden.

*Constant of wisselend zoutgehalte*: er is hier geen duidelijk generiek beeld op de diatomeeënsamenstelling te zien dat is toe te schrijven aan een constant of toenemend chloride gehalte gedurende het seizoen.

*Waterplanten aanwezigheid*: er is geen eenduidig beeld merkbaar van de aan- of afwezigheid van ondergedoken waterplanten op de waterkwaliteit bepaald met diatomeeëindexen met DNA-barcodes.

*Beverdam Rode Beek*: de beverdam heeft slechts beperkt invloed op de met diatomeeëindexen geschatte milieu condities. Direct benedenstrooms van de beverdam is er volgens de Van Dam-indexen wel een hogere zuurstofverzadiging, lagere organische belasting en lagere trofiegraad. Dat past goed bij de daar wat verhoogde stroomsnelheid.

*Eyserbeek voor en na RWZI*: de effluentlozing van de RWZI laat een verslechtering van de IPS-score zien, evenals een toename van organische belasting en input van nutriënten. Daarna verbetert de kwaliteit weer naar de situatie voor het lozingspunt. De histogrammen geven een mooi gedetailleerd beeld van de diagnostische informatie.

*Dobbers of natuurlijk substraat*: er is voor de bepaling van de diverse indexwaarden geen significant effect gevonden van het gebruikte substraat (dobbers versus natuurlijk materiaal) of van de gebruikte detectiemethode (DNA versus microscopie).

*Kromme Rijn natuurvriendelijke oevers:* de diatomeeënindexen laten geen effect zien van de natuurvriendelijke oevers op de waterkwaliteit. De indexen van de twee referentielocaties laten een wat lagere organische stikstof belasting en saprobie zien dan de natuurvriendelijke oeverlocaties. Dit suggereert dat de laatste een minder turbulent milieu hebben waarin organisch materiaal wat langer blijft liggen.

*Landgoed Oostbroek:* er zijn duidelijke verschillen in IPS- en Van Dam-index waarden, waarbij de histogrammen net als bij de Eyserbeek een mooi gedetailleerd beeld geven van de diagnostische informatie.

*Lange Weide onderwater drainage:* er zijn geen duidelijke relaties te vinden tussen diatomeeën indexen en de invloed van onderwaterdrainage op de ecologische waterkwaliteit. Ook zijn geen duidelijke trends tussen beide jaren te zien, maar lokale verschillen zijn wel merkbaar.

De inzet van de gebruikte indexen leidde in deze quick-scan niet heel vaak tot bijzondere inzichten. Bij de meeste voorbeelden was er dus te weinig verschil in milieucondities tussen locaties. Dat betekent dat de invloed van een eventuele verstoring (bv effluentlozing) of uitgevoerde maatregelen geen effect hebben gehad op de waterkwaliteit bepaald met de verschillende diatomeeënindexen

Het gebruik van histogrammen waarin de relatieve bijdragen van de onderliggende indexwaarden aan de gemiddelde waarde van een Van Dam index worden weergegeven, biedt duidelijk aanvullende informatie en dus meer potentie voor diagnostiek dan het gebruik van de gemiddelde waarden alleen. Verschuivingen in soortengroepen van diatomeeën c.q. hun Van Dam-index laten soms eerder een ontwikkeling in waterkwaliteit zien dan op basis van de gemiddelde waarde van de index valt af te leiden.

De IPS-index en de Van Dam-indexen vullen elkaar aan in de informatie die ze halen uit de aanwezige diatomeeën gemeenschap. Met name de Van Dam-indexen voor pH, saliniteit en vochtcondities vertonen een duidelijk minder sterke relatie met de IPS-index. De andere vier indexen hangen meer samen met organische belasting en voedselrijkdom, en geven naast de meer algemene indruk van de IPS, aanvullende informatie over daarmee samenhangende zuurstofcondities en wijze van organische stikstofopname.



## 8 Algemene conclusies en aanbevelingen

### 8.1 IPS-index en referentielijsten

De momenteel voor DNA-identificatie beschikbare referentielijst voor diatomeeën beslaat slechts 7% van de taxa die voor microscopische analyse beschikbaar zijn. Daarnaast is het aandeel soorten met een 'goede' milieu-indicatiewaarde in de DNA-referentielijst significant lager. Dat maakt de kans op een onderschatting van de waterkwaliteit op basis van de diatomeeënsamenstelling verkregen met DNA-analyses vermoedelijk groter.

De DNA-identificatie van de diatomeeënpopulatie leverde bruikbare resultaten op voor 94% van de voor DNA-analyse aangeleverde monsters van 363 locaties. Van alle DNA-barcodes behoorde 98,5% tot het fyllum Bacillariophyta (diatomeeën) en de DNA-analyse was dus heel specifiek voor het detecteren van diatomeeën-DNA. Met de totale dataset konden 532 'exact sequence variants' of ESVs worden geïdentificeerd (de term ESV wordt tegenwoordig vaak gebruikt in plaats van het identieke begrip 'barcode'). Deze 532 ESVs konden taxonomisch verder worden geïdentificeerd tot in totaal 185 soorten. Dit betrof 69% van alle aangetroffen reads in de dataset. Met microscopie werden in deze dataset 492 soorten vastgesteld (535 taxa, als ook ondersoorten en variëteiten worden meegenomen; deze zijn met de beschikbare en ook voor soortenaantal beperkte DNA barcode referentielijst niet te onderscheiden). Per monster werden met DNA gemiddeld echter tweemaal zoveel soorten aangetroffen als met microscopie. Het verschil tussen beide methoden in het soortenaantal voor alle monsters samen moet deels worden toegeschreven aan de veel kleinere DNA referentie bibliotheek.

Er werd vrij weinig overlap gevonden tussen de met beide methoden vastgestelde soortenlijsten, dus de soorten/taxa-samenstelling van de diatomeeënpopulatie die wordt waargenomen is afhankelijk van de analyse die wordt toegepast (microscopie en versus DNA).

Het is te verwachten dat de aanpak met DNA in de (nabije) toekomst een beter herhaalbaar en completer beeld gaat geven van de diatomeeën gemeenschap dan tot nu toe mogelijk is met microscopie. Maar ook de herhaalbaarheid van microscopische analyse kan verbeteren wanneer bijvoorbeeld geautomatiseerde beeldherkenning succesvol blijkt te zijn.

### 8.2 Vergelijking IPS-waarden gebaseerd op microscopische en moleculaire analysegegevens

Op basis van de onderzochte literatuur concluderen we dat een bandbreedte van twee IPS-eenheden voor de schatting van een IPS indexwaarde met microscopie zeker niet ongewoon is, en dat deze op kan lopen loopt tot zeker vier IPS-eenheden. De in ons onderzoek geschatte gemiddelde afwijking tussen met DNA en microscopie bepaalde IPS-waarden was 1,7 IPS-eenheden. Daarnaast viel zo'n 75% van het verschil tussen beide methoden binnen -2 tot +4 IPS eenheden. Dat is maximaal één KRW-kwaliteitsklasseniveau. De afwijking in IPS-eenheden tussen IPS-waarden verkregen met DNA of microscopie is dus niet groter dan de afwijking die wordt waargenomen binnen IPS-waarden verkregen met alleen microscopie. We concluderen daarom dat beide analysemethoden geschikt zijn om IPS-waarden te schatten op basis van de verkregen diatomeeën soortensamenstelling. Er is wat dit betreft dus ook geen noodzaak om microscopie te verkiezen boven een aanpak met DNA detectie.

De gemiddelde IPS waarde bepaald met DNA ligt wel significant 1,7 IPS-eenheid lager dan de gemiddelde waarde bepaald met microscopie. Het is op basis van deze resultaten niet vast te stellen welke methode nu de meest betrouwbare schatting van de op diatomeeën gebaseerde ecologische waterkwaliteit geeft. Enerzijds is de barcode



referentie beperkt, anderzijds is het de vraag of de 30% van het totale aantal reads dat in ons onderzoek nog niet kon worden geïdentificeerd zou leiden tot een groot verschil in index waarde. Deze 30% zal een behoorlijk aantal soorten in lage abundantie betreffen, die dus per saldo niet heel veel invloed hoeven te hebben op de indexwaarde. Er lijkt geen reden om de resultaten uit de aanpak met DNA minder te vertrouwen dan de aanpak middels microscopische analyses.

Voor het grootste deel van de aangeleverde monsters (94%) kon met DNA detectie een soortenlijst worden gegenereerd, die vervolgens kon worden gebruikt om daarvan waarden voor de ecologische kwaliteitsindexen af te leiden. De door ons gevolgde DNA analyse procedure is dus in een groot aantal waterlichamen en KRW typen goed inzetbaar gebleken om de diatomeeënpopulatie te identificeren.

In navolging van Kelly et al. (2020) concluderen we dat het van belang is voor acceptatie door beleidsmakers om te laten zien dat DNA-identificatie gegevens vergelijkbare informatie opleveren ten opzichte van microscopie-data: dat zijn immers de nu bij iedereen bekende en vertrouwde databronnen. De resultaten van onze studie en van onderzoek elders laten zien dat de vergelijkbaarheid van milieu indicatiewaarden afgeleid uit gegevens verkregen met DNA-analyse en microscopie voldoende is, mede afgezet tegen de normale bandbreedte in indicatie waarden bij inzet van microscopie. Men moet wel accepteren dat beide benaderingen een iets ander beeld van de werkelijkheid geven, waarbij het niet eenvoudig is vast te stellen welk beeld 'goed' of 'beter' is. Het is dan ook denkbaar dat de DNA-data niet altijd tot een overeenkomstige waarde leiden voor kwaliteitsklassen berekend op basis van alleen microscopische data.

### 8.3 Taxonomie-vrije analyse

Ongeveer 5% van de in dit onderzoek gevonden ESVs bleek indicatief voor een bepaalde kwaliteitsklasse (op grond van een met microscopie bepaalde klasse-indeling van locaties). Dit beperkte aandeel in het totale palet aan aangetroffen ESVs is mede het gevolg van de lage frequentie van voorkomen van individuele ESVs (meer dan de helft van alle ESVs zat in slechts één of twee monsters). Een kleine 8% van de ESVs heeft een voorspellende waarde voor de regio waar ze werden aangetroffen.

De taxonomie-vrije aanpak waarbij alle ESVs werden gebruikt gaf in zo'n 50% van de gevallen eenzelfde KRW kwaliteitsklasse indeling als op grond van de microscopische gegevens. Daarmee is deze aanpak vergelijkbaar met de werkwijze waarbij soorten op grond van DNA barcodes werden geïdentificeerd. Als de klassen 'ontoereikend' en 'matig', en de klassen 'goed' en 'zeer goed' werden samengenomen tot twee klassen die evenveel monsters bevatten, was de overeenkomst van de voorspelling 67%. Dat is een redelijke waarde voor het uitvoeren van een quick-scan met een taxonomie-vrije aanpak. In 85% van de gevallen werd ook het juiste watertype (M of R) bepaald. We concluderen uit deze resultaten dat de taxonomievrije aanpak kan worden toegepast als een quickscan.

Er treedt bij gebruik van onze taxonomie-vrije werkwijze met ESVs echter géén beduidend aanvullende verklaring op van de variatie in de dataset ten opzichte van de werkwijze met op DNA gebaseerde soortenlijsten. Dat werd wel verwacht doordat nu ook niet taxonomisch geïdentificeerde ESVs konden bijdragen aan de typering van een kwaliteitsklasse. Kennelijk is in ons geval de kwaliteitsinformatie uit de niet taxonomisch geïdentificeerde ESVs (samen 69% van alle ESVs en 31% van alle reads; zie paragraaf 3.2) niet sterk aanvullend op wat de wél geïdentificeerde ESVs al hebben ingebracht.

## 8.4 Historisch perspectief

Het onderzoek heeft een historisch perspectief opgeleverd van doelstellingen, methoden en resultaten van de belangrijkste rapportages uit de laatste decennia waarbij diatomeeën zijn gebruikt als indicatoren voor de waterkwaliteit. Meestal is de soortensamenstelling van monsters van natuurlijke substraten geanalyseerd door microscopisch onderzoek. De tamelijk grove KRW kwaliteitsscore geeft in het algemeen niet voldoende onderscheid, met andere ecologische indicatiewaarden worden betere resultaten gemeld. De belangrijkste verschillen worden vooral geregistreerd voor zoutgehalte, saprobie (verontreiniging door organisch afbreekbaar materiaal) en aan nutriënten gerelateerde variabelen, in sommige gevallen ook verdroging.

Recente ontwikkelingen in DNA-technologie maken snellere en goedkopere identificatie mogelijk, waarbij ook meer differentiatie in kwaliteitsscores optreedt dan met de KRW-kwaliteitsscore. Hierdoor zijn diatomeeën dus een waardevol instrument voor waterkwaliteitsbeheerders en -gebruikers. Hun toepassing biedt inzicht in zowel actuele als historische watercondities en helpt bij effectief reageren op milieuveranderingen.

## 8.5 Case studies

De vele voorbeelden van case studies geven een uitgebreide indruk van mogelijke diagnostische toepassingen van milieu-informatie zoals die door diatomeeën kan worden ontsloten. De inzet van DNA analyse geeft daarbij in principe een grote versnelling van de doorlooptijd tussen monsternamen en beschikbaar komen van de gegevens.

De inzet van de gebruikte indexen leidde in de quick-scans niet heel vaak tot bijzondere inzichten. Dat kan betekenen dat de meeste voorbeelden te weinig verschillende milieucondities hadden, dan wel dat uitgevoerde maatregelen geen effecten teweeg hebben gebracht. En ook te beperkt aantal monsters kan hier de oorzaak van zijn. De kracht van de inzet van DNA-detectie ligt onder andere óók in het beter kostentechnisch mogelijk maken van een meer gedetailleerd beeld in ruimte en tijd.

Het gebruik van histogrammen waarin de relatieve bijdragen van de onderliggende indexwaarden aan de gemiddelde waarde van een Van Dam-index worden weergegeven, biedt duidelijk aanvullende informatie en dus meer potentie voor diagnostiek dan het gebruik van de gemiddelde waarden alleen. Verschuivingen in soortengroepen c.q. hun Van Dam-index bijdragen laten soms namelijk eerder een ontwikkeling zien dan op basis van alleen de gemiddelde waarde van de Van Dam-index valt af te leiden.

De IPS- en de Van Dam-indexen vullen elkaar aan in de informatie die ze halen uit de aanwezige diatomeeën gemeenschap. Met name de Van Dam-indexen voor pH, saliniteit en vochtcondities vertonen een duidelijk minder sterke relatie met de IPS-index. De andere vier indexen hangen meer samen met organische belasting en voedselrijkdom, en geven naast de meer algemene indruk van de IPS, aanvullende informatie over daarmee samenhangende zuurstof condities en wijze van organische stikstofopname.

## 8.6 Aanbevelingen

De effectiviteit en betrouwbaarheid van DNA analyse van diatomeeën is ondertussen genoegzaam aangetoond in dit onderzoek en in diverse onderzoeken elders in Europa en daarbuiten. De inzet van DNA als instrument geeft een ander perspectief op vraagstukken rond taxonomie en abundantie dan vanuit de traditionele methoden. Het lijkt echter niet zinvol meer om te blijven zoeken naar een perfecte overeenkomst in analyse resultaten met beide benaderingswijzen, omdat beide methoden andere voordelen en beperkingen hebben. Het is daarom beter om DNA-resultaten vanuit de aquatische levensgemeenschap op een deels andere manier te gaan interpreteren. Dat

maakt een herziene calibratie en validatie van fysisch-chemisch en biotische milieu-informatie enerzijds en DNA-resultaten anderzijds belangrijk, zoals momenteel gebeurt met de EBEO 2.0 Database Ecologische Beoordeling (Stowa, 2024). Daarbij moet beslist worden voortgebouwd op het fundament aan kennis zoals verworven met traditionele monitoring. Het is daarom aanbevelingswaardig om de diatomeeëndetectie met DNA-analyses in te gaan zetten als routinematige monitoringsmethode alsook in waterkwaliteitsonderzoek. Daarmee komt een snelle, laagdrempelige en goedkope methode beschikbaar voor de waterbeheerder.

De verdere groei van de DNA referentie bibliotheek voor taxa moet worden gestimuleerd om zo de invloed van daarin besloten beperkingen voor op DNA gebaseerde IPS scores doen verminderen. Niettemin zullen er hoogstwaarschijnlijk binnen diatomeeën-taxa altijd meerdere DNA barcodes (ESVs) blijven voorkomen, elk met hun eigen milieu indicaties. En ook nog niet tot taxa identificeerbare ESVs zullen blijven opduiken. Het taxonomie-vrije traject uit dit onderzoek heeft geleid tot een kleine honderd ESVs die een indicatie geven van de waterkwaliteit. Een taxonomie-vrije aanpak vereist voor een goede toepasbaarheid nog wel een veel groter aantal ESVs gekoppeld aan KRW-kwaliteitsklassen dan nu het geval is. De ontwikkeling hiervan wordt geholpen door diatomeeën ESVs vanaf nu ook te gaan identificeren in relatie tot regulier verzamelde waterkwaliteitsgegevens.

Het lijkt dan ook waardevol om naast de huidige taxonomische determinatie van diatomeeën standaard de ESV-analyse mee te gaan nemen voor zowel de stromende als de stilstaande wateren om de Diatomeeën Biosensor methodiek verder door te ontwikkelen. Beide methoden zijn complementair en maken een betere diagnose en beoordeling van de waterkwaliteit mogelijk. ESVs zijn ook los van hun eventuele taxonomische duiding, te koppelen aan milieucondities en waterkwaliteit. Daarmee zullen veel meer diatomeeën 'taxa' gebruikt kunnen worden voor kwaliteitsindicatie en hoeven taxonomische vraagstukken de inzetbaarheid van milieu-informatie uit de wereld van diatomeeën niet te bemoeilijken.

Diatomeeën kunnen een grote hoeveelheid informatie verschaffen over aquatische milieu-omstandigheden, en door hun snelle levenscyclus bieden ze daarbij ook een relatief snelle en gevoelige thermometer functie, ook ten opzichte van andere organismen zoals waterplanten en vissen die minder snel reageren. De verwachte kostenefficiëntie van deze techniek maakt het daarnaast voorstelbaar dat de ruimtelijke en temporele resolutie van monitoring (eindelijk) de complexiteit van onze aquatische ecosystemen goed kan beschrijven. Daarmee zal de diagnostiek van verslechterde waterkwaliteit verbeteren, zodat meer accurate maatregelen voor inrichting en beheer kunnen worden genomen. Het is bovendien gezien de dalende beschikbare capaciteit aan menskracht met kennis van zaken over diatomeeën identificatie van groot belang dat de huidige generatie specialisten haar kennis en kunde zo efficiënt mogelijk kan inzetten en overdragen. Daarbij is het nu voortvarend inzetten van DNA als detectiemethode essentieel.

## 9 Referenties

- Almeida, S.F.P., Elias, C., Ferreira, J., Tornés, E., Puccinelli, C., Delmas, F., Dörflinger, G., Urbanič, G., Marcheggiani, S., Rosebery, J., Mancini, L. & Sabater, S., 2014. Water quality assessment of rivers using diatom metrics across Mediterranean Europe: A methods intercalibration exercise, *Sci. Total Env.* 476-477: 768-776. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.144>
- Apothéloz-Perret-Gentil, L., Cordonier, A., Straub, F., Iseli, J., Esling, P. & Pawlowski, J., 2017. Taxonomy-free molecular diatom index for high-throughput eDNA biomonitoring. *Mol. Ecol. Res.*, 17:1231–1242. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12668>
- Apothéloz-Perret-Gentil, L., Bouchez, A., Cordier, T., Cordonier, A., Guéguen, J., Rimet, F., Vasselon, V. & Pawlowski, J., 2021. Monitoring the ecological status of rivers with diatom eDNA metabarcoding: A comparison of taxonomic markers and analytical approaches for the inference of a molecular diatom index. *Molec. Ecol.* 30: 2959-2968, <https://doi.org/10.1111/mec.15646>
- Aukema, R., Lemmers, P., van Maanen, B., Pex, B. & Hermans, J., 2022. Onderzoek naar het effect van de bever op het ecosysteem en de doelsoorten van de Roode Beek in de Meinweg 2017-2021. *Rapport Natuurbalans - Limes Divergens*.
- Baillet, B., Apothéloz-Perret-Gentil, L., Baričević, A., Chonova, T., Franc, A., Frigerio, J.-M., Kelly, M., Mora, D., Pfannkuchen, M., Proft, S., Ramon, M., Vasselon, V., Zimmermann J. & Kahlert, M., 2020. Diatom DNA metabarcoding for ecological assessment: Comparison among bioinformatics pipelines used in six European countries reveals the need for standardization. *Sci. Total Env.* 745: 140948. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140948>
- Beentjes, K.K., Speksnijder, A.G.C.L., Schilthuisen, M., Hoogeveen M. & van der Hoorn, B.B., 2019. The effects of spatial and temporal replicate sampling on eDNA metabarcoding. *PeerJ* 2019. <https://doi.org/10.7717/peerj.7335>
- Beentjes, K.K., 2020. DNA-technieken voor waterbeheerders. Stowa Deltafact, <https://www.stowa.nl/deltafacts/waterkwaliteit/diversen/dna-technieken-voor-waterbeheerders>.
- Beentjes, K.K., 2024. TKI Diatom NGS Protocol. Online op Protocols.io. <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.6qpvr8k4plmk/v1>
- Besse-Lototskaya, A., Verdonschot, P.F.M. & Sinkeldam, J.A., 2006. Uncertainty in diatom assessment: Sampling, identification and counting variation. In: Furse, M.T., Hering, D., Brabec, K., Buffagni, A., Sandin L. & Verdonschot, P.F.M., (eds) *The Ecological Status of European Rivers: Evaluation and Intercalibration of Assessment Methods*. Developments in Hydrobiology, vol 188. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5493-8\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5493-8_17)
- Borrego-Ramos, M., Bécares, E., García, P., Nistal, A. & Blanco, S., 2021. Epiphytic diatom-based biomonitoring in mediterranean ponds: traditional microscopy versus metabarcoding approaches. *Water* 13, 1351, <https://doi.org/10.3390/w13101351>
- Bruce, K., Blackman, C., Bourlat, S.J., Hellström, M., Bakker, J., Bista, I., Bohmann, K., Bouchez, A., Brys, R., Clark, K., Elbrecht, V., Fazi, S., Fonseca, V.G., Hänfling, B., Leese, F., Mächler, E., Mahon, A.R., Meissner, K., Panksep, K. ... Deiner, K., 2021. *A practical guide to DNA-based methods for biodiversity assessment*. Pensoft.
- Bruder, K., & Medlin, L., 2007. Molecular assessment of phylogenetic relationships in selected species/genera in the naviculoid diatoms (Bacillariophyta). I. The genus *Placoneis*. *Nova Hedwigia*, 85: 331-352. <https://doi.org/10.1127/0029-5035/2007/0085-0331>
- Buchner, D., Macher, T. H., & Leese, F., 2022. APSCALE: advanced pipeline for simple yet comprehensive analyses of DNA metabarcoding data. *Bioinformatics*, 38: 4817-4819. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac588>
- Cáceres, M.D. & Legendre, P., 2009. Associations between species and groups of sites: indices and statistical inference. *Ecology*, 90: 3566-3574. <https://doi.org/10.1890/08-1823.1>

- Cordier, T., Forster, D., Dufresne, Y., Martins, C.I.M., Stoeck, T. & Pawlowski, J., 2018. Supervised machine learning outperforms taxonomy-based environmental DNA metabarcoding applied to biomonitoring. *Mol. Ecol. Res.* 18: 1381-1391. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12926>
- Coste, M., 1982. Résultats des recherches entreprises – les Diatomées. Hoofdstuk 4.1 in Cemagref, 1982. *Étude des Méthodes Biologiques d'Appréciation Quantitative de la Qualité des Eaux*. Ministère de l'Agriculture, Cemagref, Division Qualité des Eaux/Pêche et Pisciculture, Lyon—Agence Française de Bassin Rhône-Méditerranée-Corse.
- Coste, M. & Ector, L., 2000. Diatomées invasives exotiques ou rares en France: principales observations effectuées au cours des dernières décennies. *Systematics and Geography of Plants* 70: 373-400. <https://doi.org/10.2307/3668651>
- van Dam, H. & Mertens, A., 1993. Kiezelwieren op herbariummateriaal als referentie voor waterkwaliteit. *De Levende Natuur* 94: 22-227.
- van Dam, H. & Mertens, A., 2020. Kiezelwieren geven aan: zwavel en stikstof houden vennen in de greep. *Vakblad Natuur Bos & Landschap* 170: 14-17.
- van Dam, H., Mertens, A. & Sinkeldam, J., 1994. A coded checklist and ecological indicator values of freshwater diatoms from The Netherlands. *Neth. J. Aquat. Ecol.* 28: 117-133. <https://doi.org/10.1007/BF02334251>
- van Dam, H., Mertens, A. & Van der Wal, J., 2018. Veranderingen in de soortensamenstelling van kiezelwieren in vennen bij Oisterwijk en Boxtel. *De Levende Natuur* 119: 64-67.
- Dijkstra, N., 2022. Monitoringsplan Natuurwater vol Leven – Oostbroek. Hoogheemraadschap de Stichtse Rijnlanden.
- STOWA, 2024. EBEO 2.0. Actualisering Van Dam index (diatomeeën). <http://www.stowa.nl/ebeco>.
- Evers, C.H.M., Knobens, R.A.E. & van Herpen, F.C.J., 2018. Omschrijving MEP en maatlatten voor sloten en kanalen voor de Kaderrichtlijn Water 2021-2027. *Stowa* 2018-50.
- Falasco, E., Ector, L., Wetzel, C.E., Badino, G. & Bona, F., 2021. Looking back, looking forward: a review of the new literature on diatom teratological forms (2010-2020). *Hydrobiologia* 848: 1675-1753. <https://doi.org/10.1007/s10750-021-04540-x>
- Franken, R.J.M., Gardeniers, J.J.P. & Peeters, E., 2006. Handboek Nederlandse ecologische beoordelingssystemen (EBEO-systemen), Deel A. *STOWA-rapport 2006-4*.
- Feio, M.J., Serra, S.R.Q., Mortágua, A., Bouchez, A., Rimet, F., Vasselon, V. & Almeida, S.F.P., 2020. A taxonomy-free approach based on machine learning to assess the quality of rivers with diatoms. *Sci Tot Env* 722. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137900>
- Goldenberg Vilar, A., Vonk, J.A., Van Dam, H., W. Admiraal & Van der Geest, H.G., 2014. Typology of diatom communities in the Dutch delta: Recognizing patterns of environmental drivers in nutrient rich ditches. *Ecological Indicators* 45: 561-569. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.05.016>
- Gregersen, R., Pearman, J.K., Atalah, J., Waters, S., Vandergoes, M.J., Howarth, J.D., Thomson-Laing, G., Thompson, L. & Wood, S.A., 2023. A taxonomy-free diatom eDNA-based technique for assessing lake trophic level using lake sediments. *J. Env. Manage.* 345: 118885, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.118885>
- Guo, L., Sui, Z., Zhang, S., Ren, Y. & Liu, Y., 2015. Comparison of potential diatom 'barcode' genes (the 18S rRNA gene and ITS, COI, rbcL) and their effectiveness in discriminating and determining species taxonomy in the Bacillariophyta. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65: 1369-1380, <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000076>
- Hamsher, S.E., Evans, K.M., Mann, D.G., Poulíčková, A. & Saunders, G.W., 2011. Barcoding Diatoms: Exploring Alternatives to COI-5P. *Protist* 162: 405-422, <https://doi.org/10.1016/j.protis.2010.09.005>
- Hootsmans, M., Beentjes, K., van der Hoorn, B. & van der Wal, J., 2021. Gebruik van DNA voor inzicht in biologische waterkwaliteit met diatomeeën. *H2O-Online* 10 november 2021.
- Jaspers, M., Cremer, H., Van Ee, G., de Graaf, B., Van der Oost, R., Schuren, F. & Van den Wijngaart, T., 2012. Hydrochip: de toekomst van de monitoring, de monitoring van de toekomst. *STOWA-rapport 2012-39*.
- Kahlert, M., Kelly, M., Albert, R.-L., Almeida, S.F.P., Bešta, T., Blanco, S., Coste, M., Denys, L., Ector, L., Fránková, M., Hlúbíková, D., Ivanov, P., Kennedy, B., Marvan, P., Mertens, A., Miettinen, J., Picinska-Faltynowicz, J., Rosebery, J., Tornés, E., Vilbaste, S. & Vogel, A., 2012. Identification versus counting protocols as sources of

- uncertainty in diatom-based ecological status assessments. *Hydrobiologia* 695: 109-124.  
<https://doi.org/10.1007/s10750-012-1115-z>
- Kahlert, M., Bailet, B., Chonova, T., Karjalainen, S.M., Schneider, S.C. & Tapolczai, K., 2021. Same same, but different: The response of diatoms to environmental gradients in Fennoscandian streams and lakes - barcodes, traits and microscope data compared. *Ecological Indicators* 130(108088).  
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.108088>
- Keck, F., Vasselon, V., Rimet, F., Bouchez, A. & Kahlert, M., 2018. Boosting DNA metabarcoding for biomonitoring with phylogenetic estimation of operational taxonomic units' ecological profiles. *Molec Ecol. Res.* 18: 1299-1309. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12919>
- Kelly, M.G., 2013. Data rich, information poor? Phytobenthos assessment and the Water Framework Directive. *Eur. J. Phycol.*, 48: 437-450, <https://doi.org/10.1080/09670262.2013.852694>
- Kelly, M.G., Bayer, M.M., Hürlimann J. & Telford, R.J., 2002. Human error and quality assurance in diatom analysis. In: H. du Buf & M.M. Bayer (Eds), *Automatic diatom identification*. World Scientific, Series in machine perception & artificial intelligence 51, pp 75-91. [https://doi.org/10.1142/9789812777867\\_0005](https://doi.org/10.1142/9789812777867_0005).
- Kelly, M., Bennion, H., Burgess, A., Ellis, J., Juggins, S., Guthrie, R., Jamieson, J., Adriaenssens V. & Yallop, M., 2009. Uncertainty in ecological status assessments of lakes and rivers using diatoms. *Hydrobiologia* 633: 5–15.  
<https://doi.org/10.1007/s10750-009-9872-z>
- Kelly, M., Juggins, S., Guthrie, R., Pritchard, S., Jamieson, J., Rippey, B., Hirst, H. & Yallop, M., 2008. Assessment of ecological status in U.K. rivers using diatoms. *Freswat. Biol.* 53: 403-422. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2007.01903.x>
- Kelly, M.G., Juggins, S., Mann, D.G., Sato, S., Glover, R., Boonham, N., Sapp, M., Lewis, E., Hany, U., Kille, P., Jones, T. & Walsh, K., 2020. Development of a novel metric for evaluating diatom assemblages in rivers using DNA metabarcoding. *Ecol. Indic.* 118: 106725. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106725>
- Kelly, M., Urbanic, G., Acs, E., Bennion, H., Bertrin V., Burgess, A., Denys, L., Gottschalk, S., Kahlert, M., Karjalainen, S.M., Kennedy, B., Kosi, G., Marchetto, A., Morin, S., Picinska-Fatynowicz, J., Poikane, S., Rosebery, J., Schoenfelder, I., Schoenfelder J. & Varbiro, G., 2014. Comparing aspirations: intercalibration of ecological status concepts across European lakes for littoral diatoms. *Hydrobiol.* 734:125–141,  
<https://doi.org/10.1007/s10750-014-1874-9>
- Kirilova, E.P., 2009. Natural and human induced trophic changes in European lowland lakes. [Ph.D.-thesis Universiteit Utrecht](#).
- Kleppe, R., 2021. Relatie natuurvriendelijke oevers en juveniele vis. Notitie ATKB 20210658.
- Klink, A.G., 1983. Een oriënterend onderzoek aan de sedimenten van het Groot Huisven (Noord-Brabant). *Rapporten en Mededelingen Hydrobiologisch Adviesbureau ir. A.G. Klink* 4: 1-5.
- Kuhn, M., 2008. Building predictive models in R using the caret package. *Journal of statistical software*, 28, 1-26.  
<https://doi.org/10.18637/jss.v028.i05>
- Lange-Bertalot, H., Hofmann, G., Werum, W. & Cantonati, M., 2017. *Freshwater benthic diatoms of central Europe*. Koeltz Botanical Books.
- Lavoie, I., Somers, K.M., Paterson A.M. & Dillon, P.J., 2005. Assessing scales of variability in benthic diatom community structure. *J. Appl. Phycol* 17: 509–513. <https://doi.org/10.1007/s10811-005-9001-y>
- Lecoq, C., Coste, M. & Prygiel, J., 1993. Omnidia: a software for taxonomy, calculation of diatom indices and inventories management. *Hydrobiologia* 269/270: 509-514. <https://doi.org/10.1007/BF00028048>
- van der Lee, G.H., Polling, M., van der Laan, I., Kodde, L. & Verdonchot, R.C.M., 2024. From DNA to diagnostics: a case study using macroinvertebrate metabarcoding to assess the effectiveness of restoration measures in a Dutch stream. *Sci. Total Env.* 923: 171413. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.171413>
- Lenoir, A. & Coste, M., 1996. [Development of a practical diatom index of overall water quality applicable to the French national water Board network](#). In: Whitton, B.A., Rott, E. (Eds.), *Use of Algae for Monitoring Rivers*, vol. II. Innsbruck, Austria 17–19 September 95, Studia Student, GmbH, pp. 29–43.

- Lotter, A., Pienitz, R. & Schmidt, R., 2010. Diatoms as indicators of environmental change in subarctic and alpine regions. In: Stoermer, E.F. & J.P. Smol. The diatoms (pp. 231-248). Cambridge University Press.  
<https://doi.org/10.1017/CBO9780511763175.013>
- Mandemakers, J.J., 2024. Waterinfiltratieproject Lange Weide. Expert review waterkwaliteit en ecologie. Notitie Witteveen+Bos 138118/24-000.028.
- van der Molen, D.T., Pot, R., Evers, C.H.M., Buskens, R. & van Herpen, F.C.J., 2013. Referenties en maatlatten voor overige wateren (geen KRW-waterlichamen). *Stowa 2013-14*.
- van der Molen, D.T., Pot, R., Evers, C.H.M., van Herpen, F.C.J. & van Nieuwerburgh, L.L.J., 2018. Referenties en maatlatten voor natuurlijke watertypen voor de Kaderrichtlijn Water 2021-2027. *Stowa 2018-49, versie juni 2020*.
- Mortágua, A., Vasselon, V., Oliveira, R., Elias, C., Chardon, C., Bouchez, A., Rimet, F., João Feio, M. & Almeida, S.F.P., 2019. Applicability of DNA metabarcoding approach in the bioassessment of Portuguese rivers using diatoms. *Ecol. Indic.* 106: 105470, <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105470>
- Munteanu, N., 2023. A diatom spring. <https://themeaningofwater.com>.
- Nicolosi Gelis, M.M., Canino, A., Bouchez, A., Domaizon, I., Laplace-Treytore, C., Rimet, F. & Alric, B., 2024. Assessing the relevance of DNA metabarcoding compared to morphological identification for lake phytoplankton monitoring. *Sci. Tot. Env.* 914: 169774. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.169774>
- Oksanen, J., Simpson, G., Blanchet, F., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P., O'Hara, R., Solymos, P., Stevens, M., Szoecs, E., Wagner, H., Barbour, M., Bedward, M., Bolker, B., Borcard, D., Carvalho, G., Chirico, M., de Caceres, M., Durand, S., Evangelista, H., FitzJohn, R., Friendly, M., Furneaux, B., Hannigan, G., Hill, M., Lahti, L., McGlenn, D., Ouellette, M., Ribeiro Cunha, E., Smith, T., Stier, A., Ter Braak, C. & Weedon, J., 2022. *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.6-2, <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Poikane, S., Kelly, M. & Cantonati, M., 2016. Benthic algal assessment of ecological status in European lakes and rivers: challenges and opportunities. *Sci. Tot. Environ.* 568: 603-613.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.02.027>
- Passy, S., 2007. Diatom ecological guilds display distinct and predictable behavior along nutrient and disturbance gradients in running waters. *Aquatic Botany* 86: 171-178F. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquabot.2006.09.018>
- Pérez-Burillo, J., Trobajo, R., Vasselon, V., Rimet, F., Bouchez, A. & Mann, D.G., 2020. Evaluation and sensitivity analysis of diatom DNA metabarcoding for WFD bioassessment of Mediterranean rivers. *Sci. Tot. Env.*, 727: 138445. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138445>
- Pouličková, A. & Manoylov, K., 2019. Ecology of freshwater diatoms - current trends and applications. In: J. Seckbach & R. Gordon (Eds) *Diatoms: Fundamentals & application* (pp. 289-310). Scrivener-Wiley.
- Rimet, F. & Bouchez, A., 2011. Use of diatom life-forms and ecological guilds to assess pesticide contamination in rivers: Lotic mesocosm approaches. *Ecological Indicators* 11: 489-499.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2010.07.004>
- Rimet, F., Chaumeil, P., Keck, F., Kermarrec, L., Vasselon, V., Kahlert, M., ... & Bouchez, A., 2016. R-Syst:: diatom: an open-access and curated barcode database for diatoms and freshwater monitoring. Database, 2016.  
<https://doi.org/10.1093/database/baw016>
- Rimet, F., Gusev, E., Kahlert, M., Kelly, M.H., Kulikovskiy, M., Maltsev, Y., Mann, D.G., Pfannkuchen, M., Trobajo, R., Vasselon, V., Zimmermann, J. & Bouchez, A., 2019. Diat.barcode, an open-access curated barcode library for diatoms. *Sci. Rep.* 9:15116, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51500-6>
- Rivera, S.F., Vasselon, V., Jacquet, S., Bouchez, A., Ariztegui, D. & Rimet, F., 2018. Metabarcoding of lake benthic diatoms: from structure assemblages to ecological assessment. *Hydrobiologia* 807: 37-51,  
<https://doi.org/10.1007/s10750-017-3381-2>
- Stolk, A.H., Kuipers, F. & de Ruiter, H., 2021. Monitoringsplan Nieuwe Dordtse Biesbosch. Rapport waterschap Hollandse Delta.
- Stoof-Leichsenring, K. R., Epp, L. S. & Trauth, M.H., 2012. Hidden diversity in diatoms of Kenyan Lake Naivasha: a genetic approach detects temporal variation, 1918–1930. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2011.05412.x>



- Stowa, 2010. [Handboek Hydrobiologie deel 2. Biologisch onderzoek voor de ecologische beoordeling van Nederlandse zoete en brakke oppervlaktewateren.](#)
- Vasselon, V., Bouchez, A., Rimet, F., Jacquet, S., Trobajo, R., Corniquel, M., Tapolczai, K. & Domaizon, I., 2018. Avoiding quantification bias in metabarcoding: Application of a cell biovolume correction factor in diatom molecular biomonitoring. *Methods Ecol Evol.* 2018;9:1060–1069, <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12960>
- Vasselon, V., Rimet, F., Tapolczai, K. & Bouchez, A., 2017. Assessing ecological status with diatoms DNA metabarcoding: Scaling-up on a WFD monitoring network (Mayotte island, France). *Ecol. Indic.* 82: 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.06.024>
- Verweij, G., Wanink, J.H. & Kouwets, F.A.C., 2015. As time goes by - Veranderingen in soortconcepten in relatie tot analyseprotocollen en ecologische beoordelingen. *Diatomededelingen* 39: 19-27.
- Werner, P., Adler, S. & Dreßler, M., 2016. Effects of counting variances on water quality assessments: implications from four benthic diatom samples, each counted by 40 diatomists. *J. Appl. Phycol.* 28: 2287-2297. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0760-9>
- van Zuilichem, H., Peeters, E. & van der Wal, J., 2016. Diatomeeën als indicator voor waterkwaliteit nabij rwzi's? [H2O-Online 9 december 2016.](#)



# I Locaties, IPS en Van Dam index gegevens

Voor toekomstig gebruik van de beschikbare gegevens is er voor gekozen om deze niet integraal op te nemen als tabellen in deze Bijlage. De bestanden zijn verspreid onder de contactpersonen van de deelnemende waterschappen en waterschapslaboratoria.

De bestanden zijn uitgevoerd als Excel tabellen met daarin: de locatie codes (labcode, waterschapscode, waterschap, KRW type), en per locatie de IPS resultaten voor microscopie, Miseq en Novaseq (combi, ethanol en schraap; alle IPS waarden op basis van IPS berekening met gebruik van abundanties en aan/afwezigheid), en de Van Dam index resultaten voor microscopie, Miseq en Novaseq (combi, ethanol en schraap); per Van Dam index de aantallen barcodes per indicatiewaarde, en de gemiddelde Van Dam index waarde.

De barcode data zijn opgeslagen en opvraagbaar bij Naturalis.

## II Indicatoren analyse van alle ESVs

In onderstaande tabel zijn alle ESVs opgenomen die indicatief waren voor een bepaalde kwaliteitsklasse, met daarbij de determinatie (waar mogelijk) op basis van de Diat.barcode v11.1 database (Rimet et al, 2019). en GenBank (wanneer de identificatie alleen met GenBank werd gemaakt, is dat aangegeven). Ook de waarde voor de specificiteit (de kans dat een monster tot een bepaalde klasse behoort als deze ESV gevonden wordt) en de sensitiviteit (de kans dat een ESV wordt gevonden in een monster van een bepaalde klasse) zijn opgenomen, alsmede de algehele indicatorwaarde en de significantie (alle niet-significante observaties met  $p > 0,05$  zijn weggelaten).

NB: een aantal hieronder genoemde ESVs zijn als soort marien (*Haslea sp*) en zijn dan ook verwijderd uit de dataset die is gebruikt voor de diverse analyses met IPS en Van Dam indexen. Ook staat een bepaalde ESV als indicator voor 'goede' kwaliteit benoemd terwijl deze als soort juist een indicator voor vervuiling is (*Fistulifera saprophila*; mond. med. Jako van der Wal, AQUON). Dit geeft aan dat er nog wel discrepantie is tussen de morfologisch bepaalde soortenlijsten en de daaraan gekoppelde DNA barcodes.

Klasse	ESV	Identificatie	Specificiteit	Sensitiviteit	Indicatorwaarde	p-waarde
Ontoereikend	ESV_68	<i>Navicula veneta</i>	0,8049	0,6875	0,744	0,002
Ontoereikend	ESV_156	<i>Nitzschia supralitorea</i>	0,8766	0,375	0,573	0,005
Ontoereikend	ESV_184	<i>Planothidium victori</i>	0,82	0,375	0,555	0,003
Ontoereikend	ESV_72	<i>Eunotia</i>	0,5704	0,5	0,534	0,017
Ontoereikend	ESV_44	<i>Gomphonema parvulum</i>	0,6759	0,375	0,503	0,003
Ontoereikend	ESV_1106	<i>Gedaniella</i> (GenBank)	1	0,25	0,5	0,001
Ontoereikend	ESV_192	<i>Cylindrotheca closterium</i>	0,9998	0,25	0,5	0,001
Ontoereikend	ESV_537	<i>Navicula perminuta</i>	0,9949	0,25	0,499	0,001
Ontoereikend	ESV_134	no identification	0,8617	0,25	0,464	0,008
Ontoereikend	ESV_1049	no identification	0,9987	0,1875	0,433	0,002
Ontoereikend	ESV_1241	<i>Bacillariophyta</i> (GenBank)	1	0,1875	0,433	0,001
Ontoereikend	ESV_1603	<i>Fragilariales</i> (GenBank)	1	0,1875	0,433	0,001
Ontoereikend	ESV_291	<i>Nitzschia aurariae</i>	0,9998	0,1875	0,433	0,001
Ontoereikend	ESV_425	<i>Nitzschia laevis / pusilla</i>	0,9998	0,1875	0,433	0,001
Ontoereikend	ESV_620	no identification	1	0,1875	0,433	0,002
Ontoereikend	ESV_708	<i>Tryblionella hungarica</i>	1	0,1875	0,433	0,001
Ontoereikend	ESV_98	<i>Fragilaria</i>	0,9988	0,1875	0,433	0,037
Ontoereikend	ESV_623	<i>Navicula perminuta</i>	0,9909	0,1875	0,431	0,002
Ontoereikend	ESV_402	<i>Navicula</i>	0,9563	0,1875	0,423	0,026
Ontoereikend	ESV_1163	<i>Navicula gregaria</i>	0,946	0,1875	0,421	0,001
Ontoereikend	ESV_422	<i>Sellaphora</i>	0,9387	0,1875	0,42	0,012
Ontoereikend	ESV_980	<i>Bacillariophyta</i>	0,9263	0,1875	0,417	0,002
Ontoereikend	ESV_674	<i>Nitzschia inconspicua</i>	0,9001	0,1875	0,411	0,003

Ontoereikend	ESV_642	<i>Craticula cuspidata</i>	0,8762	0,1875	0,405	0,015
Ontoereikend	ESV_1006	<i>Eukaryota</i> (GenBank)	0,8672	0,1875	0,403	0,003
Ontoereikend	ESV_571	<i>Nitzschia amphibia</i>	0,8433	0,1875	0,398	0,009
Ontoereikend	ESV_325	<i>Nitzschia palea</i>	0,7504	0,1875	0,375	0,01
Ontoereikend	ESV_1056	<i>Haslea</i>	1	0,125	0,354	0,015
Ontoereikend	ESV_1088	<i>Navicula</i> (GenBank)	1	0,125	0,354	0,015
Ontoereikend	ESV_1189	<i>Navicula</i> (GenBank)	1	0,125	0,354	0,015
Ontoereikend	ESV_1228	<i>Planothidium</i>	1	0,125	0,354	0,015
Ontoereikend	ESV_1234	<i>Navicula perminuta</i>	1	0,125	0,354	0,015
Ontoereikend	ESV_1265	<i>Nitzschia</i> (GenBank)	1	0,125	0,354	0,015
Ontoereikend	ESV_1383	<i>Navicula</i> (GenBank)	1	0,125	0,354	0,015
Ontoereikend	ESV_1437	<i>Chlorococcum</i> (GenBank)	1	0,125	0,354	0,011
Ontoereikend	ESV_1529	<i>Haslea howeana</i>	1	0,125	0,354	0,015
Ontoereikend	ESV_1643	<i>Bacillariophyceae</i> (GenBank)	1	0,125	0,354	0,015
Ontoereikend	ESV_1801	<i>Melosira</i> (GenBank)	1	0,125	0,354	0,015
Ontoereikend	ESV_1831	<i>Navicula perminuta</i>	1	0,125	0,354	0,015
Ontoereikend	ESV_1876	<i>Fragilariophyceae</i> (GenBank)	1	0,125	0,354	0,015
Ontoereikend	ESV_1886	<i>Bacillariophyta</i> (GenBank)	1	0,125	0,354	0,015
Ontoereikend	ESV_195	<i>Staurosira</i>	0,9998	0,125	0,354	0,016
Ontoereikend	ESV_1983	<i>Bacillariophyta</i> (GenBank)	1	0,125	0,354	0,008
Ontoereikend	ESV_2019	<i>Nitzschia</i> (GenBank)	1	0,125	0,354	0,008
Ontoereikend	ESV_2055	<i>Myrionema</i> (GenBank)	1	0,125	0,354	0,015
Ontoereikend	ESV_2202	<i>Chordariaceae</i> (GenBank)	1	0,125	0,354	0,015
Ontoereikend	ESV_382	<i>Tryblionella</i>	1	0,125	0,354	0,006
Ontoereikend	ESV_404	<i>Halamphora coffeaeformis</i>	1	0,125	0,354	0,009
Ontoereikend	ESV_493	<i>Nitzschia palea</i>	1	0,125	0,354	0,015
Ontoereikend	ESV_669	<i>Navicula gregaria</i>	0,9997	0,125	0,354	0,011
Ontoereikend	ESV_990	<i>Haslea howeana</i>	1	0,125	0,354	0,015
Ontoereikend	ESV_298	<i>Asterionella</i>	0,999	0,125	0,353	0,034
Ontoereikend	ESV_345	<i>Caloneis</i>	0,9989	0,125	0,353	0,008
Ontoereikend	ESV_350	<i>Discostella</i>	0,9992	0,125	0,353	0,013
Ontoereikend	ESV_366	<i>Nitzschia</i>	0,9975	0,125	0,353	0,023
Ontoereikend	ESV_736	<i>Characiopsis</i> (GenBank)	0,9976	0,125	0,353	0,004
Ontoereikend	ESV_741	<i>Sellaphora</i>	0,9987	0,125	0,353	0,022
Ontoereikend	ESV_853	<i>Navicula</i>	0,9993	0,125	0,353	0,005
Ontoereikend	ESV_911	<i>Gedaniella</i>	0,9995	0,125	0,353	0,013
Ontoereikend	ESV_209	<i>Cymbella</i>	0,9907	0,125	0,352	0,022
Ontoereikend	ESV_461	<i>Planothidium</i>	0,991	0,125	0,352	0,031
Ontoereikend	ESV_449	<i>Navicula perminuta</i>	0,9874	0,125	0,351	0,026

Ontoereikend	ESV_583	<i>Navicula phyllepta</i> [1]	0,9879	0,125	0,351	0,009
Ontoereikend	ESV_293	<i>Aulacoseira granulata</i>	0,9696	0,125	0,348	0,017
Ontoereikend	ESV_244	<i>Cymbella</i>	0,96	0,125	0,346	0,041
Ontoereikend	ESV_819	<i>Melosira</i> (GenBank)	0,9524	0,125	0,345	0,009
Ontoereikend	ESV_1509	<i>Craticula ambigua</i>	0,9155	0,125	0,338	0,015
Ontoereikend	ESV_436	<i>Navicula</i>	0,8767	0,125	0,331	0,021
Ontoereikend	ESV_1482	<i>Conticribra weissflogii</i>	0,7892	0,125	0,314	0,022
Ontoereikend	ESV_533	<i>Placoneis</i>	0,687	0,125	0,293	0,046
Matig	ESV_212	<i>Nitzschia draveillensis</i>	0,9093	0,3276	0,546	0,006
Goed	ESV_337	<i>Navicula gregaria</i>	0,9502	0,2128	0,45	0,023
Goed	ESV_285	<i>Amphora pediculus</i>	0,9765	0,1489	0,381	0,03
Goed	ESV_374	<i>Achnantheidium minutissimum / subatomus</i>	0,9957	0,1277	0,357	0,034
Goed	ESV_791	<i>Fistulifera saprophila</i>	1	0,1277	0,357	0,012
Zeer Goed	ESV_24	<i>Achnantheidium minutissimum</i>	0,80458	0,7037	0,752	0,003
Zeer Goed	ESV_35	<i>Achnantheidium minutissimum</i>	0,83013	0,66667	0,744	0,003
Zeer Goed	ESV_105	<i>Eunotia implicata</i>	0,80804	0,40741	0,574	0,001
Zeer Goed	ESV_149	<i>Stephanodiscus</i>	0,90769	0,22222	0,449	0,014
Zeer Goed	ESV_255	<i>Eunotia minor</i>	0,83609	0,22222	0,431	0,016
Zeer Goed	ESV_157	<i>Achnantheidium</i>	0,98565	0,18519	0,427	0,023
Zeer Goed	ESV_194	<i>Nitzschia</i>	0,96691	0,18519	0,423	0,007
Zeer Goed	ESV_238	no identification	0,69174	0,22222	0,392	0,028
Zeer Goed	ESV_380	<i>Nitzschia</i>	0,99863	0,14815	0,385	0,01
Zeer Goed	ESV_333	<i>Eunotia bilunaris</i>	0,90002	0,14815	0,365	0,026
Zeer Goed	ESV_189	<i>Eunotia glacialis</i>	0,89653	0,14815	0,364	0,038
Zeer Goed	ESV_225	<i>Eunotia bilunaris</i>	0,80545	0,14815	0,345	0,049
Zeer Goed	ESV_1050	no identification	0,93387	0,11111	0,322	0,026
Zeer Goed	ESV_331	<i>Eunotia</i> (GenBank)	1	0,07407	0,272	0,034
Zeer Goed	ESV_752	<i>Xanthophyceae</i> (GenBank)	1	0,07407	0,272	0,033
Zeer Goed	ESV_796	<i>Eunotia arcus</i>	1	0,07407	0,272	0,039