



STEFAN KASEMIER
JUNI, 2015

ENVIRONMENTAL DNA: ALTERNATIEF ALS KRW MONITORING VOOR MACROFAUNA?

**AFSTUDEERSCHRIJFTE OVER HET ONDERZOEK NAAR DE EFFECTEN VAN AANGEPASTE MACROFAUNA MAAT-
LATTEN TEN BEHOEVE VAN NIEUWE MONITORINGSMETHODIEKEN, ZOALS ENVIRONMENTAL DNA.**

Environmental DNA: alternatief als KRW monitoring voor macrofauna?

Afstudeerscriptie over het onderzoek naar de effecten van aangepaste macrofauna maatlatten ten behoeve van nieuwe monitoringsmethodieken, zoals environmental DNA

Auteur: Stefan Kasemier
Studentnummer: 911117002
Contact:

In het kader van de studie: Milieukunde
In opdracht van: Royal HaskoningDHV

Begeleiders Hogeschool VHL: Dhr. ir. J.B.J. Huisman
Dhr. dr. M.J. Verkaik

Begeleider Royal HaskoningDHV: Dhr. drs. M. de Haan

Amersfoort: juni, 2015

Wijze van citeren: Kasemier, S.C. (2015). *Environmental DNA: alternatief als KRW monitoring voor macrofauna: Afstudeerscriptie over het onderzoek naar de effecten van aangepaste macrofauna maatlatten ten behoeve van nieuwe monitoringsmethodieken, zoals environmental DNA*. Amersfoort: Royal HaskoningDHV

Foto omslag: eDNA monstername - © Harry Boonstra (Koeman en Bijkerk)

DISCLAIMER: De gebruikte foto's in dit rapport waarvan geen bron wordt vermeld, zijn gemaakt door de auteur van het rapport.

Voorwoord

Voor u ligt mijn afstudeerscriptie 'Environmental DNA: alternatief als KRW-monitoring voor macrofauna'. Een onderzoek naar het effect van het aanpassen van de huidige maatlat voor macrofauna. Deze scriptie heb ik geschreven in het kader van mijn studie Milieukunde. De opdrachtgever hiervoor was Royal HaskoningDHV.

Van februari 2015 tot en met juni 2015 ben ik bezig geweest met het onderzoek en het schrijven van de scriptie. Ik kijk terug op een zeer leerzame en leuke tijd bij Royal HaskoningDHV.

In het begin was ik vooral zoekende naar een geschikte afstudeeropdracht met een toepasselijke onderzoeksvraag. Gelukkig ben ik samen met mijn begeleiders uiteindelijk tot een geschikte afstudeeropdracht gekomen, waar ik veel van geleerd heb, in allerlei opzichten.

Het onderzoeksrapport is geschreven voor deelnemers aan het TKI project eDNA voor aquatische biodiversiteit, medewerkers en studenten van Hogeschool VHL en andere geïnteresseerden.

Bij dezen wil ik graag mijn afstudeerbegeleiders van Hogeschool VHL (Jeroen Huisman en Marco Verkaik) en afstudeerbegeleider vanuit Royal HaskoningDHV (Martin de Haan) bedanken voor de begeleiding die zij mij tijdens dit traject hebben gegeven.

Mijn dank gaat verder uit naar een aantal mensen die mij informatie heeft gegeven en een bijdrage geleverd hebben aan dit rapport: Roel Knoben (RHDHV), Frank van Herpen (RHDHV), Harry Boonstra (Koeman en Bijkerk), Bram Koeze (Stichting EIS), Barbara Gravendeel (Hogeschool Leiden), Kevin Beentjes (Naturalis), Bas Reichert (BaseClear BV), Kees van Bochove (Datura), Arjen de Groot (Alterra), Edwin Kardinaal (KWR Watercycle Research Institute) en Henry Kuipers (Hogeschool VHL).

Ik wens u veel leesplezier toe.

Stefan Kasemier

Amersfoort, juni 2015.

Samenvatting

In het kader van de Kaderrichtlijn Water vormt monitoring een zware belasting voor de jaarlijkse begroting van waterbeheerders. Een goedkopere monitoringsmethode voor het reduceren van kosten is daarom gewenst. Environmental DNA (eDNA) is in potentie geschikt om de huidige monitoring te vervangen. De verwachting is dat met eDNA het niet mogelijk zal zijn om tot op soortniveau te beoordelen, maar tot op genusniveau (geslachtsniveau). Daarnaast is het vaststellen van kwantitatieve gegevens (abundantie) met behulp van eDNA niet mogelijk. De maatlatten in de Kaderrichtlijn Water (KRW) voor macrofauna beoordelen echter tot op soortniveau en maakt gebruik van abundantie, eDNA zal daarom niet direct toegepast kunnen worden. Het doel van dit onderzoek is het effect van het aanpassen van de maatlatscore voor macrofauna te meten, door op genusniveau en zonder invloed van abundantie te beoordelen. Daaruit volgt de onderzoeksvraag: *“Wat is de betrouwbaarheid van het beoordelen van waterkwaliteit op genusniveau en exclusief abundantie?”*

Allereerst worden er twee watertypen gekozen om het gevolg voor de beoordeling van de waterkwaliteit te onderzoeken. De maatlatten zijn voor deze twee watertypen aangepast en de beoordeling, in de vorm van de ecologische kwaliteitsratio (EKR), zijn met elkaar vergeleken. De aanpassing en de beoordeling zijn gedaan met behulp van het meetnetbeheer-programma Dawaco. Pearson correlatie toets in SPSS (statistiek programma) is de gehanteerde methode om de EKR te vergelijken. Naast het bepalen van de correlatie, is de kans dat een monster in de juiste ecologische kwaliteitsklasse blijft een gekozen maat om de betrouwbaarheid te meten. Daarnaast zijn de kosten voor de huidige monitoring en eDNA monitoring met elkaar vergeleken.

KRW-typen M10 en R5 zijn gekozen in dit onderzoek. M10 is een kunstmatig meer-type en R5 is een natuurlijk rivier-type. Daarmee is een groot deel van de KRW gedekt.

Voor M10 zijn er 809 bruikbare monsters geanalyseerd en voor R5 zijn er 2496 bruikbare monsters geanalyseerd. Voor M10 is de correlatie tussen de huidige maatlat en de maatlat op genusniveau zeer sterk ($R=0,949$) en voor R5 is er geen lineair verband gevonden. De kans op juiste classificatie is circa 80% voor M10 en slechts 33% voor R5.

Daarnaast is de correlatie tussen de huidige maatlat en een maatlat zonder invloed van abundantie voor beide KRW-typen uitzonderlijk sterk ($R=0,969$ voor M10 en $R=0,994$ voor R5). De kans op juiste classificatie voor M10 is 89% en voor R5 maar liefst 93%.

Het verschil in kosten tussen beide methoden van monitoring is per monster ruim € 600,- in het voordeel van eDNA monitoring.

Uit bovenstaande resultaten kan de conclusie getrokken dat de betrouwbaarheid van de aangepaste maatlat op genusniveau van M10 goed is, er is een zeer sterk lineair verband aangetoond.

Voor KRW-type R5 kan geconcludeerd worden dat de kwaliteit van het beoordelen niet betrouwbaar is, omdat er geen lineair verband is gevonden.

Het aanpassen van de maatlat zonder invloed van abundantie, is zeer betrouwbaar, het laat een uitzonderlijk sterk verband zien voor beide KRW-typen.

Kosten voor eDNA monitoring zijn een stuk lager dan de kosten van huidige monitoring, met de inzet van eDNA monitoring in de toekomst kunnen kosten voor monitoring van eindgebruikers aanzienlijk gereduceerd worden.

In de loop van het onderzoek is de verwachting van genusniveau bijgesteld naar soortniveau als laagst mogelijk detecteerbare taxonomische niveau. Daarom is het sterk aan te raden om de maatlatten op soortniveau te behouden, maar de invloed van abundantie in de maatlat weg te laten. Dit maakt het mogelijk om eDNA te gebruiken als alternatieve monitoringsmethode.

Het is aan te raden om meer onderzoek te doen naar effecten op de huidige maatlatten, vooral de invloed van de factor KM% bij rivier-typen.

Abstract

Dutch water boards have to deal with very high costs due to monitoring of their water bodies as part of the Water Framework Directive (WFD). A new method of monitoring what can reduce costs is therefore desirable. Environmental DNA (eDNA) is potentially a suitable new method of monitoring and can possibly replace conventional methods. However, eDNA can't directly be applied into metrics for macroinvertebrates, because the expected detectable taxonomic level with eDNA is genus level. Besides, it isn't possible to determine abundances with eDNA. The purpose of this research is to measure the effects of adapting metrics of macroinvertebrates. Adapting metrics means to calculate at a higher taxonomic level (genus level) and removing the influence of abundance in the formula. The following research question is formulated: *"What is the reliability of the calculation of water quality at genus level and without abundance?"*

First of all, metrics are adapted for the calculation of water quality for two types of water. The adapted metric and the existing metric are compared with the ecological quality ratio (EQR). The adaption and calculation are done with a monitoring system, called Dawaco. Pearson correlation test in SPSS (statistics program) is the used method to compare the EQR. Another measure of reliability is the chance a sample stays in the same ecological quality class. Besides, costs are compared for the current monitoring and eDNA monitoring.

The WFD-types M10 en R5 are chosen for this research. M10 is an artificial lake type and R5 is a natural river type. These two types covered the WFD for a big part. For water type M10 809 samples were used for analysis and for water type R5 2496 samples were used for analysis. M10 shows a very strong correlation ($R=0,949$) between the current metric and the metric based on genus level, for R5 is no linear relationship found. The chance for a sample to stay in the same ecological class was 80% for type M10 and just 33% for type R5.

Correlation between current metric and metric based on species level without influence of abundance is for both WFD-types exceptional strong ($R=0,969$ for M10 and $R=0,994$ for R5). The chance for a sample to stay in the same ecological class was 89% for type M10 and 93% for type R5. Difference in costs between both methods of monitoring is more than € 600,- per sample, in advantage of eDNA monitoring.

The above mentioned results lead to a conclusion that there is a very strong linear relationship between the adapted metric and the current metric, it makes it a reliable metric. For WFD-type R5 affects calculation on genus level in a highly negatively way, there is no linear relationship and that makes it unreliable. Adaption of the metric without influence of abundance leads to results that are not very different from the current metric, that makes it a reliable metric. Looking at costs for monitoring of macroinvertebrates with eDNA, it is strongly reducing costs of current monitoring.

During this research, the expected level of detection is revised. Species level is new expected level of detection. Therefore the recommendation is to keep the current metric, but without the influence of abundance. That makes it possible to use eDNA monitoring as alternative for the WFD. Another recommendation is to do more research about the effects on the current metrics, especially the influence of the KM% factor at river-types.

Verklarende woordenlijst

Abundantie	De mate van voorkomen van soorten in een bepaald gebied of in een bepaald volume.
Ecologische kwaliteitsratio (EKR)	De ratio van de waargenomen waarde van een KRW-kwaliteitselement gedeeld door de referentie waarde van dat element. ¹
Environmental DNA (eDNA)	Environmental DNA is een nieuwe methode om de aanwezigheid van soorten in een water aan te tonen. De methode is gebaseerd op het feit dat alle in het water levende dieren via feces, huidcellen en urine DNA in het water achter laten. Door watermonsters te nemen en deze te analyseren op DNA van een doelsoort is het mogelijk de aanwezigheid van een soort in het water aan te tonen zonder dat de soort zelf gevangen hoeft te worden. ²
Environmental DNA metabarcoding	Environmental DNA metabarcoding is vergelijkbaar met environmental DNA barcoding, het verschil is dat een metabarcoding analyse gericht is op een groep soorten en DNA barcoding een analyse voor individuele soorten betreft. (Herder <i>et al.</i> , 2014)
Genus (meervoud: genera)	In de taxonomie is genus (geslacht) een taxonomisch niveau hoger dan soort. En genus is een taxonomisch niveau lager dan familie.
Kaderrichtlijn Water (KRW)	De Kaderrichtlijn Water is een Europese Richtlijn die in december 2000 van kracht is geworden. Het kader geeft een kader voor de bescherming van oppervlaktewater en grondwater. De richtlijn moet ervoor zorgen dat de kwaliteit van het oppervlakte- en grondwater in Europa in 2015 op orde is. ³
Monitoring	Het uitvoeren van metingen met een bepaalde doelstelling en volgens een bepaalde strategie.
Monster	Een aantal taxa uit bijvoorbeeld het water dat gevangen is en bewaard wordt voor nadere analyse.

¹ <http://www.encyclo.nl/begrip/ecologische%20kwaliteitsratio>

² <http://www.environmental-dna.nl/>

³ <http://www.wgs.nl/loket/beleid/kader-richtlijn-0/kader-richtlijn/>

Nucleotide	Een nucleotide is een bouwsteen waaruit DNA moleculen zijn opgebouwd. Een nucleotide bestaat uit drie onderdelen: een stikstofbase, een suikergroep en één of meer fosfaatgroepen. (Alles over DNA, z.d.)
Primer	Een belangrijk onderdeel voor het slagen van de detectie van een soort zo stelt de Groot et al. (2014) is de zogenaamde genetische marker. Deze marker wordt een primer genoemd. Een primer is een klein stukje DNA bestaande uit circa 18 tot 24 basenparen lang (University of Glasgow, 2014).
Probe	Een probe is een klein stuk DNA waarmee op basis van zijn nucleotide samenstelling door middel van hybridisatie een specifiek DNA fragment herkend kan worden.
Sequencing	Sequencing is het bepalen van de volgorde van stikstofbasen (adenine, guanine, cytosine en thymine) in een DNA molecuul.
Soortniveau	Het taxonomische niveau waarop de maatlatten in de Kaderrichtlijn Water zijn gebaseerd. Één taxonomisch niveau lager dan genusniveau.
Taxon (meervoud: taxa)	Een taxon is een taxonomische eenheid of taxonomische groep. Het is een groep organismen, die door een taxonoom geacht wordt een te onderscheiden eenheid te vormen (een taxon kan ook zijn: een groep van taxa van een onderliggend niveau, of een deel van een taxon van een hoger niveau. Er zijn dus niveaus te onderscheiden) ⁴
Taxonomie	De systematische indeling van het planten- en dierenrijk in orden, suborden, families, geslachten en soorten, evenals de (wetenschappelijke) benaming van deze groepen. ⁵
TKI project	Voor elk van de clusters binnen Topsector Water zijn Topconsortia Kennis en Innovatie (TKI) ingericht. Binnen het TKI Watertechnologie werken private partijen en kennisinstituten samen aan onderzoeksprojecten. (Topsector Water, z.d.)

⁴ <https://nl.wikipedia.org/wiki/Taxon>

⁵ <http://www.encyclo.nl/begrip/TAXONOMIE>

Inhoudsopgave

1	Inleiding	13
1.1	Aanleiding.....	13
1.2	Probleemstelling.....	15
1.3	Doelstelling.....	15
1.4	Onderzoeksvragen.....	15
1.5	Leeswijzer	15
2	Achtergrond: Kaderrichtlijn water	16
2.1	Inleiding	16
2.2	Waterlichamen en kwaliteitselementen	17
2.3	Maatlatten.....	17
2.4	Maatlat macrofauna.....	17
3	Onderzoeksmethode.....	20
3.1	Dataverzameling en verwerking.....	20
3.2	Ecologische kwaliteitsratio berekenen.....	23
3.3	Statistische analyse	24
3.4	Kosten eDNA monitoring versus huidige monitoring.....	25
4	Resultaten	26
4.1	Watertypen	26
4.2	Conflicterende genera en scenario's.....	26
4.3	Resultaten M10	28
4.4	Resultaten R5	32
4.5	Overzicht resultaten M10 en R5.....	36
4.6	Kosten vergelijking huidige monitoring versus eDNA monitoring	37
5	Discussie.....	38
6	Conclusie	42
7	Aanbevelingen.....	43
8	Literatuurlijst.....	44

Bijlagen.....	48
Bijlage A Overzicht verdeling meren en rivieren in Stroomgebiedbeheerplannen (SGBP)	49
Bijlage B Conflicterende genera KRW-type M10	50
Bijlage C Conflicterende genera KRW-type R5	51
Bijlage D Scenario's R5	53
Bijlage E Correlatiegrafieken scenario 2 en 3 met abundantie (M10)	54
Bijlage F Correlatiegrafieken scenario 2 en 3 zonder abundantie (M10).....	55
Bijlage G Correlatiegrafieken scenario 2 en 3 met abundantie (R5)	56
Bijlage H Correlatiegrafieken scenario 2 en 3 zonder abundantie (R5)	57
Bijlage I Grafieken juiste classificatie M10	58
Bijlage J Grafieken juiste classificatie R5.....	60
Bijlage K Uitvoer van SPSS	62
Bijlage L Achtergrondinformatie: environmental DNA	66
Bijlage M Soorten met gevalideerde primers.....	76
Bijlage N Watertypen M10 en R5	77

1 Inleiding

In de inleiding zijn de aanleiding (paragraaf 1.1), probleemstelling (paragraaf 1.2), doelstelling (paragraaf 1.3) en onderzoeksvragen (paragraaf 1.4) van het onderzoek beschreven. De leeswijzer van dit rapport staat in paragraaf 1.5.

1.1 Aanleiding

Om de ecologische waterkwaliteit te verbeteren heeft de Europese Unie (EU) de Kaderrichtlijn Water (KRW) ingesteld. Voor de KRW moeten waterbeheerders organismen monitoren. Elk waterlichaam moet minimaal eens in de zes jaar bemonsterd worden op fytoplankton, vegetatie, macrofauna en vis. In de praktijk hanteren waterbeheerders een hogere frequentie en omdat een beheergebied doorgaans enkele tientallen waterlichamen omvat, vormt monitoring een zware belasting voor de jaarlijkse begroting van waterbeheerders. De introductie van een nieuwe monitoringsmethodiek die dergelijke kosten mogelijk kan reduceren is welkom. (KWR Watercycle Research Institute, z.d.) Een nieuwe monitoringsmethode voor het inventariseren van soorten is in ontwikkeling en volgens Bijkerk *et al.* (2013) zou het in potentie een meer betrouwbare, objectieve analyse geven, dat bovenal goedkoper zou kunnen zijn voor de waterbeheerder. Deze methode heet environmental DNA (eDNA).

1.1.1 Environmental DNA

Sinds een aantal jaren is de toepassing van DNA technieken in het milieu gevonden. In feite betekent de term eDNA niets meer dan alle DNA dat los (buiten levende organismen) in het milieu aanwezig is. Organismen laten namelijk kleine stukjes DNA in het water achter via feces, urine en huidcellen. Uit onderzoek blijkt dat eDNA het beste toegepast kan worden in aquatische milieus (Herder *et al.*, 2014; Bijkerk *et al.*, 2013; Helder *et al.*, 2013). Alleen recente aantoning van soorten is mogelijk in water, doordat de afbraaksnelheid van DNA hoog is in aquatische milieus.

Nieuwe technologische ontwikkelingen op het gebied van eDNA maken het mogelijk om in een korte periode de (aquatische) diversiteit in beeld te brengen. Met dergelijke technieken is men op termijn in staat om minimale aantallen van doelsoorten in het milieu op te sporen. Bovendien kunnen met behulp van DNA technieken soorten opgespoord worden die met huidige technieken niet gedetecteerd worden. (KWR Watercycle Research Institute, z.d.)

Een van de beperkingen van eDNA is het niet kunnen vaststellen van kwantitatieve gegevens (De Groot, 2015). Met eDNA is het slechts mogelijk de aan- of afwezigheid van soorten vast te stellen en de kwantiteit van DNA. De kwantiteit van DNA kan niet één op één gerelateerd worden aan de kwantiteit van soorten. Zie bijlage L voor meer achtergrondinformatie over de methode en toepassing van environmental DNA.

1.1.2 TKI project: environmental DNA voor aquatische biodiversiteit

Royal HaskoningDHV werkt mee aan een TKI (Topconsortia Kennis en Innovatie) -project samen met KWR Watercycle Research Institute, Koeman en Bijkerk, Naturalis biodiversity center, Hogeschool Leiden, en Baseclear, zie figuur 1.1. Dit project is in het kader van de Topsector Water:

“Voor elk van de clusters binnen Topsector Water zijn Topconsortia Kennis en Innovatie (TKI) ingericht. Binnen het TKI Watertechnologie werken private partijen en kennisinstituten samen aan onderzoeksprojecten.” (Topsector Water, z.d.)



koeman en bijkerk bv
ecologisch onderzoek en advies

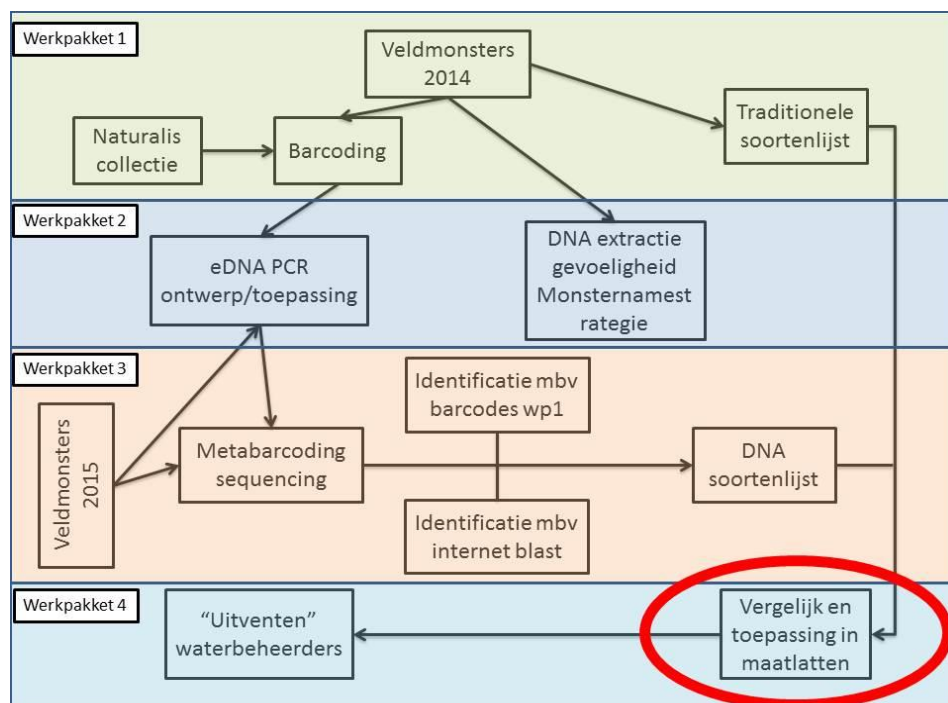


Figuur 1.1. Samenwerkende partners in het TKI project: eDNA voor aquatische biodiversiteit.

Dit project heeft als doel om te komen tot een aantoonbaar werkende alternatieve monitoringsmethodiek voor het inventariseren van aquatische biodiversiteit. Het TKI-project richt zich op de doelsoorten macrofauna en macroflora die genoemd zijn in de KRW. Het resultaat zal uiteindelijk zijn dat eDNA toepasbaar is in de waterbeheerpraktijk.

Het onderzoek richt zich op twee ordes binnen macrofauna (waterwantsen en waterkevers) en waterplantengeslacht Myriophyllum. KRW-type M10 (laagveen vaarten en kanalen) is gekozen als onderzoeksgebied/bemonsteringslocatie gekozen. Dit is één van de meest onderzochte typen waterlichamen in Nederland, waarvan bovendien meetpunten liggen in de nabijheid van alle betrokken partners. (KWR Watercycle Research Institute, z.d.)

In figuur 1.2 is een overzicht weergegeven van de activiteiten binnen het TKI project. Voor het rood omcirkelde deel is Royal HaskoningDHV verantwoordelijk. Deze analyse vindt plaats in het laatste deel van het project, werkpakket 4.



Figuur 1.2. Stroomschema TKI project eDNA en macrofauna (Uit Schriks (2013), aangepast door auteur)

1.2 Probleemstelling

In het TKI project (zoals beschreven in paragraaf 1.1.2) stuurt men aan op de ontwikkeling van een nieuwe monitoringsmethode op basis van DNA die de huidige monitoringsmethode in de KRW kan vervangen. De verwachting is dat genusniveau (geslachtsniveau) het bereikte taxonomische niveau zal zijn. Het is echter onduidelijk wat het gevolg is voor de kwaliteit van beoordelen (van de waterkwaliteit) als er niet meer tot op soortniveau, maar op genusniveau beoordeeld kan worden voor macrofauna.

Met de huidige kennis over eDNA is het vaststellen van kwantitatieve gegevens (abundantie) met behulp van eDNA niet mogelijk. Abundantie is echter een onderdeel in de formule voor het beoordelen van waterkwaliteit van macrofauna. Het is onduidelijk hoe groot het effect is van abundantie in de beoordeling van waterkwaliteit bij macrofauna.

1.3 Doelstelling

Om de maatlat geschikt te maken voor nieuwe meetmethoden zoals eDNA, is het doel van dit onderzoek het aanpassen van de maatlat voor macrofauna, gebaseerd op het:

- beoordelen van soortniveau naar genusniveau;
- beoordelen zonder invloed van abundantie.

1.4 Onderzoeksvragen

Uit de doelstelling, zoals in de vorige paragraaf beschreven, is de volgende hoofdvraag en zijn de volgende deelvragen voor dit onderzoek geformuleerd:

Hoofdvraag:

Wat is de betrouwbaarheid van het beoordelen van waterkwaliteit op genusniveau en exclusief abundantie?

Deelvragen:

- Behoud je voldoende kwaliteit op genusniveau om een betrouwbare uitspraak te kunnen doen over de biologische waterkwaliteit voor macrofauna?
- Wat verandert er in de kwaliteit van beoordelen als abundantie niet meer wordt meegenomen?
- Wat zijn de kosten voor de verschillende methoden (eDNA monitoring en huidige monitoring) en welke methode heeft de beste prijs op de lange termijn?

1.5 Leeswijzer

De opbouw van dit rapport staat in deze leeswijzer beschreven. In hoofdstuk 2 staat de werking van de KRW en bijbehorende maatlaten beschreven. Vervolgens staat in hoofdstuk 3 de onderzoeksmethode: de gekozen methode die leidt tot de resultaten. Deze resultaten staan in hoofdstuk 4 gepresenteerd. De interpretatie van de resultaten zijn vervolgens beschreven in hoofdstuk 5 discussie. Dat vervolgens leidt tot een conclusie in hoofdstuk 6 en aanbevelingen in hoofdstuk 7.

2 Achtergrond: Kaderrichtlijn water

Het doel van dit onderzoek is om het effect van het aanpassen van de maatlat voor macrofauna te bepalen, zoals staat beschreven in paragraaf 1.3. Daarom is dit hoofdstuk opgenomen in het rapport om de werking van de KRW toe te lichten en de daarbij behorende maatlatten.

In dit hoofdstuk is gebruik gemaakt van de rapporten Van der Molen et al. (2012), Evers et al. (2012) en Van der Molen et al. (2013). Deze drie rapporten vormen samen de basis van de uitwerking van de Kaderrichtlijn Water in Nederland. Het zijn de zogenaamde referentiedocumenten waarin de KRW-watertypes met de bijbehorende maatlatten zijn beschreven. In dit hoofdstuk staat beschreven hoe de Kaderrichtlijn Water is ontstaan, hoe de beoordeling in Nederland eruit ziet en tot slot wordt er ingezoomd op de werking van de maatlatten voor macrofauna.

2.1 Inleiding

Een goede waterkwaliteit vinden we in Europa belangrijk. Water trekt zich weinig aan van landsgrenzen. Daarom is er een centrale richtlijn ingesteld in Europa, namelijk: de Kaderrichtlijn Water (KRW). De Europese lidstaten hebben op grond van de KRW de plicht om de kwaliteit van de Europese wateren in een goede toestand te brengen. De uitvoering van de verplichte monitoring voor de KRW is tot nu toe alleen gebaseerd op intensieve monitoring volgens huidige methoden. Deze intensieve monitoring houdt voor macrofauna in; het bemonsteren met schepnet (zie figuur 2.1) en bodemhapper van het waterlichaam om vervolgens alle aanwezige soorten op naam te determineren.

De goede toestand bestaat uit twee componenten, namelijk: goede chemische toestand en goede ecologische toestand. In dit onderzoek richten we ons op de goede ecologische toestand. De goede chemische toestand wordt bepaald door de concentraties van prioritaire stoffen en wordt verder in dit rapport buiten beschouwing gelaten. De ecologische toestand is onderverdeeld in:

- biologische toestand
- hydromorfologie
- algemene fysische-chemie
- overige verontreinigende stoffen.

De biologische toestand wordt vervolgens getoetst aan de hand van vier kwaliteitselementen: fytoplankton (in meren), overige waterflora, macrofauna en vissen. (Buskens *et al.*, 2007) In dit onderzoek richten we ons alleen op de biologische toestand voor het derde kwaliteitselement: macrofauna.

In de KRW systematiek gaat men uit van een referentietoestand, dit is de zogenaamde 'ideale' toestand van de waterkwaliteit. Bij natuurlijke watertypen is de norm of ecologisch doel gesteld bij de ondergrens van de kwaliteitsklasse: Goede Ecologische Toestand (GET). Dit is per definitie een lichte afwijking van de referentietoestand. Echter in Nederland zijn de meeste wateren niet natuurlijk, maar vallen onder de categorie sterk veranderd/kunstmatig. Bij de niet natuurlijke watertypen is de norm gesteld op Goed Ecologisch Potentieel (GEP). Die norm is afgeleid van het meeste vergelijkbare natuurlijke watertype.



Figuur 2.1. Huidige methode van monitoring van macrofauna. (Adviesbureau AT-KB, z.d.)

2.2 Waterlichamen en kwaliteitselementen

De KRW onderscheidt waterlichamen als kleinste operationele unit. Een waterlichaam behoort tot een bepaald type en een type valt vervolgens onder een categorie. De KRW onderscheidt vier categorieën wateren: meren, rivieren, overgangs- en kustwateren.

Per watertype is een referentiesituatie beschreven en een bijbehorende maatlat opgesteld.

Kwaliteitselementen

De KRW schrijft een beoordeling van de waterkwaliteit (ecologische toestand) voor op basis van kwaliteitselementen. Voor de biologische kwaliteitselementen zijn zowel de soortensamenstelling als de hoeveelheid (abundantie) parameter bij de beoordeling van dat specifieke kwaliteitselement. Dit is verwerkt in de deelmaatlaten per biologisch kwaliteitselement, voor macrofauna is dat te vinden in paragraaf 2.4. In tabel 2.1 staan de biologische kwaliteitselementen.

Tabel 2.1. Biologische kwaliteitselementen KRW

Kwaliteitselementen

Samenstelling en abundantie van fytoplankton (-R)

Samenstelling en abundantie van overige waterflora

Samenstelling en abundantie macrofauna

Samenstelling, abundantie en leeftijdsopbouw van vis (-K)

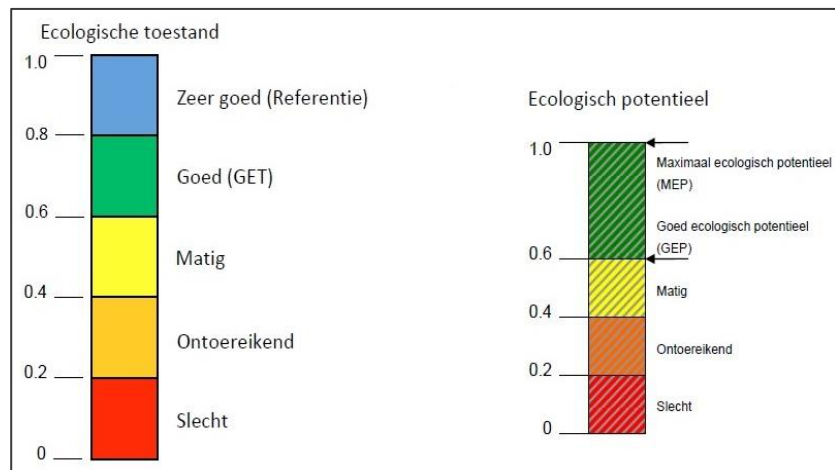
-R = niet voor categorie Rivieren

-K = niet voor categorie Kustwateren

2.3 Maatlatten

De definitie van een maatlat luidt als volgt: de beoordeling van een type per biologisch kwaliteitselement. De klassen van de maatlaten voor natuurlijke watertypen en kunstmatige watertypen staan in figuur 2.2. De score van elk watertype ligt tussen nul en één, waarbij één de referentiewaarde is en nul de slechtst mogelijke waterkwaliteit is ('dood water'). De waarde wordt uitgedrukt in de Ecologische kwaliteitsratio (EKR). Deze waarde drukt de afstand tot de referentiewaarde uit.

Voor elk biologisch kwaliteitselement is een maatlat opgesteld en staat uitgebreid beschreven in Van der Molen *et al.* (2012) voor natuurlijke watertypen, in Evers *et al.* (2012) voor kunstmatige watertypen en voor de overige wateren in Van der Molen *et al.* (2013).



Figuur 2.2. De 5 klassen van de maatlat voor natuurlijke watertypen en de 4 klassen van de maatlat voor kunstmatige watertypen, uit Van der Molen *et al.* (2012) en Evers *et al.* (2012), bewerkt door auteur.

2.4 Maatlat macrofauna

In dit onderzoek richten we ons specifiek op de maatlat voor macrofauna.

In dit deelhoofdstuk staan twee maatlaten voor macrofauna beschreven: voor natuurlijke wateren en kunstmatige wateren.

2.4.1 Natuurlijke watertypen

De samenstelling en abundantie van macrofauna wordt in elk watertype beoordeeld, zie tabel 2.1.

Er is echter een verschil van invulling tussen de watertypen meren/rivieren en overgangs-/kustwateren.

De deelmaatlat macrofauna bestaat uit drie verschillende indicatoren bij natuurlijke watertypen. Dat zijn de kenmerkende, positief dominante en negatief dominante taxa (Knoben *et al.*, 2007). Op basis van eigenschappen van soorten zijn deze ingedeeld in de drie verschillende indicatoren:

- Negatief dominante soorten zijn de soorten die bij een slechte waterkwaliteit dominant voorkomen en daarmee een slechte ecologische kwaliteit indiceren.
- Positief dominante soorten zijn soorten die kunnen dominant voorkomen in de referentietoestand.
- Kenmerkende soorten komen bij uitstek voor in het desbetreffende watertype.

De maatlat macrofauna voegt de soortensamenstelling en abundantie samen in drie parameters:

- DN % (abundantie); het percentage individuen behorende tot de negatief dominante indicatoren op basis van abundantieklassen;
- KM % (aantal taxa); het percentage kenmerkende taxa;
- KM % + DP % (abundantie); het percentage individuen behorende tot de kenmerkende en positief dominante indicatoren op basis van abundantieklassen.

Zoals hierboven vermeld staat, is er in de berekening gebruik gemaakt van abundantieklassen in plaats van abundantie. Dit voorkomt dat extreem hoge abundanties de score veel zullen beïnvloeden. De gehanteerde abundantieklassen staan in tabel 2.2. Ook wordt de berekening ongevoeliger voor verschillen in monstergrootte.

Tabel 2.2. Abundantieklassen

Absoluut aantal individuen	1	2 – 4	5 – 12	13 – 33	34 – 90	91 – 244	245 – 665	666 – 1808	> 1808
Abundantieklassen	1	2	3	4	5	6	7	8	9

“Vervolgens worden de drie parameters als volgt berekend:

- *De parameter DN % wordt berekend door de abundanties van de taxa die zowel in het monster als de lijst negatief dominante indicatoren voorkomen om te zetten naar een abundantieklasse en te sommeren en vervolgens te delen door de som van alle abundantieklassen voor alle taxa.*
- *De parameter KM % wordt berekend door het aantal taxa dat zowel in het monster als de lijst met kenmerkende taxa voorkomen te delen door het totaal aantal taxa in het monster.*
- *De parameter KM % + DP % wordt berekend door de abundanties van taxa die zowel in het monster als de lijst met kenmerkende taxa of positief dominante indicatoren voorkomen om te zetten naar een abundantieklasse en te sommeren en vervolgens te delen door de som van alle abundantieklassen voor alle taxa.”* (Van der Molen *et al.*, 2012)

Formules voor de EKR score voor rivieren

$$EKR = \frac{\left\{ 200 * \left(\frac{KM\%}{KM_{max}} \right) + 2 * (100 - DN\%) + (KM\% + DP\%) \right\}}{500}$$

KMmax in de bovenstaande formules is het percentage kenmerkende soorten dat verwacht mag worden in de referentiesituatie. De waarde van KMmax is per watertype verschillend, deze staan vermeld per watertype in Van der Molen *et al.* (2012).

2.4.2 Kunstmatige watertypen

De maatlat voor kunstmatige watertypen verschilt deels van de maatlat voor natuurlijke watertypen, daarom wordt deze apart behandeld. Kunstmatige watertypen zijn bijvoorbeeld sloten en kanalen. Bij de beoordeling van macrofauna voor kunstmatige watertypen wordt gebruik gemaakt van positieve taxa en negatief dominante taxa. Negatief dominante taxa zijn dominant in een slechte ecologische situatie. Positieve taxa zijn soorten die voorkomen onder voornamelijk goede ecologische omstandigheden en bij een hoge soortenrijkdom.

Soortensamenstelling en abundantie zijn gecombineerd in deze maatlat door middel van onderstaande indicatoren:

- *DN% (abundantie)*; het percentage individuen behorende tot de negatief dominante indicatoren op basis van abundantieklassen.

De parameter DN% wordt berekend door abundanties van de taxa die in het monster aanwezig zijn om te zetten naar de abundantieklassen, zie tabel 2.2. Vervolgens worden de abundantieklassen opgeteld en gedeeld door het totaal aantal abundantieklassen dat aanwezig is in het monster.

- *PT (aantal taxa)*; het aantal positieve taxa.

De parameter PT wordt berekend door het aantal positieve taxa aanwezig in het monster op te tellen.

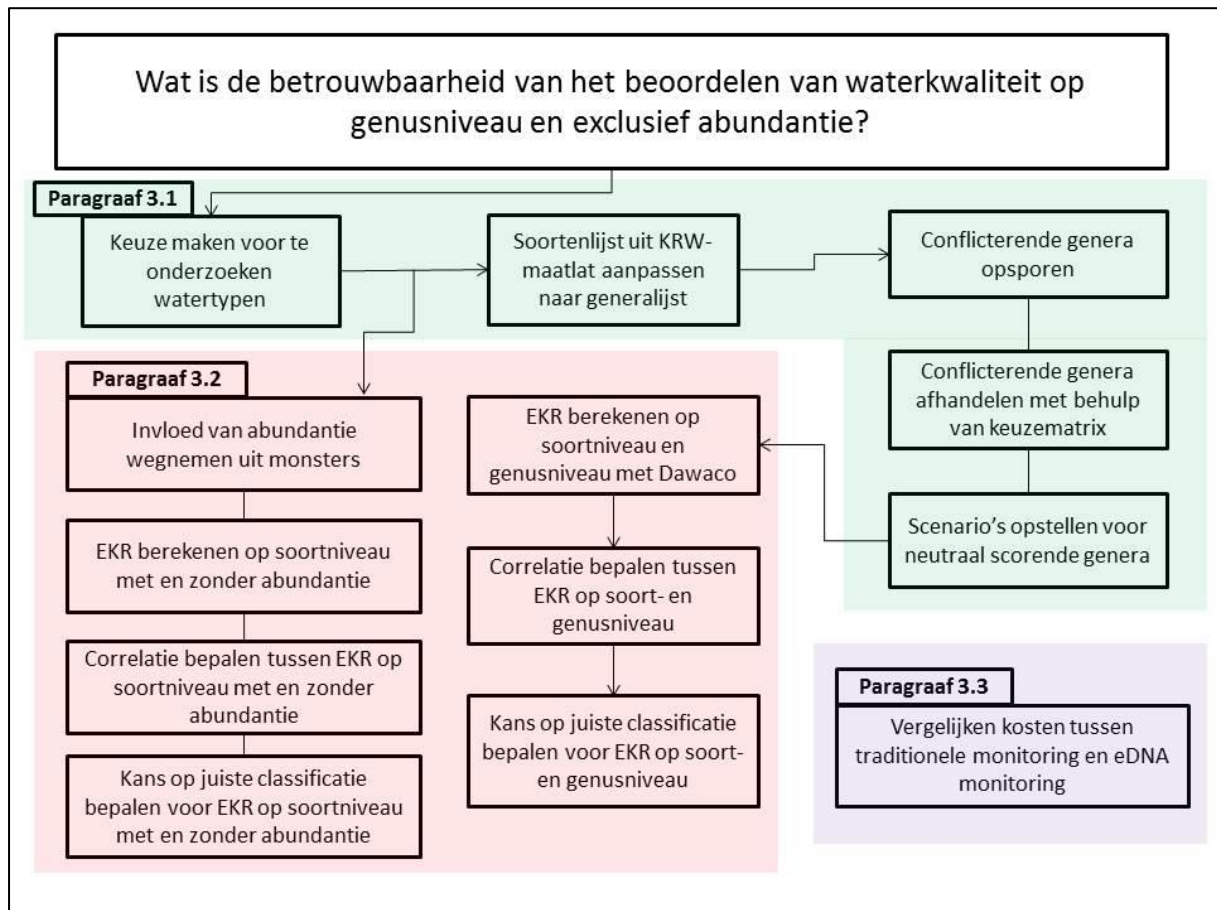
Formule voor de EKR score voor macrofauna:

$$EKR = \frac{\left\{ 2x \left(\frac{PT}{PT_{max}} \right) + \left(1 - \frac{DN\%}{DN_{max}\%} \right) \right\}}{3}$$

PT_{max} is hierin het aantal positieve taxa, dat aanwezig is in een MEP-omstandigheid. DN_{max}% is het minimale percentage negatieve dominante taxa dat voorkomt in de kwaliteitsklasse slecht. De waarden voor PT_{max} en DN_{max}% staan in Evers *et al.* (2012) en zijn per watertype verschillend.

3 Onderzoeksmethode

Om tot een antwoord te komen op de onderzoeksvraag: *“Wat is de betrouwbaarheid van het beoordelen van waterkwaliteit op genusniveau en exclusief abundantie?”*, dient er allereerst een keus gemaakt te worden voor de te onderzoeken watertypen. Vervolgens wordt de KRW-maatlat aangepast van soortenlijst naar generalijst (zie paragraaf 3.1.2). Daarna worden bewerkingen gedaan in Dawaco, correlatie bepaald en de kans op juiste classificatie (zie paragraaf 3.2). Daarnaast staat een korte methode uitgelegd voor de vergelijking van kosten in paragraaf 3.3, dit staat los van de rest van de methode. In figuur 3.1 staat het gehanteerde stroomschema voor dit onderzoek weergegeven.



Figuur 3.1. Stroomschema onderzoeksmethode

3.1 Dataverzameling en verwerking

3.1.1 Keuze watertypen

Na het bepalen van de onderzoeksmethode, dient er eerst een keus gemaakt worden welke watertypen gebruikt gaan worden voor dit onderzoek.

Vanwege de tijdsduur van dit onderzoek is het niet realistisch om elk KRW-type te analyseren. Daarom is besloten om slechts 2 van de 55 KRW-watertypen te kiezen. Deze twee watertypen worden op (onder andere) het voorkomen in Nederland gekozen. De vier stroomgebiedbeheerplannen (SGBP's 2009 – 2015) in Nederland worden hiervoor gebruikt. Om de KRW zo goed mogelijk te dekken, wordt een kunstmatig- en een natuurlijk watertype gekozen.

3.1.2 Van soort naar genus

Nadat de onderzoeksmethode en watertypen gekozen zijn, zoals in figuur 3.1 staat weergegeven, is de vervolgstap om soortenlijsten uit de KRW-documenten aan te passen naar generalijsten. Uit de documenten waarin de referentie en maatlaten van de KRW-typen in Nederland zijn beschreven (Van der Molen *et al.*, 2012 en Evers *et al.*, 2012), worden macrofauna soortenlijsten gekopieerd. De soortenlijsten worden gevalideerd op aanwezigheid in Nederland met de website www.nederlandsesoorten.nl. Op deze website staan alle, in Nederland, voorkomende soorten. Daarnaast zullen taxonomische gegevens (familie- en genusniveau) toegevoegd worden aan de macrofauna soortenlijsten, zie tabel 3.1 voor de bewerkte soortenlijst in Microsoft Excel.

Tabel 3.1. Voorbeeld uit macrofauna soortenlijst. (bron: www.nederlandsesoorten.nl)

Familie	Familie_NL	Genus (samengevoegd)	Genus	Soorten	Totaal gevestigde NL soorten # in genus	# in deze soortenlijst
Asellidae	(soort: zoetwaterpis sebed)	Asellus	Asellus	Aquaticus	1	1
Chironomidae	Dansmuggen	Cricotopus	Cricotopus	Sylvestris	26	1

Voor kunstmatige watertypen worden zowel positieve als negatieve indicerende taxa uit de macrofauna soortenlijst gekopieerd. Voor natuurlijke watertypen geldt dat er drie indicatoren zijn: kenmerkend, negatief en positief, zoals te lezen is in hoofdstuk 2.4.

Vervolgens worden de soortenlijsten een taxonomisch niveau omhoog (op genusniveau) gebracht, door een lijst te creëren met alle genera per indicatorlijst (kenmerkend, positief en negatief).

3.1.3 Conflicterende genera

De verwachting is dat in de generalijsten conflicterende genera ontstaan. Als een genus in meer dan één indicatorlijst voorkomt, wordt dit een conflicterend genus genoemd, dat wil zeggen: één of meer soorten staan in de positieve indicatorlijst en één of meer soorten staan in de negatieve indicatorlijst, dan wel kenmerkende indicatorlijst. Een voorbeeld hiervan is gegeven in kader 3.1. Om dit conflicterend genus toe te kunnen wijzen aan een indicatorlijst dient er een keus gemaakt te worden. Daarom zijn er drie criteria opgesteld, namelijk:

- Frequentie soorten; het aantal soorten dat binnen het genus in de indicatorlijst voorkomt.
- Monsters %; het aantal monsters waarin de soort in aangetroffen t.o.v. het totaal aantal monsters, weergegeven in een percentage.
- Meetpunten %; het aantal meetpunten waarin de soort in aangetroffen t.o.v. het totaal aantal meetpunten, weergegeven in een percentage.

De frequentie van soorten in een genus in een bepaalde indicator geeft een indicatie tot welk genus het zou moeten behoren. Daarnaast het percentage monsters en meetpunten geeft een indicatie over het voorkomen in Nederland, dat naast frequentie van soorten een belangrijke indicatie geeft tot welk genus het zou moeten behoren. De twee criteria hierboven (monsters % en meetpunten %) worden met behulp van Limnodata Neerlandica bepaald.

Kader 3.1. Voorbeeld conflicterend genus

Een voorbeeld van een conflicterend genus staat in tabel 3.2 op de volgende pagina. Het genus *Erpobdella* (bloedzuigers) heeft twee soorten in de macrofauna soortenlijst die een verschillende indicatie van de waterkwaliteit geven. De ene is *Erpobdella nigracollis*, een positief indicerende soort en de andere is *Erpobdella octoculata* (achtogige bloedzuiger), een negatief indicerende soort.

Dawaco

De watermonsters worden met behulp van Dawaco-Meetnetbeheer uit de database van Limnodata Neerlandica gehaald. Limnodata Neerlandica is de verzamel database met een groot aantal watermonsters die in Nederland zijn genomen. Dawaco is het informatiesysteem voor meetnetten.

Tabel 3.2. Voorbeeld conflicterende genera (Uit: Macrofauna taxonlijst M10 lijst, aangemaakt door auteur, bron: limnodata Neerlandica)

Positief						Negatief					
	Frequentie soorten	Monsters aantal (Limnodata)	Meetpunten aantal (Limnodata)	Monsters % (Limnodata)	Meetpunten % (Limnodata)		Frequentie soorten	Monsters aantal (Limnodata)	Meetpunten aantal (Limnodata)	Monsters % (Limnodata)	Meetpunten % (Limnodata)
Erpobdella											
Erpobdella nigricollis	1	50	38	4	11	Erpobdella octoculata	1	424	203	35	60
Totalen	50	50	38	4	11		50	424	203	35	60

Zoals te zien is in tabel 3.2, zijn er naast de drie hierboven genoemde criteria, nog twee criteria meegenomen. Dit gaat om absolute aantallen monsters en meetpunten. Er is gekozen om de absolute weergave niet te gebruiken als criteria bij de keuzematrix voor conflicterende genera. De relatieve weergave (in percentages) geeft een beter beeld van het voorkomen in de watermonsters en kunnen beter met elkaar vergeleken worden dan absolute gegevens.

De gegevens uit Limnodata Neerlandica zijn gekoppeld met de gegevens uit de soortenlijsten. Dit is gekoppeld in Microsoft Access, door een 'relationship' te maken tussen taxon namen uit beide bestanden.

3.1.4 Keuzematrix conflicterende genera

Voor conflicterende genera dienen keuzes gemaakt te worden, op basis van de criteria die in de vorige deelparagraaf beschreven zijn (frequentie soorten, percentage monsters en percentages meetpunten). Een keuzematrix wordt hierbij gebruikt als hulpmiddel. In de keuzematrix staan de genera, de criteria en de scores die aan de criteria zijn verbonden. De score is weergegeven als symbool en kleur. Eén symbool betekent dat de criteria zwak neigt naar een bepaalde indicator. Bij twee symbolen betekent dat het kenmerk sterk neigt naar een bepaalde indicator. Voor de verschillende criteria zijn grenswaarden opgesteld, een overzicht hiervan staat in tabel 3.3. Door het ontbreken van literatuur over grenswaarden in deze methode, zijn grenswaarden opgesteld op basis van expert judgement, in samenwerking met dhr. M. de Haan (Royal HaskoningDHV). Bewust is er gekozen voor grote verschillen tussen de grenswaarden, om een genus duidelijk te kunnen toedelen aan een indicator.

Tabel 3.3. Grenswaarden voor de maatstaven in de keuzematrix.

Indicator	Symbool	Vershil percentage soorttaandeel	Vershil in percentage monsters	Vershil in percentage meetpunten	Totaal
Positief	++	50 - 100	≥ 25	≥ 25)	≥ 4 + symbolen
	+	10 - 49	5 tot 24	5 tot 24	
Neutraal	0	10 tot -10	4 tot -4	4 tot -4	< 4 dezelfde symbolen
Negatief	-	-10 tot -49	-5 tot -24	-5 tot -24	≥ 4 - symbolen
	--	-50 tot -100	≤ -25	≤ -25	

In totaal kan een genus maximaal zes symbolen scoren, twee symbolen per maatstaf. Een genus wordt pas toegewezen aan een indicator als het $\geq$ vier gelijke symbolen scoort.

Als de totaalscore in de keuzematrix een indicator (kenmerkend, positief of negatief) geeft, dan wordt dat genus meegenomen in de indicatorlijst en in de maatlat.

Bij een score van drie of minder gelijke symbolen is de totaalscore neutraal. Dat betekent dat het genus niet duidelijk in een indicatorlijst ingedeeld kan worden.

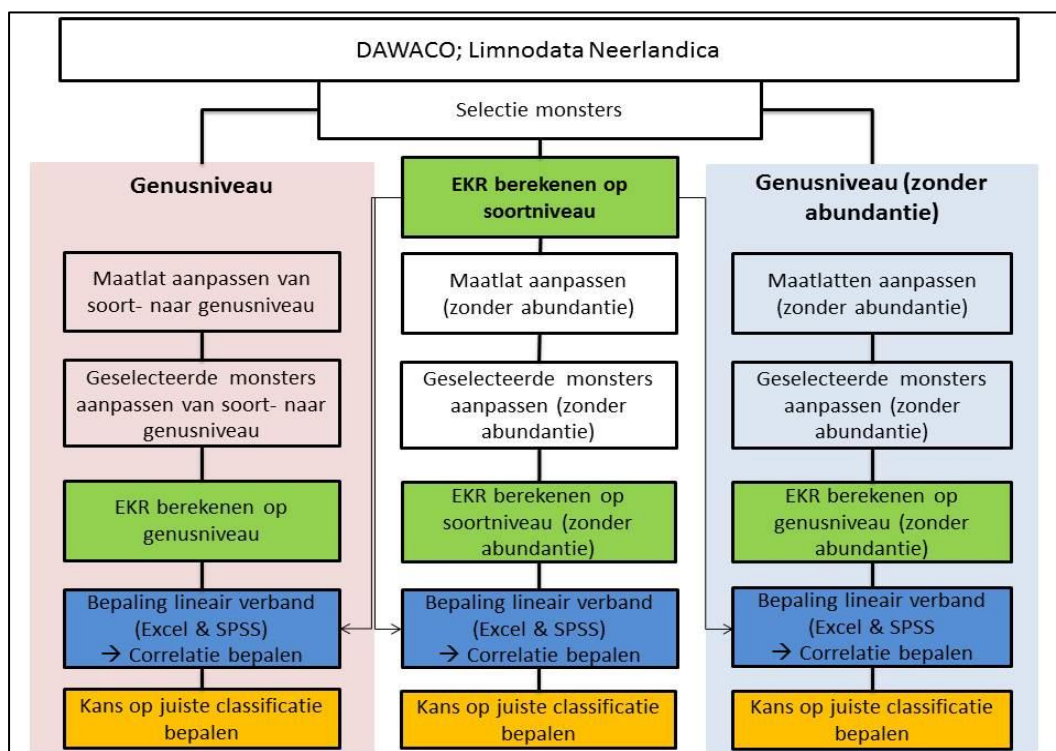
3.1.5 Scenario's

Uit de keuzematrices, zoals in de vorige deelparagraaf is beschreven, kunnen per watertype een aantal neutraal scorende genera naar voren komen. Deze behoren niet duidelijk tot één van de indicatorlijsten. Om de neutraal scorende genera toch op te kunnen nemen in de maatlat, worden er drie scenario's per KRW-type opgesteld. Een scenario is een genuslijst waarmee de ecologische kwaliteitsratio (EKR) berekend kan worden op genusniveau. Het doel van de verschillende scenario's is om te bepalen welke genuslijst het beste de huidige maatlat kan vervangen. In elk scenario wordt een andere samenstelling van de neutraal scorende genera bepaald. In de scenario's worden naast de genera uit de keuzematrices, de genera meegenomen die niet conflicterend zijn uit de genuslijsten (opgewerkte soortenlijsten). De conflicterende genera die uit de keuzematrix een kenmerkende, positieve of negatieve score hebben gekregen staan in de desbetreffende indicatorlijst in elk scenario.

3.2 Ecologische kwaliteitsratio berekenen

Nadat de genuslijsten en scenario's opgesteld zijn, kan de EKR berekend worden op genusniveau.

Voor het berekenen van de EKR is het programma Dawaco gekozen. Dit programma kan de EKR voor een groot aantal monsters tegelijk berekenen.



Figuur 3.2. Stappenplan voor Dawaco, Microsoft Excel en SPSS.

In figuur 3.2 staat het stroomschema voor het aanpassen van de maatlat tot aan de kans op juiste classificatie. Het figuur is opgebouwd in drie delen (genusniveau, soortniveau en genusniveau zonder abundantie). Dit zijn drie afzonderlijke trajecten, welke door het bepalen van de correlatie met elkaar vergeleken kunnen worden.

Selectie van monsters

Als in een watertype meer dan 2500 monsters beschikbaar zijn in de database van Limnodata Neerlandica, wordt er gekozen voor de meest recente monsters (jaren 2000 tot en met 2015). Dit wordt gekozen om de grootte van de analyse niet te omvangrijk te maken en het programma niet meer dan 2500 monsters goed kan analyseren. Bij minder beschikbare monsters, worden alle beschikbare monsters meegenomen in de analyse.

Maatlat en monsters aanpassen

De soortenlijst (huidige maatlat) wordt in Dawaco aangepast naar genuslijst (aangepaste maatlat). Tegelijk worden de geselecteerde monsters op soortniveau, aangepast naar genusniveau. Zo zijn de maatlat en de geselecteerde monsters op hetzelfde taxonomische niveau, zodat een EKR op genusniveau de EKR berekend kan worden.

De invloed van abundantie wordt, na het berekenen van de EKR op genusniveau en soortniveau (huidige maatlat), weggehaald uit de monsters. Dat wil zeggen dat alle taxa in het monster een abundantie van '1' krijgen. Zo is de abundantie niet meer van invloed in de berekening van de EKR.

Voor de selectie van monsters naar keuze komt een uitvoerbestand in Microsoft Excel, met een EKR berekend op basis van de formule zoals beschreven staat in de KRW documenten: Van der Molen *et al.* (2012) en Evers *et al.* (2012). Per scenario is de EKR berekend voor de totale set aan monsters.

3.3 Statistische analyse

Nadat de EKR berekend is op soortniveau (met en zonder abundantie) en op genusniveau (met en zonder abundantie), is de volgende stap om te kijken of er een verband tussen de variabelen is. De data dat met elkaar vergeleken wordt, bestaat uit twee lijsten met EKR's van de monsters. Voor elk monster, uit de totale set aan monsters, is op twee verschillende manieren een EKR berekend. Eenmaal een EKR van de huidige maatlat en eenmaal een EKR van de aangepaste maatlat (genusniveau, met en zonder abundantie en soortniveau zonder abundantie, zoals hieronder beschreven). Deze variabelen zijn dus afkomstig uit één set monsters. De variabelen hebben een ratio meetschaal.

Om de onderzoeksvraag te kunnen beantwoorden, dient er onderzocht te worden of er een lineair verband is tussen de huidige maatlat en de aangepaste maatlat. Eerst wordt een trendlijn in Microsoft Excel gemaakt, om te bepalen of het een lineair verband betreft. Dit geeft een goed beeld, echter, dit is niet genoeg om te bepalen of het een lineair verband betreft. Daarom is naast een trendlijn in Excel, gekozen om de One-Sample t-test te gebruiken. Deze toets wordt uitgevoerd met behulp van het statistiek programma SPSS en berekent de gemiddelde afwijking van de aangepaste maatlat ten opzichte van de huidige maatlat. Daarnaast wordt deze afwijking grafisch gepresenteerd met een spreidingsdiagram, in dit diagram staat de huidige maatlat op de horizontale as en op de verticale as staat het verschil (afwijking) tussen de huidige maatlat en de aangepaste maatlat. Als blijkt dat er geen lineair verband gevonden wordt in Excel en SPSS, kan de conclusie getrokken worden dat er geen correlatie is. De sterkte en richting van het lineaire verband kan vervolgens bepaald worden. Dat wordt gedaan door middel van de Pearson correlatie toets. Deze toets wordt berekend met behulp van SPSS.

De correlatie wordt berekend tussen:

- EKR op soortniveau (met abundantie) met EKR op soortniveau (zonder abundantie).
- EKR op soortniveau (met abundantie) met EKR op genusniveau (met abundantie) voor de verschillende scenario's.
- EKR op soortniveau (met abundantie) met EKR op genusniveau (zonder abundantie) voor de verschillende scenario's.

De Pearson correlatie toets geeft een waarde voor de correlatiecoëfficiënt R . Deze waarde geeft de kracht en richting van het verband aan. De correlatiecoëfficiënt kan zowel negatief als positief zijn en is tussen -1 (perfecte negatieve correlatie) en +1 (perfecte positieve correlatie). Een correlatiecoëfficiënt van 0 betekent dat er geen correlatie is. De kolom 'interpretatie kracht verband' uit tabel 3.4, wordt overgenomen in dit onderzoek.

Tabel 3.4. Wat zegt R ? (Leiden Universiteit, 2006)

Correlatiecoëfficiënt (R) afgerond	Interpretatie kracht verband
< 0,30	Zeer zwak
0,30 – 0,50	Zwak
0,50 – 0,70	Matig
0,70 – 0,85	Sterk
0,85 – 0,95	Zeer sterk
> 0,95	Uitzonderlijk sterk

Hypothese

De nulhypothese (H_0) van de verbanden tussen de variabele: huidige maatlat (EKR op soortniveau) en de overige variabelen is dat er geen verband is. Uit deze stelling zou je dus kunnen concluderen dat er geen significante invloed is tussen de huidige maatlat en de aangepaste maatlat. Wanneer H_0 verworpen zou worden, betekend dat de huidige maatlat en de aangepaste maatlat correleren. De gekozen onbetrouwbaarheid voor de significantie is 0,01. Dat wil zeggen dat er een significant verband is bij een p -waarde van 0,01 of lager. Dit wordt tweezijdig getoetst, omdat de nulhypothese stelt dat er geen verband is tussen beide variabelen. (Pearson, z.d.; Kent State University, z.d.)

Kans op juiste classificatie

Naast de correlatie wordt de kans op misclassificatie gebruikt als graadmeter voor het bepalen van de betrouwbaarheid. Met de kans op juiste classificatie wordt bedoeld: de kans dat een monster na verandering van de maatlat in dezelfde klasse valt.

Om te meten wat de kans op juiste classificatie is, zijn de kwaliteitsklassen uit de verschillende scenario's vergeleken met de kwaliteitsklassen uit de monsters die beoordeeld zijn met de huidige maatlat. Deze vergelijking wordt gedaan met behulp van Microsoft Excel. Handmatig wordt gekeken naar het aantal monsters per ecologische kwaliteitsklasse in dezelfde klasse, in een hogere of lagere klasse terecht komt. Deze absolute getallen worden naar een percentage omgezet.

De vergelijking tussen de kwaliteitsklassen is grafisch weergegeven in percentages. Daarnaast is er een cirkeldiagram gemaakt van percentages waarin:

- De kwaliteitsklasse gelijk zijn (juiste classificatie);
- De kwaliteitsklasse verschilt, op genusniveau valt het monster in een lagere kwaliteitsklasse.
- De kwaliteitsklasse verschilt, op genusniveau valt het monster in een hogere kwaliteitsklasse.

Bij de interpretatie van de resultaten dient rekening gehouden te worden dat een monster in de ecologische kwaliteitsklasse 'slecht' niet een klasse lager kan en een monster in de ecologische kwaliteitsklasse 'zeer goed' niet in een klasse hoger terecht kan komen.

3.4 Kosten eDNA monitoring versus huidige monitoring

Om een inschatting te geven van kosten voor eDNA monitoring als alternatief voor de KRW in de toekomst, zijn verschillende specialisten benaderd die de methode voor eDNA metabarcoding ontwikkelen. Er is gekozen om dit per waterlichaam te vergelijken met de kosten voor huidige monitoring. Voor het bepalen van kosten voor huidige monitoring is deskresearch gedaan. Daarnaast zijn twee specialisten op het gebied van het bemonsteren van macrofauna benaderd over kosten van het bemonsteren en determineren van macrofauna. Vervolgens zijn beide methoden vergeleken op basis van kosten voor monitoren van macrofauna voor één monster en voor een groter aantal monsters (96 monsters).

4 Resultaten

In dit hoofdstuk staan de resultaten uiteengezet voor twee watertypen. De eerste paragraaf bestaat uit het resultaat van de gekozen watertypen voor dit onderzoek, voor meer informatie over deze twee watertypen, zie bijlage N. In paragraaf 4.2 staan de resultaten van de conflicterende genera en scenario's gepresenteerd. Vervolgens staat in paragraaf 4.3 resultaten van correlaties en de kans op juiste classificatie voor de verschillende scenario's van M10. In paragraaf 4.4 staan de resultaten van R5 van correlaties en juiste classificatie van de verschillende scenario's. De resultaten uit paragraaf 4.3 en 4.4 staan nog eens overzichtelijk gepresenteerd in paragraaf 4.5. Paragraaf 4.6 bestaat uit de resultaten van de vergelijking van kosten tussen eDNA monitoring en huidige monitoring.

4.1 Watertypen

Keuze voor KRW-type M10

KRW-type M10 is gekozen omdat het relatief vaak voorkomt in Nederland, namelijk: in ruim 12% van alle sloten en kanalen (zie bijlage A: tabel A.1). Dit watertype staat voor de kunstmatige meer-typen. Bovendien wordt dit watertype gebruikt als bemonsteringslocatie voor het TKI project, zoals beschreven staat in paragraaf 1.1.2.

Keuze voor KRW-type R5

Naast een stagnant kunstmatig waterlichaam (M10), is een natuurlijk en stromend waterlichaam gekozen. De keuze is gevallen op KRW-type R5 (langzaam stromende middenloop/benedenloop op zand). Met de keuze voor M10 en R5 is een groot gedeelte van de KRW-typen gedekt.

Het type R5 is het meest voorkomende riviertype in Nederland. In bijlage A: tabel A.2 staat een overzicht van de aantallen riviertypen per stroomgebied. Daarin is per watertype aangegeven hoe vaak het watertype voorkomt en welk percentage van het totaal dit uit maakt. Met ruim 52 % van alle riviertypen is R5 het meest voorkomende riviertype.

4.2 Conflicterende genera en scenario's

Voordat een EKR gebaseerd op een genus maatlat berekend kan worden, is het noodzakelijk om eerst de conflicterende genera, zoals beschreven in paragraaf 3.1.4, af te handelen. Daarom is per watertype een keuzematrix opgesteld. De resultaten uit de keuzematrices staan in deze paragraaf. De neutraal scorende genera worden vervolgens in scenario's ingedeeld.

4.2.1 Scenario's M10

Voor KRW-type M10 geldt dat er drie genera conflicterend zijn. Het betreft een kleine fractie van het totaal aantal genera dat in de monsters voorkomt. Voor M10 geldt dat circa 1% van het totaal aantal genera conflicterend is. In tabel B.1 (bijlage B) staan de conflicterende soorten binnen de genera voor watertype M10. Daarin staan de waarden voor de criteria weergegeven, waarop de keuzematrix in tabel 4.1 gebaseerd is.

In watertype M10 zijn de volgende genera conflicterend: *Erpobdella* (genus uit de bloedzuigers), *Sigara* (genus uit de duikerwantsen) en *Tubificidae* (familie uit de zoetwaterborstelwormen).

Tabel 4.1. Keuzematrix voor conflicterende genera uit type M10 (zie tabel B.1 voor de waarden voor de maatstaven)

Genus	Soorten	Monsters %	Meetpunten %	Totaal
<i>Erpobdella</i>	0	--	--	Negatief
<i>Sigara</i>	++	-	+	Neutraal
<i>Tubificidae</i> *	--	--	--	Negatief

* Tubificidae is een familie binnen de zoetwaterborstelwormen, deze hele familie is als negatief indicierend aangewezen in de maatlat voor M10.

Legenda	
++	Sterk positief
+	Zwak positief
0	Neutraal
-	Zwak negatief
--	Sterk negatief

De licht- en donkergroene kleur staat voor zwak of sterk positief, de grijze kleur staat voor neutraal en licht- en donkerrood staat voor de mate dat een maatstaf negatief scoort (zie legenda in tabel 4.1). De score in de 'totaal' kolom geeft aan tot welke indicator het genus behoort.

Voor het genus *Erpobdella* en de familie *Tubificidae* is de totaalscore negatief, deze twee genera worden in de scenario's opgenomen in de negatieve indicatorlijst. Voor het genus *Sigara* is de totaalscore neutraal. *Sigara* is in drie verschillende scenario's afwisselend meegenomen: in de positieve indicatorlijst (scenario 2), in de negatieve indicatorlijst (scenario 1) en in geen van beide indicatorlijsten (scenario 3). In tabel 4.2 staat dit overzichtelijk weergegeven.

Tabel 4.2. Overzicht scenario's M10

Scenario 1		Scenario 2		Scenario 3	
Positief	Negatief	Positief	Negatief	Positief	Negatief
	Erpobdella	Sigara	Erpobdella		Erpobdella
	Sigara		Tubificidae		Tubificidae
	Tubificidae				

4.2.2 Scenario's R5

Voor KRW-type R5 geldt dat er elf genera conflicterend zijn. Het betreft een kleine fractie van het totaal aantal genera. Voor R5 gaat het om circa 6% van het totaal aantal genera. In tabel C.1 en tabel C.2 (bijlage C) staan de conflicterende soorten binnen de genera voor watertype R5. Daarin staan de waarden voor de maatstaven weergegeven, waarop de keuzematrix in tabel 4.3 is gebaseerd. In tabel 4.3 staan de conflicterende genera: *Arrenurus* (mijten), *Caenis* (haften), *Chironomus* (dansmuggen), *Hygrobates* (mijten), *Limnephilus* (schietsmotten), *Microsepta* (dansmuggen), *Nais* (zoetwaterborstelwormen), *Polypedilum* (dansmuggen), *Sigara* (duikerwantsen) en *Simulium* (kriebelmuggen) en *Sphaerium* (tweekleppigen).

Tabel 4.3. Keuzematrix voor conflicterende genera uit type R5 (zie bijlage D1 voor de waarden van de maatstaven)

Genus	Soorten	Monsters %	Meetpunten %	Totaal	Legenda * Zwak kenmerkend ** Sterk kenmerkend + Zwak positief ++ Sterk positief 0 Neutraal - Zwak negatief -- Sterk negatief
<i>Arrenurus</i>	**	-	-	Neutraal	
<i>Caenis</i>	*	--	--	Negatief	
<i>Chironomus</i>	--	--	--	Negatief	
<i>Hygrobates</i>	*	+	+	Neutraal	
<i>Limnephilus</i>	**	0	0	Neutraal	
<i>Microsepta</i>	++	+	++	Positief	
<i>Nais</i>	0	0	-	Neutraal	
<i>Polypedilum</i>	*	-	--	Neutraal	
<i>Sigara</i>	-	--	--	Negatief	
<i>Simulium</i>	**	*	*	Kenmerkend	
<i>Sphaerium</i>	0	--	--	Negatief	

De licht- en donkerblauwe kleuren in de tabel geven de mate van kenmerkendheid aan in de tabel, de licht- en donkergroene kleur staat voor zwak of sterk positief, de grijze kleur staat voor neutraal en licht- en donkerrood staat voor de mate dat een maatstaf negatief scoort (zie legenda). De score in de 'totaal' kolom geeft aan tot welke indicator het genus behoort.

Voor *Caenis*, *Chironomus*, *Sigara* en *Sphaerium* is de totaalscore negatief, deze vier genera worden opgenomen in de negatieve indicatorlijst. Voor *Microsepta* is de totaalscore positief, deze wordt opgenomen in de positieve indicatorlijst. Voor *Simulium* is de totaalscore kenmerkend, deze wordt

opgenomen in de kenmerkende indicatorlijst. Voor de overige genera (*Arrenurus*, *Hygrobates*, *Limnephilus*, *Nais* en *Polypedilum*) is de uitkomst neutraal.

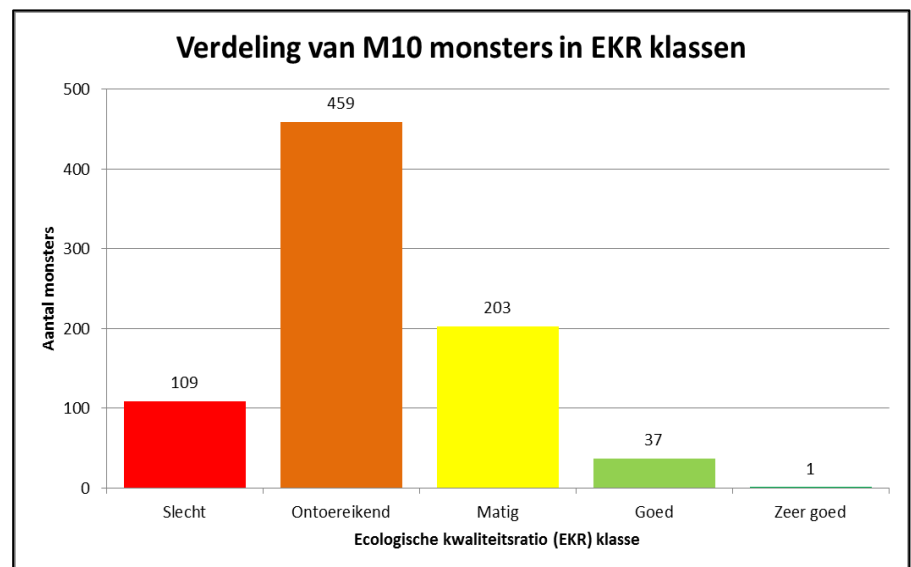
De neutraal scorende genera zijn verwerkt in scenario's, zie bijlage D. Elk genus staat in ten minste twee van de drie scenario's, in de verschillende indicatorlijsten waar ze conflicterend in zijn. *Polypedilum* is hier een uitzondering op, dit genus staat in alle drie scenario's, omdat *Polypedilum* in alle drie indicatorlijsten voorkomt.

4.3 Resultaten M10

4.3.1 Verdeling in EKR klassen in gebruikte monsters

In totaal bestaat de set van monsters voor M10 uit 809 bruikbare monsters.

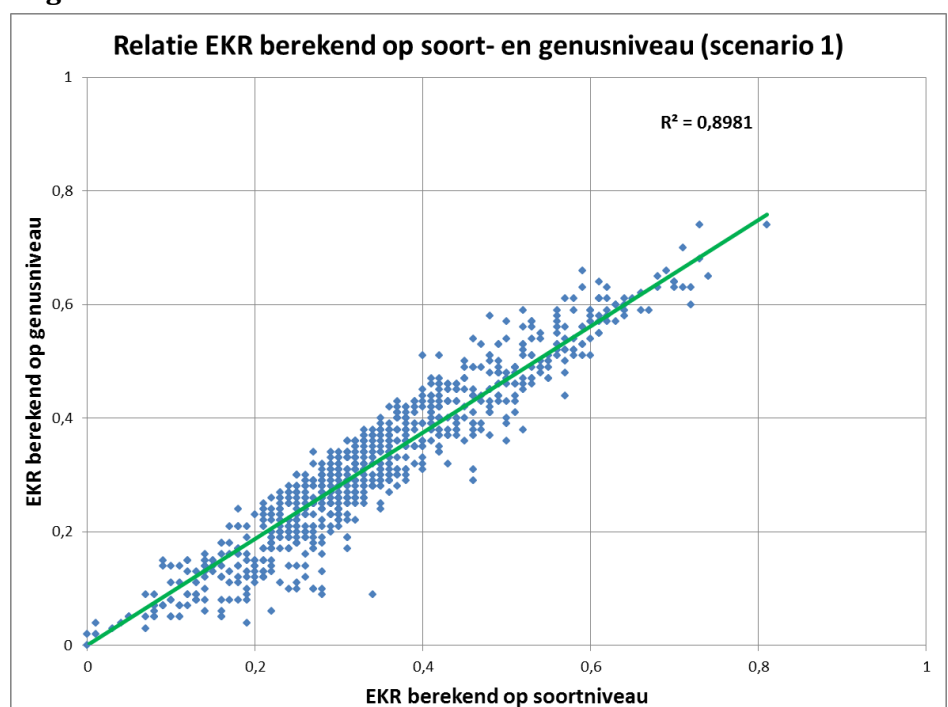
De verdeling van de set monsters staat in figuur 4.1. Het aantal monsters staat uitgezet op de verticale as. Op de horizontale as staan de EKR klassen. Voor een groot deel bestaat deze set monsters uit ontoereikende en matige monsters. De ecologische kwaliteitsklasse zeer goed bestaat slechts uit één monster. Het verband tussen EKR op soortniveau en EKR op genusniveau staat voor scenario 1 weergegeven in figuur 4.2. Het gaat duidelijk om een lineair verband, in de volgende paragraaf staat de correlatie van dit verband.



Figuur 4.1. Overzicht van de verdeling van de monsters uit KRW-type M10 in de ecologische kwaliteitsklassen.

4.3.2 Correlatie van EKR soort- en genusniveau

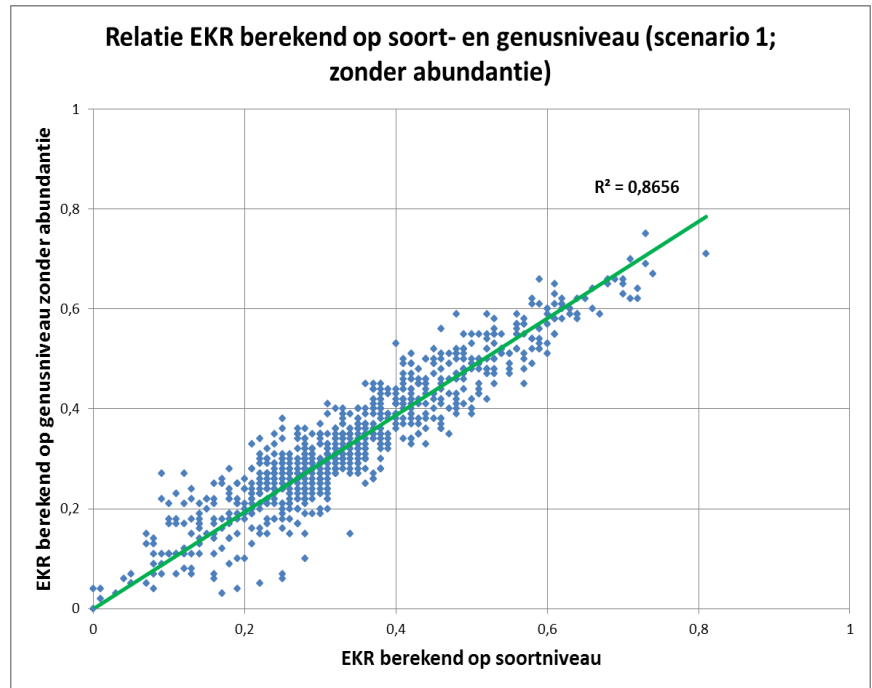
Het verband in figuur 4.2 is zeer sterk, het heeft een correlatiecoëfficiënt (R) van 0,949 en is significant ($p < 0,01$), zie bijlage K: tabel K.1. Het verband tussen EKR op soortniveau en EKR op genusniveau staat voor scenario 2 weergegeven in bijlage E: figuur E.1. Dit verband is zeer sterk, het heeft een correlatiecoëfficiënt (R) van 0,943 en is significant ($p < 0,01$), zie bijlage K: tabel K.2. Voor scenario 3 is dit weergegeven in bijlage E: figuur E.2. Dit verband is eveneens zeer sterk, het heeft een correlatiecoëfficiënt (R) van 0,945 en is significant ($p < 0,01$), zie bijlage K: tabel K.3. Het verschil tussen de drie scenario's is zeer klein.



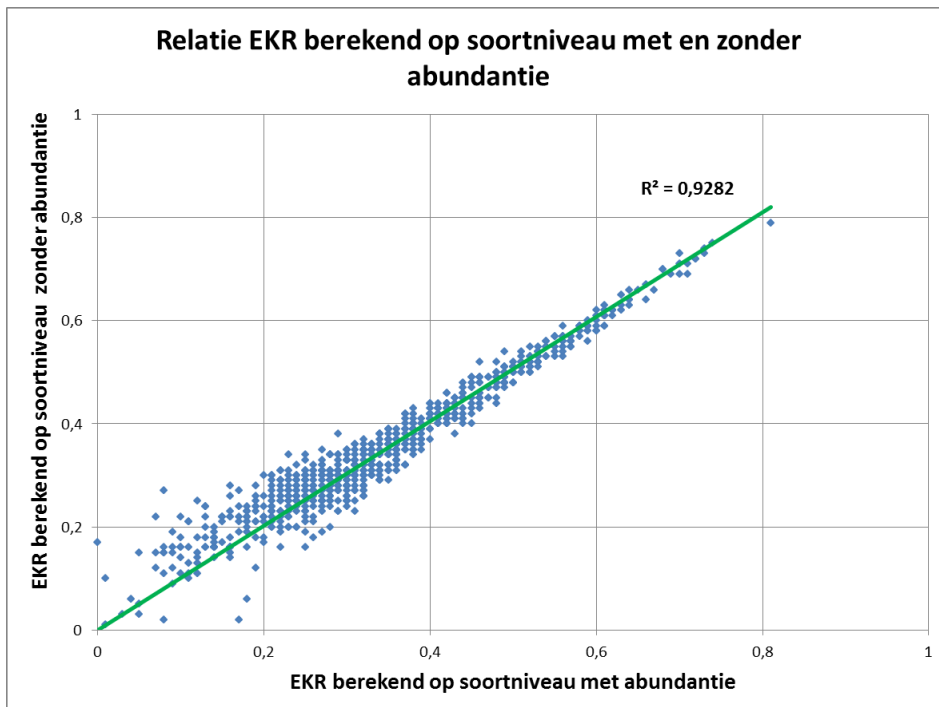
Figuur 4.2. Het verband tussen EKR op genusniveau (scenario 1) en EKR op soortniveau. Elk monster is berekend op soortniveau (huidige maatlat) en genusniveau, en staat tegen elkaar uitgezet in de grafiek.

Genusniveau; zonder abundantie

In deze paragraaf staan de resultaten van de correlatie op EKR soortniveau en EKR op genusniveau zonder abundantie). In figuur 4.3 staat de correlatie weergegeven tussen EKR op soortniveau en EKR op genusniveau (scenario 1; zonder abundantie). Dit verband is zeer sterk, het heeft een correlatiecoëfficiënt (R) van 0,933 en is significant ($p < 0,01$), zie bijlage K: tabel K.4. De correlatie tussen EKR op soortniveau en EKR op genusniveau (zonder abundantie) staat voor scenario 2 weergegeven in figuur F.1 (bijlage F). Dit verband is zeer sterk, het heeft een correlatiecoëfficiënt van 0,923 en is significant ($p < 0,01$), zie bijlage K: tabel K.5. De correlatie tussen EKR op soortniveau en EKR op genusniveau (zonder abundantie) staat voor scenario 3 weergegeven in bijlage F: figuur F.2. Dit verband is zeer sterk, het heeft een correlatiecoëfficiënt van 0,926 en is significant ($p < 0,01$), zie bijlage K: tabel K.6.



Figuur 4.3. Het verband tussen EKR op genusniveau (scenario 1: zonder abundantie) en EKR op soortniveau. Elk monster is berekend op soortniveau (huidige maatlat) en genusniveau zonder abundantie, en staat tegen elkaar uitgezet in de grafiek.



Figuur 4.4. Het verband tussen EKR op soortniveau (zonder abundantie) en EKR op soortniveau (met abundantie). Elk monster is berekend op soortniveau (huidige maatlat) en soortniveau zonder abundantie, en staat tegen elkaar uitgezet in de grafiek.

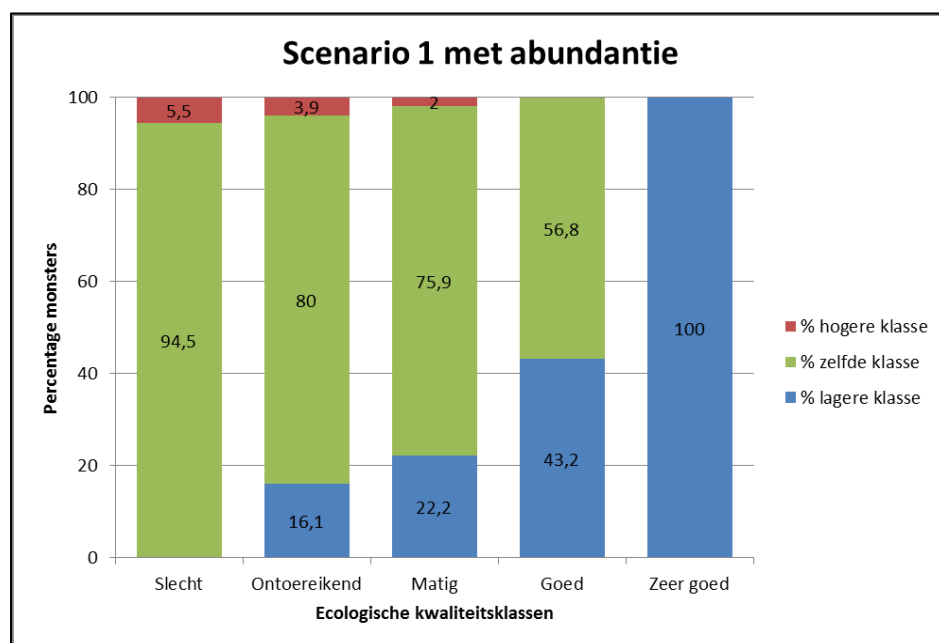
Soortniveau; zonder abundantie

In figuur 4.4 staat de correlatie tussen EKR op soortniveau met abundantie en EKR op soortniveau zonder abundantie. Dit verband is uitzonderlijk sterk, het heeft een correlatiecoëfficiënt van 0,969 en is significant ($p < 0,01$), zie bijlage K: tabel K.7. Dat is een uitzonderlijk sterke correlatie. In figuur 4.4 is duidelijk te zien dat de afwijking groter is bij een lagere EKR. Bij een hogere EKR score is de afwijking laag.

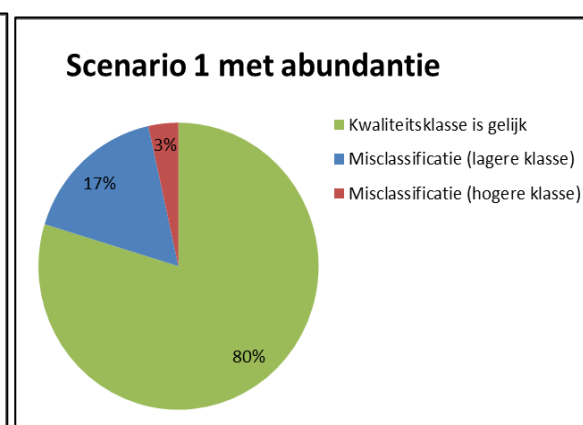
4.3.3 Kans op juiste classificatie

De kans op juiste classificatie is gedefinieerd, namelijk: de kans dat een monster in dezelfde ecologische kwaliteitsklasse terecht komt door verandering van soortniveau naar genusniveau.

De kans op juiste classificatie staat voor scenario 1 met abundantie weergegeven in figuur 4.5. Figuur 4.5a laat per ecologische kwaliteitsklasse zien hoeveel procent in een lagere klasse (blauw), hoeveel procent in dezelfde klasse (groen) en hoeveel procent in een hogere klasse (rood) terechtkomt na het beoordelen op genusniveau. Daarnaast is in figuur 4.5b te zien hoeveel procent in totaal in een lagere, dezelfde of hogere klasse terecht komt.



Figuur 4.5a. De kans op juiste classificatie voor scenario 1 met abundantie.



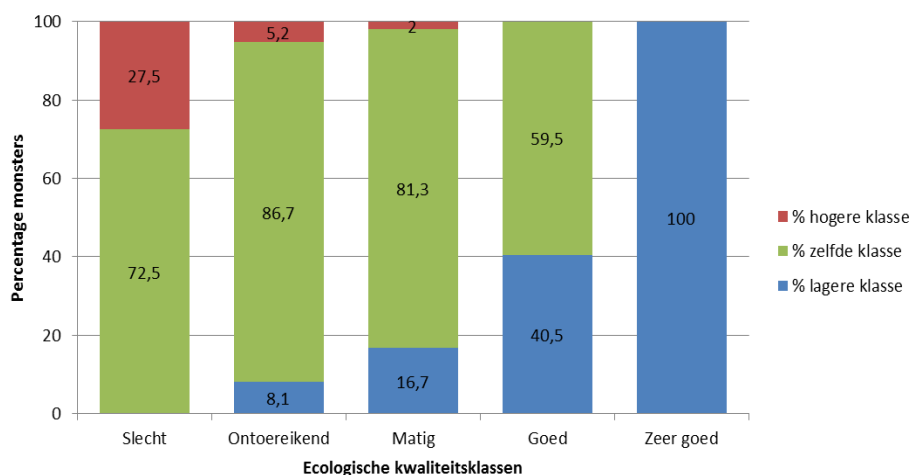
Figuur 4.5b. De kans op juiste classificatie voor scenario 1 (met abundantie), weergegeven in een cirkeldiagram.

Uit deze figuren blijkt dat 80% in dezelfde klasse blijft na de beoordeling op genusniveau. 17% komt in een lagere klasse terecht en 3% komt in een hogere klasse. De overige figuren, voor scenario 2 en 3, staan weergegeven in bijlage I: figuur I.1. In scenario 2 blijft 84% in dezelfde klasse, 7% in een lagere klasse en 9% in een hogere klasse. In scenario 3 blijft 83% in dezelfde klasse, 9% in een lagere klasse en 8% in een hogere klasse. De verschillen tussen de scenario's zijn wisselend, zo heeft scenario 2 het hoogste percentage aan monsters dat in dezelfde klasse blijft, echter niet de hoogste waarde voor R, zoals blijkt uit figuur 4.2, figuur E.1 en figuur E.2 blijkt dat de ecologische kwaliteitsklasse 'slecht' het hoogste percentage heeft dat in een hogere klasse terecht komt. De ecologische kwaliteitsklasse 'zeer goed' heeft het hoogste percentage dat in een lagere klasse terecht komt. Dit geeft echter een vertekend beeld, de klasse 'zeer goed' heeft slechts één monster. Dit geldt eveneens voor de figuren voor scenario 2 en 3 uit figuur I.1.

Genusniveau; zonder abundantie

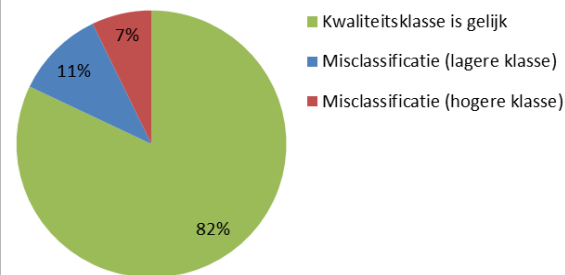
De kans op juiste classificatie voor scenario 1 zonder abundantie staat weergegeven in figuur 4.6 op de volgende pagina. Figuur 4.6a laat per ecologische kwaliteitsklasse zien hoeveel procent in een lagere klasse (blauw), hoeveel procent in dezelfde klasse (groen) en hoeveel procent in een hogere klasse (rood) terechtkomt na het beoordelen op genusniveau zonder abundantie. Daarnaast is in figuur 4.6b te zien hoeveel procent in totaal in een lagere, dezelfde of hogere klasse terecht komt.

Scenario 1 zonder abundantie



Figuur 4.6a. De kans op juiste classificatie voor scenario 1 zonder abundantie.

Scenario 1 zonder abundantie



Figuur 4.6b. De kans op juiste classificatie voor scenario 1 (zonder abundantie), weergegeven in een cirkeldiagram.

Uit deze figuren blijkt dat 82% in dezelfde klasse blijft na de beoordeling op genusniveau zonder abundantie. 11% komt in een lagere klasse terecht en 7% komt in een hogere klasse. De overige figuren, voor scenario 2 en 3, staan weergegeven in bijlage I: figuur I.2. In scenario 2 blijft 81% in dezelfde klasse, 5% in een lagere klasse en 14% in een hogere klasse. In scenario 3 blijft 81% in dezelfde klasse, 7% in een lagere klasse en 12% in een hogere klasse. De verschillen tussen de scenario's zijn op genusniveau zonder abundantie eveneens wisselend. Uit figuur 4.6a blijkt dat de ecologische kwaliteitsklasse 'slecht' het hoogste percentage heeft dat in een hogere klasse terecht komt. De ecologische kwaliteitsklasse 'zeer goed' heeft het hoogste percentage dat in een lagere klasse terecht komt. Dit geeft echter een vertekend beeld, de klasse 'zeer goed' heeft slechts één monster. Dit geldt eveneens voor de figuren voor scenario 2 en 3 uit figuur I.2. Er is geen enkel monster, in alle scenario's, waarvan de kwaliteitsklasse verandert in een klasse die niet direct een klasse lager of hoger is. (bijvoorbeeld: van goed naar ontoereikend of van slecht naar matig). Dat betekent dat de afwijking van de EKR voor elk monster minder dan 0,2 is.

Soortniveau; zonder abundantie

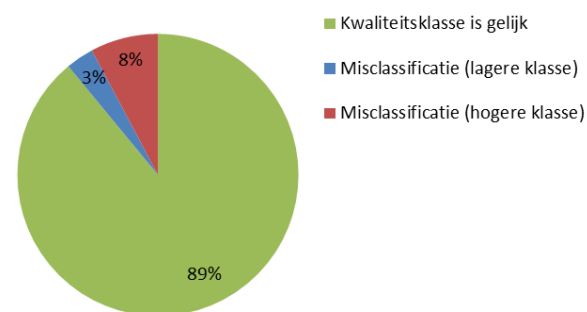
De kans op juiste classificatie na berekening van EKR op soortniveau zonder abundantie staat in figuur 4.7. Figuur 4.7a laat per ecologische kwaliteitsklasse zien hoeveel procent in een lagere klasse (blauw), hoeveel procent in dezelfde klasse (groen) en hoeveel procent in een hogere klasse (rood) terechtkomt na het beoordelen op soortniveau zonder abundantie. Daarnaast is in figuur 4.7b te zien hoeveel procent in totaal in een lagere, dezelfde of hogere klasse terecht komt.

Soortniveau zonder abundantie



Figuur 4.7a. De kans op juiste classificatie voor soortniveau zonder abundantie.

Soortniveau zonder abundantie



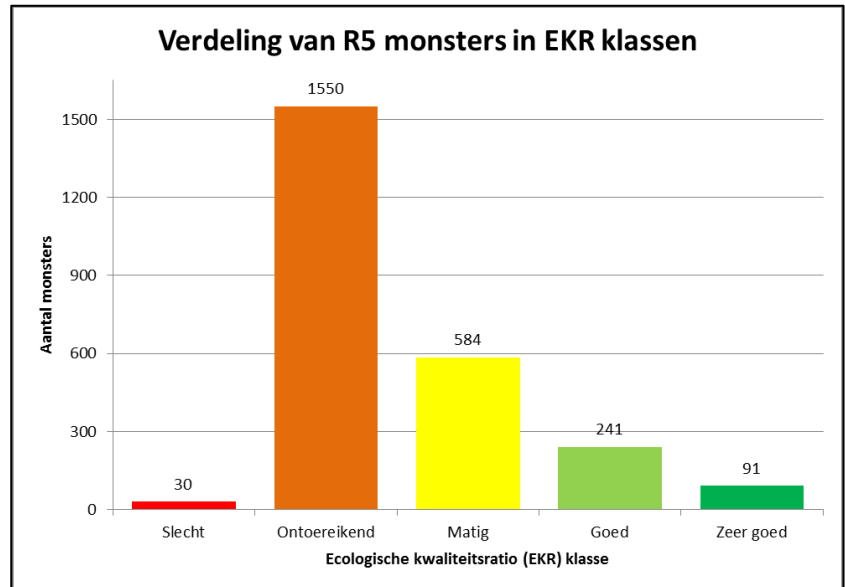
Figuur 4.7b. De kans op juiste classificatie voor EKR berekend op soortniveau zonder abundantie, weergegeven in een cirkeldiagram.

Uit deze figuren blijkt dat 89% in dezelfde klasse blijft na de beoordeling op soortniveau zonder abundantie. 3% komt in een lagere klasse terecht en 8% komt in een hogere klasse. Uit figuur 4.7a blijkt dat de ecologische kwaliteitsklasse 'slecht' het hoogste percentage heeft dat in een hogere klasse terecht komt. De ecologische kwaliteitsklasse 'zeer goed' heeft het hoogste percentage dat in een lagere klasse terecht komt. Dit geeft echter een vertekend beeld, de klasse 'zeer goed' heeft slechts één monster.

4.4 Resultaten R5

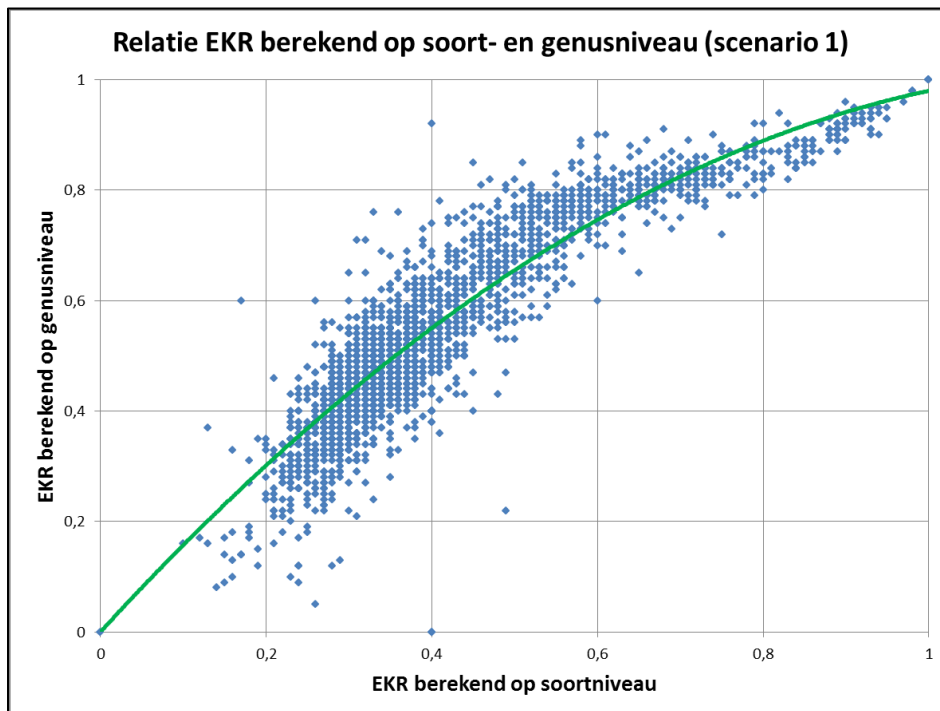
4.4.1 Verdeling in EKR klassen in gebruikte monsters

In Dawaco zijn alle monsters uitgekozen van het jaar 2000 tot en met 2015. Een selectie uit het totaal aantal monsters van R5 is gekozen, omdat de populatie anders te groot was voor nadere analyse. In totaal is een set van 2496 monsters geanalyseerd. In figuur 4.8 staat de verdeling weergegeven over de ecologische kwaliteitsklassen. Het aantal monsters staat uitgezet op de verticale as. Op de horizontale as staan de EKR klassen. Voor een groot deel bestaat deze set monsters uit ontoereikende en matige monsters. De ecologische kwaliteitsklasse slecht bestaat slechts uit dertig monsters.



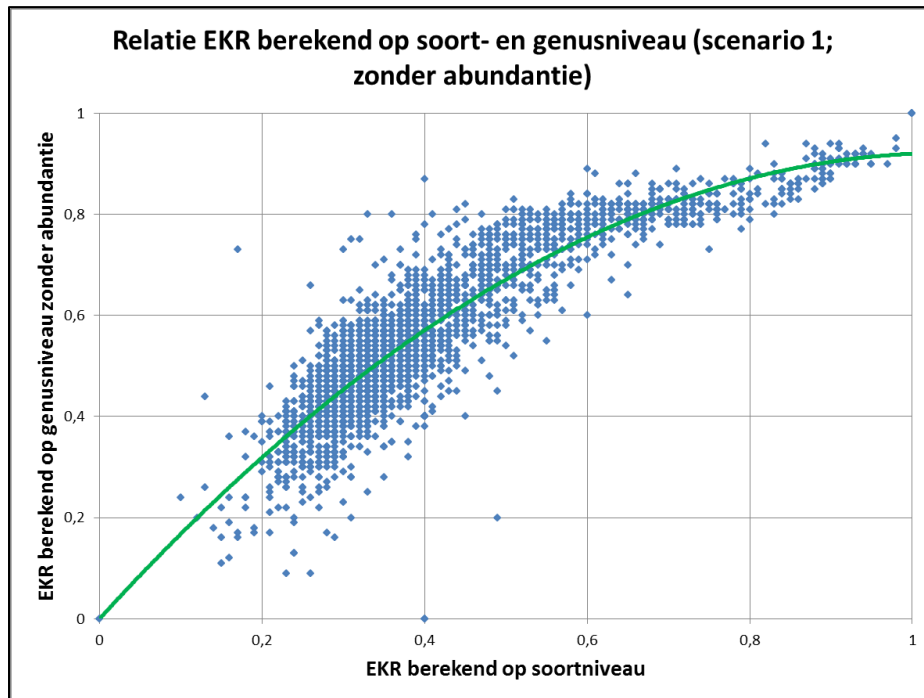
Figuur 4.8. Overzicht van de verdeling van de monsters uit KRW-type R5 in de ecologische kwaliteitsklassen.

4.4.2 Correlatie van EKR soort- en genusniveau



Figuur 4.9. Het verband tussen EKR op genusniveau (scenario 1) en EKR op soortniveau. Elk monster is berekend op soortniveau (huidige maatlat) en genusniveau, en staat tegen elkaar uitgezet in de grafiek.

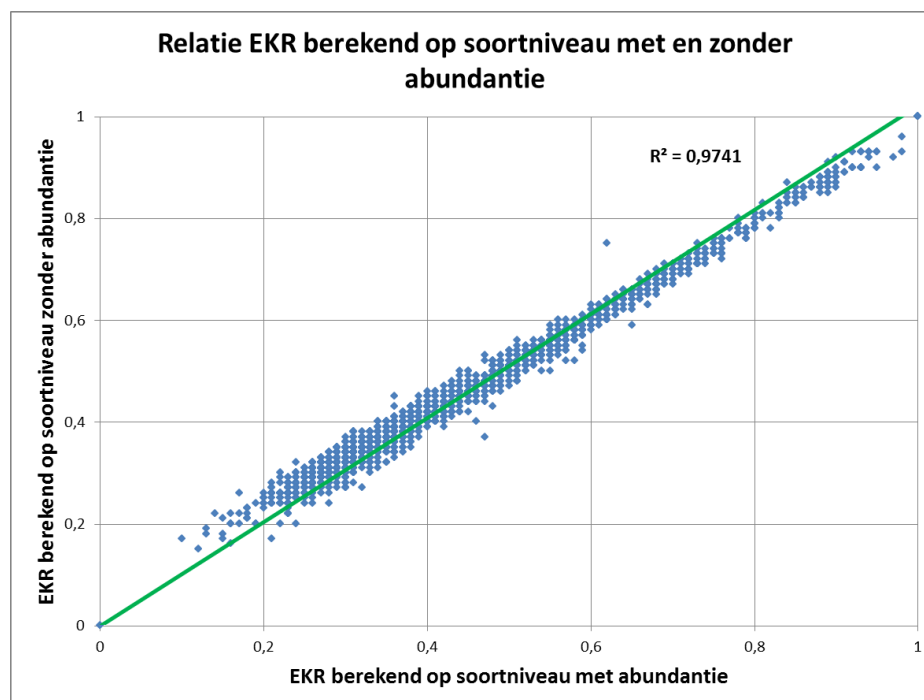
In figuur 4.9 staat het verband voor scenario 1. De trendlijn is een kromme. Daarnaast komt voor scenario 1 een waarde van -0,13 uit de One-Sample t-test, zie tabel K.10 en figuur K.2. De Pearson correlatie toets is daarom niet uitgevoerd voor de scenario's van R5. Het verband tussen EKR op soortniveau en EKR op genusniveau staat voor scenario 2 weergegeven in bijlage G: figuur G.1. Een vergelijkbaar verband als bij scenario 1 is aangetroffen bij scenario 2, een niet lineair verband. Voor scenario 3 is dit weergegeven in bijlage G: figuur G.2. Scenario 3 kent eveneens geen lineair verband.



Figuur 4.10. Het verband tussen EKR op genusniveau (scenario 1: zonder abundantie) en EKR op soortniveau. Elk monster is berekend op soortniveau (huidige maatlat) en genusniveau zonder abundantie, en staat tegen elkaar uitgezet in de grafiek.

Genusniveau; zonder abundantie

In deze paragraaf staan de resultaten van de correlatie op EKR soortniveau en EKR op genusniveau zonder abundantie). In figuur 4.10 staat het verband weergegeven tussen EKR op soortniveau en EKR op genusniveau (scenario 1; zonder abundantie). De trendlijn is een kromme, waarbij duidelijk is geworden dat het verband niet lineair is. De correlatie tussen EKR op soortniveau en EKR op genusniveau (zonder abundantie) staat voor scenario 2 weergegeven in bijlage H: figuur H.1. Een vergelijkbaar verband is aangetroffen bij scenario 2, een niet lineair verband. Voor scenario 3 is dit weergegeven in bijlage H: figuur H.2. Scenario 3 kent eveneens geen lineair verband. Tussen de scenario's zijn weinig verschillen zichtbaar. Deze grafieken zijn eveneens niet lineair en daarom is er geen Pearson correlatie test uitgevoerd.



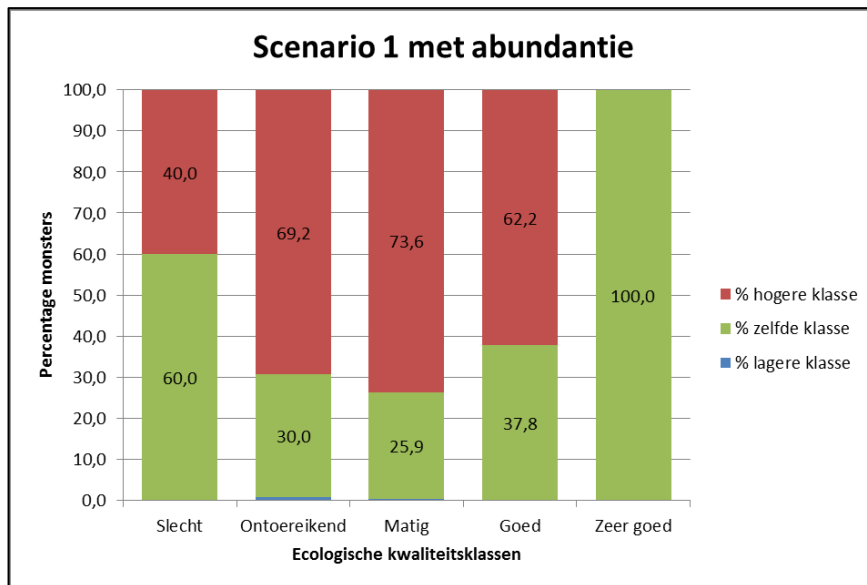
Figuur 4.11. Het verband tussen EKR op soortniveau (zonder abundantie) en EKR op soortniveau (met abundantie). Elk monster is berekend op soortniveau (huidige maatlat) en soortniveau zonder abundantie, en staat tegen elkaar uitgezet in de grafiek.

Soortniveau; zonder abundantie

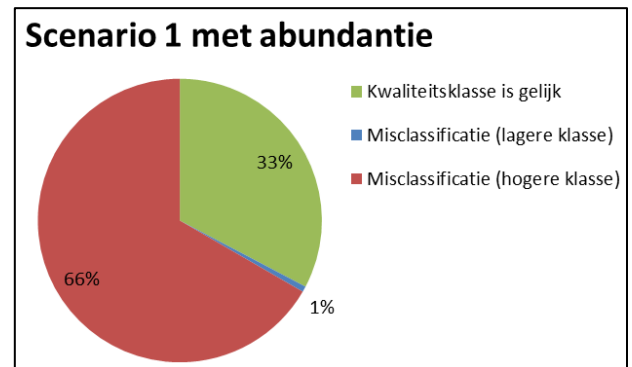
In figuur 4.11 staat de correlatie tussen EKR berekend op soortniveau met abundantie en EKR berekend op soortniveau zonder abundantie. Dit verband, in tegenstelling tot de scenario's van R5 is lineair. Dit verband is uitzonderlijk sterk, het heeft een correlatiecoëfficiënt van 0,994 en is significant ($p < 0,01$), zie bijlage K: tabel K.8.

4.4.3 Kans op juiste classificatie

De kans op juiste classificatie staat voor scenario 1 met abundantie weergegeven in figuur 4.11. Figuur 4.11a laat per ecologische kwaliteitsklasse zien hoeveel procent in een lagere klasse (blauw), hoeveel procent in dezelfde klasse (groen) en hoeveel procent in een hogere klasse (rood) terecht komt na het beoordelen op genusniveau. Daarnaast is in figuur 4.11b te zien hoeveel procent in totaal in een lagere, dezelfde of hogere klasse terecht komt.



Figuur 4.11a. De kans op juiste classificatie voor scenario 1 met abundantie.

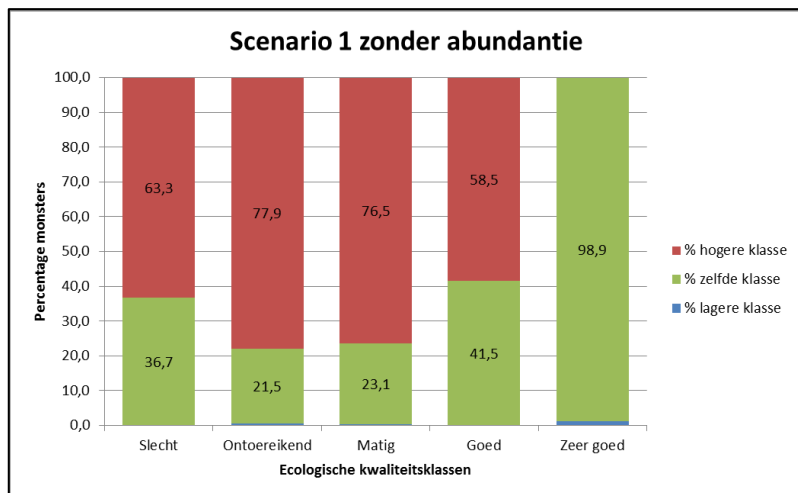


Figuur 4.11b. De kans op juiste classificatie voor scenario 1, weergegeven in een cirkeldiagram.

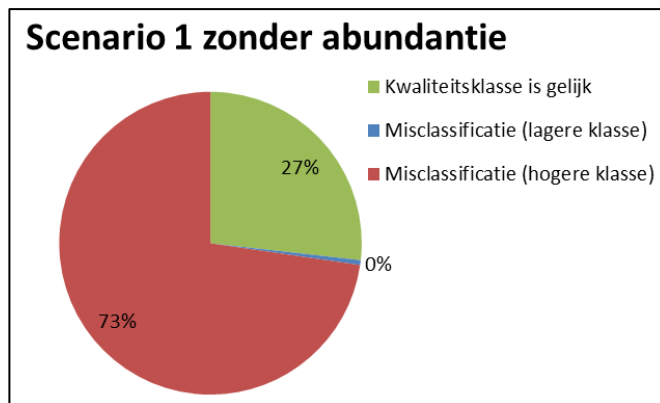
Uit deze figuren blijkt dat 33% in dezelfde klasse blijft na de beoordeling op genusniveau. 1% komt in een lagere klasse terecht en 66% komt in een hogere klasse. De overige figuren, voor scenario 2 en 3, staan weergegeven in bijlage J: figuur J.1. In scenario 2 blijft 24% in dezelfde klasse, 0% in een lagere klasse en 76% in een hogere klasse. In scenario 3 blijft 24% in dezelfde klasse, 0% in een lagere klasse en 76% in een hogere klasse. De verschillen tussen de scenario's zijn wisselend, maar hebben scenario 2 en 3 dezelfde percentages.

Genusniveau; zonder abundantie

De kans op juiste classificatie voor scenario 1 zonder abundantie staat weergegeven in figuur 4.12 op de volgende pagina. Figuur 4.12a laat per ecologische kwaliteitsklasse zien hoeveel procent in een lagere klasse (blauw), hoeveel procent in dezelfde klasse (groen) en hoeveel procent in een hogere klasse (rood) terecht komt na het beoordelen op genusniveau zonder abundantie. Daarnaast is in figuur 4.12b te zien hoeveel procent in totaal in een lagere, dezelfde of hogere klasse terecht komt.



Figuur 4.12a. De kans op juiste classificatie voor scenario 1 zonder abundantie.

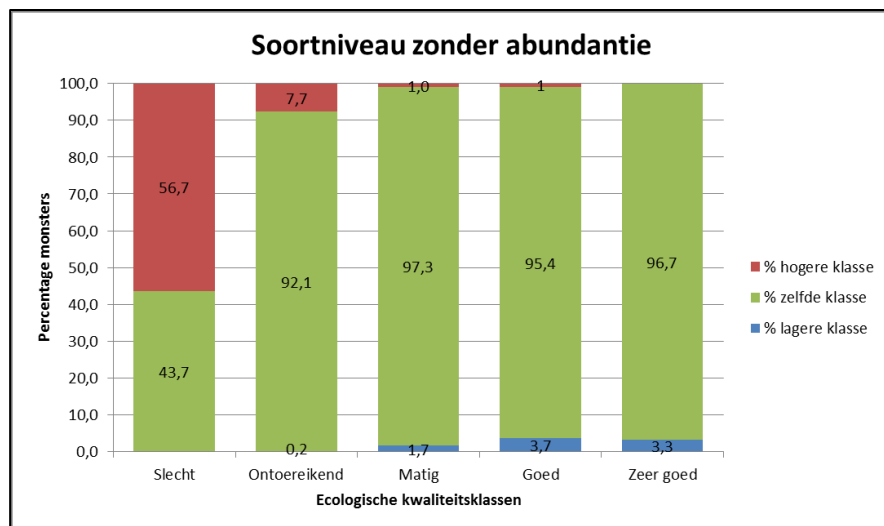


Figuur 4.12b. De kans op juiste classificatie voor scenario 1 zonder abundantie, weergegeven in een cirkeldiagram.

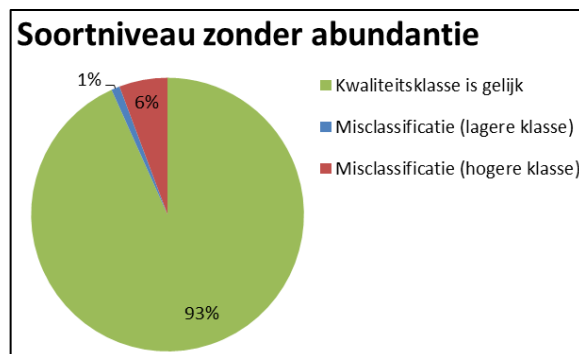
Uit deze figuren blijkt dat 27% in dezelfde klasse blijft na de beoordeling op genusniveau zonder abundantie. 0% komt in een lagere klasse terecht en 73% komt in een hogere klasse. De overige figuren, voor scenario 2 en 3, staan weergegeven in bijlage J: figuur J.2. In scenario 2 blijft 19% in dezelfde klasse, 0% in een lagere klasse en 81% in een hogere klasse. In scenario 3 blijft 19% in dezelfde klasse, 0% in een lagere klasse en 81% in een hogere klasse. De verschillen tussen de scenario's zijn wisselend, maar hebben scenario 2 en 3 dezelfde percentages.

Soortniveau; zonder abundantie

De kans op juiste classificatie na berekening van EKR op soortniveau zonder abundantie staat in figuur 4.13. Figuur 4.13a laat per ecologische kwaliteitsklasse zien hoeveel procent in een lagere klasse (blauw), hoeveel procent in dezelfde klasse (groen) en hoeveel procent in een hogere klasse (rood) terechtkomt na het beoordelen op soortniveau zonder abundantie. Daarnaast is in figuur 4.13b te zien hoeveel procent in totaal in een lagere, dezelfde of hogere klasse terecht komt.



Figuur 4.13a. De kans op juiste classificatie voor soortniveau zonder abundantie.



Figuur 4.13b. De kans op juiste classificatie voor EKR berekend op soortniveau zonder abundantie, weergegeven in een cirkeldiagram.

Uit deze figuren blijkt dat 93% in dezelfde klasse blijft na de beoordeling op soortniveau zonder abundantie. 1% komt in een lagere klasse terecht en 6% komt in een hogere klasse. Uit figuur 4.13a blijkt dat de ecologische kwaliteitsklasse 'slecht' het hoogste percentage heeft dat in een hogere klasse terecht komt. Dit geeft echter een vertekend beeld, want deze klasse bestaat slechts uit dertig monsters, zoals te zien is in figuur 4.8.

4.5 Overzicht resultaten M10 en R5

In deze paragraaf staan de resultaten van watertypen M10 en R5 overzichtelijk gepresenteerd in de drie onderstaande tabellen. De resultaten zijn afkomstig uit paragraaf 4.3, paragraaf 4.4 en bijlages E t/m J.

Maatlat op genusniveau

Tabel 4.4 geeft een overzicht van de resultaten van de maatlat op genusniveau. De waarden van de correlatiecoëfficiënt en de kans op juiste classificatie staan hier onder andere in.

Tabel 4.4. Samenvatting resultaten M10 en R5 (genusniveau) uit vorige paragrafen.

	M10 genusniveau	R5 genusniveau
<i>Lineair verband?</i>	Ja	Nee
<i>Correlatiecoëfficiënt (R)</i>	0,949	Geen correlatie
<i>Interpretatie kracht verband</i>	Zeër sterk	-
<i>Kans op juiste classificatie</i>	80%	33 %
<i>Misclassificatie (lagere klasse)</i>	17 %	1 %
<i>Misclassificatie (hogere klasse)</i>	3 %	66 %

Maatlat op genusniveau (zonder abundantie)

In tabel 4.5 staat een overzicht van de resultaten van de maatlat op genusniveau zonder abundantie. Zo staan hier de waarden van onder andere de correlatiecoëfficiënt en de kans op juiste classificatie.

Tabel 4.5. Samenvatting resultaten M10 en R5 (genusniveau zonder abundantie) uit vorige paragrafen.

	M10 genusniveau (zonder abundantie)	R5 genusniveau (zonder abundantie)
<i>Lineair verband?</i>	Ja	Nee
<i>Correlatiecoëfficiënt (R)</i>	0,933	Geen correlatie
<i>Interpretatie kracht verband</i>	Zeër sterk	-
<i>Kans op juiste classificatie</i>	82 %	27 %
<i>Misclassificatie (lagere klasse)</i>	11 %	0 %
<i>Misclassificatie (hogere klasse)</i>	7 %	73 %

Maatlat op soortniveau (zonder abundantie)

Tabel 4.6 geeft een overzicht van de resultaten van de maatlat op soortniveau zonder abundantie. Zo staan hier de waarden van onder andere de correlatiecoëfficiënt en de kans op juiste classificatie.

Tabel 4.6. Samenvatting resultaten M10 en R5 (soortniveau zonder abundantie) uit vorige paragrafen.

	M10 soortniveau (zonder abundantie)	R5 soortniveau (zonder abundantie)
<i>Lineair verband?</i>	Ja	Ja
<i>Correlatiecoëfficiënt (R)</i>	0,969	0,994
<i>Interpretatie kracht verband</i>	Uitzonderlijk sterk	Uitzonderlijk sterk
<i>Kans op juiste classificatie</i>	89 %	93 %
<i>Misclassificatie (lagere klasse)</i>	3 %	1 %
<i>Misclassificatie (hogere klasse)</i>	8 %	6 %

4.6 Kosten vergelijking huidige monitoring versus eDNA monitoring

In deze paragraaf staan de resultaten die tot antwoord op de laatste deelvraag leidt: “Wat zijn de kosten voor de verschillende methoden (eDNA monitoring en huidige monitoring) en welke methode heeft de beste prijs op de lange termijn?” In deze paragraaf staan de kosten voor huidige monitoring van macrofauna en de kosten van eDNA monitoring als alternatief.

4.6.1 Kosten huidige methode

In tabel 4.7 staan de kosten voor de huidige methode, zoals ze in 2015 zijn vastgesteld door ecologisch adviesbureau Koeman en Bijkerk in samenwerking met stichting EIS. Voor de bemonstering geldt dat deze prijs is vastgesteld voor een dag dat er vijf monsters genomen worden. De reiskosten zijn hier niet bij inbegrepen. De berekening van bemonstering voor 96 monsters is eveneens gebaseerd op vijf monsters per dag. De totale kosten voor het bemonsteren, uitzoeken en determineren van 96 macrofauna monsters bedraagt € 94.752,-. Dit komt gemiddeld per monster neer op een bedrag van 987 euro. Dit bedrag is exclusief BTW en reiskosten.

Tabel 4.7. Huidige kosten voor bemonstering voor macrofauna (KRW-type M3 of M10). Prijzen zijn in euro, exclusief BTW en reiskosten. De prijzen zijn opgesteld door Koeman en Bijkerk, in samenwerking met stichting EIS.

	Aantal uur (per monster)	Prijs per monster (5 monsters)	Prijs per 96 monsters
Bemonstering + reistijd	1,5	112	10.752
Uitzoeken	4,5	315	30.240
Determineren	8	560	53.760
Totaal	14	987	94.752

4.6.2 Kosten eDNA methode

In tabel 4.8 staan de kosten voor de eDNA methode. De prijzen zijn opgesteld door Koeman en Bijkerk, in samenwerking met stichting EIS voor bemonstering en reistijd, dit is exclusief reiskosten. De tijd die nodig is om van de bemonsteringslocatie naar het bedrijf die de eDNA analyse uitvoert, is bij de reistijd inbegrepen. Voor de overige stappen van de eDNA methode zijn de prijzen vastgesteld door BaseClear BV. Een commercieel bio-informatica bedrijf. De prijzen zijn opgesteld als prijs per monster, wanneer er 96 monsters tegelijk geanalyseerd kunnen worden. In verhouding is dit goedkoper dan een analyse voor een individueel monster. Deze prijzen zijn een indicatie van de verwachte marktprijs. De totale kosten voor het bemonsteren en lab-analyse van 96 macrofauna monsters bedraagt € 30.080,-. Dit komt neer op gemiddeld 341 euro per monster. Dit bedrag is exclusief BTW. De prijzen voor 96 monsters zijn in verhouding goedkoper dan de prijs voor één monster. Dit verschil zit vooral in de stap van het bemonsteren. Het is voordeliger om tegelijk meer monsters te nemen, dan slechts één monster. Voor eDNA kunnen er gemiddeld zes monsters per dag worden genomen, inclusief de administratieve verwerking en het afleveren van de monsters bij het laboratorium. (Boonstra, 2015)

Tabel 4.8. Indicatieve kosten voor eDNA analyse voor macrofauna. Prijzen zijn in euro, exclusief BTW. De prijzen zijn opgesteld door Koeman en Bijkerk (bemonstering + reistijd) en de overige prijzen zijn opgesteld door BaseClear BV.

	Prijs per monster (bij 96 monsters)	Prijs per 96 monsters
Bemonstering + reistijd	121	8.960
DNA extractie	50	4.800
PCR	75	7.200
Sequencing (50K reads)	50	4.800
Bioinformatica	45	4.320
Totaal	341	30.080

5 Discussie

Opzet onderzoek

Dit onderzoek is mede opgezet om te onderzoeken wat het effect is op de maatlat voor macrofauna als er op genusniveau beoordeeld gaat worden met DNA technieken. Er is verondersteld dat met de in ontwikkeling zijnde DNA technieken niet tot op soortniveau gedetecteerd kan worden. Aan het eind van dit onderzoek is deze veronderstelling ontkracht door het TKI project: het detecteerbare niveau blijkt in plaats van genusniveau, soortniveau te zijn. Daarin onderscheidt het resultaat van detectie met DNA technieken zich dus niet van huidige bemonstering en determinatie. Wel blijft er onderscheid in de mate waarin abundantie van soorten kan worden vastgesteld: dat kan wel met huidige technieken, maar niet met DNA technieken.

Dataverwerking

In het hoofdstuk onderzoeksmethode is een methode gepresenteerd om conflicterende genera in te kunnen delen in een genuslijst (zie keuzematrix paragraaf 3.1.4). Deze methode hanteert een aantal maatstaven met grenswaarden. De verdeling van waarden voor de desbetreffende maatstaven, heeft de keuze voor grenswaarden bepaald. Zo is er getracht een goede keus te kunnen maken. Dit is niet gebaseerd op een bron uit de literatuur, een andere onderzoeker had andere waarden kunnen kiezen en is daarmee arbitrair.

Resultaten M10

De correlatiegrafieken voor de verschillende scenario's, zoals in bijlage E en bijlage F staan en in paragraaf 4.3.2 van het type M10 hebben vrijwel dezelfde vorm. Een lage EKR op soortniveau heeft een grotere afwijking van de trendlijn. Deze afwijking kan verklaard worden met het feit dat in een monster met lage EKR score vaak minder taxa hebben dan een monster met een hogere EKR score. Het is namelijk gevoeliger voor afwijking door het veranderen van soort- naar genusniveau. Sommige soorten, die opgewerkt zijn naar genera, worden ten onrechte meegenomen als een negatief dominant genus of een positief genus. Door het beoordelen op genusniveau wordt het minder nauwkeurig.

Formule EKR berekening voor kunstmatige meren.

$$EKR = \frac{\left\{ 2x \left(\frac{PT}{PT_{max}} \right) + \left(1 - \frac{DN\%}{DN_{max}\%} \right) \right\}}{3}$$

Dezelfde vorm van de grafiek geldt voor soortniveau zonder abundantie. De nauwkeurigheid neemt toe naarmate de EKR toeneemt. Alle taxa in het monster hebben de waarde 1 voor abundantie gekregen. Alleen het aantal negatieve taxa heeft nog effect op de score, de hoeveelheid (abundantie) negatieve taxa niet. Dat verklaart deels waarom een aantal monsters met een lage EKR een grotere afwijking hebben op de EKR zonder abundantie dan monsters met een hoge EKR.

De ecologische kwaliteitsklasse zeer goed omvat slechts één monster. Op basis van dit ene monster kan geen betrouwbare uitspraak gedaan worden over de ecologische kwaliteitsklasse, echter is deze wel meegenomen in de correlatie analyse.

Resultaten R5

De correlatiegrafieken zoals in bijlage G en bijlage H staan en in paragraaf 4.4.2 van het type R5 hebben vrijwel dezelfde vorm. Deze vorm is een kromme. Dit geeft aan dat het geen lineair verband heeft. Dit is ook te zien in bijlage K: tabel K.10. Hier staat de gemiddelde fout, die is berekend met de "One-Sample t-test", namelijk: -0,13. Dat wil zeggen dat de gemiddelde afwijking van de EKR na het aanpassen van de maatlat -0,13 is. Vergeleken met de gemiddelde afwijking van M10 scenario 1 (zie

bijlage K: tabel K.9), is deze waarde erg hoog (0,245). Tevens is te zien in bijlage K: figuur K.2 dat het verband niet lineair is. Bij een lineair verband zal de afwijking zowel positief als negatief zijn. De maatlat op genusniveau geeft systematisch lagere waarden voor de EKR dan de maatlat op soortniveau, vooral tussen de EKR waarden: 0,20 en 0,80. Figuur K.2 laat zien dat de afwijking negatief is, dat wil zeggen dat de maatlat op genusniveau gemiddeld een onderschatting geeft van de EKR score.

De vorm van de grafieken van R5 (op genusniveau) heeft te maken met de formule voor de EKR van rivieren, zoals R5. De opwerking van soort- naar genusniveau heeft als consequentie dat er minder taxa in een monster aanwezig zijn op genusniveau. Tegelijkertijd wordt de indicator minder specifiek en behoren meer taxa tot de indicatoren (kenmerkend, positief en negatief). Het gevolg daarvan is dat de waarden voor KM%, DN% en DP% hoger uitvallen. In de onderstaande formule komt KM% twee maal voor. Dat betekent dat de waarde voor KM% een grotere invloed heeft op de uitkomst (EKR) dan de overige twee indicatoren (DN% en DP%). Bovendien wordt de factor (KM%/KMmax) met 200 vermenigvuldigd, dat de indicator KM% nog belangrijker maakt in de formule.

Voor rivieren (zwaardere weging van de parameter DN%):

$$EKR = \frac{\left\{ 200 * \left(\frac{KM\%}{KMmax} \right) + 2 * (100 - DN\%) + (KM\% + DP\%) \right\}}{500}$$

Zichtbaar in figuur 4.9 (hoofdstuk 4 Resultaten) is dat de hoge EKR scores op soortniveau (vanaf EKR 0,8) beter correleren met beoordeling op genusniveau. Dit kan verklaard worden doordat er meer taxa in deze monsters aanwezig zijn en de invloed van KM% daarin minder groot is.

Hoogstwaarschijnlijk heeft KM% ook op andere KRW-typen effect waar KM% in de formule aanwezig is.

Voor R5 is in dit onderzoek duidelijk geworden dat monsters met een EKR score van 0,4 een overschatting kunnen zijn van de werkelijke EKR score. Monsters met een EKR score van 0,4 waarin geen enkel taxon tot een indicator behoort, krijgen een onterecht hogere waardering. Als de waarden voor KM%, DN% en DP% nul zijn, is de uitkomst van de formule 0,4. Deze monsters zijn ten onrechte meegenomen in dit onderzoek. Dit zijn onder andere monsters met minder dan tien verschillende taxa.

Knoben *et al.* (2007) stelt dat monsters met tien verschillende taxa kunnen worden getoetst. Het programma Dawaco stelt dit echter niet als eis voor toetsing: monsters met minder dan tien verschillende taxa worden ook getoetst. In dit onderzoek gaat het om 11 monsters voor type M10 en 62 monsters voor type R5 die onterecht zijn meegenomen in de analyse.

Effect van beoordelen zonder abundantie

Uit de resultaten blijkt dat de EKR zonder abundantie uitzonderlijk sterk correleert met EKR met abundantie, zowel voor KRW-type M10 (R=0,969) als KRW-type R5 (R=0,994). Kwantitatieve gegevens produceren met behulp van eDNA blijkt vooralsnog niet mogelijk. Dit resultaat geeft aan dat beoordeling van de biologische waterkwaliteit voor macrofauna goed mogelijk is zonder het vaststellen van abundantie van soorten.

Kosten

De berekende kosten van eDNA zijn gebaseerd op een verwachte prijs als de methodiek verder ontwikkeld is. Dat zijn dus geen vastgestelde marktprijzen en de kosten in dit onderzoek kunnen in kleine mate afwijken van toekomstige kosten. Het geeft echter wel een goed beeld van het verschil in kosten tussen huidige monitoring van macrofauna en eDNA monitoring. De verwachting is dat in de loop der jaren er meer onderzoek zal plaatsvinden op het gebied van DNA. De afgelopen jaren is de ontwikkeling van deze DNA technieken sterk ontwikkeld. De verwachting is dat deze trend zich door

zet. Dat maakt de kosten van DNA technieken goedkoper. De aanname is dat de kostenindicatie voor eDNA uit paragraaf 4.6.2 eerder overschat is, dan onderschat. Echter moet hierbij gezegd worden, de kosten voor de ontwikkeling van deze methode is niet meegenomen in dit onderzoek. Daarnaast is het noodzakelijk om de methode te standaardiseren en draagvlak bij de Europese commissie te creëren, voordat dit een goed werkend alternatief kan zijn voor de monitoring van de KRW. Zo stelt Gravendeel (2015) dat het streven binnen Naturalis is om binnen 3,5 jaar ontwikkeld te hebben. Naast het vergelijken van kosten tussen huidige monitoring en eDNA monitoring, is het zinvol om kosten te vergelijken tussen huidige monitoring en determinatie tot op soortniveau en op genusniveau. Op genusniveau monitoren kunnen naar verwachting kosten bespaard worden, door minder tijd aan determineren kwijt te zijn. Het kan in de toekomst een beleidsoverweging zijn om meer aan monitoring te doen met dezelfde kosten. Zo kan er meer inzicht komen in waterkwaliteit voor hetzelfde geld. In dit onderzoek is echter gekozen om dit niet te vergelijken, omdat de focus ligt op het implementeren van eDNA monitoring in de KRW. In mogelijke vervolgonderzoeken is dit zeer zinvol om te vergelijken. Ook het monitoren zonder abundantie kan dan meegenomen worden in het vergelijken van kosten.

Kans op juiste classificatie

Een beperking aan het maatstaf kans op juiste classificatie is dat het geen perfect beeld geeft van het scoreverschil. Een monster kan theoretisch in dezelfde klasse blijven na aanpassing van de maatlat, terwijl de score een verschil van 0,19 heeft. Omgekeerd kan een monster slechts een scoreverschil van 0,01 hebben, maar toch in een hogere/lagere klasse terecht komen.

Daarnaast is de kans op juiste classificatie iets overschat. De slechte ecologische kwaliteitsklasse kan niet slechter worden na aanpassing en de zeer goede ecologische kwaliteitsklasse kan niet beter worden. Hier dient rekening mee gehouden te worden bij de grafieken voor juiste classificatie.

Onderzoek Quickscan macrofauna ‘overige wateren’

Een vergelijkbaar onderzoek is uitgevoerd door Alterra en Waterschap Rivierenland. In dat onderzoek was het doel om een alternatieve methode te ontwikkelen om waterkwaliteit te beoordelen die kosten voor monitoring van macrofauna kan reduceren. Een simpele beoordeling van de monsters geeft een resultaat dat te vergelijken is met de score van de KRW-maatlat, zo stelt Keizer *et al.* (2013). Deze maatlat is gebaseerd op determineren in het veld op het laagst mogelijk taxonomische niveau dat nog met het oog te onderscheiden valt, dit is voornamelijk familieniveau. In dat onderzoek is de conclusie getrokken dat 85% van de kosten gereduceerd kan worden ten opzichte van huidige monitoring. De maatlat ontwikkeld door Keizer *et al.* (2013) is een stuk minder nauwkeurig ($R^2 = 0,74$) dan de resultaten uit dit onderzoek. Het beoordelen op soortniveau zonder abundantie geeft de volgende waarden voor de determinatiecoëfficiënt ($R^2 = 0,93$ en $R^2 = 0,97$). Dat maakt de resultaten in dit onderzoek meer betrouwbaar. Er moet echter gezegd worden dat dit niet direct te vergelijken is, omdat er in het onderzoek van Keizer *et al.* (2013) gebruik is gemaakt van monsters uit een ander KRW-type, namelijk: M01a.

Toepasbaarheid in de KRW

De mogelijkheden van eDNA als monitoringsmethode zijn twee jaar geleden door Bijkerk *et al.* (2013) sceptisch behandeld. Zo stelde Bijkerk *et al.* (2013) dat door het niet kunnen vaststellen van abundantie het onmogelijk is om de huidige methode volledig te vervangen. Uit dit onderzoek blijkt echter dat bij het beoordelen van macrofauna, het weglaten van abundantie geen grote gevolgen heeft op de score van de EKR.

Toekomstperspectief

Om een aangepaste maatlat te kunnen gebruiken in het kader van de KRW, is het noodzakelijk om deze methode geaccepteerd te krijgen door de Europese commissie. Daarvoor is het nodig om aan een intercalibratie stap te doen. Daarvoor zijn speciale intercalibratie richtlijn voor opgesteld.

Deze richtlijn is te vinden op de website van de Europese commissie (ec.europa.eu).

Allereerst is er draagvlak nodig voor de aangepaste maatlat in Nederland, alvorens er een intercalibratie stap gedaan kan worden.

6 Conclusie

Probleemstelling

De verwachting is dat met eDNA het niet mogelijk zal zijn om tot op soortniveau te beoordelen, maar tot op genusniveau (geslachtsniveau). Daarnaast is het vaststellen van kwantitatieve gegevens (abundantie) met behulp van eDNA niet mogelijk. De maatlatten in de KRW voor macrofauna beoordelen echter tot op soortniveau en maakt gebruik van abundantie, eDNA zal daarom niet direct toegepast kunnen worden. In dit onderzoek is daarom onderzoek gedaan naar het effect van beoordelen van de waterkwaliteit van soortniveau naar genusniveau en exclusief abundantie. De hoofdvraag luidt als volgt: *Wat is de betrouwbaarheid van het beoordelen van waterkwaliteit op genusniveau en exclusief abundantie?*

Om een antwoord te krijgen op deze hoofdvraag is onderzoek gedaan naar de verandering van beoordelen en het effect op de ecologische kwaliteitsratio score, zie hoofdstuk 3 Onderzoeksmethode.

Resultaten

Uit de resultaten blijkt dat voor KRW-type M10 een zeer sterk lineair verband ($R=0,949$) bestaat tussen het beoordelen op soortniveau en genusniveau. De kans op juiste classificatie is circa 84%. Het lineair verband tussen beoordelen op soortniveau met abundantie en op soortniveau zonder abundantie is uitzonderlijk sterk ($R=0,969$). De kans op juiste classificatie is circa 89%.

Uit de resultaten voor KRW-type R5 blijkt dat er geen lineair verband bestaat tussen het beoordelen op soortniveau en genusniveau. De kans op juiste classificatie is slechts 33%. Echter blijkt uit de resultaten wel een uitzonderlijk sterk lineair verband te bestaan ($R=0,994$) tussen beoordelen op soortniveau met abundantie en op soortniveau zonder abundantie. De kans op juiste classificatie is circa 93%.

Een overstap van huidige monitoring van de KRW naar de eDNA methode, kan leiden tot een besparing van € 646,- per monster en ruim € 64.000,- voor 96 monsters, mits eDNA een goed ontwikkelde en gestandaardiseerde methode is in de toekomst.

Conclusies

Uit bovenstaande resultaten kan de conclusie getrokken dat op genusniveau de kwaliteit van het beoordelen van KRW-type M10 negatief wordt beïnvloed, maar slechts op geringe wijze. De betrouwbaarheid van de aangepaste maatlat op genusniveau is goed, er is een zeer sterk lineair verband aangetoond.

Voor KRW-type R5 kan geconcludeerd worden dat de kwaliteit van het beoordelen niet betrouwbaar is, omdat er geen lineair verband is gevonden. Het aanpassen van de maatlat zonder invloed van abundantie, is zeer betrouwbaar, het laat een uitzonderlijk sterk verband zien voor beide KRW-typen. Kosten voor eDNA monitoring zijn een stuk lager dan de kosten van huidige monitoring, met de inzet van eDNA monitoring in de toekomst kunnen kosten voor monitoring van eindgebruikers aanzienlijk gereduceerd worden. Hierbij dient gezegd te worden dat de eDNA methode eerst verder ontwikkeld en geoptimaliseerd dient te worden voordat dit de huidige manier van monitoren kan vervangen.

7 Aanbevelingen

Aanpassen Dawaco

Monsters, zoals in hoofdstuk 5 (discussie) is beschreven, met minder dan tien verschillende taxa zijn onterecht meegenomen in dit onderzoek. Deze randvoorwaarde stond abusievelijk niet in de maatlatdocumenten vermeld. Het is sterk aan te bevelen om het programma Dawaco aan te passen, zodat monsters met minder dan tien verschillende taxa geen EKR score berekend kan worden.

Gebruik maatlatten op soortniveau, zonder abundantie is een goede optie

Zoals in hoofdstuk 5 (discussie) te lezen is, blijkt dat de verwachting dat genusniveau het laagst detecteerbare taxonomische niveau zal zijn met het monitoren door middel van eDNA bijgesteld te zijn. De huidige verwachting is dat met monitoren van eDNA op soortniveau gedetecteerd kan worden. Daarom is het sterk aan te raden om de maatlatten op soortniveau te behouden, maar de invloed van abundantie in de maatlat weg te laten. Dit maakt het mogelijk om eDNA te gebruiken als alternatieve monitoringsmethode. Echter, voordat dit een alternatief kan zijn, is het noodzakelijk om de aangepaste maatlat te intercalibreren volgens Europese richtlijnen.

Vervolg onderzoek naar meer KRW-typen

Dit onderzoek is gericht op de maatlatten van KRW-typen M10 en R5. Dit is slechts een fractie van de KRW-typen. Het is daarom ook van belang dat hier vervolgonderzoek naar gedaan wordt. Het is aan te bevelen om minstens één vergelijkbaar KRW-type als M10 te onderzoeken naar het effect op de maatlat om vast te kunnen stellen dat KRW-typen zoals M10 geschikt zijn voor beoordelen op genusniveau.

Vervolgonderzoek formule natuurlijke rivieren

Als er besloten wordt om op genusniveau te beoordelen voor natuurlijke rivieren, is het noodzakelijk om een lineair verband te creëren tussen het beoordelen op soortniveau en genusniveau. Met de huidige formule kan er niet betrouwbaar EKR scores berekend worden op genusniveau. Het is aan te bevelen om de invloed van KM% in de formule verder te onderzoeken, zoals in hoofdstuk 5 staat uitgelegd.

8 Literatuurlijst

Adviesbureau AT-KB. (z.d.). *(KRW) bemonstering*. [Online afbeelding]. Gedownload op 2 maart 2015, van <http://www.at-kb.nl/nl/diensten/ecologie/hydrobiologie/-krw-bemonstering>

Alles over DNA. (z.d.). *Nucleotiden: doelgroepen*. Geraadpleegd op 13 mei 2015, van <http://www.allesoverdna.nl/woordenboek/nucleotiden.html>

Balzer, J & Hirsch, M. (2007). *PCR: Wat is het en wat kunt u ermee in de praktijk?* Almere: Vet Med Lab a Division of IDEXX Laboratories BV

Betawerk. (z.d.). *Polymerase-kettingreactie*. [Online afbeelding]. Gedownload op 12 maart 2015, van <http://www.10voorbiologie.nl/index.php?cat=9&id=393&par=394&sub=1663>

Bijkerk, R., Patberg, W., Wanink, J.H., Wallaart, E., Warmink, E. (2013). *De toepassing van eDNA in de monitoring van waterorganismen*. Amersfoort: Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer. STOWA Rapport 2013 – 24.

BioRadLifeScience. (2012, 16 maart). *Digital PCR Using the Bio-Rad QX100™ ddPCR™ system*. [Online video]. Geraadpleegd op 26 februari 2015, van <https://www.youtube.com/watch?v=Qwma-1Ek-Y4>

Boonstra, H. (mondelinge bron), Haren, 22 april 2015.

ChicagoUSACE (US Army Corps of Engineers®; Chicago district). (2011). *Filtering water samples for eDNA analysis*. [Online video]. Geraadpleegd op 25 februari 2015, van <https://www.youtube.com/watch?v=qLTKtfHH-Pw>

Daligault, J. (2014). *Génomique – Transcriptomique: Real Time PCR*. [Online afbeelding]. Gedownload op 24 februari 2015, van <http://www.ijm.fr/plateformes/genomique/>

Dejean, T., Valentini, A., Duparc, A., Pellier-Cuit, S., Pompanon, F., Taberlet, P., Miaud, C. (2011). Persistence of Environmental DNA in Freshwater Ecosystems. *PLoS ONE*, 6 (8): E23398.

Dorkin, R. (Docent). (2012, 9 mei) *Polymerase Chain Reaction (PCR) | MIT 7.01SC Fundamentals of Biology* [youtube-video] Cambridge: Massachusetts Institute of Technology.

Evers, C.H.M., Knoben, R.A.E., Herpen, F.C.J. van, Broek, A.J.M. van den, Buskens, R., Leerdam, A. van. (2012). Omschrijving MEP en maatlatten voor sloten en kanalen voor de Kaderrichtlijn Water 2015-2021. Amersfoort: Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer. STOWA Rapport 2012-34.

Ficetola, G.F., Miaud, C., Pompanon, F., Taberlet, P. (2008). Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 4, blz. 423-425.

Gravendeel, B. (mondelinge bron), Leiden, 1 juni 2015.

Groot, G.A. de (mondelinge bron), Wageningen, 13 februari 2015.

Groot, G.A. de., Laros, I., Ottburg, F.G.W.A., Roessink, I. (2014). Aquatische exoten vroeg detecteren via eDNA. *Landschap*, 3, blz. 146-153.

Helder, J.E., Delft, J.J.C.W., van. Bellemain, E., Valentini, A. (2013). Environmental DNA, krachtig gereedschap voor het monitoren van fauna. *De Levende Natuur*, 114, blz. 108-113.

Helder, J.E., Valentini, A., Bellemain, E., Dejean, T., Delft, J.J.C.W. van., Thomsen, P.F., Taberlet, P. (2014). *Environmental DNA - toepassingsmogelijkheden voor het opsporen van (invasieve) soorten*. Nijmegen: Stichting RAVON. Rapport 2013 – 104.

Helpdesk water. (2012). Blauwalgenprotocol 2012: aangepaste versie van blauwalgenprotocol 2011. Gedownload op 26 februari 2015, van <http://www.helpdeskwater.nl/actueel/@21897/blauwalgen/>

Jakobs, C. (2014, 4 juli). *PCR (polymerase-kettingreactie)*. Geraadpleegd op 18 februari 2015, van <http://www.science-explained.com/nl/theorie/pcr-polymerase-kettingreactie/>

Keizer, H.E., Gylstra, R., Verdonschot, R.C.M, Verdonschot, P.F.M. (2013). KRW QuickScan macrofauna 'overige wateren'. *H2O-Online*, Vol. 2013 (No. juni), pag. 1-10.

Kent State University. (z.d.) *SPSS tutorials: pearson correlation*. Geraadpleegd op 22 juni 2015, van <http://libguides.library.kent.edu/SPSS/PearsonCorr>

Knoben, R.A.E., Kamsma, P.A.M., Pot, R. [red.] (2007). Achtergronddocument referenties en maatlaten macrofauna ten behoeve van de Kaderrichtlijn Water. Amersfoort: STOWA.

KWR Watercycle Research Institute (z.d.) *Identificeren van eDNA t.b.v. inzicht in aquatische biodiversiteit*. Geraadpleegd op 5 februari 2015, van <http://www.kwrwater.nl/TKI/eDNA-en/>

Leiden Universiteit. (2006). *Statistiek voor historici: Correlatie en regressie*. Geraadpleegd op 1 mei 2015, van <http://www.let.leidenuniv.nl/history/RES/stat/html/les10.html>

Ministerie van Verkeer en Waterstaat, ministerie van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer, ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit. (2009a). *Stroomgebiedbeheerplan Eems 2009-2015*. Geraadpleegd op 25 maart 2015, van <http://www.helpdeskwater.nl/publish/pages/24004/sgbpeems2009-2015.pdf>

Ministerie van Verkeer en Waterstaat, ministerie van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer, ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit. (2009b). *Stroomgebiedbeheerplan Maas 2009-2015*. Geraadpleegd op 25 maart 2015, van <http://www.rijksoverheid.nl/bestanden/documenten-en-publicaties/notas/2009/12/22/stroomgebiedbeheerplan-maas/13-sgbp-maas.pdf>

Ministerie van Verkeer en Waterstaat, ministerie van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer, ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit. (2009c). *Stroomgebiedbeheerplan Rijndelta 2009-2015*. Geraadpleegd op 25 maart 2015, van <http://www.rijksoverheid.nl/documenten-en-publicaties/brochures/2011/01/10/stroomgebiedbeheerplan-rijndelta.html>

Ministerie van Verkeer en Waterstaat, ministerie van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer, ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit. (2009d). *Stroomgebiedbeheerplan Schelde 2009-2015*. Geraadpleegd op 25 maart 2015, van www.helpdeskwater.nl/publish/pages/24004/sgbpschelde2009-2015.pdf

Molen, D.T. van der, Pot, R., Evers, C.H.M., Nieuwerburgh, L.L.J., van. [red.] (2012). Referenties en maatlatten voor natuurlijke watertypen voor de Kaderrichtlijn Water 2015-2021. Amersfoort: Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer. STOWA Rapport 2012-31.

Molen, D.T. van der, Pot, R., Evers, C.H.M., Buskens, R., Herpen, F.C.J. van. [red.] (2013). Referenties en maatlatten voor overige wateren (geen KRW-waterlichamen). Amersfoort: Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer. STOWA Rapport 2013-14.

Nathan, L.M., Simmons, M., Wegleitner, B.J., Jerde, C.L., Mahon, A.R. (2014). *Quantifying Environmental DNA Signals for Aquatic Invasive Species Across Multiple Detection Platforms*. [Online afbeelding]. Geraadpleegd op 26 februari 2015, van <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/es5034052>

PCR (z.d.). Geraadpleegd op 18 februari 2015, van <http://www.environmental-dna.nl/Toepassingen/PCR.aspx>

Pearson. (z.d.). *Verbanden tussen variabelen vaststellen en interpreteren*. Geraadpleegd op 20 juni 2015, van <https://www.google.nl/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=5&cad=rja&uact=8&ved=0CDwQFjAE&url=http%3A%2F%2Fwww.pearsoneducation.nl%2Fburnsbush%2FHoofdstuk%252018.ppt&ei=IniFVdHyLq6N7AbVvoGQDw&usg=AFQjCNGtn0m6dWjti6PxvfjB5yhCZCDRDQ>

Piaggio, A.J., Engeman, R.M., Hopken, M.W., Humphrey, J.S., Keacher, K.L., Bruce, W.E., Avery, M.L. (2014). Detecting an elusive invasive species: a diagnostic PCR to detect Burmese python in Florida waters and an assessment of persistence of environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, 14, blz. 374–380.

Pilliod, D.S., Goldberg, C.S., Arkle, R.S., Waits, L.P. (2014). Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Molecular Ecology Resources*, 14, blz. 109-116.

Pot, R. (2014). QBWat, programma voor beoordeling van de biologische waterkwaliteit volgens de Nederlandse maatlatten voor de Kaderrichtlijn Water. Versie 5.32. <http://www.roelfpot.nl/qbwat>

Premier Biosoft. (z.d.) *PCR Primer Design Guidelines, PCR (Polymerase Chain Reaction)*. Geraadpleegd op 26 mei 2015, van http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html

Ruiter, A.M. de. (2010). *DNA*. Geraadpleegd op 29 april 2015, van <http://erfelijkheid.nl/content/dna>

Schriks, M. (2013). *Projecthandvest – eDNA voor aquatische biodiversiteit*. Nieuwegein: KWR Watercycle Research Institute.

Smith, C.J., Osborn, A.M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 67, blz. 6-20.

Straatkaart. (2008). *Keizersbeek: foto uit de buurt van Het Verzet 7121XD Aalten*. [Online afbeelding]. Gedownload op 26 maart 2015, van http://straatkaart.nl/7121XD-Het-Verzet/media_fotos/keizersbeek-j2U/

TECHgenes. (z.d.). *Meer inzicht in DNA*. [Online afbeelding]. Gedownload op 16 april 2015, van <http://www.techgenes.nl/meer-inzicht-in-dna/>

Thomsen, P.F., Kielgast, J., Iversen, L.L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M.T.P., Orlando, L., Willerslev, E. (2012). Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21, blz. 2565-2573.

Topsector Water. (z.d). *TKI Watertechnologie*. Geraadpleegd op 24 februari 2015, van <http://www.topsectorwater.nl/tki-watertechnologie/>

University of Glasgow (20 januari 2014). *PCR primer design*. [youtube-video]. Geraadpleegd op 23 februari 2015, van https://www.youtube.com/watch?v=c-f1H07D_70

VIDA (Verenigd patiënten platform Immunologische Disorders Alimentair-geïnduceerd). (z.d.). *Wat is DNA?* [Online afbeelding]. Gedownload op 16 april 2015, van <http://www.ziekdoorvoeding.nl/watisdna.php>

Bijlagen

Bijlage A: Overzicht verdeling meren en rivieren in Stroomgebiedbeheerplannen (SGBP)

Bijlage B: Conflicterende genera KRW-type M10

Bijlage C: Conflicterende genera KRW-type R5

Bijlage D: Scenario's R5

Bijlage E: Correlatiegrafieken scenario 2 en 3 met abundantie (M10)

Bijlage F: Correlatiegrafieken scenario 2 en 3 zonder abundantie (M10)

Bijlage G: Correlatiegrafieken scenario 2 en 3 met abundantie (R5)

Bijlage H: Correlatiegrafieken scenario 2 en 3 zonder abundantie (M10)

Bijlage I: Grafieken juiste classificatie M10

Bijlage J: Grafieken juiste classificatie R5

Bijlage K: Uitvoer van SPSS: Pearson's correlatie toets

Bijlage L: Achtergrondinformatie: environmental DNA

Bijlage M: Soorten met gevalideerde primers

Bijlage N: Watertypen M10 en R5

Bijlage A Overzicht verdeling meren en rivieren in Stroomgebiedbeheerplannen (SGBP)

Tabel A.1. Meren (Ministerie van Verkeer en Waterstaat *et al.* (2009a, 2009b, 2009c, 2009d))

Meertypen	SGBP_Eems	SGBP_Rijn	SGBP_Maas	SGBP_Schelde	Totaal	Percentage van het totaal
M1	0	34	13	0	47	18,58%
M2	0	2	0	0	2	0,79%
M3	0	89	9	1	99	39,13%
M4	0	0	0	0	0	0,00%
M5	0	0	0	0	0	0,00%
M6	0	31	7	0	38	15,02%
M7	0	17	1	0	18	7,11%
M8	0	18	0	0	18	7,11%
M9	0	0	0	0	0	0,00%
M10	0	31	0	0	31	12,25%
Totaal	0	222	30	1	253	

Tabel A.2. Rivieren (Ministerie van Verkeer en Waterstaat *et al.* (2009a, 2009b, 2009c, 2009d))

Riviertypen	SGBP_Eems	SGBP_Rijn	SGBP_Maas	SGBP_Schelde	Totaal	Percentage van het totaal
R4	0	8	39	0	47	18,5 %
R5	3	99	30	1	133	52,4 %
R6	0	21	9	0	30	11,8 %
R7	1	7	3	0	11	4,3 %
R8	0	5	5	0	10	3,9 %
R12	1	5	0	0	6	2,4 %
R13	0	0	2	0	2	0,8 %
R14	0	0	3	0	3	1,2 %
R15	0	0	1	0	1	0,4 %
R16	0	0	1	0	1	0,4 %
R17	0	0	6	0	6	2,4 %
R18	0	0	4	0	4	1,6 %
Totaal	5	145	103	1	254	

Bijlage B Conflicterende genera KRW-type M10

Tabel B.1. Gedetailleerde informatie conflicterende soorten van M10 (www.nederlandsesoortenlijst.nl en Limnodata Neerlandica)

Positief	Frequentie soorten					Negatief	Frequentie soorten				
	Monsters aantal (Limnodata)	Meetpunten aantal (Limnodata)	Monsters % (Limnodata)	Meetpunten % (Limnodata)	Monsters aantal (Limnodata)		Meetpunten aantal (Limnodata)	Monsters % (Limnodata)	Meetpunten % (Limnodata)		
Erpobdella											
Erpobdella nigricollis	1	50	38	4	11	Erpobdella octoculata	1	424	203	35	60
Totalen	50	50	38	4	11		50	424	203	35	60
Sigara											
Sigara distincta	8	5	3	0	1	Sigara striata	1	577	242	48	72
Sigara falleni		323	160	27	48						
Sigara fossarum		14	12	1	4						
Sigara iactans		22	16	2	5						
Sigara lateralis		152	82	13	24						
Sigara longipalis		0	0	0	0						
Sigara nigrolineata		1	1	0	0						
Sigara scotti		0	0	0	0						
Totalen	89	517	274	43	82		11	577	242	48	72
Tubificidae											
Aulodrilus limnobius	2	2	2	0	1	Tubificidae (familie)	60	547	259	45	77
Spirosperma ferox		7	6	1	2						
Totalen	3	9	8	1	3		97	547	259	45	77

Bijlage C Conflicterende genera KRW-type R5

Tabel C.1. Gedetailleerde informatie conflicterende soorten van R5 (www.nederlandsesoortenlijst.nl en Limnodata Neerlandica)

Kenmerkend						Negatief						Positief					
	Frequentie soorten	Monsters aantal (Limnodata)	Meetpunten aantal (Limnodata)	Monsters % (Limnodata)	Meetpunten % (Limnodata)		Frequentie soorten	Monsters aantal (Limnodata)	Meetpunten aantal (Limnodata)	Monsters % (Limnodata)	Meetpunten % (Limnodata)		Frequentie soorten	Monsters aantal (Limnodata)	Meetpunten aantal (Limnodata)	Monsters % (Limnodata)	Meetpunten % (Limnodata)
Arrenurus																	
Arrenurus cylindratus	3	123	95	2	8	Arrenurus globator	1	842	358	14	29						
Arrenurus octagonus		49	41	1	3												
Arrenurus zacharias		3	3	0	0												
Totalen	3	175	139	3	11		1	842	358	14	29						
Caenis																	
Caenis pseudorivulorum	2	42	15	1	1	Caenis horaria	1	2301	735	39	59						
Caenis rivulorum		0	0	0	0												
Totalen	2	42	15	1	1		1	2301	735	39	59						
Chironomus																	
Chironomus gr fluviatilis	1	65	47	1	4	Chironomus (genus)	45	2108	740	36	59						
Totalen	1	65	47	1	4												
Hygrobates																	
Hygrobates fluviatilis	2	183	75	3	6							Hygrobates nigromaculatus	1	643	293	11	23
Hygrobates longiporus		23	8	0	1												
Totalen	2	206	83	3	7								1	643	293	11	23
Limnephilus																	
Limnephilus centralis	4	6	5	0	0							Limnephilus bipunctatus	1	3	3	0	0
Limnephilus elegans		0	0	0	0												
Limnephilus extricatus		40	34	1	3												
Limnephilus fuscicornis		14	8	0	1												
Totalen	4	60	47	1	4								1	3	3	0	0

Micropsectra																	
Micropsectra atrofasciata	1	233	145	4	12					Micropsectra (genus)	11	1079	468	18	38		
										Micropsectra notescens		15	15	0	1		
Totalen	1	233	145	4	12						11	1094	483	18	39		
Nais																	
						Nais elinguis	1	205	130	3	10	Nais barbata	1	50	47	1	4
Totalen							1	205	130	3	10		1	50	47	1	4
Polypedilum																	
Polypedilum bicrenatum gr.	4	0	0	0	0	Polypedilum nubeculosum	2	942	458	16	37	Polypedilum scalaenum	1	388	178	7	14
Polypedilum convictum		21	21	0	2	Polypedilum sordens		251	147	4	12						
Polypedilum laetum agg		11	8	0	1												
Polypedilum pedestre		70	55	1	4												
Totalen	4	102	84	1	7		2	1193	605	20	49		1	388	178	7	14
Sigara																	
Sigara hellensii	1	6	4	0	0	Sigara falleni	2	1335	533	23	43						
						Sigara striata		2373	764	40	61						
Totalen	1	6	4	0	0					3708	1297	63	104				
Simulium																	
Simulium angustipes	7	4	4	0	0					Simulium lineatum	2	0	0	0	0		
Simulium aureum		3	3	0	0					Simulium ornatum		12	12	0	1		
Simulium equinum		24	17	0	1												
Simulium erythrocephalum		111	75	2	6												
Simulium lundstromi		50	32	1	3												
Simulium morsitans		59	27	1	2												
Simulium vernalis		33	25	1	2												
Totalen	7	284	183	5	14						2	12	12	0	1		
Sphaerium																	
Sphaerium rivicola	1	4	4	0	0	Sphaerium corneum	1	1508	566	26	45						
Totalen	1	4	4	0	0					1	1508	566	26	45			

Bijlage D Scenario's R5

De schuingedrukte genera staan in elk scenario.

Tabel D.1. Scenario 1

Scenario 1		
Kenmerkend	Positief	Negatief
<i>Simulium</i>	<i>Micropsectra</i>	<i>Caenis</i>
		<i>Chironomus</i>
		<i>Sigara</i>
		<i>Sphaerium</i>
		Polypedilum

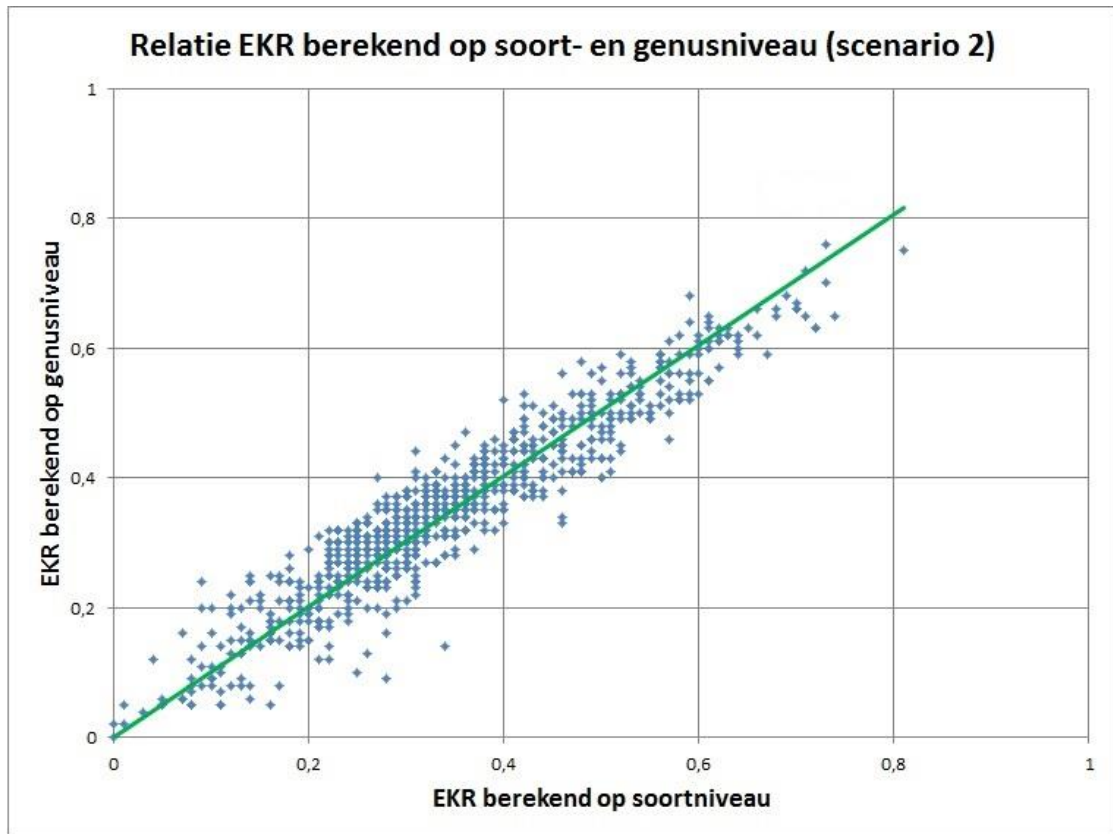
Tabel D.2. Scenario 3

Scenario 2		
Kenmerkend	Positief	Negatief
<i>Simulium</i>	<i>Micropsectra</i>	<i>Caenis</i>
Limnephilus	Hygrobates	<i>Chironomus</i>
Polypedilum	Nais	<i>Sigara</i>
		<i>Sphaerium</i>
		Arrenurus

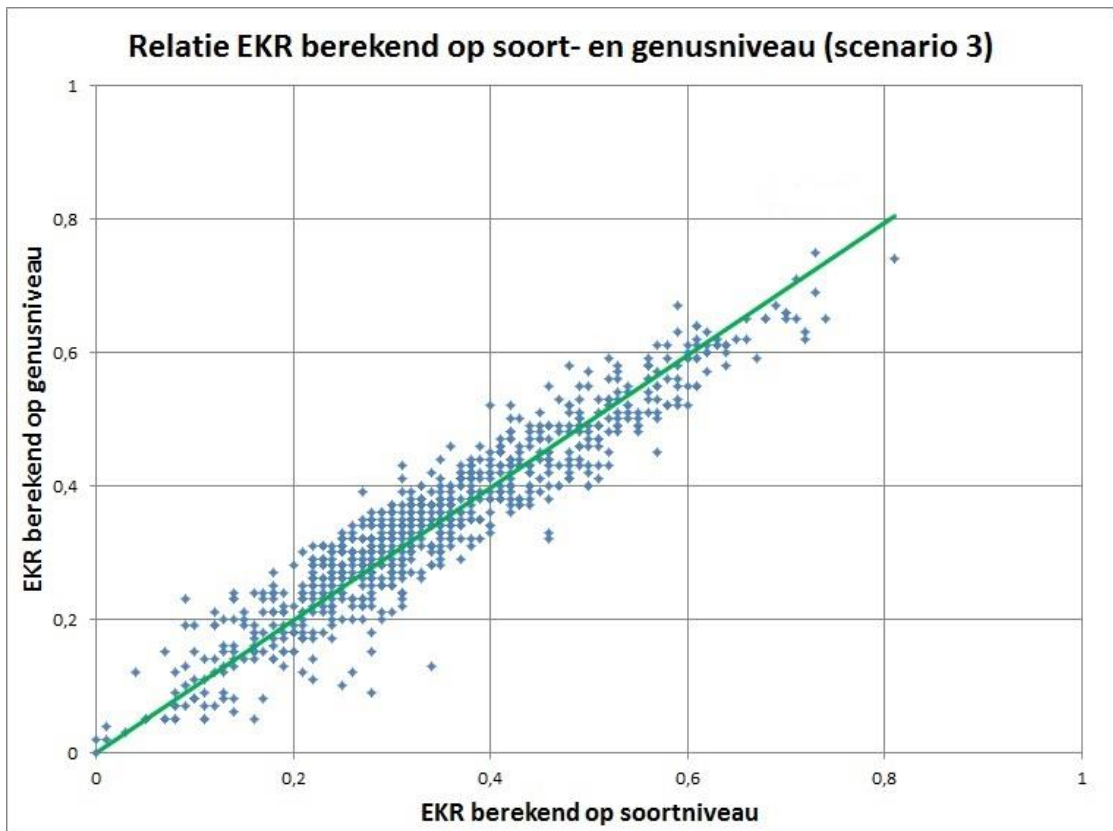
Tabel D.3. Scenario 2

Scenario 3		
Kenmerkend	Positief	Negatief
<i>Simulium</i>	<i>Micropsectra</i>	<i>Caenis</i>
Arrenurus	Polypedilum	<i>Chironomus</i>
Hygrobates	Limnephilus	<i>Sigara</i>
		<i>Sphaerium</i>
		Nais

Bijlage E Correlatiegrafieken scenario 2 en 3 met abundantie (M10)

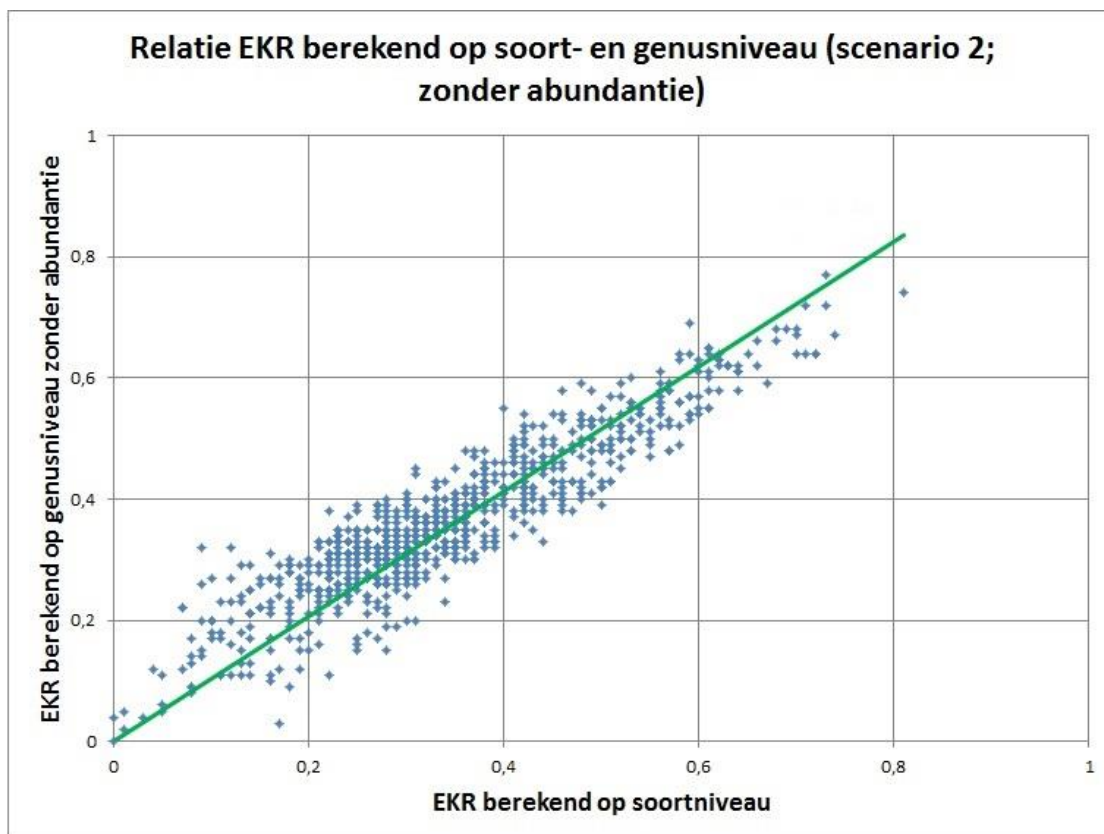


Figuur E.1. Het verband tussen EKR op genusniveau (scenario 2) en EKR op soortniveau.

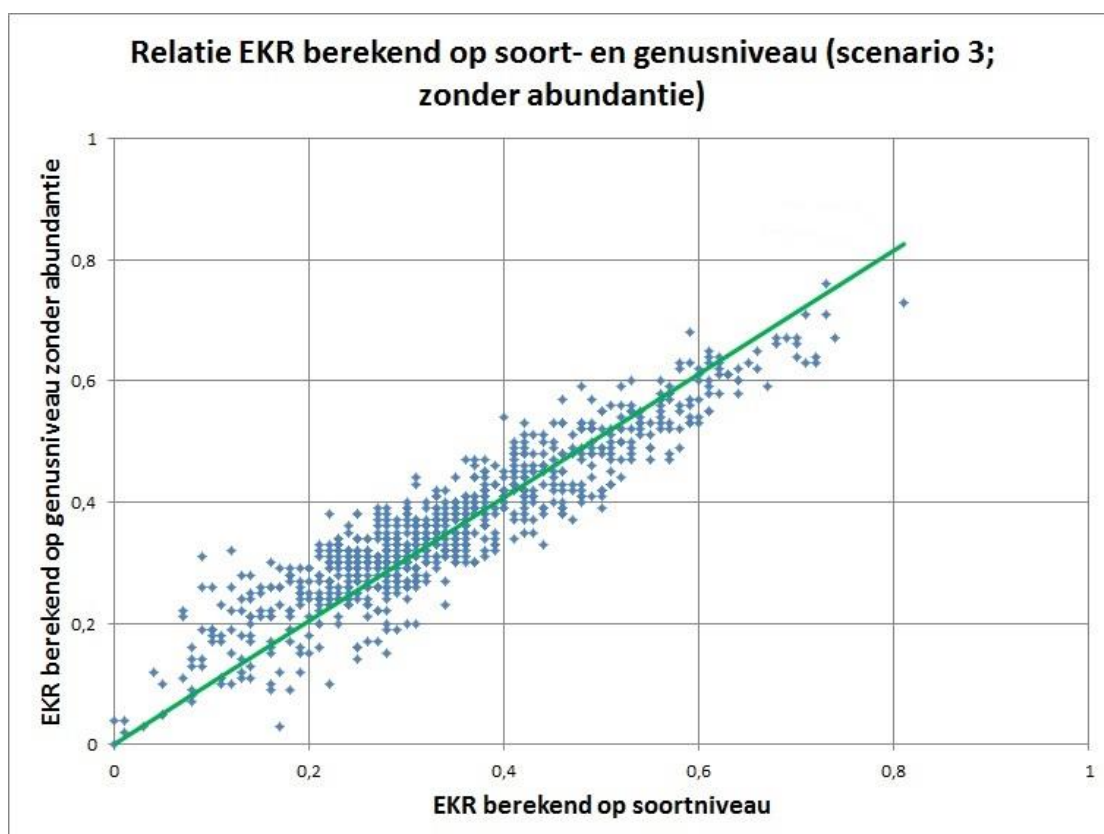


Figuur E.2. Het verband tussen EKR op genusniveau (scenario 3) en EKR op soortniveau.

Bijlage F Correlatiegrafieken scenario 2 en 3 zonder abundantie (M10)

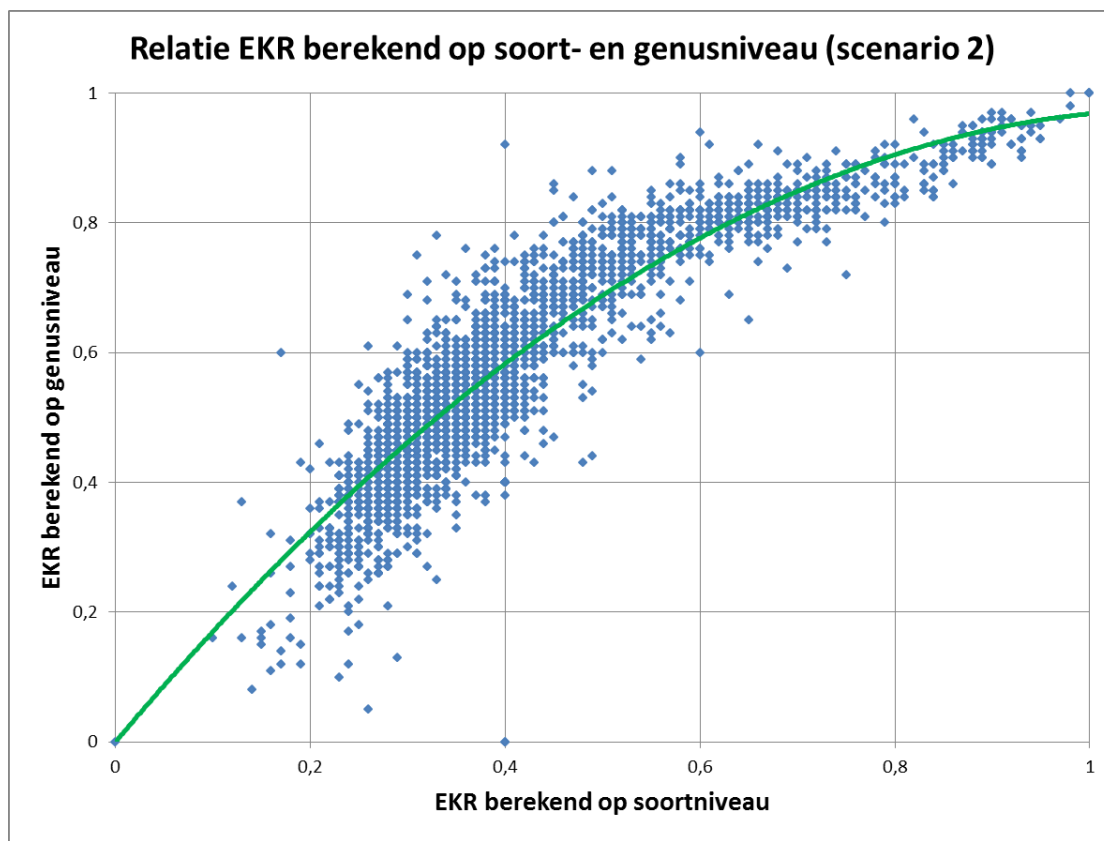


Figuur F.1. Het verband tussen EKR op genusniveau zonder abundantie (scenario 2) en EKR op soortniveau.

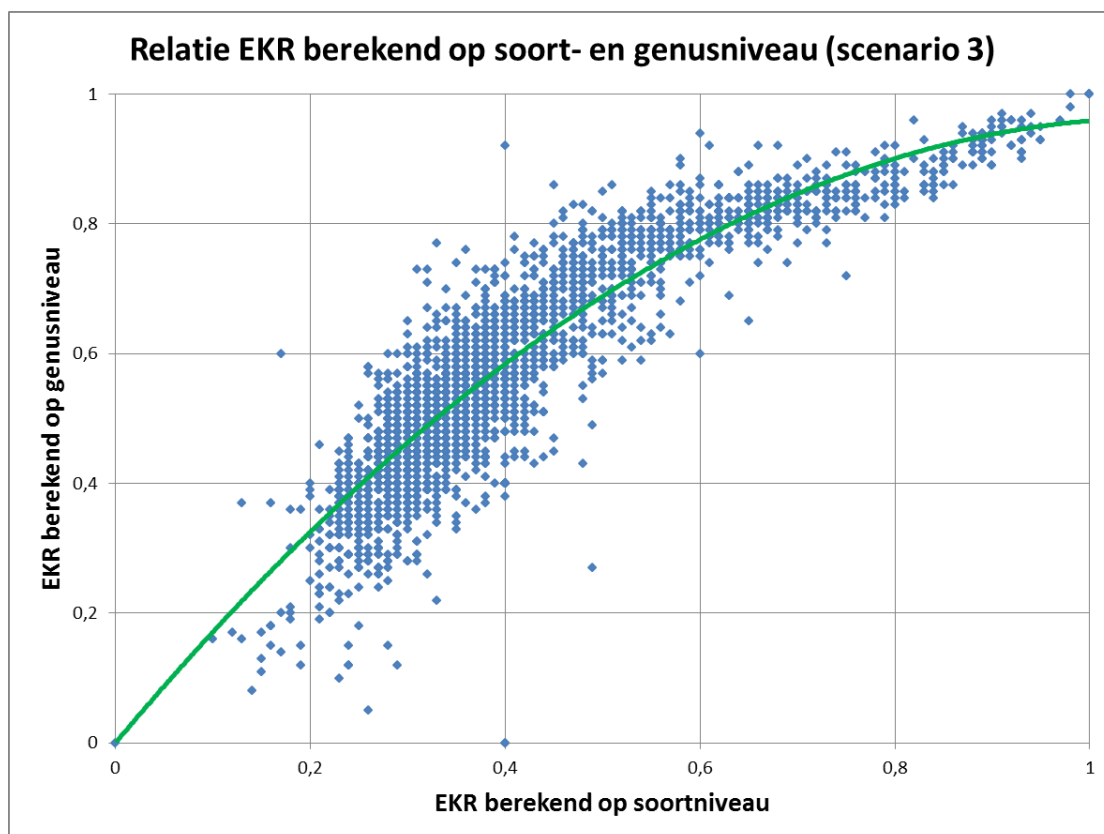


Figuur F.2. Het verband tussen EKR op genusniveau zonder abundantie (scenario 3) en EKR op soortniveau.

Bijlage G Correlatiegrafieken scenario 2 en 3 met abundantie (R5)

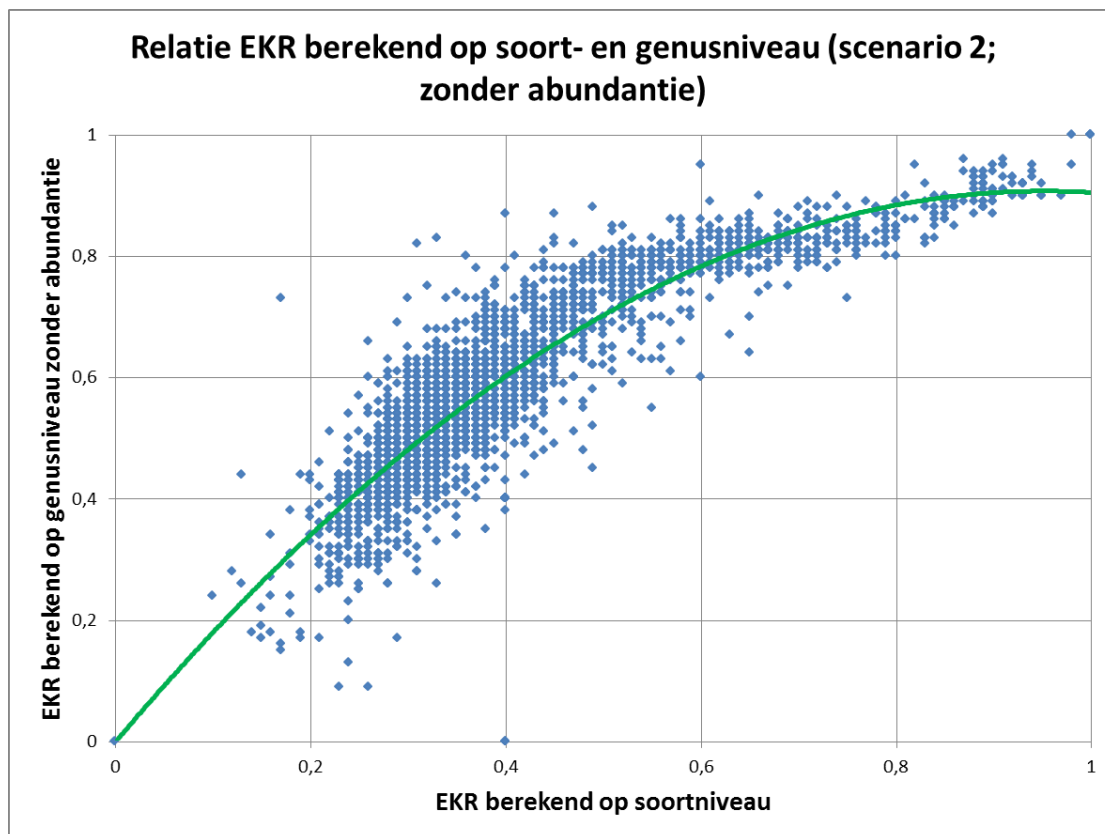


Figuur G.1. Het verband tussen EKR op genusniveau (scenario 2) en EKR op soortniveau.

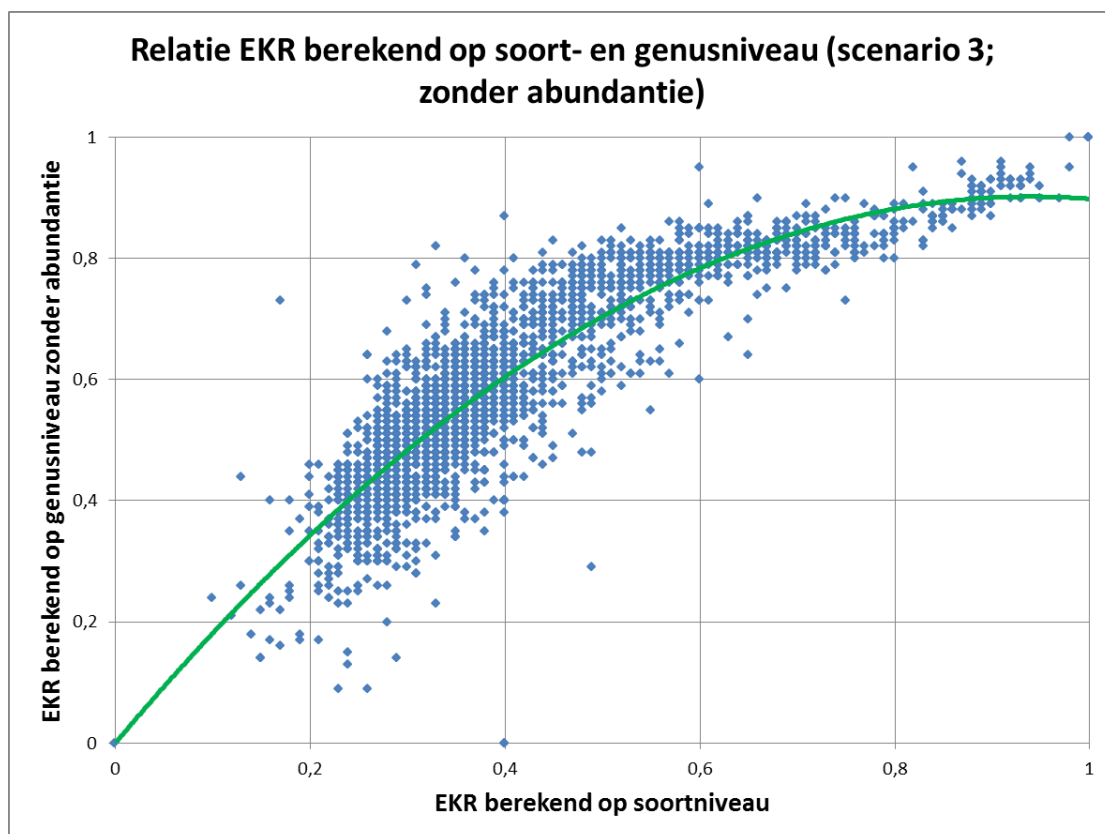


Figuur G.2. Het verband tussen EKR op genusniveau (scenario 3) en EKR op soortniveau.

Bijlage H Correlatiegrafieken scenario 2 en 3 zonder abundantie (R5)

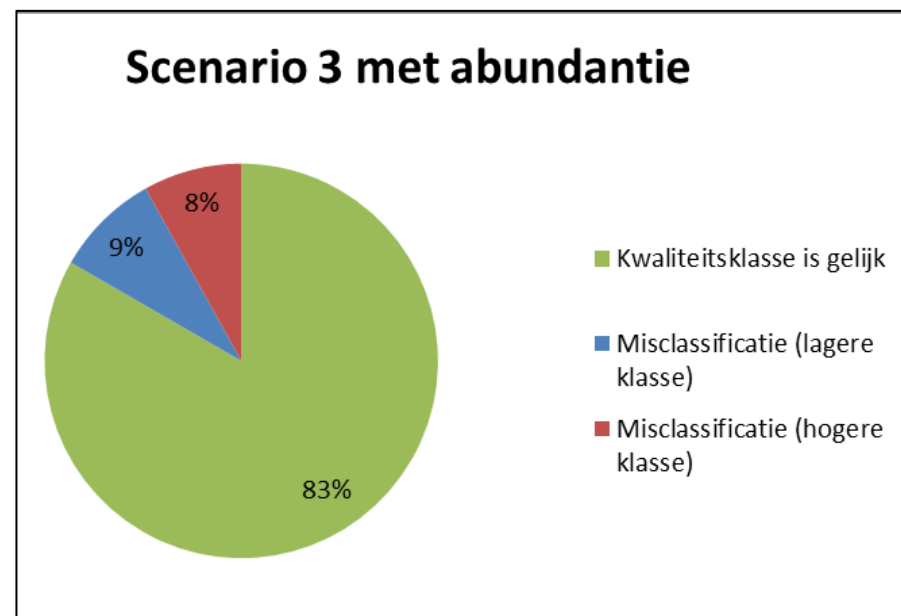
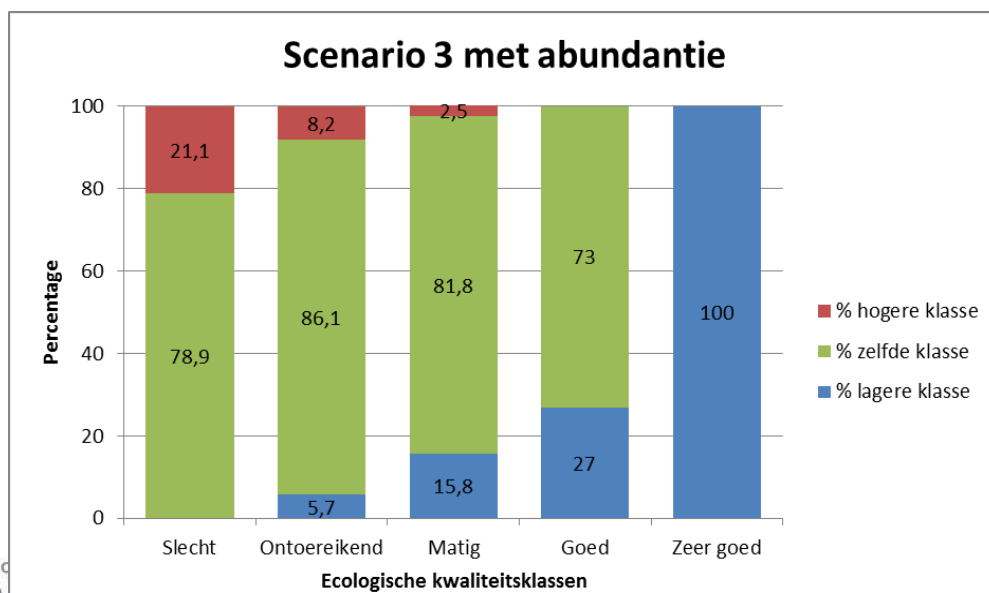
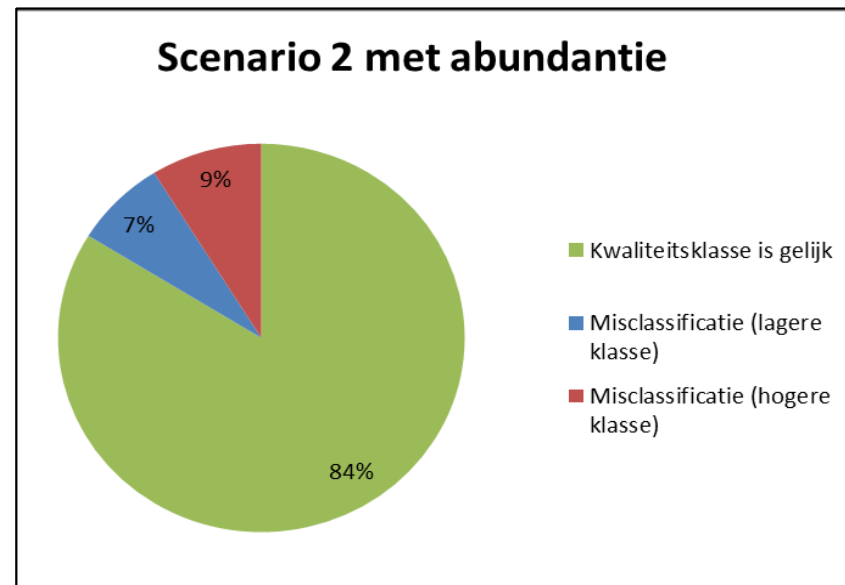
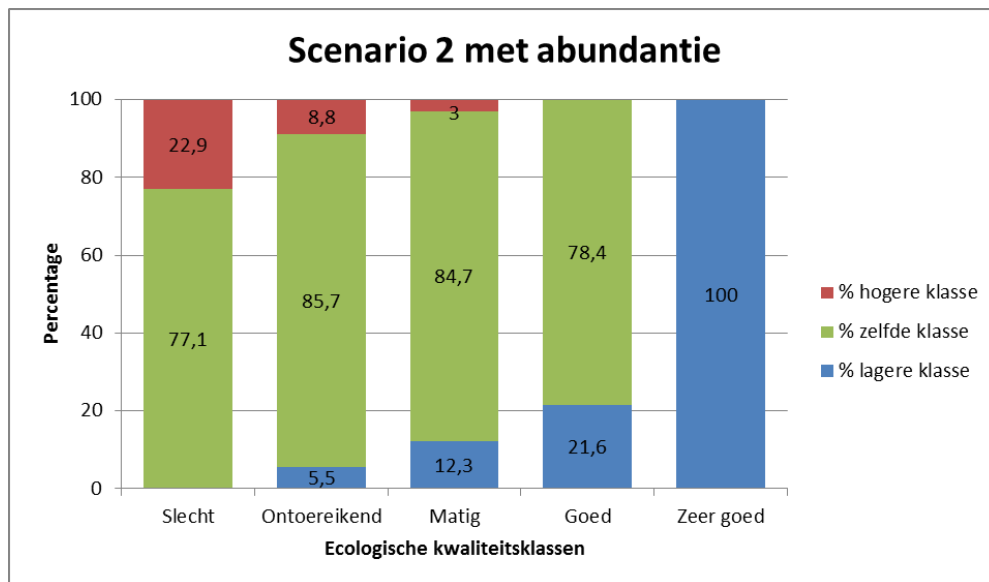


Figuur H.1. Het verband tussen EKR op genusniveau zonder abundantie (scenario 2) en EKR op soortniveau.



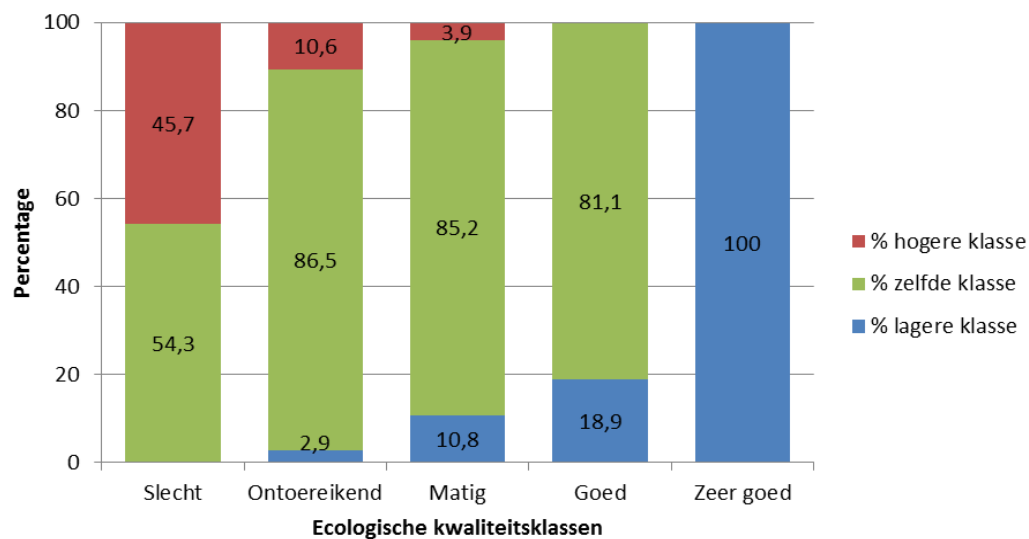
Figuur H.2. Het verband tussen EKR op genusniveau zonder abundantie (scenario 3) en EKR op soortniveau.

Bijlage I Grafieken juiste classificatie M10

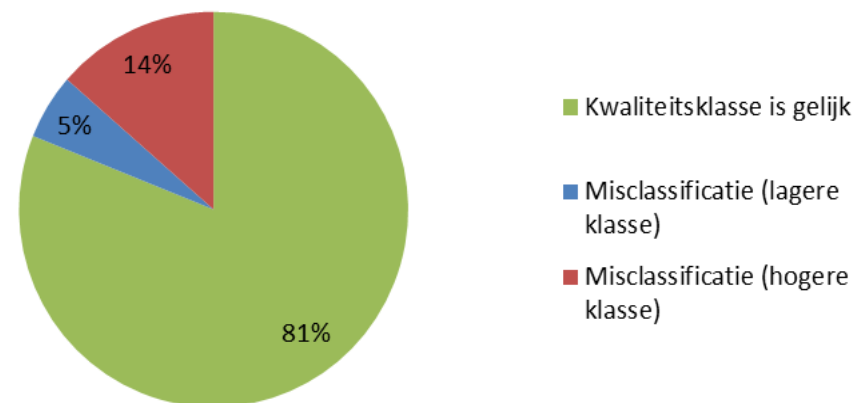


Figuur I.1. Juiste classificatie grafieken voor scenario 2 en 3 met abundantie

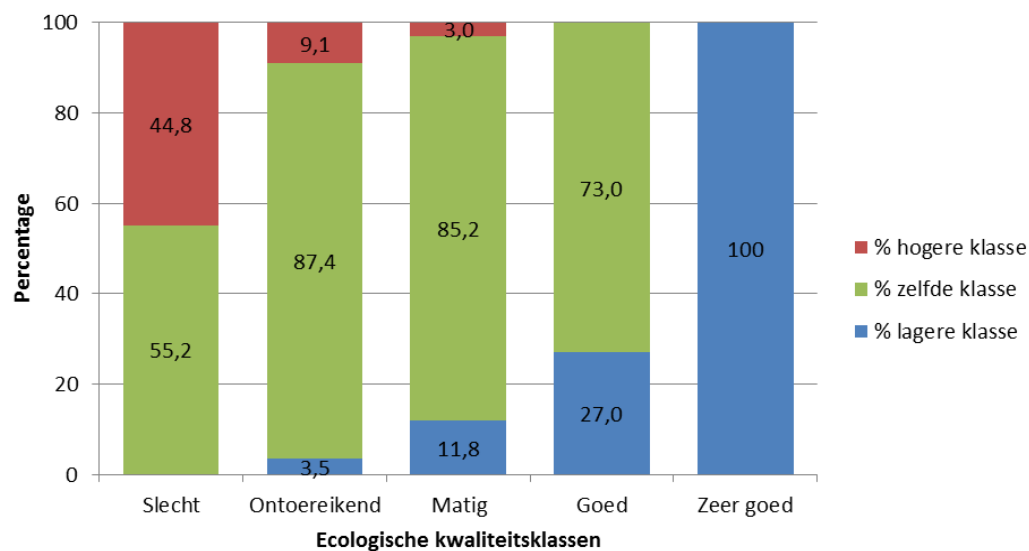
Scenario 2 zonder abundantie



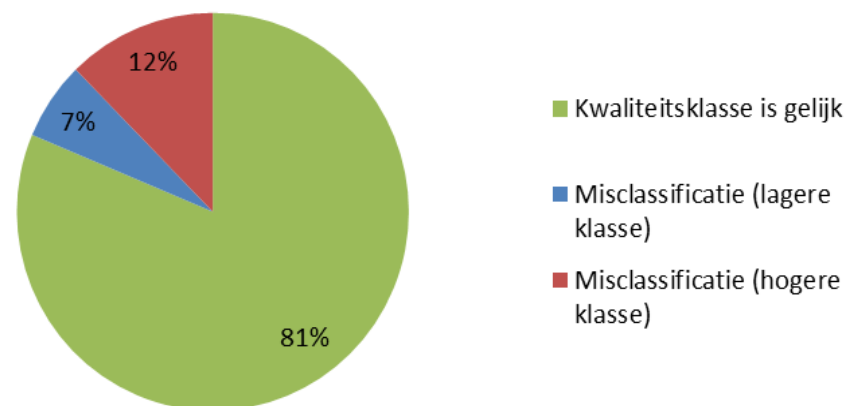
Scenario 2 zonder abundantie



Scenario 3 zonder abundantie

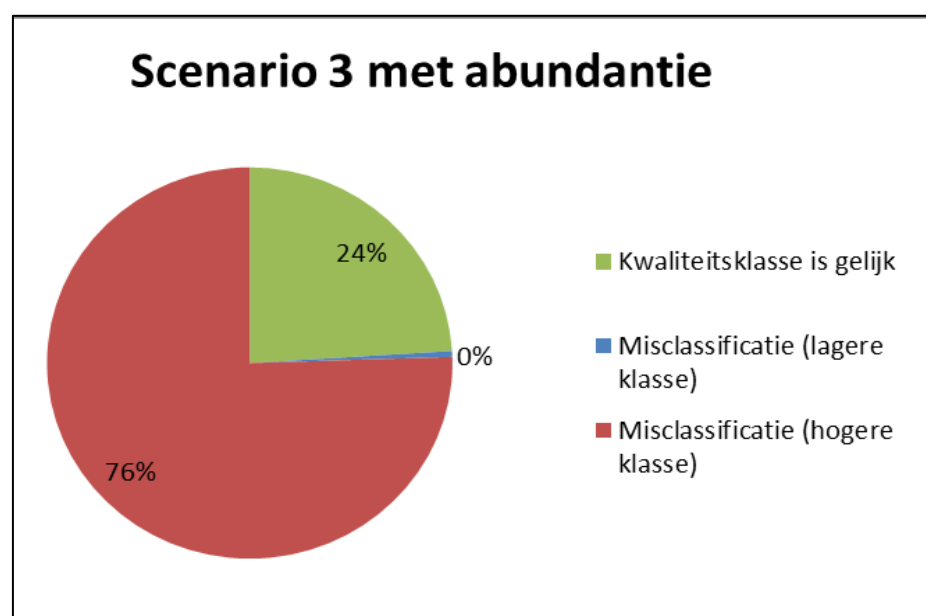
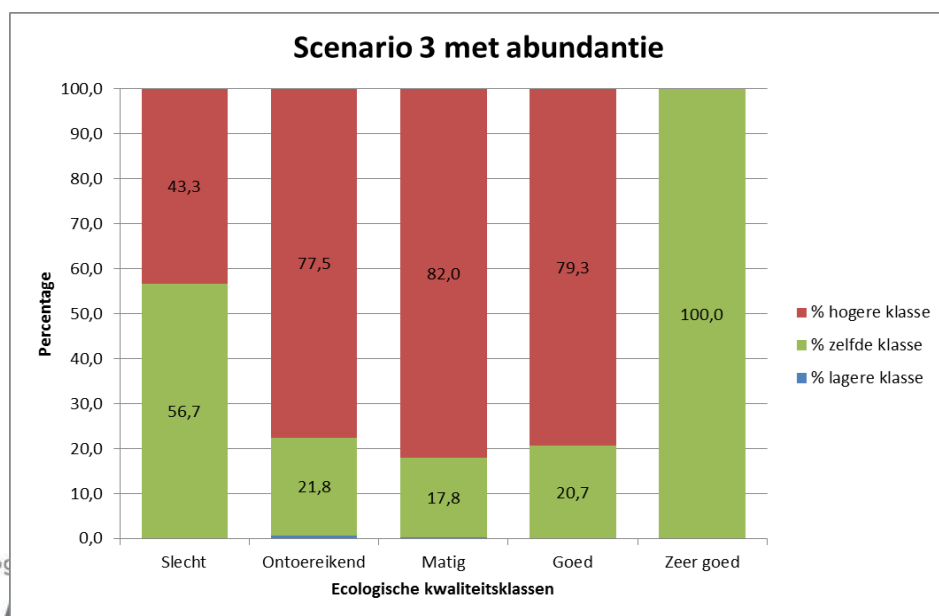
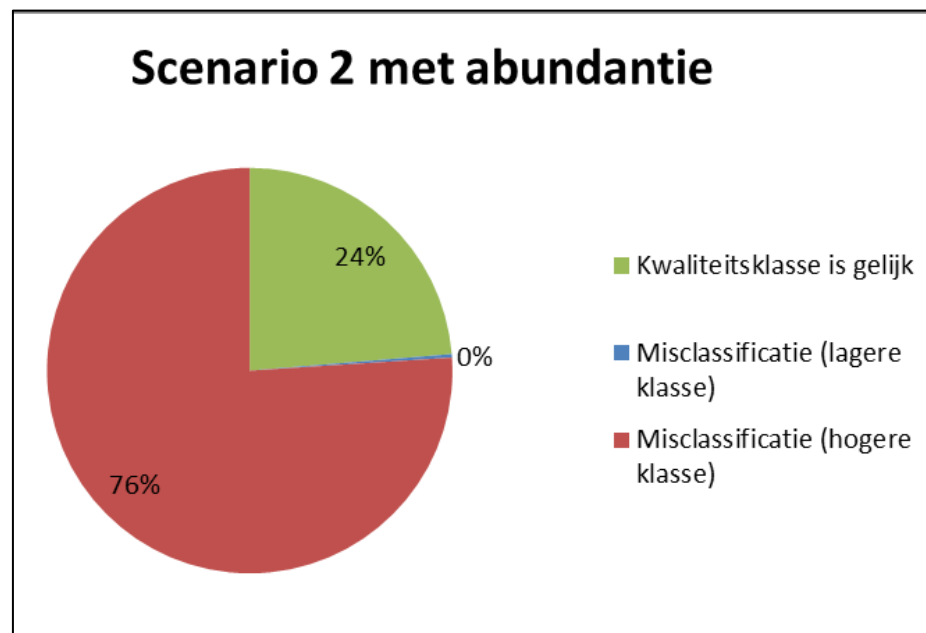
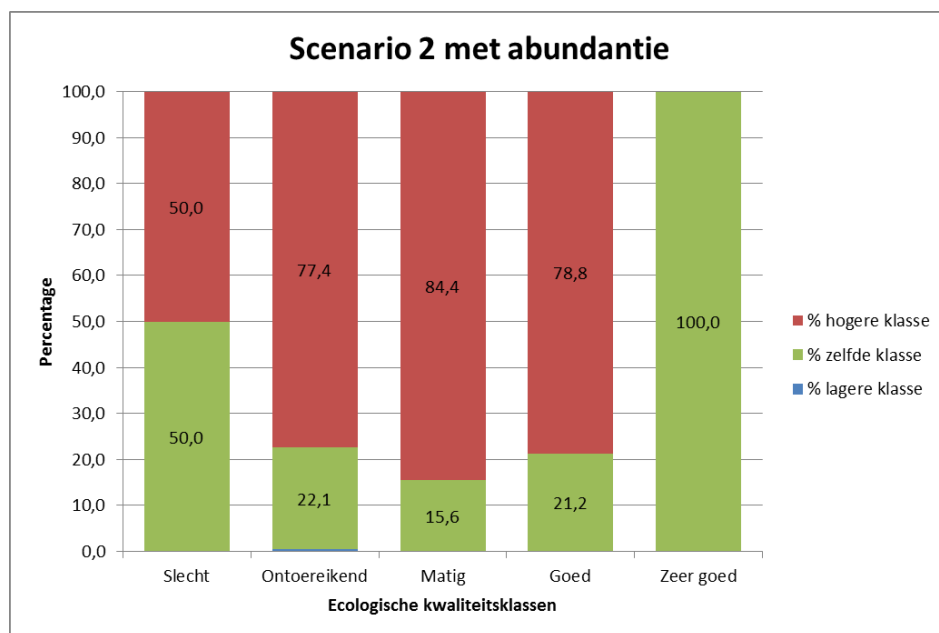


Scenario 3 zonder abundantie



Figuur I.2. Juiste classificatie grafieken voor scenario 2 en 3 zonder abundantie.

Bijlage J Grafieken juiste classificatie R5

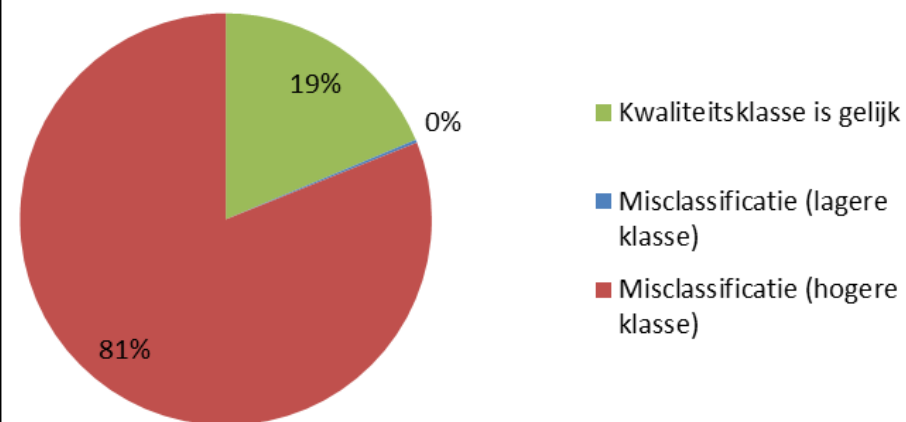


Figuur J.1. Juiste classificatie grafieken voor scenario 2 en 3 met abundantie.

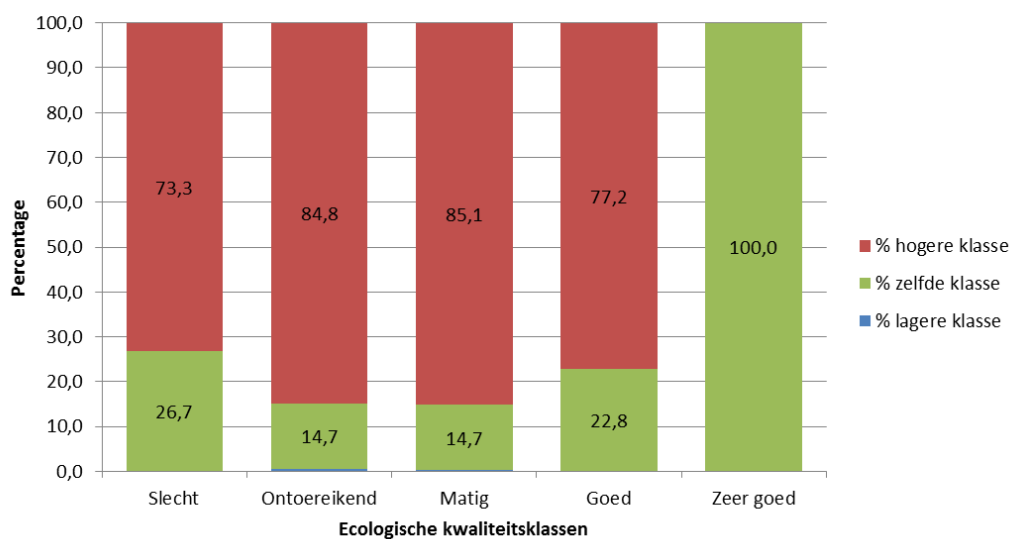
Scenario 2 zonder abundantie



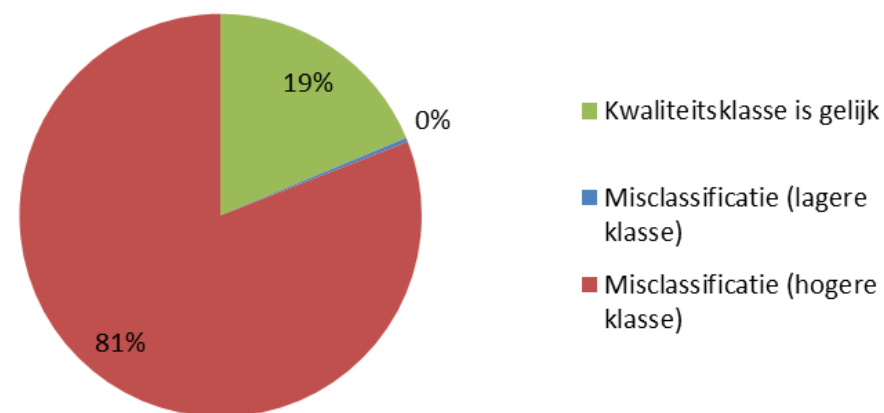
Scenario 2 zonder abundantie



Scenario 3 zonder abundantie



Scenario 3 zonder abundantie



Figuur J.2. Juiste classificatie grafieken voor scenario 2 en 3 zonder abundantie.

Bijlage K Uitvoer van SPSS

Pearson's correlatie toets

Tabel K.1. M10: correlatie EKR soort en EKR genus (scenario 1)

		EKR_soort	EKR_genus scenario 1
EKR_soort	Pearson Correlation	1	,949**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	809	809
EKR_genus scenario 1	Pearson Correlation	,949**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	809	809

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Tabel K.2. M10: correlatie EKR soort en EKR genus (scenario 2)

		EKR_soort	EKR_genus scenario 2
EKR_soort	Pearson Correlation	1	,943**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	803	803
EKR_genus scenario 2	Pearson Correlation	,943**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	803	803

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Tabel K.3. M10: correlatie EKR soort en EKR genus (scenario 3)

		EKR_soort	EKR_genus scenario 3
EKR_soort	Pearson Correlation	1	,945**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	803	803
EKR_genus scenario 3	Pearson Correlation	,945**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	803	803

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Tabel K.4. M10: correlatie EKR soort en EKR genus (scenario 1; zonder abundantie)

		EKR_soort	EKR_genus sc1_geenabun
EKR_soort	Pearson Correlation	1	,933**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	809	809
EKR_genus sc1_geenabun	Pearson Correlation	,933**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	809	809

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Tabel K.5. M10: correlatie EKR soort en EKR genus (scenario 2; zonder abundantie)

		EKR_soort	EKR_genus sc2_geenabun
EKR_soort	Pearson Correlation	1	,923**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	803	803
EKR_genus sc2_geenabun	Pearson Correlation	,923**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	803	803

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Tabel K.6. M10: correlatie EKR soort en EKR genus (scenario 3; zonder abundantie)

		EKR_soort	EKR_genus sc3_geenabun
EKR_soort	Pearson Correlation	1	,926**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	803	803
EKR_genus sc3_geenabun	Pearson Correlation	,926**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	803	803

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Tabel K.7. M10: correlatie EKR soort met abundantie en EKR soort zonder abundantie)

		EKR_soort	EKR_soort_gee nabun
EKR_soort	Pearson Correlation	1	,969**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	809	809
EKR_soort_geenabun	Pearson Correlation	,969**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	809	809

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Tabel K.8. R5: correlatie EKR soort met abundantie en EKR soort zonder abundantie)

		EKR_soort	EKR_soort_gee nabun
EKR_soort	Pearson Correlation	1	,994**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	2496	2496
EKR_soort_geenabun	Pearson Correlation	,994**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	2496	2496

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

One-Sample T-Test

Tabel K.9. One-Sample T-test (M10; scenario 1) dat de gemiddelde afwijking geeft van de huidige maatlat.

One-Sample Statistics

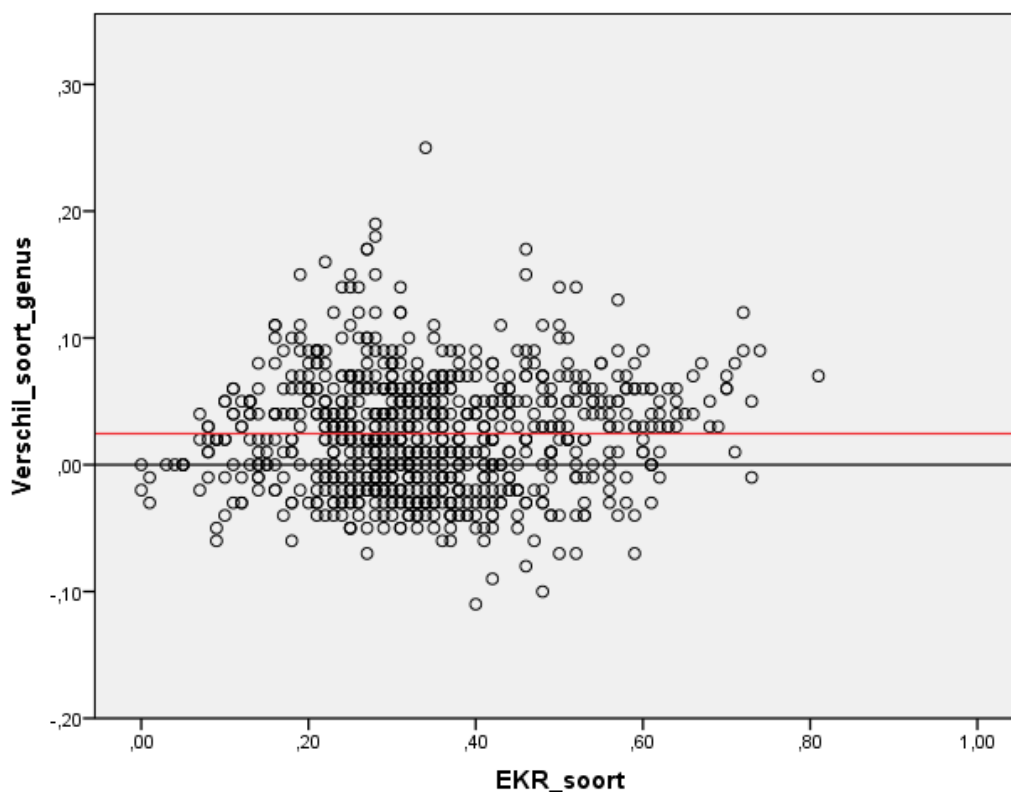
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Verschil_soort_genus	809	,0245	,04579	,00161

Tabel K.10. One-Sample T-test (R5; scenario 1) dat de gemiddelde afwijking geeft van de huidige maatlat.

One-Sample Statistics

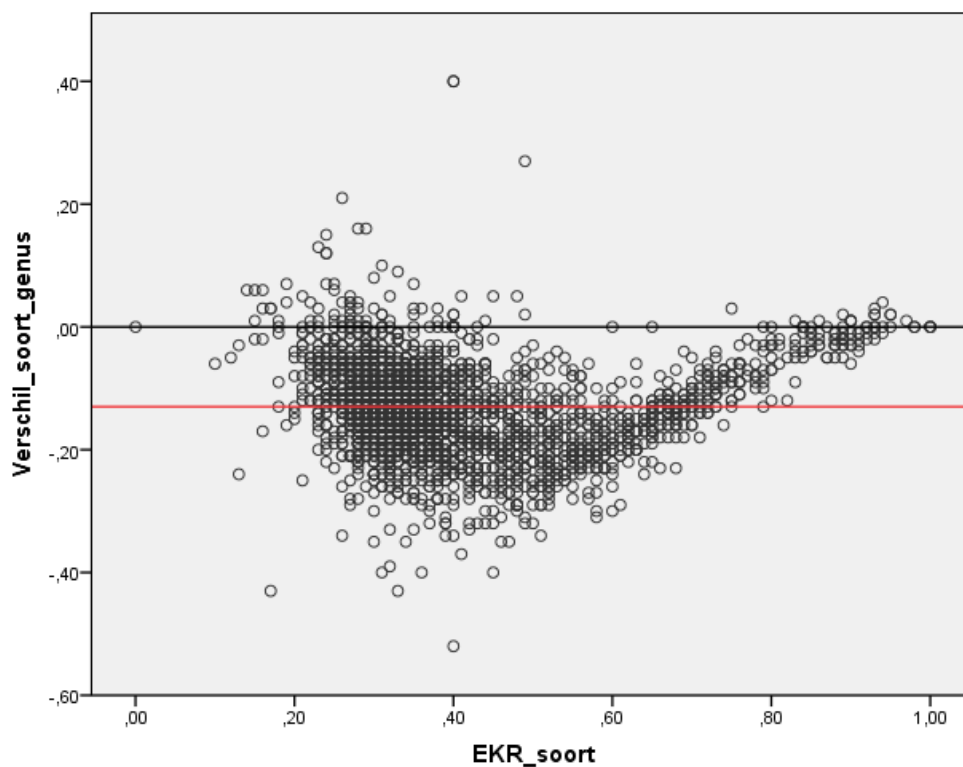
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Verschil_soort_genus	2496	-,1330	,07783	,00156

Afwijking van maatlat op soortniveau voor M10 (scenario 1)



Figuur K.1. Schematische weergave van het verschil tussen beoordelen op soort- en genusniveau en EKR op soortniveau voor M10; scenario 1. De rode lijn is de gemiddelde afwijking van 0,0245 (zie tabel K.9). De punten op de zwarte lijn geven geen afwijking van de huidige maatlat op soortniveau.

Afwijking van maatlat op soortniveau voor R5 (scenario 1)



Figuur K.2. Schematische weergave van het verschil tussen beoordelen op soort- en genusniveau en EKR op soortniveau voor R5; scenario 1. De rode lijn is de gemiddelde afwijking van 0,1330 (zie tabel K.10). De punten op de zwarte lijn geven geen afwijking van de huidige maatlat op soortniveau.

Bijlage L Achtergrondinformatie: environmental DNA

In deze bijlage kunt u meer achtergrondinformatie vinden over DNA en de methode environmental DNA. Al jarenlang wordt er gewerkt met DNA en zijn er technieken die DNA kunnen analyseren. Sinds een aantal jaren is hier ook de toepassing voor in het milieu gevonden. Environmental Deoxyribo Nucleic Acid (kortweg eDNA) is het DNA van organismen. In feite betekent de term eDNA niets meer dan alle DNA dat los (buiten levende organismen) in het milieu aanwezig is. In deze bijlage staat uitgelegd wat deze methode precies is, hoe het werkt en wat de voor- en nadelen zijn.

DNA in het kort

Iedereen heeft wel eens van DNA gehoord, echter de precieze werking van DNA is voor veel mensen onbekend.

DNA zit in iedere cel van het lichaam, in elk mens, dier en plant. DNA bestaat uit een dubbele helix, deze helix is te zien in figuur L.1.

DNA is opgebouwd uit drie nucleotiden. Een nucleotide bestaat uit drie componenten. De eerste nucleotidecomponent bestaat uit vier verschillende stikstofbasen. De vier stikstofbasen zijn: adenine (A), cytosine (C), guanine (G) en thymine (T).

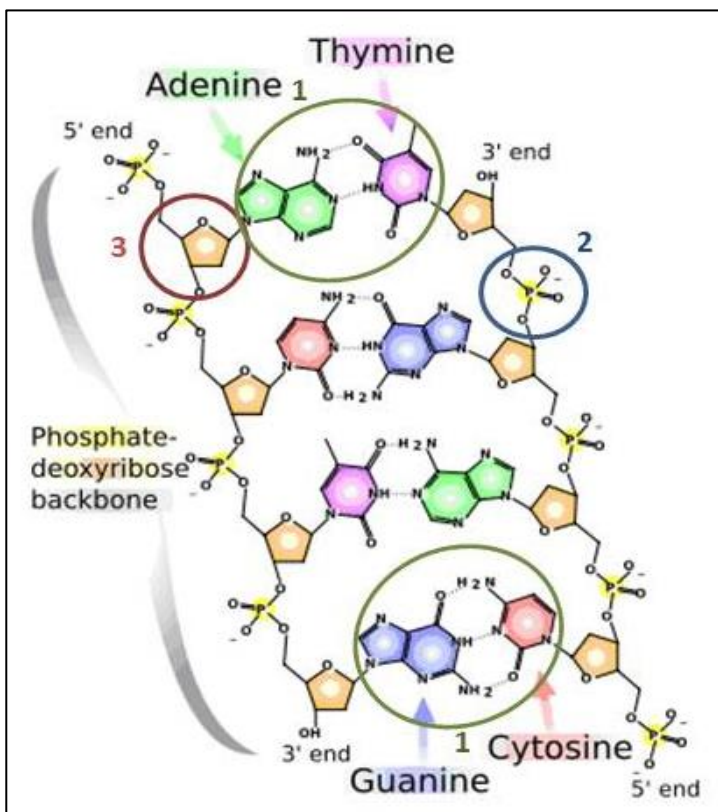


Figuur L.1. Een grafisch weergegeven DNA streng. (TECHgenes, z.d.)

In een DNA streng zit adenine altijd tegen over thymine en cytosine zit tegen over guanine (zie figuur L.2, nummer 1). Naast de vier verschillende basen, is de tweede nucleotidecomponent: fosfaatgroep (zie figuur L.2, nummer 2). De fosfaatgroep (PO_4^-) zit altijd tussen twee moleculen desoxyribose in. Desoxyribose ($\text{C}_5\text{O}_2\text{H}_8$) is het derde nucleotidecomponent in DNA (zie figuur L.2, nummer 3). In figuur L.2 staat bij de uiteinden een 3' einde of een 5' einde. Het 3' einde dankt zijn naam aan het OH-molecuul dat bindt aan het derde C-atoom van desoxyribose. Het 5' einde bestaat uit de fosfaatgroep die bindt aan het vijfde C-atoom van desoxyribose, dit verklaart de naamgeving 5' einde.

De volgorde van de basenparen is bepalend voor de unieke code van DNA. De basen

volgen elkaar op in één lange reeks en steeds met een andere volgorde. In deze lange reeksen zitten codes voor erfelijke eigenschappen. Deze code is bij elk mens, dier en plant verschillend.



Figuur L.2. Structuurformule van DNA. (VIDA, z.d., bewerkt door auteur)

DNA is in iedere cel aanwezig, het ligt in de celkern. De celkern is het onderdeel van de cel dat alles regelt. Als al het DNA uit de celkern achter elkaar gelegd zou worden, is een DNA streng circa twee meter lang. Een celkern is daarvoor veel te klein, daarom is DNA om eiwitbollen gewonden. Zo ontstaat een structuur dat chromatinedraad genoemd wordt. Dat is vervolgens opgevouwen tot een chromosoom.

(Alles over DNA, z.d.; de Ruiter, 2012)

Wat is environmental DNA?

Sinds 2008 is de toepassingsmethode eDNA ontwikkeld. Environmental DNA is een nieuwe methode voor het inventariseren van organismen. Organismen laten DNA in het water achter via feces, urine en huidcellen. In het aquatische milieu verspreidt dit DNA, dat is mogelijk door het oplossend vermogen van water. Deze methode is voor het eerst getest door het Franse onderzoekslaboratorium Spygen (Herder *et al.*, 2012). Spygen is met de Nederlandse kennisorganisatie RAVON (Reptielen, Amfibieën en Vissen Onderzoek Nederland) een samenwerkingsverband aangegaan, waarin RAVON kennis heeft op ecologisch gebied/veldwerkzaamheden verricht en Spygen heeft laboratorium faciliteiten en kennis over DNA.

De eDNA methode bestaat uit twee fasen. De eerste fase is het veldonderzoek en de tweede fase is het laboratoriumonderzoek. Tijdens het veldonderzoek worden er monsters genomen in het veld en in de tweede fase wordt het DNA uit het monster geëxtraheerd en vervolgens geanalyseerd. Met eDNA is het mogelijk om soorten te detecteren, zonder ze daadwerkelijk in het veld waar te nemen, zo stelt Herder *et al.* (2014). Elke soort heeft zijn eigen specifieke DNA, dit werkt net als bij mensen. Zo zet de politie bijvoorbeeld al jaren DNA in om criminelen op te sporen. Doordat elk mens een specifiek DNA profiel heeft, kun je mensen “detecteren” ofwel opsporen. Deze zelfde technieken van opsporen werkt ook in het milieu. Wanneer er een stukje van een DNA profiel is ontwikkeld van een specifieke soort, kun je dit naast het gevonden DNA leggen. Daaruit kun je de conclusie trekken of de soort in dat monster aanwezig is. Een stukje van een DNA profiel dat ontwikkeld wordt in laboratoria, noemt men een primer. Er zijn momenteel nog maar een aantal gevalideerde primers ontwikkeld voor bepaalde diersoorten.

Toepassing

De eDNA methode kan in verschillende habitats worden toegepast. Uit onderzoek blijkt dat de methode het beste toegepast kan worden in aquatische milieus (Herder *et al.*, 2014; Bijkerk *et al.*, 2013). Afbraak van DNA speelt hierin een grote rol, namelijk in aquatische milieus is de afbraak snelheid berekend in aquaria over een periode van één (Piaggio *et al.*, 2014) à twee weken (Thomsen *et al.*, 2012) tot circa één maand (Dejean *et al.*, 2011), afhankelijk van de soort (Herder *et al.*, 2014). Aldus Herder *et al.* (2014) is dit verschil te verklaren doordat er in het onderzoek van Dejean *et al.* (2011) de dichtheid van de organismen vele malen hoger was dan in het onderzoek van Thomsen *et al.* (2012). Er kan niet eenduidig vastgesteld worden wat de precieze persistentie is van DNA in het water, er zijn namelijk meerdere factoren die hierbij een rol spelen. Temperatuur in het water, de hoeveelheid zonlicht in het water, het type water, de stroming van het water en het substraat zijn allemaal factoren die de persistentie beïnvloeden (Herder *et al.*, 2014). De hoeveelheid zonlicht bepaalt bijvoorbeeld de hoeveelheid UV-straling dat in het water terecht komt. De UV-straling kan ervoor zorgen dat het DNA sneller wordt afgebroken. Het onderzoek van Pilliod *et al.* (2014) toont aan dat eDNA niet meer aangetroffen wordt na acht dagen blootstelling van direct zonlicht, maar eDNA werd wel aangetroffen bij de controlegroep die elf en achttien dagen in het donker zijn opgeslagen.

Uit verschillende onderzoeken (Dejean *et al.*, 2011; Thomsen *et al.*, 2012; Piaggio *et al.*, 2014) blijkt dat afbraak van DNA in water vele malen sneller gaat dan bijvoorbeeld in een (water)bodem. Hierbij is het van belang dat er een betrouwbare uitspraak gedaan kan worden over de recente

aanwezigheid van de betreffende soort. Wanneer het DNA relatief kort na het vrijkomen in het milieu wordt afgebroken, en het wordt aangetroffen op die plaats, kan er dus met redelijke zekerheid gezegd worden dat de betreffende soort daar aanwezig is of recentelijk is geweest. In bodems met een veel lagere afbraaksnelheid waar de soort is gedetecteerd met eDNA, kan hier geen betrouwbare conclusie uit getrokken worden of de soort aanwezig is of recentelijk is geweest.

In ecologisch onderzoek waarbij eDNA mogelijk in de plaats van conventionele monitoringstechnieken gebruikt kan worden, is het van belang dat men kan aantonen met een momentopname dat een soort daar aan- of afwezig is (Herder *et al.*, 2014). Afhankelijk van de vraagstelling kan eDNA geschikt zijn voor aquatische milieus en/of terrestrische milieus.

De methode

De toepassing van eDNA is toegelicht in de vorige paragraaf, maar hoe werkt nu de eDNA methode? Dat staat hieronder tot in detail beschreven.

Globaal kan gezegd worden dat eDNA bestaat uit drie grove stappen, allereerst de monsternamen in het veld. Daarna de extractie van het DNA uit het water, dit gebeurt in het laboratorium. De laatste stap is de detectie, tevens in het laboratorium. Dit staat hieronder verder toegelicht.

- **Monsternamen**

De eerste stap van de methode is een monster nemen in het veld. Zoals in de paragraaf hiervoor te lezen is, wordt dit het meest toegepast in water. Monsters bestaan daarom voornamelijk uit watermonsters. Zoals te zien is in figuur L.3, gaat monsternamen met de nodige zorgvuldigheid, handschoenen zijn verplicht om te voorkomen dat het DNA van de persoon die het monster neemt ook in het monster terecht komt. Het is sterk aan te raden, aldus De Groot *et al.* (2014), om zorgvuldig en steriel met de bemonsteringsmaterialen om te gaan, zo kan voorkomen worden dat soorten onterecht worden aangetoond (vals positief).

Voor watermonsters bestaan twee methodes om het monster te verzamelen.

De eerste methode is vooral in kleine meertjes en sloten van toepassing. Daarvoor geldt dat er met een monster van 15 milliliter kan volstaan worden. Om het monster een aantal dagen tot weken op te laten slaan, wordt aan het monster ethanol en natriumacetaat toegevoegd. Het DNA in het monster slaat dan neer samen met ethanol en natriumacetaat. Dit heeft als praktisch voordeel dat de analyse niet met spoed hoeft uitgevoerd te worden. De logistiek laat soms niet toe om snel genoeg het monster bij het laboratorium te brengen.

De grootte van het monster is een belangrijke beperking, namelijk als er een lage concentratie van een soort aanwezig is op de te bemonsteren locatie, is de kans groot dat het DNA gemist wordt. Andersom is de kans groot om de doelsoort aan te treffen in het monster als er een hoge dichtheid aanwezig is van de soort. Helder *et al.* (2014) stelt dat eDNA over het algemeen niet homogeen verdeeld is, dat kan betekenen dat de doelsoort niet gedetecteerd wordt, terwijl deze wel op deze locatie aanwezig is (vals negatief). Dit kan grotendeels verholpen worden, door de



Figuur L.3. Het nemen van een eDNA monster (© Jelger Helder)

bemonsteringsstrategie daarop aan te passen. Ecologische kennis is daarbij van groot belang, welke habitat heeft de doelsoort, waar is de grootste kans op het aantreffen van de soort. Om de kans te vergroten om het DNA van de doelsoort te vinden, is te kiezen voor een strategie van het nemen van meerdere deelmonsters en deze vervolgens samenvoegen tot een gehomogeniseerd mengmonster per locatie.



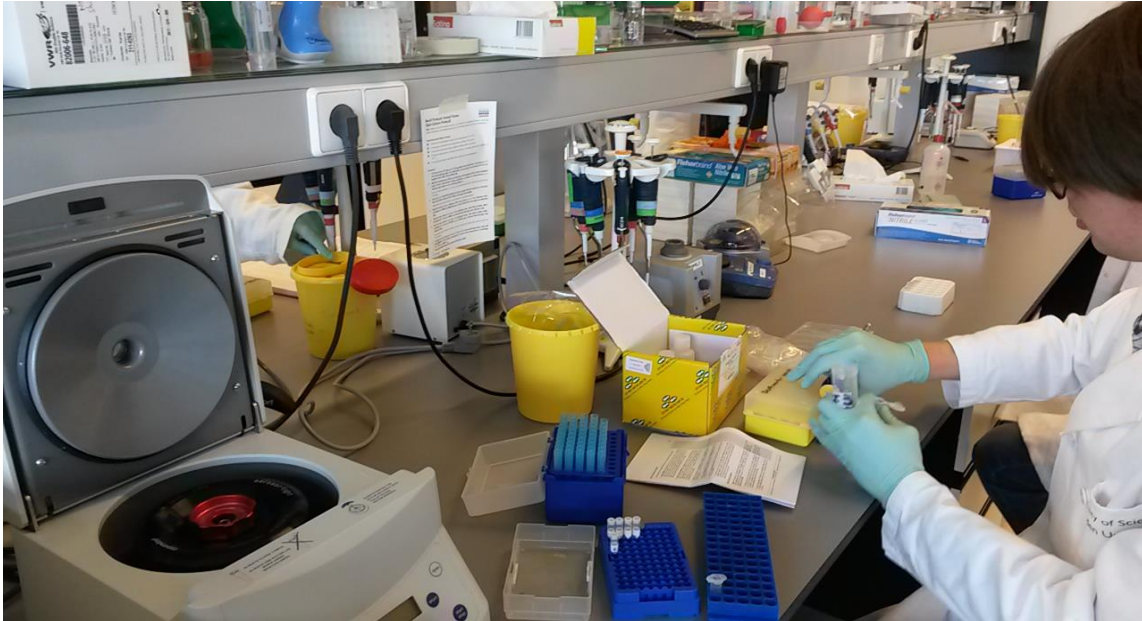
Figuur L.4. Monsternamen eDNA door Koeman en Bijkerk. Deze monsters zijn gebruikt in het TKI project, zoals beschreven in de inleiding. (paragraaf 1.1.2) (© Harry Boonstra, 13-11-2014)

De tweede manier is voornamelijk voor grotere, snelstromende wateren geschikt. Voor de eDNA analyse van deze methode is circa vijf tot twintig liter nodig, omdat er continu verdunning/wegspoeling is van DNA in snelstromende wateren. De optimale balans tussen hoeveelheid monsters en monstervolume is tot op heden heel verschillend over gedacht, het verschilt per soort en monsterlocatie (de Groot *et al.*, 2014; Herder *et al.*, 2014). De doelsoort en het DNA daarvan zijn per definitie niet gelijk verspreid over het water, omdat de omstandigheden sterk variëren, door de verschillende factoren die hier invloed op hebben (zie paragraaf 'toepassing'). Standaard worden daarom meerdere monsters genomen per locatie (Ficetola *et al.*, 2008). Vervolgens als de monsters zijn verzameld, dienen de monsters op de goede manier opgeslagen te worden en getransporteerd naar een laboratorium om daarna vervolgens de extractie en detectie van het DNA uit te voeren. De monsters dienen in het laboratorium eerst gefiltreerd te worden voordat ze verder behandeld kunnen worden. (Bijkerk *et al.*, 2013; De Groot *et al.*, 2014; Herder *et al.*, 2014)

- *Extractie*

De tweede stap die genomen moet worden is de extractie van DNA uit het water. Daarvoor zijn twee methodes om het DNA uit het monster te halen.

De eerste methode is voor kleine volumes (niet meer dan 30 ml) en maakt gebruik van centrifugeren (zie figuur L.5, apparaat aan de linkerzijde). Daarna wordt ethanol en natriumacetaat toegevoegd en daaruit volgt een neerslagreactie. Het DNA kan vervolgens via verschillende methodes verder gezuiverd worden. (Ficetola *et al.*, 2008; Dejean *et al.*, 2011; Thomsen *et al.*, 2012; Bijkerk *et al.*, 2013; Helder *et al.*, 2014)



Figuur L.5. DNA extractie door medewerker van Datura.

De tweede methode is het filtreren, zie figuur L.6, van een groter volume groter dan 30 ml. Door middel van filtratie kan het DNA geconcentreerd worden uit het monster. Het DNA dat in het water aanwezig is blijft achter in het filter en wordt vervolgens bewaard voor de verder analyse.



Figuur L.6. Het filtreren van een watermonster om het DNA uit het monster te extraheren. (ChicagoUSACE, 2011)

- **Detectie**

Een belangrijk onderdeel voor het slagen van de detectie van een soort zo stelt de Groot *et al.* (2014) is de zogenaamde genetische marker. Deze marker wordt een primer genoemd. Een primer is een klein stukje DNA bestaande uit circa 18 tot 24 basenparen lang (University of Glasgow, 2014). Deze lengte is lang genoeg om specifiek genoeg te zijn en kort genoeg om gemakkelijk te binden. Primers worden ontworpen met speciale software programma's op de computer, maar soms ook op het oog door specialisten. Het software programma kiest de geschikte stukken voor een primer uit het DNA. Een geschikte primer heeft een aandeel van G-C tussen de 40% en 60%, dat wil zeggen dat de combinatie van G-C tussen de 40 tot 60% moet zijn. Mocht het aandeel G-C lager of hoger liggen, dan is het geen betrouwbare primer. Daarnaast is de smelttemperatuur van de primer belangrijk. De smelttemperatuur is de temperatuur waarbij de helft van de duplex enkelstrengs is geworden, dat indiceert de stabiliteit van de duplex. Meestal ligt de smelttemperatuur van een primer tussen 52 en 58 graden Celsius. (De Groot *et al.*, 2014; Premier Biosoft., z.d.)

De techniek van het vermenigvuldigen van DNA wordt in de volgende paragraaf verder uitgelegd.

Overzicht detectietechnieken

Soortspecifieke analyse

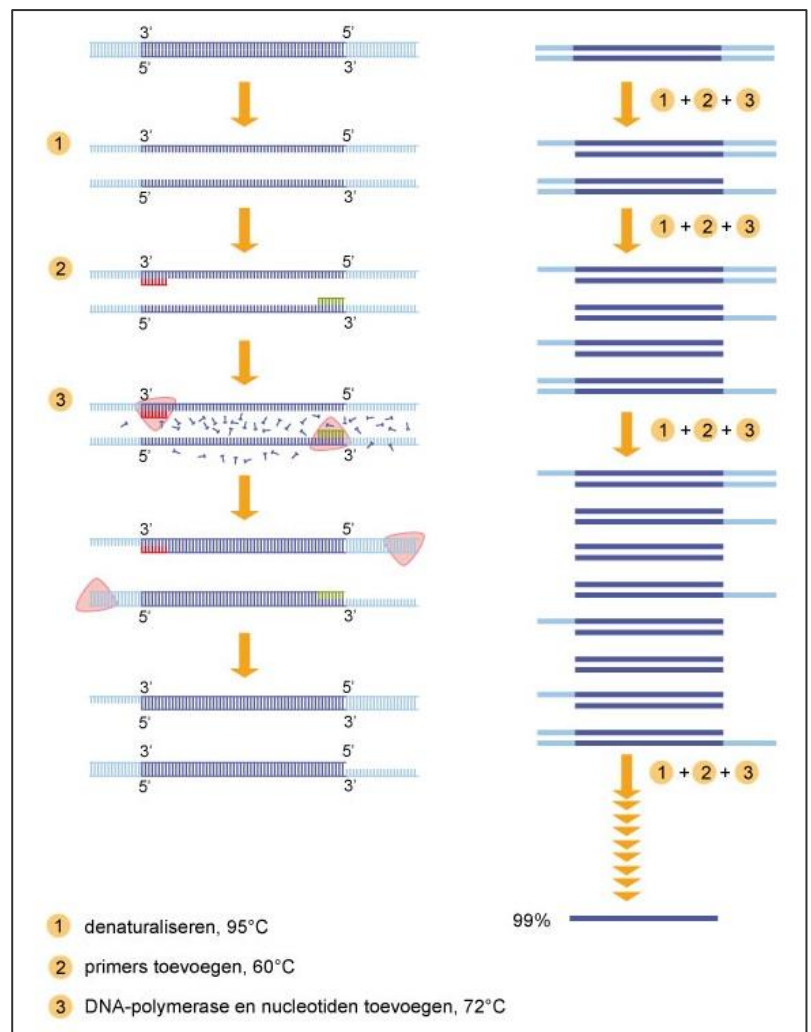
De onderstaande technieken zijn slechts toepasbaar voor het detecteren van één specifieke soort:

- Polymerase kettingreactie (PCR)
- Kwantitatieve PCR (qPCR)
- Digital droplet PCR (ddPCR)

Polymerase kettingreactie (PCR)

De polymerase ketting reactie, beter bekend als PCR (Polymerase Chain Reaction), is een methode om van een klein stukje DNA genoeg DNA aan te maken om dit te kunnen analyseren. Het proces in de PCR bestaat uit drie fases, namelijk (1) denaturatie, (2) hybridisatie en tot slot (3) verlenging. In figuur L.7 is de PCR reactie te zien. Bij de reactie in de PCR is het enzym DNA-polymerase van groot belang, omdat dit enzym er voor zorgt dat de reactie verloopt in de reactor.

- De eerste fase in de PCR is de (1) *denaturatie*, in deze fase loopt de temperatuur in de PCR op tot circa 90 – 96 ° C. In deze fase scheidt de dubbele helix van het DNA zich en gaat het van dubbelstrengs DNA naar enkelstrengs DNA, zie stap 1 in figuur L.7.
- In de tweede fase van de reactie, (2) *hybridisatie (annealing)* gaat de temperatuur van 90 – 96 ° C naar 45 – 60 ° C en worden de primers toegevoegd. In deze stap (zie stap 2, figuur L.7) kunnen primers binden op de specifieke plek aan het



Figuur L.7. Het PCR proces (Betawerk. (z.d.).

enkelstrengs DNA, aan het 5' en de 3' eind. De twee enkelstrengs DNA hebben niet de tijd om weer terug aan elkaar te binden, voordat de primer is gebonden aan het enkelstrengs DNA, omdat de primers sneller bewegen in de oplossing. In stap 2 is te zien dat er twee primers gebonden zijn aan het enkelstrengs DNA.

- De laatste fase van de reactie, (3) *verlenging (elongation)* gaat de temperatuur weer omhoog in de reactor. Van 45 – 60 ° C naar circa 72 ° C. De laatste stap (zie stap 3, figuur L.7) bestaat uit het verlengen van het DNA van de primer, zodat het een nieuw compleet stuk dubbelstrengs DNA is. In deze stap worden nucleotiden bij de reactie gevoegd. Deze losse bouwstenen hechten aan het enkelstrengs DNA en vormen zo een nieuw stuk dubbelstrengs DNA. Het overige DNA wat in het monster aanwezig is, vermeerderd zich niet, omdat de primers zijn ontwikkeld voor de specifieke doelsoort(en).

Dit proces van de drie fasen herhaalt zich meestal circa 30 maal. Het DNA vermeerderd zich op deze manier exponentieel, zoals dit aan de rechterzijde van figuur L.7 te zien is.

De PCR methode maakt gebruik van gels om de resultaten op te visualiseren. Wanneer er een match is met het eDNA licht het gel op, maar is er maar een heel klein beetje DNA van een bepaalde soort, is het zeer lastig waar te nemen en daarmee is de betrouwbaarheid niet optimaal. Er kan door interpretatie van de resultaten vals negatieve of vals positieve waarnemingen optreden.

(Balzer & Hirsch, 2007; Dorkin, 2012; Bijkerk *et al.*, 2013; Herder *et al.*, 2014; Jakobs, 2014; PCR, z.d.)

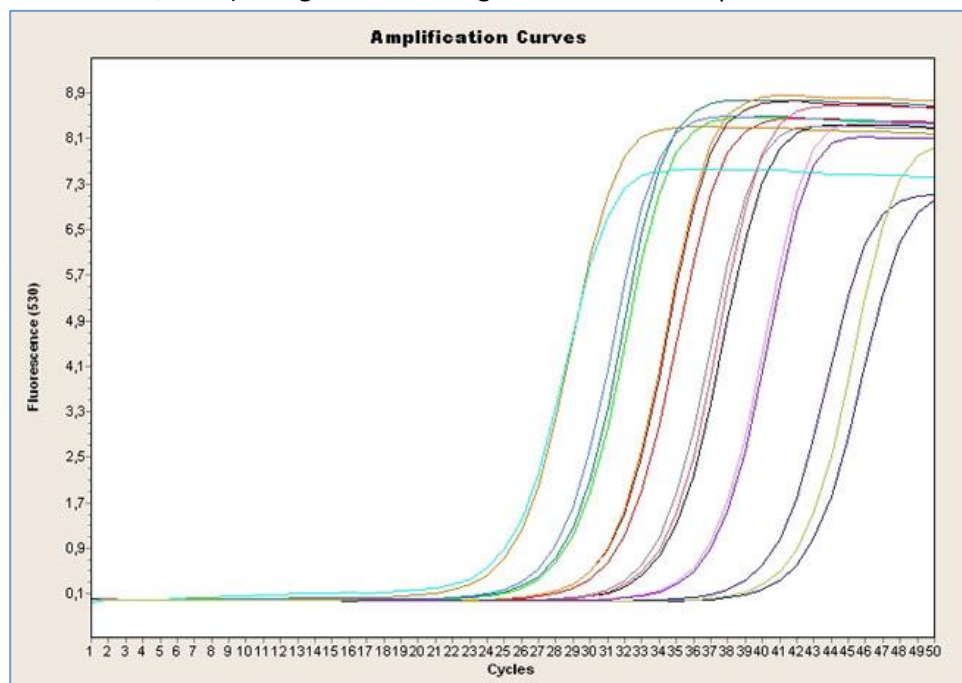
Kwantitatieve PCR

Kwantitatieve PCR (qPCR) methode, ook wel bekend als “realtime PCR” wordt over het algemeen verkozen boven de conventionele methoden (Herder *et al.*, 2014). Zo stelt Herder *et al.* (2014) dat ze over het algemeen een hogere specificiteit hebben en bovendien een hogere gevoeligheid. Dit heeft te maken met het feit dat qPCR gebruik maakt van een probe. Een probe is een stukje enkelstrengs DNA dat fluorescerende moleculen met zich meedraagt. Daardoor is de kans groter om extreem zeldzaam eDNA te detecteren (Smith & Osborn, 2009). In figuur L.7 is een groene en een rode primer

te zien, de probe past precies tussen deze twee primers. Dit heeft als voordeel dat er een extra verificatie ingebouwd is, waardoor de kans groter is dat het bindt aan het specifieke DNA waarnaar je op zoek bent. De resultaten worden grafisch weergegeven met een amplificatie curve. In figuur L.8 zie je op de horizontale as het aantal cycli dat de qPCR heeft gedraaid. Op de verticale as is de hoeveelheid fluorescentie uitgezet. Hieruit is duidelijk af te leiden dat er positieve waarnemingen zijn. De mate van fluorescentie staat in relatie met het aantal DNA waar probes aan zijn gebonden. Namelijk bij de binding van de

probe komt fluor pas vrij in de reactie. Een nadeel echter aan deze methode is dat het meer geld kost

ten opzichte van een conventionele PCR. Het verschil in kosten zit voornamelijk in de ontwikkeling en validatie van de probes, dat een extra stap is in de methode.



Figuur L.8. Resultaat uit een qPCR, amplificatie curve (Daligault, 2014)

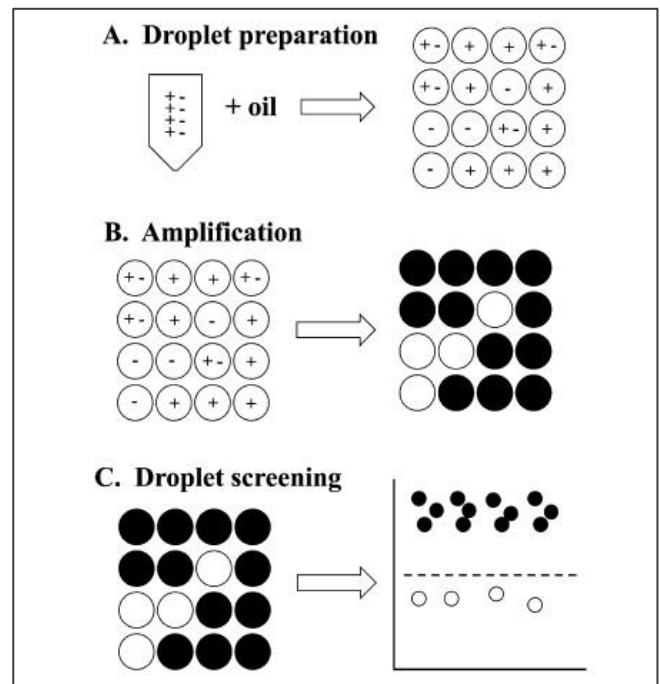
Een groot nadeel van de PCR én de qPCR is dat er stoffen zijn die de reactie inhiberen en daarmee dus verstoren waardoor er vals negatieve waarnemingen kunnen optreden (Herder *et al.*, 2014). Een van die stoffen zijn humuszuren. Humuszuren komen vrij bij afbraak van organisch materiaal, voornamelijk lignine afkomstig uit plantenresten (De Groot, 2015). Bij hoge gehalten van humuszuur (groter dan 30 µg/l) zijn er onbetrouwbare uitslagen gemeten in de fluorescentiemeting van diverse groepen blauwalgen met de qPCR (Helpdesk water, 2012). Dit probleem speelt zich voornamelijk af in veengebieden, zo is uit de praktijk gebleken. (De Groot, 2015) De concentratie van humuszuren is in veengebieden namelijk hoog. De invloed van stoffen die inhiberen kan verminderen door het gebruik van een ander apparaat, namelijk de Digital Droplet PCR (ddPCR) reactor.

Digital Droplet Polymerase Chain Reaction (ddPCR)

Net als bij de conventionele PCR techniek, als de qPCR gaat er bij de ddPCR ook een monster in, die geëxtraheerd DNA bevat. Daarnaast worden er ook primers en probes aan toegevoegd, net als in de qPCR. Anders dan bij qPCR en conventionele PCR, wordt er bij ddPCR er een mix aan toegevoegd dat onder andere bestaat uit olie. Het belangrijkste verschil is dat er in de methode van ddPCR het monster in circa 20.000 kleine “waterpartijen” wordt gescheiden door de olie die er aan toegevoegd is, zie stap A in figuur L.9. De methode van primer/probe en het amplificeren daarvan is gelijk aan de qPCR methode, namelijk er treedt fluorescentie op wanneer het enkelstrengs DNA wordt geamplificeerd. In deze methode zijn er als het ware 20.000 reacties waarvan bij het resultaat de druppel een kleur heeft van de fluorescentie of niet. De druppels die een kleur hebben worden gemeten aan het eind van de cycli. Het aantal positieve waarden wordt vervolgens grafisch weergegeven in een grafiek. In elke druppel vindt een reactie plaats. Dat heeft een positieve invloed op de betrouwbaarheid en een lager risico op negatieve invloed van inhiberende stoffen, zoals lignine. (BioRadLifeScience, 2012)

Momenteel zijn er maar een aantal ddPCR's in Nederland aanwezig. Eén daarvan staat op het

Wageningen UR complex. Alterra maakt gebruik van deze techniek en heeft het uitvoerig getest en tot op heden geeft het apparaat betere resultaten dan de qPCR (De Groot, 2015). Deze technieken ontwikkelen zich enorm snel, een apparaat is soms in drie jaar tijd dusdanig verouderd in vergelijking tot de nieuwe apparaten dat het afgeschreven is, aldus De Groot (2015).



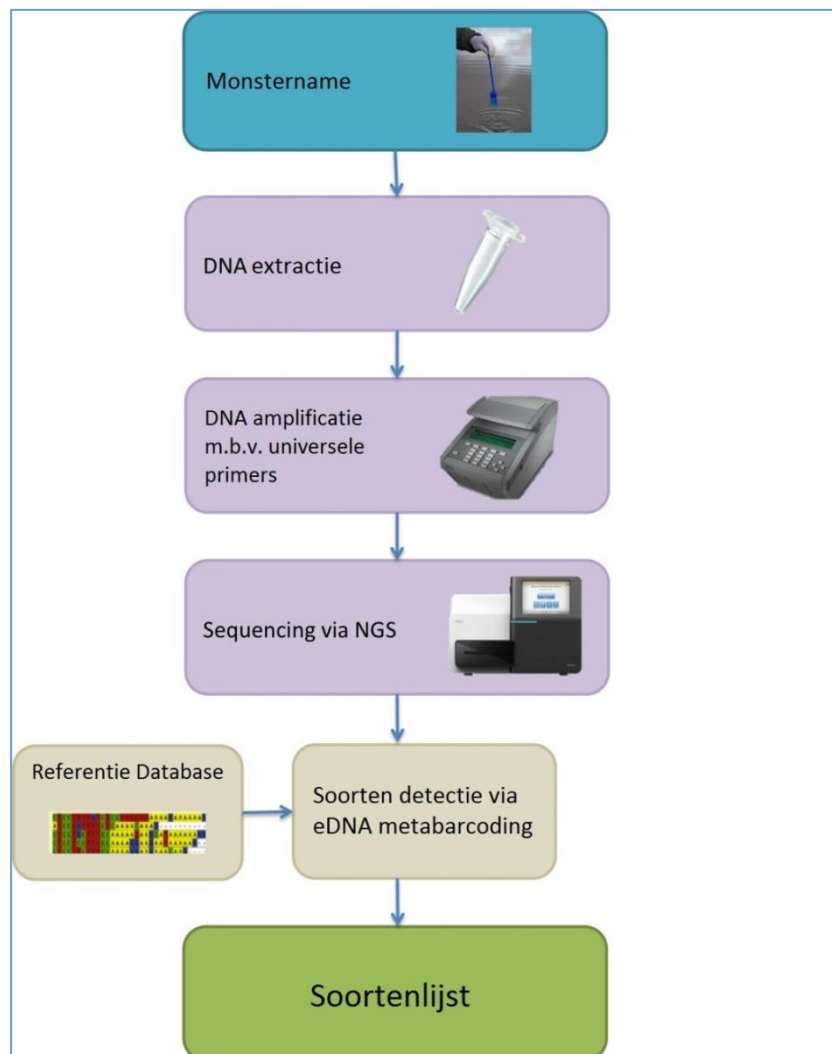
Figuur L.9. Schematische weergave van de reactie in een ddPCR (Nathan *et al.*, 2014)

Universele analyse

In de methode hierboven beschreven geldt dat het gaat om het detecteren van één specifieke doelsoort, in deze paragraaf zal de methode voor detecteren van meerdere soorten behandeld worden. Een mogelijkheid is om voor verschillende soorten primers te ontwikkelen en apart PCR's voor te laten uitvoeren, echter zit hier een limiet aan de hoeveelheid soorten die tegelijk geanalyseerd kan worden en bovendien is dat vrij duur (Herder *et al.*, 2014). Als het gaat om inzicht te krijgen in een soortenlijst te generen van een water, bijvoorbeeld in het kader van de KRW, is de universele analyse een betere methode.

Deze methode werkt voor het veldonderzoek hetzelfde als bij de soortspecifieke analyse. Er wordt volgens dezelfde principes als bij de soortspecifieke analyse bemonsterd, echter dient er niet een soortspecifiek habitat gezocht te worden. Vervolgens is de DNA extractie ook hetzelfde als bij de

soortspecifieke analyse. Daarna wordt het geëxtraheerde DNA geamplificeerd met behulp van universele primers. Deze universele primers zijn geschikt voor het amplificeren van een bepaalde soortgroep, bijvoorbeeld de soortgroep vissen. Al het DNA wat in het monster aanwezig is dat afkomstig is van vissen wordt geamplificeerd. Dat wordt vervolgens gesequenced met de Next Generation Sequencing techniek. Na de sequentie bepaling, kunnen de uitkomsten daarvan vergeleken worden met een referentie database, zoals BoLD (Barcode of Life Data). Dit wordt metabarcoding genoemd. Uit deze vergelijking kan er een soortenlijst gegeneerd worden uit het monster. In figuur L.10 is dit stappenplan te zien.



Figuur L.10. Stappenplan om te komen tot een soortenlijst m.b.v. NGS (figuur aangepast naar Herder et al., 2014)

Kosten eDNA analyse

De methode is in ontwikkeling en daarmee gepaard gaan snel veranderende technieken maakt het lastig om eenduidig iets te kunnen zeggen over de kosten van eDNA analyses. Volgens Bijkerk *et al.* (2013) zijn de kosten voor één soort met behulp van een PCR analyse € 155,- per monster. Volgens de Groot (2015) zijn de kosten voor dezelfde analyse aanzienlijk lager en liggen deze momenteel op € 50,- à € 60,-. Hierbij dient gezegd te worden dat het rapport van Bijkerk *et al.* (2013) twee jaar eerder is geschreven dan de Groot (2015). Met de huidige ontwikkeling van deze technieken kunnen er steeds meer analyses gedaan worden voor minder geld. De verwachting is dat

prijzen voor deze analyses omlaag zullen gaan de komende jaren. Afhankelijk van de doelsoort en het desbetreffende onderzoek kan eDNA goedkoper zijn dan de conventionele technieken, voornamelijk bij onderzoek waar grote hoeveelheden monsters genomen moeten worden, is het efficiënter om eDNA in te zetten (De Groot, 2015).

De benodigde tijd om een eDNA analyse uit te laten voeren is afhankelijk van de hoeveelheid monsters die genomen dienen te worden. Monsternamen en analyse in het laboratorium is uitvoerbaar in enkele dagen, mits de monsterlocatie dichtbij het laboratorium gelegen is (Herder *et al.*, 2014; De Groot, 2015). In de praktijk voeren laboratoria meestal meerdere analyses uit, dit is in verhouding goedkoper. Dit heeft als nadeel dat het langer kan duren voordat er resultaat is. Herder *et al.* (2014) stelt dat er over het algemeen vier tot zes weken nodig is om van monsternamen tot resultaat te komen.

Voor- en nadelen

Voordelen

- Eén van de voordelen is dat het minder tijd en daarmee dus minder geld kost om met eDNA de aanwezigheid van een soort te bepalen. Hierbij dient gezegd te worden dat dit sterk afhankelijk is van welke soort bemonsterd wordt. Soorten die zich lastig laten vangen met behulp van conventionele technieken, zullen goedkoper gevonden kunnen worden met behulp van eDNA. Een soort die zich gemakkelijk laat vangen en gemakkelijk te detecteren is, zal goedkoper zijn om met conventionele technieken te bemonsteren.
- De methode geeft in veel onderzoeken een hogere detectiekans dan met behulp van conventionele technieken, vooral bij soorten die lastig waar te nemen zijn met de conventionele techniek en soorten die in lage dichtheid voorkomen. Voor deze soorten geldt dan ook dat de eDNA methode kostenefficiënter is dan de conventionele techniek (Herder *et al.*, 2014).
- De methode is diervriendelijker, omdat er geen soorten meer gevangen hoeven te worden om ze waar te nemen. De conventionele techniek zorgt voor stress bij soorten. Met eDNA is daar geen sprake meer van, er hoeft alleen een monster genomen te worden, een geringe verstoring.

Nadelen

- Een groot nadeel van deze techniek is dat kwantiteit niet goed vastgesteld kan worden, ondanks dat daar onderzoek naar gedaan wordt, blijft dit de komende tijd niet te bepalen aldus de Groot (2015). Met eDNA is het alleen mogelijk om de aan- of afwezigheid van de doelsoort vast te stellen. Naast kwantiteit is het ook niet mogelijk om informatie te genereren over de lengte, het ontwikkelingsstadium, de vruchtbaarheid of de vitaliteit van de soort in tegenstelling tot de conventionele methoden (Bijkerk *et al.*, 2013 en Herder *et al.*, 2014).
- Het aangetroffen DNA uit een watermonster is vaak vergedegradiseerd, waardoor soorten soms nauwelijks te detecteren zijn. Er zijn dan te weinig basenparen om soorten van elkaar te kunnen onderscheiden.
- De eDNA-methode is nog niet opgenomen in de huidige wetgeving en is nog niet gestandaardiseerd. Daarom kan bewijsmateriaal verkregen door middel van eDNA nog niet gezien worden als geldig bewijsmateriaal.

Tot slot ontbreekt er nog veel kennis over de techniek. Er zijn voor een zeer beperkt aantal soorten goedwerkende analyses beschikbaar, zie tabel M.1 waarvoor gevalideerde analyses beschikbaar zijn.

Bijlage M Soorten met gevalideerde primers

Overzicht van de soorten waarvoor gevalideerde primers zijn ontwikkeld. De lijst kan mogelijk niet compleet zijn, doordat de ontwikkelingen van primers zich snel opvolgen.

Deze lijst is samengesteld uit meerdere lijsten van de volgende partijen:

- RAVON in samenwerking met SPYGEN
- Datura, ZZP laboratorium
- Sylphium Life Sciences in samenwerking met Koeman en Bijkerk
- Alterra, onderdeel van Wageningen UR.

Tabel M.1. Soorten waarvoor gevalideerde primers beschikbaar zijn.

Soort (Nederlandse naam)	Latijnse naam
Alver	<i>Alburnus alburnus</i>
Amerikaanse brulkikker	<i>Lithobates catesbeianus</i>
Baars	<i>Perca fluviatilis</i>
Bermpje	<i>Barbatula barbatula</i>
Bittervoorn	<i>Rhodeus amarus</i>
Blankvoorn	<i>Rutilus rutilus</i>
Bunzing	<i>Mustela putorius</i>
Driehoeksmossel	<i>Dreissena polymorpha</i>
Europese aal	<i>Anguilla anguilla</i>
Gevlekte witsnuitlibel	<i>Leucorrhinia pectoralis</i>
Groene glazenmaker	<i>Aeshna viridis</i>
Grote modderkruiper	<i>Misgurnus fossilis</i>
Heikikker	<i>Rana arvalis</i>
Humus-kieuwpootkreeft	<i>Lepidurus apus</i>
Italiaanse kamsalamander	<i>Triturus carnifex</i>
Kamsalamander	<i>Triturus cristatus</i>
Karper	<i>Cyprinus carpio</i>
Kleine modderkruiper	<i>Cobitis taenia</i>
Knoflookpad	<i>Pelobates fuscus</i>
Kwabaal	<i>Lota lota</i>
Meerval	<i>Silurus glanis</i>
Noordse woelmuis	<i>Microtus oeconomus</i>
Otter	<i>Lutra lutra</i>
Quaggamossel	<i>Dreissena rostriformis bugensis</i>
Rivierdonderpad	<i>Cottus perifretum</i>
Rivierprik	<i>Lampetra fluviatilis</i>
Rode Amerikaanse rivierkreeft	<i>Procambarus clarkii</i>
Roodwang/geelwang/geelbuikschilpad	<i>Trachemys scripta</i>
Ruisvoorn	<i>S. erythrophthalmus</i>
Snoek	<i>Esox lucius</i>
Vuursalamander	<i>S. salamandra</i>
Waterspitsmuis	<i>Neomys fodiens</i>
Winde	<i>Leuciscus idus</i>
Zwartbekgrondel	<i>Neogobius melanostomus</i>
Zwemmersjeuk	<i>Trichobilharzia</i>

Bijlage N Watertypen M10 en R5

KRW-type M10

M10 waterlichamen hebben vaak een natuurlijke oorsprong in veenriviertjes en krekken, ze bestaan niet puur uit veen, sommige M10 waterlichamen fungeerden namelijk als getijdenkreek en kregen aanvoer van slib uit rivieren en zee.

Laagveen vaarten en kanalen komen vooral voor in laag Nederland en zijn stagnante wateren. In deze wateren worden veel algemene macrofauna soorten aangetroffen. Deze watergangen zijn aangelegd voor scheepvaart en/of water aan- en afvoer. Ze zijn gelegen in de veengebieden van Friesland, (Groningen), Drenthe, Overijssel, Utrecht en Noord- en Zuid-Holland. Meestal liggen M10-waterlichamen in agrarische gebieden, met enkele uitzonderingen in natuurgebieden (bijvoorbeeld in de Wieden en Weerribben of Vechtplassen). (Evers *et al.*, 2012)

Een voorbeeld van een M10 waterlichaam staat in figuur N.1.



Figuur N.1 Het Polderhoofdkanaal, bemonsteringslocatie van Koeman en Bijkerk op 13-11-2014. (© Harry Boonstra)

KRW-type R5

Doorgaans zijn de R5-beken genormaliseerd ofwel sterk veranderd.

Langzaam stromende midden- en benedenlopen komen vaak voor op hogere zandgronden met weinig hoogteverschil. Bijvoorbeeld in uitgestoven laagten en ingesneden beekdalen. Zowel in half open landschappen als in bosrijke gebieden komt dit watertype voor. In figuur N.2 is de Keizersbeek te zien, nabij het dorp Aalten gelegen in Gelderland. De Keizersbeek is een voorbeeld van een R5-waterlichaam.

(Van der Molen *et al.*, 2012)



Figuur N.2. De Keizersbeek, nabij Aalten (Gelderland). Een waterlichaam van KRW-type R5: langzaam stromende midden- en benedenlopen op zand. (Straatkaart, 2008)

