

MICROBIOM-ANALYSE ALS NIEUWE TOOL VOOR ECOLOGISCHE WATERKWALITEITSBEOORDELING?



RAPPORT

2026
12

MICROBIOOM-ANALYSE ALS NIEUWE TOOL VOOR
ECOLOGISCHE WATERKWALITEITSBEOORDELING?

RAPPORT

2026

12

ISBN 978.94.6479.140.2



COLOFON

Amersfoort, februari 2026

UITGAVE Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer STOWA
Postbus 2180
3800 CD Amersfoort

AUTEURS Isa Martin, MSc^{1,2}
Prof. Dr. Laura van Niftrik¹
Dr. Annelies J. Veraart^{2,*}

1. Radboud Institute for Biological and Environmental Sciences (RIBES), afdeling Microbiologie. Radboud Universiteit, Nijmegen
 2. Radboud Institute for Biological and Environmental Sciences (RIBES), afdeling Ecologie. Radboud Universiteit, Nijmegen
- * Correspondentie: Annelies.Veraart@ru.nl

BEGELEIDINGSCOMMISSIE

Bas van der Wal (STOWA)	Marijan Uytewaal (HDSR)
Freek van Gent (STOWA, Ambient)	Nikki Dijkstra (HDSR)
Carmen Hogendoorn (Rijkswaterstaat)	Tessa van der Wijngaart (STOWA)
Miriam Collombon (Waternet)	Hans Massop (AQUON)

De qPCR-analyses zijn uitgevoerd door KWR. Daarvoor dank aan Paul van der Wielen, Leonie Borstlap, Goffe Elsinga en analisten. Vanuit WenR adviseerden Ralf Verdonshot en Gea van der Lee over o.a. locatieselectie. Medewerkers van Datura, Jitske Rook, Lindy Kool, Kees van Bochove, Stijn Kouwenberg en Ymke Nederlof en Sebastiaan Schep van Witteveen+Bos gaven advies over bemonstering en filtratie, evenals Sander Heeman vanuit AQUON. Sandra Roodzand, Anneke ter Schure, Marco Beers, Kees Fraanje, Frank van Herpen, Joachim Rozemeijer en Joep Appels hebben namens de waterschappen Hollands Noorderkwartier, Brabantse Delta en Aa en Maas, evenals medewerkers van Deltares en MicroLAN geholpen bij de locatieselectie. Vanuit de Radboud Universiteit hebben bijgedragen aan de uitvoering en advisering rondom dit onderzoek: Theo van Alen, Rosa Boone, Claudia Brunetti, Lidwien Burgers, Maite Colina Rama, Geert Cremers, Stijn Diebels, Felix Duzinski, Nefeli Elezi, Rob de Graaf, Suzanne Haaijer-Vroomen, Ans Lamers, Dimitra Morfogianni, José Paranaíba, Katinka van de Pas-Schoonen, Roy Peters, Ida Peterse, Judith van der Knaap, Sebastian Krosse, Isabel Rigutto, Ilenia Marquina Luévano, Bjorn Robroek, Elisa Rodriguez Maldonado, Charon Ruijs, Elvira Spoelman, Annemiek Tiekstra, Zeger Veenstra, Paul van der Ven, Jessica Venetz, Wilco Verberk, Niels Wagemaker, Stefan Weidveld, Paul van der Wielen en Jan Zethof.

IN SAMENWERKING MET

Dr. Paul van der Wielen (KWR Water Research)
Dimitra Morfogianni (stagiair Radboud Universiteit Nijmegen en KWR Water Research)

FOTO OMSLAG Beeldbank Radboud Universiteit
VORMGEVING Buro Vormvast
STOWA STOWA 2026-12
ISBN 978.94.6479.140.2

De inhoud van deze uitgave is met de grootst mogelijke zorg samengesteld. Niettemin aanvaarden de auteurs en de uitgever geen enkele aansprakelijkheid voor mogelijke onjuistheden in de publicatie, of eventuele gevolgen door toepassing van de inhoud ervan.

STOWA spant zich in de rechthebbenden van in de uitgave gebruikte afbeeldingen te respecteren conform het auteursrecht. Indien u desondanks van mening bent dat uw rechten in het geding zijn, dan verzoeken wij u contact met ons op te nemen.

TEN GELEIDE

De waterkwaliteit wordt bepaald door complexe, samenhangende processen in het watersysteem. Om deze goed te duiden, kan aanvullende diagnostiek die verder kijkt dan wat we tot nu toe konden, zeer waardevol zijn. Dit rapport laat zien dat microbiom-onderzoek waterbeheerders die verdieping kan bieden. Micro-organismen reageren snel op veranderingen en weerspiegelen direct de biogeochemische processen in het systeem. Door het microbiom mee te nemen ontstaat een extra informatieniveau dat helpt knelpunten beter te signaleren, te verklaren en gericht aan te pakken.

Waar waterbeheerders al jarenlang vertrouwen op metingen van chemische waterkwaliteit en op biologische indicatoren zoals vissen, macrofauna, waterplanten en algen, blijft een belangrijke component van het ecosysteem daarbij grotendeels buiten beeld: het microbiom. Micro-organismen vormen het fundament van aquatische systemen. Zij verzorgen biogeochemische processen die bepalend zijn voor bijvoorbeeld nutriëntenhuishouding, zuurstofdynamiek en emissies van broeikasgassen. Toch wordt deze rijkdom aan informatie nog nauwelijks benut in de routinematige waterkwaliteitsdiagnostiek.

In het kader van EBEO 2.0, waarin wordt gewerkt aan een vernieuwde beoordelingssystematiek voor ecologische waterkwaliteit, is behoefte aan inzicht in de mogelijkheden die het microbiom biedt voor diagnose en duiding van milieuknelpunten. Dit rapport verkent die mogelijkheden langs twee pijlers. Allereerst is gekeken naar praktische en reproduceerbare methoden voor bemonstering, opslag, DNA-extractie en sequencing. Daarnaast wordt een verkenning gepresenteerd van de relatie tussen microbiom samenstelling en waterkwaliteitsparameters in vijftig sloten, verspreid over Nederland.

De resultaten bieden een eerste bouwsteen voor het ontwikkelen van microbiële indicatoren en mogelijke indices die in toekomstige beoordelingssystemen een plek kunnen krijgen. Dit rapport vormt een belangrijke stap richting een bredere, meer integrale benadering van waterkwaliteitsdiagnostiek. Het maakt duidelijk dat het microbiom een concrete en veelbelovende informatiebron is die waterbeheerders kan helpen om ecologische problemen sneller en nauwkeuriger te duiden. Vervolgonderzoek is nodig voor verdere standaardisatie, ontwikkeling van referentiekaders en verankering in monitoringprogramma's. Tegelijkertijd toont dit werk overtuigend aan dat de wereld onder het wateroppervlak veel meer vertelt dan we tot nu toe benutten.

Mark van der Werf
Directeur STOWA

BEGRIPPENLIJST

16S rRNA — Een onderdeel van het ribosomaal DNA van microorganismen. Veel regio's hiervan variëren sterk tussen soorten, waardoor het amplificeren ervan een beeld kan geven van de soortsaanpak van het microbiom in een monster

Ampliconsequencing — Het amplificeren van DNA op basis van een specifiek stukje ervan (amplicon), bijvoorbeeld 16S rRNA

Archaea — Een domein van ééncellige micro-organismen, met een unieke genetische code, waardoor ze zich van zowel de bacteriën als de eukaryoten onderscheiden.

ASV — Amplicon Sequencing Variant; unieke sequentie van DNA gevonden na ampliconsequencing

Denitrificatie — Microbieel proces waarin nitraat in meerdere stappen wordt omgezet naar stikstofgas

Elutie — Het oplossen van DNA in een buffervloeistof

Lyse-stap — Stap in het proces van DNA-extractie waarin de celwanden worden opengemaakt zodat het DNA vrij kan komen.

Multivariate analyse — Statistische analyse waarin meerdere variabelen en hun relaties tot elkaar worden geanalyseerd

Nitrificatie — Microbieel proces waarin ammonium in meerdere stappen wordt omgezet naar nitraat

Primer — Een kort stuk enkelstrengs DNA dat zich hecht aan dubbelstrengs DNA en daarmee de aanmaak van een nieuwe DNA-streng op gang brengt

qPCR — Kwantitatieve PCR; methode waarin specifieke genen worden geamplificeerd, en gekeken wordt naar de hoeveelheid kopieën van een gen in een monster

Regressieanalyse — Analyse van de samenhang tussen twee of meer variabelen

STOWA IN HET KORT

KENNIS OVER WATER, VOOR NU ÉN LATER

De Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer – kortweg STOWA – is het kennisplatform van regionale waterbeheerders in Nederland. Vanuit ons kantoor in Amersfoort werken we aan het ontwikkelen, verzamelen, verspreiden en implementeren van toegepaste kennis. Die kennis hebben waterbeheerders nodig om de opgaven waar zij voor staan, goed uit te kunnen voeren. Of het nu gaat om klimaatadaptatie (zowel stedelijk als landelijk gebied), een goede waterkwaliteit, duurzame en effectieve afvalwaterzuivering, veilige dijken en kaden, energietransitie of circulaire economie.

Het soort kennis dat wij ontwikkelen, is breed: technisch en natuurwetenschappelijk, maar soms ook bestuurlijk-juridisch of sociaalwetenschappelijk. Om te zorgen dat die kennis maximaal kan worden toegepast in de praktijk, presenteren we onze onderzoeksresultaten indien mogelijk in de vorm van praktische handreikingen, tools en instrumenten. Ook faciliteren we met het oog op kennisdoorwerking Communities of Practice en organiseren we daarvoor allerlei bijeenkomsten en webinars. Via onze eigen en andermans media geven we uitleg over de achtergronden bij ons werk.

STOWA werkt vraaggestuurd. We inventariseren welke kennisvragen waterbeheerders hebben en zetten die vragen uit bij de juiste kennisleveranciers: universiteiten, kennisinstituten, kennisbedrijven of adviesbureaus. Wij nemen de aanbesteding en begeleiding van gezamenlijke kennisprojecten op ons. Maar wij zorgen ervoor dat waterbeheerders verbonden blijven met deze projecten en er ook 'eigenaar' van zijn. Dit om te waarborgen dat de projectresultaten de deelnemers praktische handelingsperspectieven bieden. Ieder project wordt om die reden begeleid door een commissie waar regionale waterbeheerders zelf deel van uitmaken. De grote onderzoekslijnen worden vastgesteld door programmacommissies, waar waterbeheerders ook zitting in hebben.

STOWA is onafhankelijk, onpartijdig en transparant. De afnemers van onze kennis moeten erop kunnen vertrouwen dat de inhoud van onze rapporten objectief en representatief is. Alleen zo kan onze kennis worden ingezet voor beter waterbeheer en innovaties die antwoord geven op de uitdagingen van vandaag en morgen. Het is aan waterbeheerders te bepalen hoe ze de kennis van STOWA in de praktijk gebruiken.

STOWA is een stichting die de richtlijnen volgt voor organisaties zonder winstoogmerk (RJ-640). In ons jaarverslag is daarom naast een cijfermatige jaarrekening ook een directieverslag opgenomen over de stichting en haar activiteiten. Het budget bedraagt jaarlijks ongeveer 20 miljoen euro. Onze deelnemers leggen gezamenlijk ieder jaar ongeveer 10 miljoen in als structurele bijdrage. Daarnaast ontvangen we jaarlijks ongeveer 10 miljoen euro in de vorm van bijdragen aan afzonderlijke projecten.

MICROBIOOM-ANALYSE ALS NIEUWE TOOL VOOR ECOLOGISCHE WATERKWALITEITSBEOORDELING?

1 INHOUD

	TEN GELEIDE BEGRIPPENLIJST	
1	SAMENVATTING	
	STOWA IN HET KORT	
2	AANLEIDING, ACHTERGROND EN AFBAKENING	1
3	METHODEN	3
3.1	Bemonsteringspilot	3
3.1.1	Bemonstering	3
3.1.2	DNA extracties	3
3.2	Onderzoek	4
3.2.1	Locatieselectie	4
3.2.2	Bemonstering	4
3.2.3	Monsterverwerking	5
3.2.4	Kwantitatieve PCR	6
3.2.5	Data-analyse	8

4	RESULTATEN EN DISCUSSIE	10
4.1	Optimale opslag en verwerking	10
4.1.1	Bewaarmethode	10
4.1.2	DNA-Extractie	11
4.1.3	16S rRNA genregio's en primers	12
4.2	Optimale bemonstering	13
4.3	Microbiële indicatoren	15
4.3.1	Literatuurstudie microbiële indicatoren en indices	15
4.3.2	Relaties tussen functionele genen en omgevingsfactoren	17
4.3.3	Invloed van bemonsteringsregio en omgevingsfactoren op de samenstelling van het microbiom	20
4.3.4	Correlaties tussen microbiële genera en omgevingsfactoren	21
5	CONCLUSIES	26
6	AI-VERKLARING	28
7	REFERENTIES	29
BIJLAGE	BEMONSTERINGSLOCATIES	33

1

SAMENVATTING

Hoewel micro-organismen van groot belang zijn voor het functioneren van aquatische ecosystemen, en het karakteriseren van microbiële soortssamenstelling via DNA-analyse steeds makkelijker is geworden, wordt er in Nederland nog niet op grote schaal gebruik gemaakt van microbiële soortssamenstelling in waterkwaliteitsdiagnostiek. In dit onderzoek belichten we een aantal essentiële aspecten van microbiom-monitoring, als startpunt voor vervolgonderzoeken naar de toepasbaarheid van het microbiom in waterkwaliteitsdiagnostiek.

Ten eerste onderzochten we via literatuuronderzoek wat de beste methoden zijn voor opslag van, en DNA-extractie uit, microbiom-monsters, van zowel water als sediment. Beide typen monsters hebben baat bij snelle extractie van het DNA (binnen enkele dagen), waarbij water-monsters binnen 48 uur gefilterd moeten worden. Bij langere perioden tussen extractie en bemonstering kunnen monsters het beste bij -20 of -80 graden worden ingevroren. DNA-extractie kan het best gedaan worden met standaard extractie-kits, specifiek voor water, biofilm of sediment.

In het veld onderzochten we hoeveel monsters genomen moeten worden om tot een betrouwbaar beeld van de microbiële samenstelling te komen. Hierbij maakten we een afweging tussen wat praktisch haalbaar is, met behoud van voldoende representatie van de totale (grote) diversiteit aan microbiële genera. Bij het nemen van watermonsters in sloten heeft een mengmonster uit minimaal zes slootlocaties de voorkeur, van sedimenten moeten minimaal vier slootlocaties bemonsterd worden. In vijftig sloten, verdeeld over vijf regio's, hebben we vervolgens deze inzichten toegepast bij de bemonstering, opslag en extractie van microbiële DNA, met als doel een eerste indruk te krijgen van de indicatieve waarde van de microbiom-samenstelling voor waterkwaliteit. We hebben door middel van 16s rRNA amplicon sequencing het microbiom van de sloot-sedimenten en slootwatermonsters in kaart gebracht, en deze gerelateerd aan de chemische samenstelling van water en sediment.

Daarnaast hebben we gen-abundanties gekwantificeerd voor genen betrokken bij nitrificatie, denitrificatie, methaan-productie en -afbraak, en sulfaat-reductie, en vervolgens relaties tussen gen-abundantie en de samenstelling van slootwater en sediment in kaart gebracht. Multivariate analyse (NMDS) wees uit dat de microbioomsamenstelling, en dan vooral de samenstelling van archaea in slootwater, verschilt tussen bemonsteringsregio's, en dat ook binnen regio's grote verschillen in microbioomsamenstelling te zien zijn die samenhangen met variatie in waterchemie, zoals bijvoorbeeld zwavelgehalte, ammoniumgehalte of ijzergehalte. Dit laat zien dat de samenstelling van het (water)microbiom inderdaad een mogelijke aanvulling kan zijn op huidige diagnostiek, hoewel hiervoor vooralsnog wel een referentiekader nodig is van andere, vergelijkbare watersystemen binnen een regio. De abundantie van specifieke genen hing in sommige regio's samen met milieufactoren, bijvoorbeeld de genen *dsrB* (coderend voor sulfaat-reductie) en *mcrA* (coderend voor methaan-productie), die beide correleerden met organische stof in het sediment.

Naast deze genen waren er ook specifieke genera, waaronder enkele nog ongeclassificeerde genera, die binnen regio's sterk correleerden met omgevingsvariabelen zoals ijzergehalte. Ons onderzoek laat zien dat het inzetten van microbioomanalyse in waterkwaliteitsdiagnostiek praktisch haalbaar is, en potentie heeft. Voor het inzetten als diagnostische methode zijn echter nog een aantal stappen te maken: 1) het standaardiseren van methoden voor monsternamen, opslag, extractie, sequencing en data-analyse, zodat analyses onderling vergelijkbaar zijn, en 2) de hieruit verkregen data, en meta-data (waterkwaliteitsdata) verwerken in een referentiedatabase, 3) ontwikkeling van statistische methoden voor het herkennen van 'afwijkende' of indicerende microbiota.

2

AANLEIDING, ACHTERGROND EN AFBAKENING

Micro-organismen spelen een cruciale rol in het functioneren van aquatische ecosystemen, als spil in het voedselweb en transformator van belangrijke voedingsstoffen, zoals koolstof, stikstof en zwavel. Toch wordt kennis over deze organismen nog niet meegenomen in routinematige ecologische beoordeling van oppervlaktewateren. Daarnaast heeft de huidige gebruikte methodiek voor ecologische beoordeling, waarin micro-organismen nog niet worden meegenomen, te weinig diagnostische waarde, waardoor verbeteringen in ecologische toestand en mogelijke verbeteringsroutes niet inzichtelijk gemaakt kunnen worden. In de afgelopen decennia zijn nieuwe technieken ontwikkeld waarmee de identiteit en potentiële functies van micro-organismen relatief eenvoudig in kaart gebracht kunnen worden. Door slim toepassen van deze technieken kan extra informatie verkregen worden, waarmee de beschikbare fysisch-chemische data beter geduid kunnen worden. Deze informatie kan aansluiten op andere initiatieven rond waterkwaliteitsmonitoring, zoals het EBEO2.0 programma.

In dit document geven we handvatten voor verschillende microbiële en moleculaire bepalingen, die routinematig toegepast kunnen worden in waterkwaliteitsanalyse. Daarnaast presenteren we data uit een pilot-onderzoek naar optimale ruimtelijke-bemonsteringsfrequentie en data uit een verkennend onderzoek naar de relatie tussen microbiïesamenstelling van waterbodem en waterkolom en de biogeochemische waterkwaliteit in vijftig Nederlandse sloten, afkomstig uit verschillende beheergebieden. In het onderzoek naar relaties tussen microbiom en waterkwaliteit lag de focus op de fysisch-chemische status van de bemonsterde slootssystemen, met name beschikbaarheid van macronutriënten en sporenelementen, in het bijzonder nitraat, ammonium, fosfaat, ijzer, zwavel en chloride. Effecten van toxiciteit en relaties tussen sloot-microbiom en medicijnresten, biociden en zeer zorgwekkende stoffen zijn in deze eerste analyse buiten beschouwing gelaten.

WAT ZIJN MICRO-ORGANISMEN, EN WAAROM ZIJN ZE BELANGRIJK VOOR AQUATISCHE ECOSYSTEMEN?

Micro-organismen zijn organismen die vaak te klein zijn om met het blote oog te kunnen waarnemen, zoals eencellige organismen en sommige kleine meercellige organismen. In dit document richten we ons specifiek op bacteriën en archaea, omdat I) deze organismen belangrijke biochemische processen faciliteren, II) over deze organismen de meeste kennis beschikbaar is, en III) omdat beide groepen met vergelijkbare technieken onderzocht kunnen worden. Bacteriën en archaea mediëren belangrijke biochemische cycli in water en bodem, zoals het beschikbaar maken van organisch of atmosferisch stikstof voor planten en algen, de afbraak van organisch materiaal en de productie en afbraak van broeikasgassen. Door hun diversiteit aan voorkeuren en functies kunnen bacteriën en archaea gebruikt worden als indicatoren voor bijvoorbeeld zuurstofstatus, stikstofbelasting, verwachte broeikasgasemissies, belasting met sulfaat of ijzerrijk (grond)water.

ONDERZOEKSVRAGEN

1. Bemonsteringsstrategie
 - a. Op welke manier kan het microbioom van oppervlaktewateren en de onderwaterbodems van deze wateren het best bemonsterd worden, op zo'n manier dat opschaling naar grote monstercampagnes realistisch is? — *Literatuur & veldstudie*
 - b. Hoeveel monsters zijn per locatie nodig om de totale microbiële diversiteit zo compleet mogelijk in beeld te brengen ("zie bemonsteringspilot") — *Veldstudie*
 - c. Wat is de invloed van de gebruikte DNA-extractiemethode op de gemeten microbiële soortsamenstelling? — *Literatuurstudie*
2. Microbiële indicatoren
 - a. Zijn er uit water- of sedimentmicrobioomdata soortgroepindicatoren te extraheren waarmee in watermanagement toepasbare kennis verkregen kan worden over de biogeochemie, ecologische toestand en/of ecosysteemfunctioneren van een aquatisch ecosysteem? Voorbeelden van biogeochemie zijn bijvoorbeeld aanwijzingen voor stikstofbelasting of sulfaatbelasting. Voorbeelden van biogeochemisch functioneren zijn aanwijzingen voor nitrificatie, methaanproductie of methaanafbraak. — *Veldonderzoek/lab-analyse*
 - b. Zijn er microbiële indices of multivariate patronen te extraheren die als aanknopingspunt dienen om de toestand van een aquatisch ecosysteem te verbeteren? — *Literatuuronderzoek, veldonderzoek, data-analyse*

3

METHODEN

3.1 BEMONSTERINGSPILOT

3.1.1 BEMONSTERING

Voor de pilot zijn drie sloten in Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier (HHNK) in Noord-Holland bemonsterd, in September 2024. In Tabel B1 in de bijlage zijn de coördinaten van deze sloten te vinden. Deze hebben we aan de hand van data van HHNK en observatie ter plekke geselecteerd op basis van bereikbaarheid, breedte en diepte. In iedere sloot hebben we op 10 verschillende segmenten bemonsteringen en metingen uitgevoerd, met 2 meter tussen elk segment. Dit was altijd op ongeveer een derde van de breedte van de sloot. Bij alle bemonsteringen werden Nitril handschoenen gedragen om de kans op besmetting met menselijke cellen te verkleinen. Daarnaast werd de steekbuis voor sedimentbemonstering na ieder monster grondig omgespoeld met slootwater, en is al het andere materiaal dat het monster aanraakte van tevoren gesteriliseerd, of schoongemaakt met 70% ethanol.

Sedimentmonsters zijn handmatig genomen met een steekbuis. Vanuit de steekbuis hebben we de eerste 2 cm vanaf het sedimentoppervlak overgebracht naar ziplock zakjes. Het sediment is vervolgens gemengd, en daarna is met een schone lepel een sub-monster voor DNA-extractie genomen en deze in een Eppendorf-buisje bewaard. Sedimentmonsters zijn vervolgens onmiddellijk gekoeld, en monsters bedoeld voor DNA-extractie zijn aan het einde van de dag ingevroren (-20 °C).

Op verschillende plekken in de sloot hebben we een halve liter water bemonsterd in luchtdichte, geautoclaveerde glazen flessen, en onmiddellijk koel bewaard. Deze zijn dezelfde week gefilterd met een 0.2 µm filter (Supor, ø 47 mm). Na filtratie zijn de filters dezelfde dag nog ingevroren.

Daarnaast hebben we water ook op een alternatieve manier bemonsterd met 'eDNA Dual filter capsules' (Sylphium), waarmee met een 50 mL spuit het water ter plekke door een filter kan worden gezogen. Vervolgens is het DNA uit de filters geëxtraheerd met de Sylphium eDNA-isolatiekit. Na extractie kon worden gekeken of DNA-opbrengst per mL gefilterd water tussen de methoden verschilde.

3.1.2 DNA EXTRACTIES

Het DNA uit sediment en water werd geëxtraheerd zoals beschreven in sectie "3.2.3 Monsterverwerking" van dit rapport. In plaats van de *PowerWater* kit, hebben we in de pilot de Qiagen *DNeasy PowerBiofilm* kit gebruikt. We hebben hiervoor de filters in tweeën geknipt, en één helft daarna nog in kleinere stukjes geknipt, voor de extracties. Tijdens de extractie hebben we voor een paar monsters de andere helft van het filter ook gebruikt, om te testen of het versnipperen zou zorgen voor een hogere DNA-opbrengst. Dit bleek niet het geval, dus hebben we ervoor gekozen om in het onderzoek de filters alleen door de helft te knippen en 1 helft te gebruiken voor de extractie.

3.2 ONDERZOEK

3.2.1 LOCATIESELECTIE

Locaties zijn geselecteerd aan de hand van data verkregen van de waterschappen Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier (HHNK) in Noord-Holland en Texel, Brabantse Delta in West-Brabant en Aa en Maas in Oost-Brabant, en vanuit voorgaand onderzoek van de WUR in De Wieden en de Radboud Universiteit in heel Nederland. Hierbij werd een selectie gemaakt van ondiepe, smalle sloten (<10m breed), die gemakkelijk bereikbaar waren met een auto. Locaties zijn eerst bekeken via satelliet, en naderhand ook ter plekke bezocht om in te schatten of zij geschikt waren. Uiteindelijk hebben we 50 sloten uitgekozen, waarvan 10 op Texel, 9 in Noord-Holland, 9 in de Brabantse Delta (West-Brabant), 12 in Aa en Maas (Oost-Brabant), en 10 in De Wieden. Sloten zijn ook uitgekozen op basis van eerder gemeten nutriëntenconcentraties, om in een zo breed mogelijke gradiënt te kunnen bemonsteren. De locaties op de kaart zijn in Figuur B1 en B2 van de bijlage te vinden. De coördinaten, KRW watertypen en bodemprofielen volgens de bodemkaart van de Atlas Leefomgeving staan in Tabel B2.

3.2.2 BEMONSTERING

Bemonsteringen zijn eind februari en begin maart 2025 gedaan. Voor iedere sloot zijn tijdens de bemonstering de weersomstandigheden en het omliggend landgebruik genoteerd. Vervolgens zijn de monsters genomen in een transect van 10 meter slootlengte. Per sloot zijn er 4 sedimentmonsters en 6 watermonsters genomen, evenredig verdeeld langs het transect. Het sediment is bemonsterd met behulp van een eDNA monsterhengel met een 50 mL spuit, waarvan de bovenkant was afgesneden, zodat een soort mini-steekbuis ontstond. Hierna zijn steeds de bovenste 3 cm van het sediment naar ziplock zakjes overgebracht en gehomogeniseerd, waarna een sub-monster voor de DNA-analyse naar een Eppendorf-buisje werd overgebracht met een schone lepel. Sediment werd gekoeld bewaard (4 °C) en Eppendorfs werden aan het einde van de dag ingevroren op -20 °C.

Op 6 verschillende plekken in de sloot zijn watermonsters van ongeveer 0.5 L genomen, en deze zijn samengevoegd en gemengd in een schone emmer. Uit dit mengmonster werd vervolgens een hoeveelheid (50-400 mL) water gefiltreerd in het veld (0.2 µm, 47 mm), met behulp van een elektrische boorpomp 'Vampir Probensammler' (Buerkle). Het gefilterde water is bewaard voor latere elementenanalyse. Watermonsters en filters zijn onmiddellijk gekoeld, en filters zijn aan het einde van de dag ingevroren (-20 °C).

Bij de bemonstering zijn steeds handschoenen gedragen. De emmer voor waterbemonstering is voor ieder monster steeds grondig omgespoeld met slootwater. Al het andere materiaal dat gebruikt werd voor het hanteren van filters en sedimentmonsters is voor ieder monster schoongemaakt met 70% ethanol. In iedere sloot is zuurstofconcentratie en -saturatie in de waterkolom en vlak boven het sediment gemeten, evenals de pH, het elektrisch geleidingsvermogen (EGV) en de temperatuur. Daarnaast is de oppervlaktebedekking van drijvende, emergente en ondergedoken vegetatie genoteerd, net als de meest abundante soorten per groep. Luchtdruk, slootbreedte en diepte zijn ook voor iedere sloot gemeten. Buiten het 10 meter transect is het porievocht bemonsterd met twee lysimeters, ter indicatie van de biogeochemie in het sediment.

3.2.3 MONSTERVERWERKING

DNA-EXTRACTIES EN AMPLICON SEQUENCING

Het DNA van de filters is geëxtraheerd met de *DNeasy PowerWater Kit* (Qiagen). De filters werden daartoe in tweeën gedeeld met behulp van een pincet en schaar, die beide vooraf werden gereinigd met 70% isopropanol en gesteriliseerd in een vlam. Voor iedere extractie werd een halve filter gebruikt. Tijdens de mechanische lyse-stap weken we af van het standaard-protocol door de beadbeating-buizen (waarin kleine kogeltjes zitten die de cellen breken om het DNA vrij te maken) 10 minuten lang met een frequentie van 50 s^{-1} te schudden met een TissueLyzer (Qiagen). Uit het sediment is DNA geëxtraheerd met het *DNeasy PowerSoil Kit* protocol (Qiagen), met de volgende aanpassingen ter optimalisatie:

1. Er is een extra lyse-stap toegevoegd, waarbij de monsters voorafgaand aan de mechanische lyse gedurende 10 minuten bij $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ werden geïncubeerd in een verwarmingsblok.
2. De monsters zijn gedurende 10 minuten met 50 s^{-1} geschud op een TissueLyzer.

Het DNA werd geëluëerd in $2 \times 30\text{ }\mu\text{l}$ C6-oplossing. De elutie werd opgesplitst in twee stappen om een zo volledig mogelijke terugwinning van DNA te verzekeren. De verkregen DNA-monsters werden vervolgens door MacroGen Europe gesequenced door middel van 16S rRNA-ampliconsequencing van de V3-V4 regio (Illumina sequencing, MiSeq, paired end, 100K reads). Voor bacteriën werden de primers Bac341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') en Bac806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') toegepast, en voor archaea de primers Arch349F (5'-GYGCASCAGKCGMGAAG-3') en Arch806R (5'-GGACTACVSGGTATCTAAT-3').

CHEMISCHE ANALYSES VAN WATER EN SEDIMENT

Gefilterde oppervlakte- en poriewatermonsters werden geanalyseerd met behulp van een Seal Analytical autoanalyzer, voor de bepaling van nitraat (NO_3^-), ammonium (NH_4^+), fosfaat (PO_4^{3-}), natrium (Na^+), kalium (K^+) en chloride (Cl^-). Daarnaast werd inductief-gekoppeld plasma optische emissiespectrometrie (ICP-OES; iCap 6300, Thermo Scientific) toegepast om de concentraties van de volgende sporenelementen te meten: aluminium (Al), calcium (Ca), ijzer (Fe), kalium (K), magnesium (Mg), mangaan (Mn), natrium (Na), fosfor (P), zwavel (S), silicium (Si) en zink (Zn).

In het veld werden de sedimenten eerst gekarakteriseerd op basis van tactiele beoordeling. Daarbij werd onderscheiden of het sediment hoofdzakelijk zandig (korrelig), kleiig (plakkerig) of veenachtig (rijk aan organisch materiaal) was. In het lab hebben we vervolgens het vochtpercentage en organische stofgehalte bepaald. Voor de bepaling van het vocht- en organische stofgehalte van de verzamelde sedimenten werd circa 20 g vers sediment (G_v) afgewogen en gedurende minimaal 48 uur gedroogd bij $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Het drooggewicht (G_d) werd vervolgens bepaald, waarna het sediment gedurende 4 uur bij $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ werd verast in een moffeloven. Ten slotte werd het asgewicht (G_a) geregistreerd en vochtgehaltes en organische stofgehaltes berekend volgens de volgende formules:

$$\text{Vochtgehalte (\%)} = \frac{G_v - G_d}{G_v} \times 100$$

$$\text{Organisch gehalte (\%)} = \frac{G_d - G_a}{G_d} \times 100$$

Om de C/N gehaltes van het sediment te bepalen werden gedroogde sedimentmonsters tot poeder vermalen met behulp van een kogelmaler (MM 400, Retch). Van dit materiaal werd 40–60 mg afgewogen en verpakt in tinnen cupjes. De koolstof/stikstof-verhouding (C/N) werd geanalyseerd met behulp van een CNHS-element-analyser (Vario Micro Cube, Elementar).

3.2.4 KWANTITATIEVE PCR

Om de aanwezigheid en hoeveelheid microbiële genen betrokken bij belangrijke biogeochemische processen te kwantificeren is gebruik gemaakt van kwantitatieve PCR (qPCR), met specifieke primers per target-gen (Tabel 1). Alle qPCR-primers zijn door IDT (Integrated DNA Technologies) vervaardigd.

Tabel 1 Targetgenen en de gebruikte qPCR primer-combinaties voor het bepalen van de aanwezigheid en hoeveelheid microbiële genen betrokken bij belangrijke biogeochemische cycli

Gen	Primerpaar	Voorwaartse primer	Achterwaartse primer
Archaeaal <i>amoA</i>	Arch-amoAF/ Arch-amoAR	STAATGGTCTGGCTTAGACG	GCGCCATCCATCTGTATGT
Bacterieel <i>amoA</i>	amoA1F/ amoA2R	GGGGTTTCTACTGGTGGT	CCCCCKGSAAGCCTTCTTC
<i>mcrA</i>	mlas/ mcrA-rev	GGTGGTGTGGDTTCACMCARTA	CGTTCATBGCAGTAGTTVGGRTAGT
<i>pmoA</i>	A189/ Mb661R	GGNGACTGGGACTTCTGG	CCGGMGCAACGCTYTTACC
<i>nirK</i>	nirK876/ nirK1040	ATYGGCGGVCAVGGCGA	GCCTCGATCAGRTTGTGGIT
<i>nirS</i>	nirSCd3aF/ nirSR3cd	AACGYSAAGGARACSGG	GASTTCGGRTGSGTCTTSAYGAA
<i>dsrB</i>	DSRp2060F/ DSR4R	CAACATCGTYCAYACCCAGGG	GTGTAGCAGTTACCGCA

Voor nauwkeurige benadering van de gen-abundantie in de bemonsterde fracties van de sloten hebben we gebruik gemaakt van een interne controle (IC), waarop ook een kwantitatieve-PCR is uitgevoerd. Het gebruik van een IC is essentieel voor het beoordelen van de efficiëntie van DNA-extractie en het detecteren van potentiële PCR-remmers. Door een bekende hoeveelheid IC-DNA toe te voegen aan de monsters, en deze gelijktijdig te extraheren en co-amplificeren, kan het terugwinningspercentage (R%) voor elk monster worden berekend. Deze R%-factor wordt vervolgens gebruikt om de kwantificeringsresultaten van SYBR Green-gebaseerde qPCR-tests te corrigeren, zodat de gerapporteerde aantallen genkopieën de werkelijke concentraties in de omgeving nauwkeurig weerspiegelen, onafhankelijk van monster-specifieke verliezen of amplificatie-inefficiënties (Bustin & Nolan, 2004).

In dit onderzoek hebben we gebruik gemaakt van een fragment van het Dengue virus (149 bp) (NEN, 2013; Paulus, 2021). Kwantitatieve PCR (qPCR), gericht op het gen van de IC, werd uitgevoerd met behulp van een probe-gebaseerd detectiesysteem in een totaal reactievolume van 25 µl, uitgevoerd op een Bio-Rad CFX Opus 96 Real-Time PCR-systeem. Voor deze probe-gebaseerde qPCR bestond het reactiemengsel per reactie uit:

- 12.5 µl iQ Supermix
- 2.5 µl bovine serum albumin (BSA, runderserumalbumine)
- 3.5 µl nuclease-vrij water
- 0.5 µl forward primer (IC-F) (voorwaartse primer)
- 0.5 µl reverse primer (IC-R) (achterwaartse primer)
- 0.5 µl probe (IC-P)
- 5 µl monster DNA

De uitgevoerde thermische cyclus bestond uit een initiële denaturatie gedurende 3 minuten bij 95 °C, gevolgd door 43 cycli van denaturatie bij 95 °C gedurende 20 seconden, en hybridisatie/elongatie (*annealing/ extension*) gedurende 60 seconden bij 60 °C.

SYBR®GREEN QPCRS

De PCR-amplificaties voor de target-genen (16S rRNA, bacterieel *amoA*, archaeaal *amoA*, *mcrA*, *pmoA*, *nirK*, *nirS*, en *dsrB*) werden uitgevoerd in een totaal reactievolume van 25 µl, met behulp van een Bio-Rad CFX Opus 96 Real-Time PCR Systeem. Voor deze qPCR bestond het reactiemengsel per 'well' (in de 96-wells plaat) uit:

- 12.5 µl iQ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad)
- 2.5 µl bovine serum albumin (BSA)
- Primers (volume afhankelijk per gen)
- Nuclease-vrij water (aanvulling naar eindvolume)
- 5 µl monster DNA

De volgende volumes werden gebruikt voor de verschillende target-genen:

- voor *amoA* (bacterieel and archaeaal) and *pmoA*:
 - 0.5 µl van elke primer, met een primer concentratie van 200 nM
 - 4 µl nuclease-vrij water
- voor *mcrA*, *nirK*, and *dsrB*:
 - 1 µl van elke primer, bij een primer concentratie van 400 nM
 - 3 µl nuclease-vrij water
- voor *nirS*:
 - 1.5 µl van elke primer, bij een primer concentratie van 600 nM
 - 2 µl nuclease-vrij water

De uitgevoerde thermische cycli voor de verschillende targetgenen is beschreven in Tabel 2. Alle qPCR analyses zijn uitgevoerd bij KWR Water Research.

Tabel 2 Thermische cycli gebruikt voor denaturatie, hybridisatie en extensie van het DNA voor het amplificeren van de targetgenen in de qPCRs

qPCR target	qPCR protocol
Totaal 16S	95 °C gedurende 3 minuten; 44 cycli van 95 °C gedurende 20 seconden, 60 °C gedurende 1 minuut; gevolgd door 60 °C gedurende 5 minuten, 95 °C gedurende 10 seconden, 65 °C gedurende 1 minuut; en een smeltcurve van 65–95 °C met stappen van 0,5 °C elke 5 seconden
Archaeaal <i>amoA</i>	95 °C gedurende 3 minuten; 43 cycli van 95 °C gedurende 20 seconden, 55 °C gedurende 1 minuut, 72 °C gedurende 1 minuut; gevolgd door 60 °C gedurende 2 minuten, 95 °C gedurende 1 minuut, 55 °C gedurende 1 minuut; en een smeltcurve van 55–95 °C met stappen van 0,5 °C elke 5 seconden.
Bacterieel <i>amoA</i>	95 °C gedurende 3 minuten; 40 cycli van 95 °C gedurende 20 seconden, 60 °C gedurende 1 minuut, 72 °C gedurende 1 minuut; gevolgd door 95 °C gedurende 1 minuut, 55 °C gedurende 1 minuut en een smeltcurve van 55–95 °C met stappen van 0,5 °C elke 5 seconden.
<i>mcrA</i>	95 °C gedurende 3 minuten; 5 cycli van 95 °C gedurende 20 seconden met een stijgingssnelheid van 0,1 °C/s tijdens gloei-extensie, 48 °C gedurende 45 seconden, 72 °C gedurende 30 seconden; gevolgd door 35 cycli van 95 °C gedurende 20 seconden, 55 °C gedurende 45 seconden, 60 °C gedurende 30 seconden; dan 60 °C gedurende 10 minuten; en een smeltcurve van 55–95 °C met stappen van 0,5 °C elke 5 seconden.
<i>pmoA</i>	95 °C gedurende 3 minuten; 43 cycli van 95 °C gedurende 20 seconden, 57 °C gedurende 1 minuut, 72 °C gedurende 1 minuut; gevolgd door 95 °C gedurende 1 minuut; en een smeltcurve van 55–95 °C met stappen van 0,5 °C elke 5 seconden.
<i>nirK</i>	95 °C gedurende 3 minuten; 6 <i>touchdown</i> -cycli van 95 °C gedurende 15 seconden, gloeien beginnend bij 63 °C en afnemend met 1 °C per cyclus tot 58 °C gedurende 30 seconden, 72 °C gedurende 30 seconden; gevolgd door 39 cycli van 95 °C gedurende 15 seconden, 58 °C gedurende 30 seconden, 60 °C gedurende 30 seconden; dan 60 °C gedurende 5 minuten; en een smeltcurve van 55–95 °C met stappen van 0,5 °C elke 5 seconden.
<i>nirS</i>	95 °C gedurende 3 minuten; 6 <i>touchdown</i> -cycli van 95 °C gedurende 15 seconden, gloeien beginnend bij 63 °C en afnemend met 1 °C per cyclus tot 58 °C gedurende 30 seconden, 72 °C gedurende 30 seconden; gevolgd door 35 cycli van 95 °C gedurende 15 seconden, 58 °C gedurende 30 seconden, 72 °C gedurende 30 seconden, 80 °C gedurende 15 seconden; dan 72 °C gedurende 5 minuten; en een smeltcurve van 65–95 °C met stappen van 0,5 °C elke 5 seconden.
<i>dsrB</i>	95 °C gedurende 3 minuten; 40 cycli van 95 °C gedurende 20 seconden, 55 °C gedurende 40 seconden, 72 °C gedurende 1 minuut; gevolgd door 60 °C gedurende 10 minuten; en een smeltcurve van 55–95 °C met stappen van 0,5 °C elke 5 seconden.

3.2.5 DATA-ANALYSE

De data voor de pilot en het onderzoek zijn geanalyseerd in RStudio (versie 4.4.2). Voor de verwerking van de sequencingdata is ook het programma MobaXTerm gebruikt. Voordat 16S rRNA gensequentie-data voor analyse kan worden gebruikt is het noodzakelijk om eerst de reads en read-uiteindes van lage kwaliteit eruit te filteren en verwijderen (trimmen). Dit hebben we gedaan met behulp van het *Figaro* softwarepakket en het *dada2* pakket van RStudio. Dit resulteert in een dataset van microbiële amplicon sequence variants (ASVs); in andere woorden: unieke gensequenties. Met *dada2* kon vervolgens de taxonomie bepaald worden tot op genus niveau. Hiervoor is de *Silva nr99 versie 138.1 training set* gebruikt als referentiedatabase. Het uiteindelijke resultaat is een dataset van alle geobserveerde ASVs, hun bijbehorende taxonomie, en hoe vaak deze per monster zijn geobserveerd.

De absolute hoeveelheden ASVs zijn gebruikt voor het maken van accumulatiecurves met de *specaccum* functie in het *vegan* R-pakket. Hiervoor zijn eerst de datapunten verwijderd van ASVs die maar in 2 of minder monsters voorkwamen.

Voor het vergelijken van soortsaanstellingen tussen monsters zijn de absolute hoeveelheden omgerekend naar relatieve abundanties (percentages). De verdere verwerking en visualisatie hiervan is met het *phyloseq* pakket gedaan. Figuren zijn gemaakt in R, met *ggplot2*.

CORRELATIES TUSSEN TARGETGENEN EN OMGEVINGSVARIABLEN

Voordat modellen werden gemaakt voor de relaties tussen targetgenen en omgevingsvariabelen, werd voor ieder gen bekeken of de aantallen genkopieën normaal verdeeld waren, middels een Shapiro test en visuele beoordeling van een histogram en ‘quantile-quantile’

plot van de data. Dit is voor ieder monstertype (sediment of water) en voor iedere regio gedaan. Voor de data die niet normaal verdeeld was, zijn de aantallen genkopieën logaritmisch getransformeerd. Dit is vervolgens gebruikt voor het maken van lineaire modellen. Deze modellen zijn steeds vergeleken met een negatief binomiaal model (*glm.nb*) en log-log model waarin ook de x-variabele logaritmisch getransformeerd was. Vergelijkingen zijn gedaan middels *Akaike Information Criterion* (AIC) en *adjusted R²* waarden. Er is gekeken naar de relatie van ieder gen ten opzichte van de volgende variabelen: nitraat, ammonium, fosfaat, fosfor, zwavel, chloride, elektrische geleidbaarheid, organisch gehalte en C/N ratio.

MULTIVARIATE ANALYSE (NMDS)

Om de variatie in microbiomsamenstelling tussen en binnen de verschillende bemonsteringsregio's te onderzoeken, in samenhang met gradiënten in milieuvariabelen is een 'Non-metric Multidimensional Scaling' (NMDS) ordinatie uitgevoerd, m.b.v. het *vegan* pakket in R, met gebruik van een *Bray-Curtis* afstandsmatrix. In de analyse zijn de volgende variabelen meegenomen: nitraat, ammonium, fosfaat, fosfor, zwavel, chloride, elektrische geleidbaarheid, vochtgehalte, organisch gehalte, C/N ratio, zuurstof, pH, temperatuur, aluminium, calcium, ijzer, kalium, magnesium, mangaan, natrium, silicium en zink.

CORRELATIES TUSSEN GENERA EN OMGEVINGSVARIABLEN

Voor het verkennen van de relaties tussen genera en omgevingsvariabelen zijn alleen de genera die in meer dan 10% van de monsters voorkwamen gebruikt. Deze zijn vervolgens logaritmisch getransformeerd met de *clr* functie (*centre log ratio*, CLR) van het *compositions* pakket. Dit hebben we gedaan omdat het moeilijk is om relatieve abundanties van genera te correleren met omgevingsvariabelen, omdat alle waardes van elkaar afhankelijk zijn. Als één genus talrijker wordt, worden de anderen automatisch minder abundant, hoewel zij niet per se in aantallen verminderd hoeven zijn. De CLR-transformatie neemt deze onzekerheid weg.

Een Spearman analyse is uitgevoerd om een eerste indruk te krijgen van waarschijnlijke verbanden. Deze analyse is uitgevoerd met de volgende variabelen: nitraat, ammonium, fosfaat, fosfor, zwavel, chloride, elektrische geleidbaarheid, vochtgehalte, organisch gehalte, C/N ratio, pH en temperatuur. Vanuit hier zijn vervolgens lineaire modellen gemaakt met de *lm* functie, daar waar de Spearman analyse sterke verbanden aantoonde.

4

RESULTATEN EN DISCUSSIE

4.1 OPTIMALE OPSLAG EN VERWERKING

Door middel van een literatuurstudie onderzochten we de verschillende gangbare methoden voor het bewaren van microbioommonsters van water en sediment, met hun voor- en nadelen. Hetzelfde deden we voor methodes van DNA-extractie en het gebruik van primers voor amplicon sequencing.

4.1.1 BEWAARMETHODE

Microbioomsamenstelling is erg gevoelig omgevingsfactoren, zoals bijvoorbeeld temperatuur of zuurstof (Petersen & Klug, 1994; Lin [†] et al., 2010). Het is daarom van belang om microbiële monsters op zo'n manier te bewaren dat ze zelfs na lange tijd nog representatief zijn voor het moment dat het monster was genomen. Dit geldt voor opslag na de bemonstering, maar ook na bijvoorbeeld filtraties en DNA-extracties. Om microbiële activiteit te verminderen en veranderingen in microbiële samenstelling te voorkomen, worden monsters over het algemeen op lage temperaturen bewaard, veelal bij +4, -20 of -80 graden Celcius. Daarnaast is toevoeging van conserveermiddelen een optie om degradatie van DNA tegen te gaan.

SEDIMENTMONSTERS

In sediment- of bodemmonsters kan opslag op kamertemperatuur leiden tot significante veranderingen in de microbiële samenstelling en diversiteit (Rubin et al., 2013; F. B. Brandt et al., 2014). Daarentegen stellen Lauber et al. (2010) dat bodemmonsters op zijn minst 14 dagen op kamertemperatuur kunnen worden bewaard, zonder grote effecten op de bacteriële samenstelling. Omdat het mogelijk is dat bacteriën zelfs actief blijven bij temperaturen rond en beneden 0 graden Celcius (Nikrad et al., 2016), is het echter verkiesbaar om monsters in te vriezen als het DNA niet binnen deze termijn geëxtraheerd kan worden. Het is aangetoond dat het invriezen van monsters de microbiële samenstelling beter behoudt dan koeling bij 4 °C (Lee et al., 2007; Rissanen et al., 2010; Rubin et al., 2013). Vaak worden monsters ingevroren bij -80 °C. Dit zorgt voor een zeer goed behoud van de samenstelling van het monster (bijvoorbeeld, wanneer er interesse is in het transcriptoom), maar kost ook veel energie, en ruimte in een -80 °C vriezer is relatief duur. Verschillende onderzoeken tonen aan dat er geen groot verschil optreedt in microbiële samenstellingen tussen opslag bij -20 °C en opslag bij -80 °C (F. B. Brandt et al., 2014; Lee et al., 2007; Rissanen et al., 2010). De microbiële samenstelling in bodems kan bij -20 °C minstens 11 dagen onveranderd blijven, maar een bewaartijd van 16 weken is ook gerapporteerd (F. B. Brandt et al., 2014; Wallenius et al., 2010). Enzymatische activiteit en verlies van biomassa worden ook geremd bij -20 °C (Lee et al., 2007), tot wel 13 maanden (Stenberg et al., 1998).

Aangezien sommige onderzoeken ook een verlies van microbiële biomassa aantonen na invriezen (Černohlávková et al., 2009; Lee et al., 2007), is het aan te raden om het verwerken van monsters in alle gevallen zo snel mogelijk te doen, en het ontdooien en opnieuw invriezen zo veel mogelijk te beperken (bijvoorbeeld door monsters in kleinere subsamples te verdelen).

In plaats van ze in te vriezen, kunnen monsters ook met conserveermiddelen worden bewaard. Harry et al. (2000) toonden aan dat na bewaring op ethanol, de hoeveel geëxtraheerd DNA gelijk was aan de hoeveelheid DNA na bewaring bij 4 °C, zonder ethanol. Daarentegen laten Rissanen et al. (2010) zien dat gebruik van *RNAlater* en ethanol veel lagere opbrengsten van DNA veroorzaakten en dat opslag bij –20 °C, of met phenol-chloroform de voorkeur hebben.

WATERMONSTERS

Na het nemen van watermonsters kunnen er veel keuzes worden gemaakt voor de opslag. Bijvoorbeeld of de monsters eerst opgeslagen worden, of dat zij direct worden gefiltreerd. De manier waarop het filter daarna wordt bewaard is ook van belang, evenals de opslag van het DNA na extractie.

Net als in sediment zijn de positieve effecten van koeling op het goed houden van watermonsters bewezen. Wang et al. (2022) suggereren dat voor analyses op prokaryoten, zoetwatermonsters maar maximaal 12 uur buiten de koeling kunnen staan zonder significante veranderingen in alfa en bèta diversiteit. Lipus et al. (2019) tonen aan dat bij koeling op 4 °C, de microbiële gemeenschap voor minstens 3 dagen relatief stabiel blijft of langzamere veranderingen vertoont dan wanneer het bewaard wordt bij kamertemperatuur. Opslag langer dan een week kan echter leiden tot verlies in diversiteit, net zoals het invriezen bij –20 °C (Gilpin et al., 2013).

Het bewaren van watermonsters is dus mogelijk op de korte termijn, maar om microbiële veranderingen zo veel mogelijk te voorkomen, ligt er een voorkeur voor directe filtratie. Wanneer er direct wordt gefiltreerd, en het filter bewaard wordt bij –20 °C, blijft de microbiële gemeenschap relatief stabiel (Gilpin et al., 2013; Hinlo et al., 2017).

Het gebruik van commercieel verkrijgbare of algemene conserveermiddelen voor opslag van DNA en/ of RNA, zoals LifeGuard, DESS of ethanol is ook een optie om DNA beter te bewaren. Het is echter vaker aangetoond dat deze middelen even effectief zijn als het invriezen van monsters (Hinlo et al., 2017; Tatangelo et al., 2014), of zelfs kunnen zorgen voor een veranderde waarneming van de microbiële samenstelling (Iturbe-Espinoza et al., 2021). Net als bij sedimentmonsters is het daarom aan te raden om hier alleen gebruik van te maken wanneer invriezen bij minstens –20 °C niet mogelijk is, bijvoorbeeld bij langdurige en afgelegen veldcampagnes.

4.1.2 DNA-EXTRACTIE

Er zijn verschillende manieren om DNA uit een monster te extraheren, o.a. ook afhankelijk van het type monster (water, sediment etc.). Dit kan door gebruik van gestandaardiseerde kits, maar er bestaan ook andere methoden. Welke methode gebruikt wordt kan effect hebben op de hoeveelheid, kwaliteit en samenstelling van het geëxtraheerde DNA. Roager et al. (2023) en Rubin et al. (2014) lieten bijvoorbeeld zien dat extractie met phenol-chloroform tot een hogere kwantiteit en kwaliteit van het DNA kan leiden dan extractie via andere veelgebruikte methoden, zoals de *Qiagen DNeasy PowerWater* of *PowerSoil* kits, de *MO BIO PowerSoil* kit of de *NucleoSpin Tissue* kit (Macherey-Nagel). Er is echter geen verschil in microbiële samenstelling gevonden tussen de methoden, wat suggereert dat ondanks verlaagde kwaliteit en kwantiteit van het DNA, de kits wel betrouwbare resultaten geven over de soortensamenstelling in de monsters.

Het EBEO2.0 project heeft als doel om een methode te ontwikkelen die uiteindelijk kan worden opgeschaald naar beheer en monitoring van waterkwaliteit door waterschappen en natuurbeheerders. Daarom gaat onze voorkeur uit naar het gebruik van een gestandaardiseerde, commercieel verkrijgbare DNA-extractiekit. Hiermee kan vergelijkbaarheid tussen metingen beter gegarandeerd worden, en er is bovendien minder risico aan gebonden door afwezigheid van schadelijke stoffen zoals phenol en chloroform. Bovendien wordt in sommige onderzoeksbureaus (KWR) al standaard gebruik gemaakt van gestandaardiseerde kits en is dit ook een veelgebruikte methode aan diverse universiteiten. Het gebruik van kits in onze methode zal opschaling naar grotere en herhaalde bemonsteringscampagnes daarom hopelijk soepeler laten verlopen.

Lear et al. (2018) raden het gebruik van Qiagen DNeasy PowerSoil en PowerMax aan voor het extraheren van DNA uit sediment en DNeasy PowerWater voor extraheren uit water. Aangezien de DNeasy kits afgestemd zijn op 0.25 g sediment is bij grotere volumes een andere kit aan te raden. Hoewel de kwantiteit en kwaliteit van het DNA minder kan zijn dan bij extracties met phenol-chloroform, worden van DNeasy kits dezelfde microbiële composities verkregen als andere methoden (Roager et al., 2023; Stojan et al., 2023). Ook wijken de resultaten van DNeasy kits niet meer af van in het lab samengestelde microbiomen (zgn. ‘*mock communities*’) dan andere methoden (Stojan et al., 2023). Andere onderzoeken tonen daarnaast aan dat DNeasy PowerSoil en PowerSoil pro wel betere kwantiteit en kwaliteit van het DNA verkregen dan RNeasy Power Soil, Favorgen FavorPrep Soil DNA en MinkaGene DNA (Pearman et al., 2020; Shi et al., 2022). Binnen de commercieel verkrijgbare extractiekits lag onze voorkeur daarom bij de *Qiagen DNeasy* kits.

4.1.3 16S rRNA GENREGIO'S EN PRIMERS

Voor een karakterisering van de samenstelling van het microbiom kan gebruik gemaakt worden van DNA-sequencing. Hierbij wordt vaak gekozen voor sequencing van het 16S rRNA-gen. Dit gen bevat negen hypervariabele regio's, die sterk verschillen in sequentie tussen verschillende bacteriën en archaea, en daardoor zeer geschikt zijn als fylogenetische marker. Omdat het momenteel nog te kostbaar is om al deze regio's te sequencen, wordt afhankelijk van het type organisme dat onderzocht wordt, een keuze gemaakt voor bepaalde regio's. Voor onderzoek naar bacteriën wordt bijvoorbeeld vaak gekeken naar regio's V1 tot en met V4.

Veel onderzoekers geven de voorkeur aan de regio V3 of V4 voor het onderzoeken van bacteriën in het milieu (Brandt & Albertsen, 2018; Chen et al., 2019; Vasileiadis et al., 2012). Kerrigan et al. (2019) vonden echter dat de V6 regio betere resultaten gaf dan de V4 regio in onderzoek naar zeewater, maar Zhang et al. (2017) spreken dit tegen in hun onderzoek in het water en sediment van een zoetwatermeer, waar regio's V3 en V4 geschikter werden gevonden dan V6. Yang et al. (2016) stellen dat V4-V6 primers het beste zijn om de meeste bacteriële phyla in kaart te brengen, terwijl Kim et al. (2011) voorkeur geven aan V1-V3 en V1-V4 voor bacteriën, en V1-V3 en V4-V7 voor archaea. Als echter specifiek gekeken wordt naar onderzoek in zoetwater, komt een voorkeur voor V3, V4 of V3-V4 primers vaak naar voren (J. Brandt & Albertsen, 2018; Chopyk et al., 2018; Cross et al., 2023; KleinJan et al., 2023; Parulekar et al., 2017; Vasileiadis et al., 2012; Zhang et al., 2017). Om deze reden is voor ons de keuze gevallen op de V3-V4 regio.

4.2 OPTIMALE BEMONSTERING

Tijdens het pilot onderzoek is gekeken of standaard waterbemonstering eenvoudiger en efficiënter kon worden gemaakt door de eDNA bemonsteringscapsules en isolatiekit van Sylphium te gebruiken. In Tabel 3 zijn de DNA-concentraties en –opbrengsten van beide methoden weergegeven. Gemiddeld gezien zijn concentraties tussen beide methoden vergelijkbaar, maar in de Sylphium capsules was het verschil tussen monsters groter, en waren er meer lage waarden. Dus hoewel de Sylphium extractie methode even effectief kan zijn als, of zelfs beter kan zijn dan de *PowerBiofilm* kit, blijken de resultaten tussen monsters veel meer te variëren. Qua DNA-opbrengst per mL gefilterd water is de Sylphium methode minder effectief. Hoewel er een hoger volume door de capsules kan worden gefiltreerd, is de opbrengst van DNA-materiaal alsnog lager. Dit kan liggen aan het feit dat de poriëgrootte van het Sylphium filter groter was (0.8 µm) dan de standaard 0.22 µm die gebruikt wordt om microbiomen te filteren. We hebben er daarom voor gekozen om in dit onderzoek de Sylphium capsules niet te gebruiken.

Tabel 3 Opbrengsten van de DNA-extracties direct uit filters en uit de Sylphium capsules: het gefiltreerde volume, de DNA-concentratie na extractie, en de DNA-opbrengst per mL gefiltreerd water, weergegeven in gemiddelde, standaarddeviatie (SD) en mediaan (Med).

	Volume (mL)			DNA-concentratie (ng/µl)			DNA-opbrengst (ng/mL)		
	Gemiddelde	SD	Med.	Gemiddelde	SD	Med.	Gemiddelde	SD	Med.
Filters	318.7	68.51	315	2.391	1.52	2.01	0.757	0.45	0.658
Sylphium capsules	540	0	540	2.458	3.22	0.7	0.455	0.6	0.13

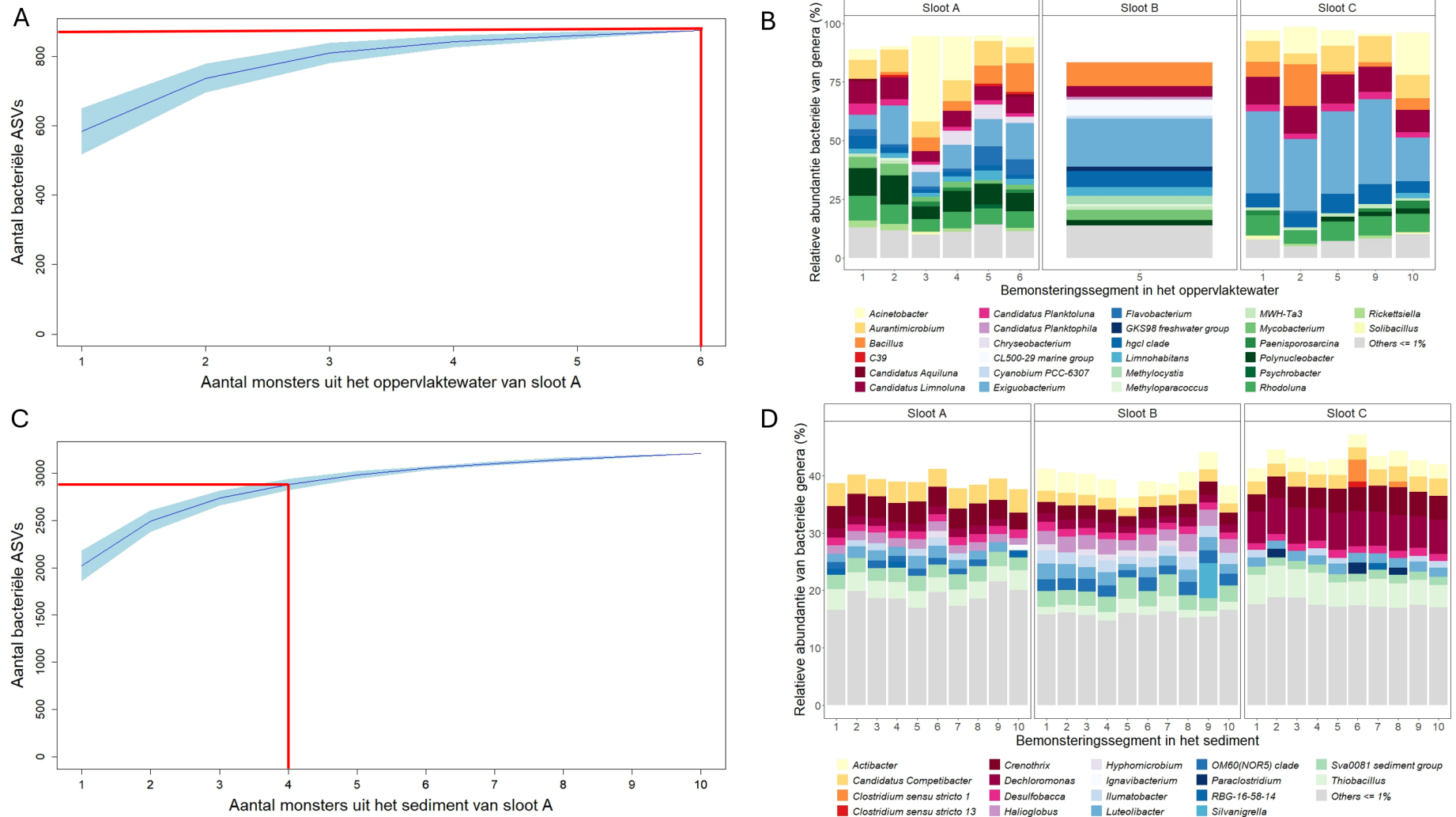
Aan de hand van de verzamelde monsters van de bemonsteringspilot is bepaald wat een optimale hoeveelheid monsters is om zoveel mogelijk microbiële diversiteit mee te nemen, maar de bemonsteringstijd zo realistisch mogelijk te houden. Daarnaast geeft de data informatie over de variabiliteit van de microbiële samenstelling over de lengte van een sloot.

In de accumulatiecurves van Figuur 1 is te zien dat, logischerwijs, de hoeveelheid unieke sequenties (ASVs) toeneemt met de hoeveelheid genomen watermonsters, maar dat dit al na een kleine hoeveelheid monsters begint af te vlakken. Het grootste deel van het microbioom wordt dus in een paar monsters al gevangen, en extra monsternamen zal relatief weinig extra informatie opleveren. Omdat dit onderzoek zich niet richt op het vinden van zeer zeldzame soorten, lijkt het dus niet relevant om meer monsters te nemen dan in deze pilot is gedaan.

Ook is te zien dat vanuit het sediment driemaal zoveel unieke sequenties komen dan uit het oppervlaktewater. Uit de abundantiegrafieken is daarnaast op te maken dat de samenstelling van het microbioom relatief stabiel blijft in het sediment, en in het water meer lijkt te variëren. Aan de hand hiervan, en in acht nemend dat sedimentbemonstering vaak arbeidsintensiever is dan waterbemonstering, is ervoor gekozen om minder monsters te nemen in het sediment dan in het water. Uiteindelijk is daarom de keuze gevallen op 6 monsters voor het oppervlaktewater, en 4 voor het sediment.

Figuur 1

A, C: Accumatiecurves van bacteriële ASVs per bemonsteringslocatie in het sediment en water van sloot A (Tabel B1). Rode lijnen geven de uiteindelijke keuze voor de hoeveelheid monsters aan.
B, D: Relatieve abundantie van de meest abundante genera in sediment en slootwater per bemonsteringslocatie, exclusief niet-geclassificeerde genera.



4.3 MICROBIËLE INDICATOREN

4.3.1 LITERATUURSTUDIE MICROBIËLE INDICATOREN EN INDICES

Hoge abundanties van (combinaties van) microbiële functionele groepen kunnen een indicatie geven van heersende biogeochemische omstandigheden (Tabel 4). Omdat microbiële levensgemeenschappen in waterbodems over langere perioden gevormd worden, kunnen deze een beeld geven van de algemene heersende redoxcondities, die verdergaan dan momentopnames in waterchemie en aanwezige flora en fauna. In de zomermaanden wordt hoge stikstofbelasting bijvoorbeeld niet altijd teruggemeten als een hoge nitraat of ammoniumconcentratie, terwijl abundantie van stikstofomzettende micro-organismen hier een indicatie kan geven van belasting met NH_4^+ , NO_3^- of een combinatie van beide. Belangrijke indicatoren voor de waterkwaliteit in Nederland zijn organismen en genen die betrokken zijn bij nitrificatie, denitrificatie en sulfaatreductie, en organismen zoals methanogenen en andere strikt anaerobe micro-organismen die langdurige strikte zuurstofloosheid indiceren. Daarnaast zijn er organismen die duiden op invloed vanuit de rioolwaterzuivering (specifieke nitrificeerders die aanwezig zijn in actief slib).

Naast deze indicatorsoorten zijn er voor andere zoetwaterecosystemen diverse microbiële indices ontwikkeld om de relatie tussen biologische indicatoren en omgevingsstressoren te duiden, analoog aan eerder gebruikte indices gebaseerd op bijvoorbeeld diatomeeënsamenstelling (Aylagas et al., 2021; Niu et al., 2018; Pearman et al., 2022; S. Wang et al., 2023). Deze zijn gebiedsspecifiek en afhankelijk van bestaande referentiegegevens. Gezamenlijk laten deze studies zien dat het integreren van microbiële data in biomonitoring niet alleen de nauwkeurigheid verhoogt, maar ook nieuwe mogelijkheden biedt om de ecologische status van zoetwatersystemen beter te begrijpen en te beheren. Het ontwikkelen van indices voor Nederlandse sloten kan daarmee een interessante vervolgstap zijn voor dit onderzoek. Daarnaast laat recent onderzoek zien dat juist de samenstelling van het totale microbioom – dus de relatieve abundanties van verschillende soorten - een gevoeliger indicator kan zijn van ecosysteemfunctioneren dan bijv. alleen microbiële diversiteit of individuele soorten of genera (Cook et al., 2025).

Tabel 4 **Overzicht van de belangrijkste microbiële omzettingen in relatie tot het biogeochemisch functioneren van aquatische ecosystemen.**

Proces of indicator		Functionele genen	
Stikstofomzettingen			
Nitrificatie	$\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$	amoA	Aerobe bacteriën en Archaea. Bekende soorten zijn bijv. <i>Nitrosomonas</i> , <i>Nitrosococcus</i> , <i>Nitrospina</i>
Denitrificatie	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2\text{O}, \text{N}_2$	<i>nirK</i> , <i>nirS</i> , <i>nosZ_I</i> , <i>nosZ_{II}</i>	Diverse facultatief anaërobe bacteriën.
Anammox	$\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2$	anammox 16S rRNA, hzsA	Strikt anaerobe bacteriën die behoren tot de Planctomyceten
Stikstoffixatie	$\text{N}_2 \rightarrow \text{N}_{\text{org}}$	nifH	Cyanobacteriën, vrij-levende stikstof-fixerende bacteriën
Koolstofomzettingen			
Methanogenese (methaanproductie, indicator van organische belasting en methaanemissie)	$\text{CO}_2 + \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4$ Acetaat $\rightarrow \text{CH}_4$	mcrA	Strikt anaerobe archaea, zoals <i>Methanosarcina</i>
Methaanoxidatie, indicator van organische belasting via methaan	$\text{CH}_4 \rightarrow \text{CO}_2$	pmoA (aëroob)	Aerobe bacteriën zoals <i>Methylomonas</i> sp. en <i>Methylobacter</i> sp. en anaërobe archaea zoals <i>Candidatus Methanoperedens nitroreducens</i>
S en Fe omzettingen			
Zwaveloxidatie	$\text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{S}^0 \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$	soxAB	o.a. <i>Thiobacillus</i> , <i>Beggiatoa</i>
Sulfaatreductie	$\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{S} \rightarrow \text{H}_2\text{S}$	dsrAB, apsA*	o.a. <i>Desulfovibrio</i> , <i>Desulfomonas</i>
IJzer-reductie	$\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$	Geen specifiek gen	Diverse bacteriën en Archaea, o.a. <i>Geobacter</i> , <i>Geothrix</i> spp., <i>Candidatus Methanoparadens ferrireducens</i>

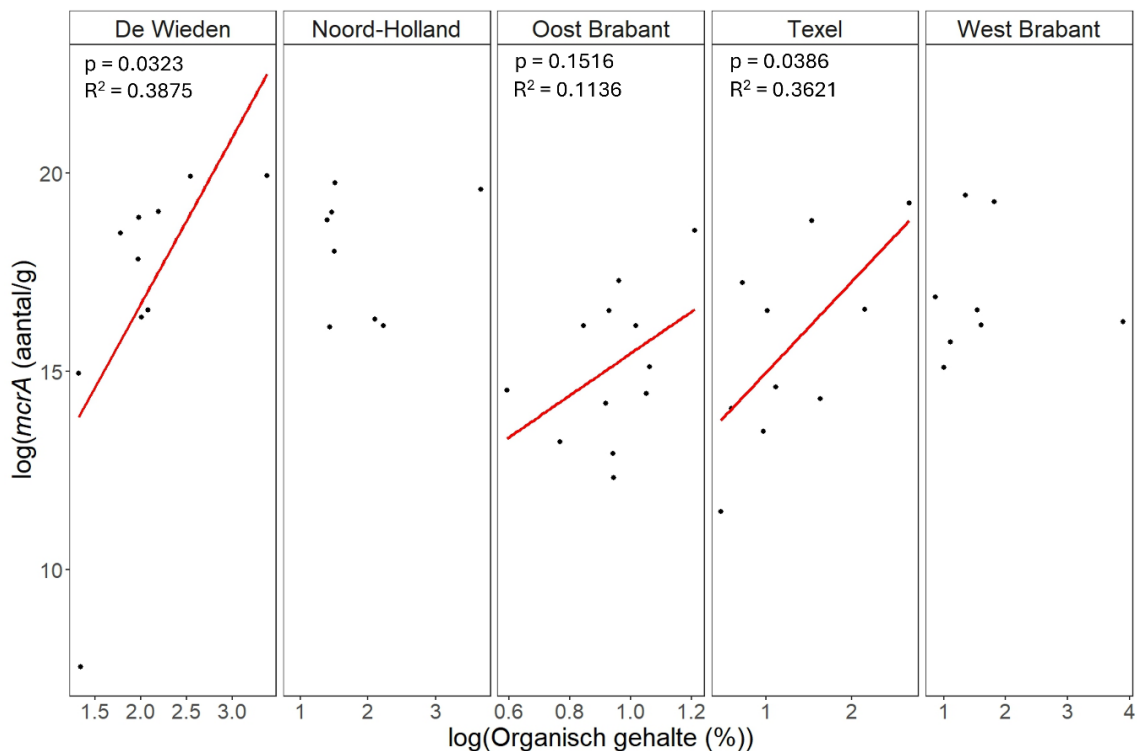
* Aanwezigheid van sulfaat-reductie genen is ook in verband gebracht met vervuiling met metalen (Yin et al., 2015) en microplastics (Pinnell & Turner, 2019).

4.3.2 RELATIES TUSSEN FUNCTIONELE GENEN EN OMGEVINGSFACTOREN

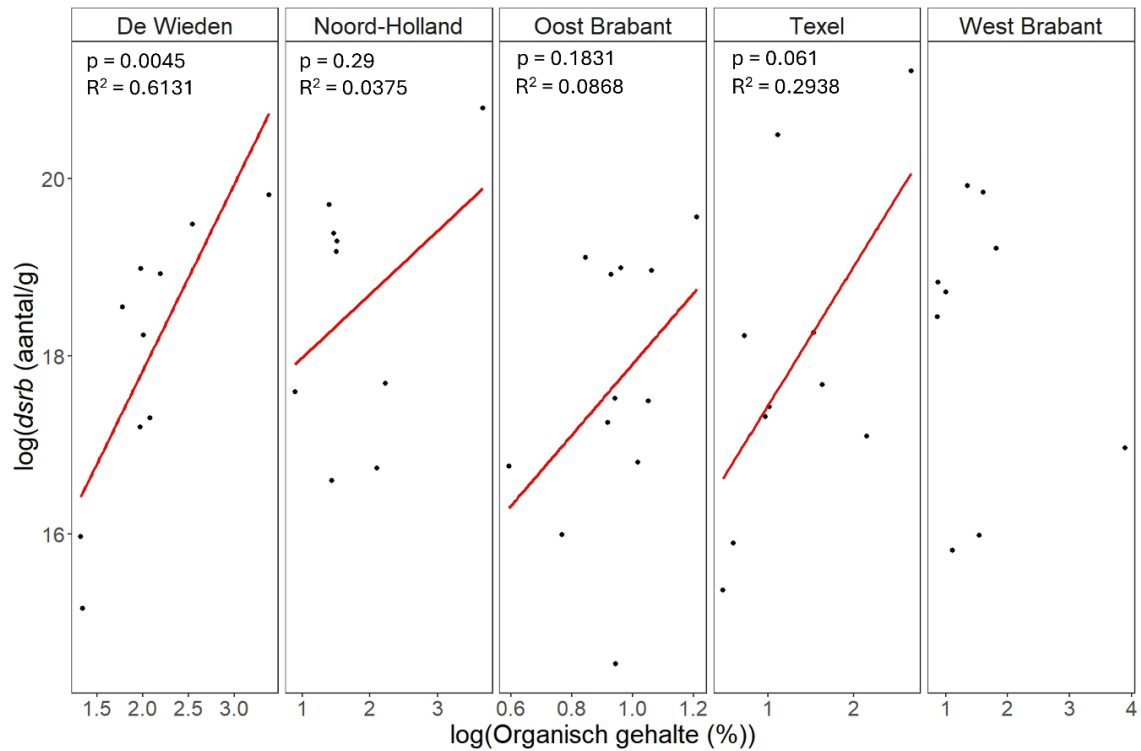
Onze analyse laat zien dat qPCR vooral inzicht geeft in de relatie tussen gen-abundantie als indicator voor de microbiële potentie voor een biogeochemische omzetting, en omgevingsfactoren zoals macro-ion beschikbaarheid, als wordt gekeken binnen geografische regio's (Figuur 3, 4). Over de hele dataset van 50 sloten zijn de verbanden tussen gen-abundantie en biogeochemie zwakker (Figuur 5).

In drie locaties vonden we een (zwak) verband tussen het gen *mcrA*, dat codeert voor een essentieel enzym voor methaanproductie, en het organisch gehalte in het sediment (Figuur 2). Dit is ook te verwachten, omdat methaan-productie de laatste stap is in de afbraak van organisch materiaal. Echter, de plaatselijke omstandigheden over langere tijd, zoals bijvoorbeeld het type organisch materiaal (makkelijk of moeilijk afbreekbaar), de zuurgraad, en bijv. het zoutgehalte, bepalen samen hoe goed de omstandigheden zijn voor methaanproducerende microorganismen, en dus hoeveel *potentie* er is voor methaanproductie, en vervolgens bepalen de actuele omstandigheden hoeveel methaan er ook *daadwerkelijk* wordt geproduceerd. Soortgelijke patronen zijn te zien voor het gen *dsrB*, coderend voor de omzetting van sulfiet naar sulfide in het sulfaat-reductie proces (Figuur 3). Mogelijk verloopt de relatie tussen sulfaat-omzetting en organisch materiaal via zuurstof, waarbij de afbraak van organisch materiaal zuurstofloosheid veroorzaakt die micro-organismen noodzaakt om te schakelen naar alternatieve elektronenacceptoren, zoals sulfaat.

Figuur 2 Relatie tussen d.m.v. qPCR bepaalde *mcrA*-genkopieën, coderend voor methaanproductie, en het organische gehalte van de bodem. Met regressielijn ($y \sim x$) en bijbehorende adjusted R-squared. Er is in 3 regio's een positief verband, maar de spreiding in organisch gehalte verschilt per regio. Alleen regressielijnen met $R^2 > 0$ zijn weergegeven

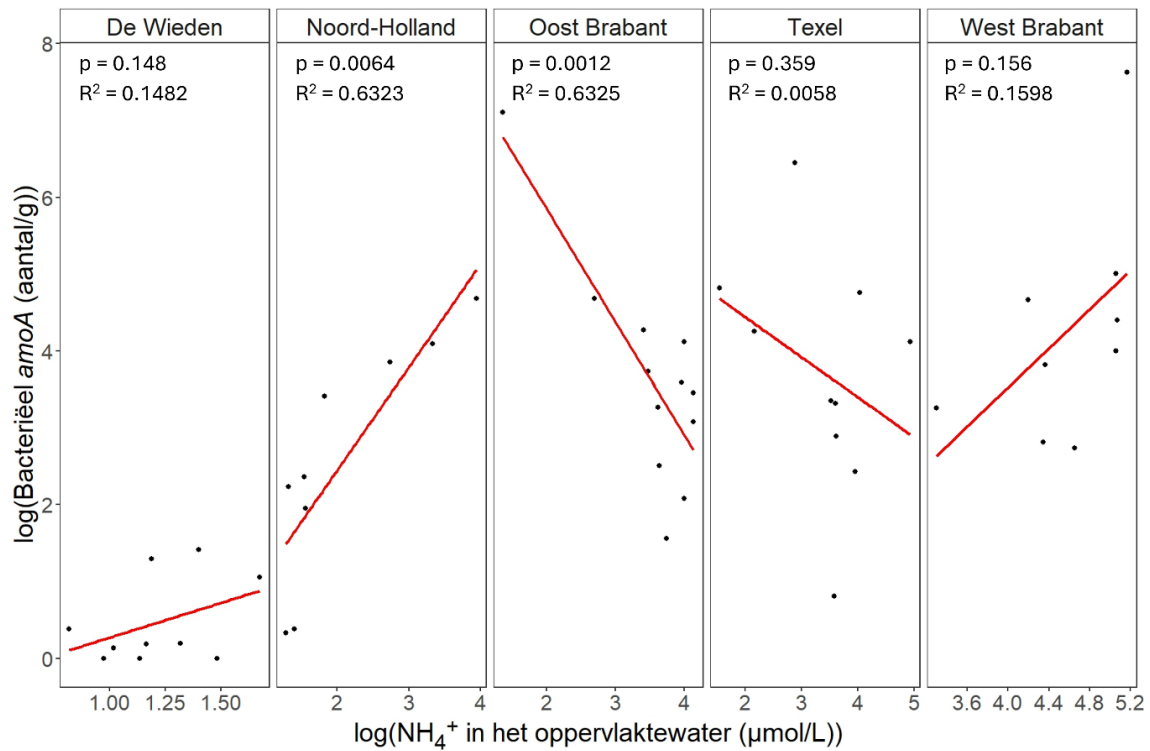


Figuur 3 Relatie tussen d.m.v. qPCR bepaalde *dsrB*-genkopieën, coderend voor sulfaatreductie, en het organische gehalte van de bodem. Met regressielijn ($y \sim x$) en bijbehorende adjusted R-squared. Er is in 4 regio's een positief verband, maar de spreiding in organisch gehalte verschilt per regio. Alleen regressielijnen met $R^2 > 0$ zijn weergegeven

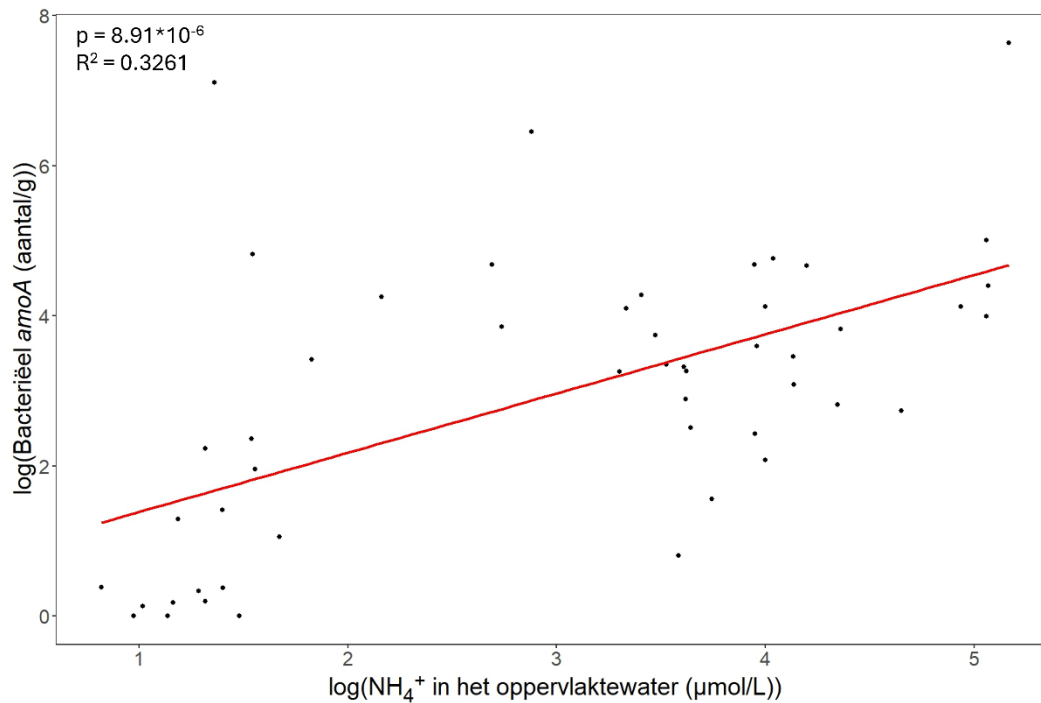


Abundanties van het bacteriële gen coderend voor de eerste stap van nitrificatie (*amoA*) hebben een meer variabel verband met ammonium in de verschillende bemonsteringsregio's. Vaak is een (zwak) positief verband te zien, wat ook verwacht wordt omdat ammonium het substraat is voor nitrificatie, maar soms is het verband zwak negatief (Figuur 4). Mogelijk spelen in deze regio's andere stikstofomzettingen een grotere rol. Over alle regio's samen is er echter een zwak verband te zien, waarin bacterieel *amoA* toeneemt met hogere ammoniumconcentraties (Figuur 5).

Figuur 4 Relatie tussen bacteriële amoA-genkopieën, coderend voor nitrificatie, en de ammoniumconcentratie in het sediment. Met regressielijn ($y \sim x$) en bijbehorende adjusted R-squared. De richting van relaties en spreiding in ammoniumconcentratie verschillen tussen regio's. Alleen regressielijnen met $R^2 > 0$ zijn weergegeven



Figuur 5 Relatie tussen bacteriële amoA-genkopieën, coderend voor nitrificatie, en de ammoniumconcentratie in het sediment. Met regressielijn ($y \sim x$) en bijbehorende adjusted R^2 . Er is een positief verband

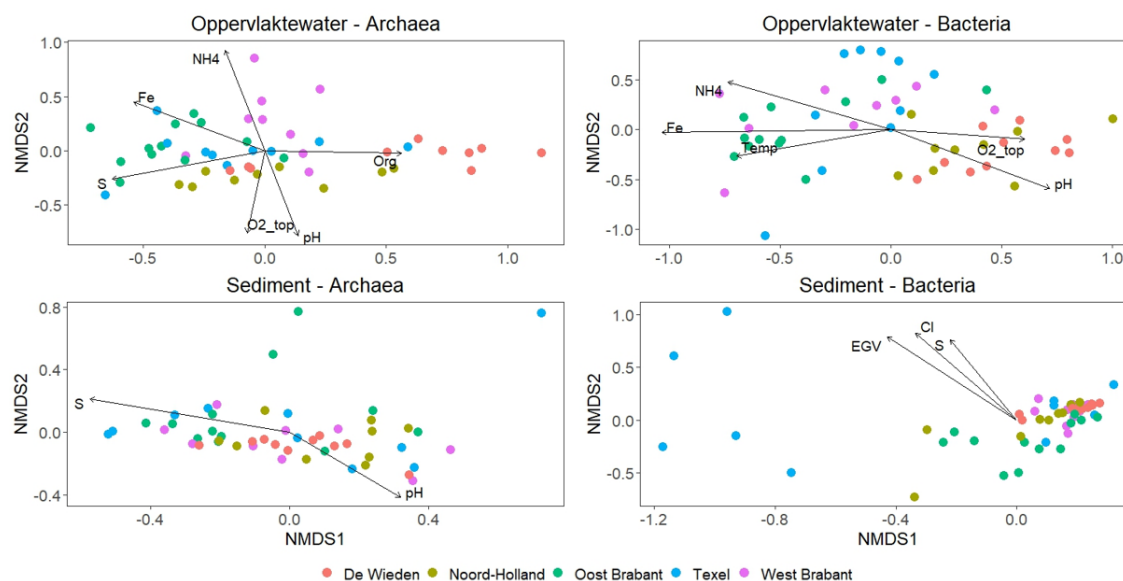


NB: Omdat de hier uitgevoerde qPCRs op DNA gebaseerd zijn (en niet op RNA) geeft dit alleen weer of de genen aanwezig zijn, niet of deze op het moment van monsternamen ook actief waren. De genabundantie zegt dus iets over microbiële *potentie*, maar niet over de actuele microbiële *activiteit* ter plaatse.

4.3.3 INVLOED VAN BEMONSTERINGSREGIO EN OMGEVINGSFACTOREN OP DE SAMENSTELLING VAN HET MICROBIOOM

In Figuur 6 is de samenhang tussen de microbioomsamenstelling, bemonsteringsregio en omgevingsfactoren weergegeven met 'Non-metric Multidimensional Scaling' (NMDS). Iedere regio is weergegeven in een andere kleur. Uit de NMDS-analyse is goed te zien dat de microbiële samenstelling verschilt per regio. In de waterlaag is in de microbiomen van de verschillende sloten een duidelijke zonering te zien over gradiënten in omgevingsfactoren. Bij archaea zijn dit bijvoorbeeld organische stofgehalte, totaal zwavel en ammonium. IJzerconcentratie lijkt bij zowel archaea en bacteriën vooral een sterke invloed te hebben in de bemonsteringslocaties in Oost-Brabant, waar ook vaker ijzerrijke kwel werd geobserveerd. Dit wijst erop dat bepaalde aspecten van het microbiom in deze regio potentieel indicatief zijn voor ijzerrijke omstandigheden (In sectie 4.3.4 duiken we hier dieper in). Omgevingsfactoren hangen sterker samen met de microbioomsamenstelling in het water dan die van het sediment. Bemonstering van het oppervlaktewater-microbiom geeft mogelijk dus de meeste informatie over het biogeochemisch functioneren van een sloot, een grensvoorwaarde voor het ecologisch functioneren. De bacteriële soortensamenstelling in het sediment is wel duidelijk anders in een aantal Texelse sloten dan de andere sloten, vermoedelijk door de historische en actuele invloed van zeewater.

Figuur 6 NMDS ordinatie van de samenstelling van archaea en bacteriën (ASVs), in de waterlaag en het sediment van 50 Nederlandse sloten. Ieder punt representeert de samenstelling van het microbiom van een bemonsteringslocatie. Hoe dichter punten bij elkaar liggen, hoe meer ze overeenkomen. Significante relaties tussen microbiom en omgevingsfactoren zijn weergegeven als pijlen. Omgevingsfactoren hangen sterker samen met microbioomsamenstelling in het water dan het sediment. In het water is in de archaeale microbiomen van de verschillende sloten een duidelijke zonering te zien over gradiënten in omgevingsfactoren zoals organische stofgehalte, totaal zwavel en ammonium



4.3.4 CORRELATIES TUSSEN MICROBIËLE GENERA EN OMGEVINGSFACTOREN

Correlaties tussen microbiële genera en milieumstandigheden kunnen gebruikt worden voor het detecteren van potentiële indicatorgenera of indicatorsoorten. Met de tot nu toe gebruikte statistische toetsen zijn er vrijwel geen significante correlaties gevonden tussen specifieke microbiële genera en omgevingsfactoren in de totale dataset. Echter, wanneer ingezoomd wordt op de 5 afzonderlijke bemonsteringsgebieden, komen er wel relaties naar voren. In Tabel 5 is te zien hoeveel correlaties er te vinden waren per regio en bemonsteringstype. Met name in West-Brabant en Texel waren er sterke verbanden te vinden tussen specifieke micro-organismen en omgevingsfactoren. Deze data omvat ook correlaties met ongeclassificeerde genera (tot nog toe 'onbekende' soorten).

Tabel 5 Aantal significante correlaties tussen microbiële genera en omgevingsfactoren, per regio en monstertype. Resultaten van Spearman correlatie-analyse

	Bacteriën		Archaea	
	Water	Sediment	Water	Sediment
Oost Brabant	3	11	0	1
West Brabant	0	0	0	177
De Wieden	12	8	1	15
Noord-Holland	0	0	0	0
Texel	1607	3	8	1
Totaal	0	0	1	0

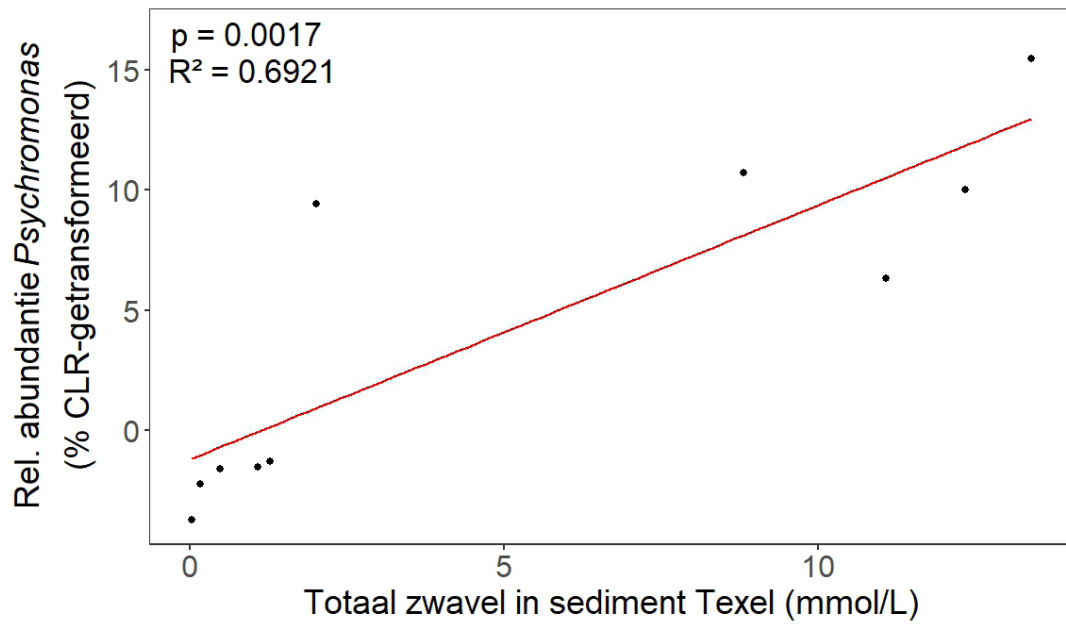
In Tabel 6 is te zien dat de meerderheid van de correlaties met ijzer-, zwavel-, chloride en EGV te maken had. Een voorbeeld is de relatie tussen de relatieve abundantie van organismen van het genus *Psychromonas* en het totaal zwavelgehalte in slootsediment op Texel (Figuur 7). Bekende *Psychromonas*-bacteriën omvatten o.a. koude-minnende organismen, vaak aangetroffen bij hoge zoutgehaltes. In dit geval zou deze soort dus gezien kunnen worden als zeewaterindicator, maar let op dat het aantreffen van deze soort in één of enkele monsters niet als zodanig gebruikt kan worden.

Tabel 6 Aantal significante correlaties tussen microbiële genera en omgevingsfactoren, per monstertype. Resultaten van Spearman correlatie-analyse

	Bacteriën		Archaea	
	Water	Sediment	Water	Sediment
NO ₃ ⁻	2	0	0	0
NH ₄ ⁺	2	0	0	0
PO ₄ -P	50	0	0	1
Fosfor	15	2	0	0
Zwavel	511	4	3	1
IJzer	9	1	0	162
Chloride	490	0	4	1
Organisch gehalte	1	1	0	6
Vochtgehalte	3	0	0	3
C/N ratio	4	0	0	4
EGV	523	6	2	9
Zuurstof sediment	4	8	0	2
Zuurstof water	0	0	0	4
pH	7	0	0	1
Temperatuur	1	0	0	0

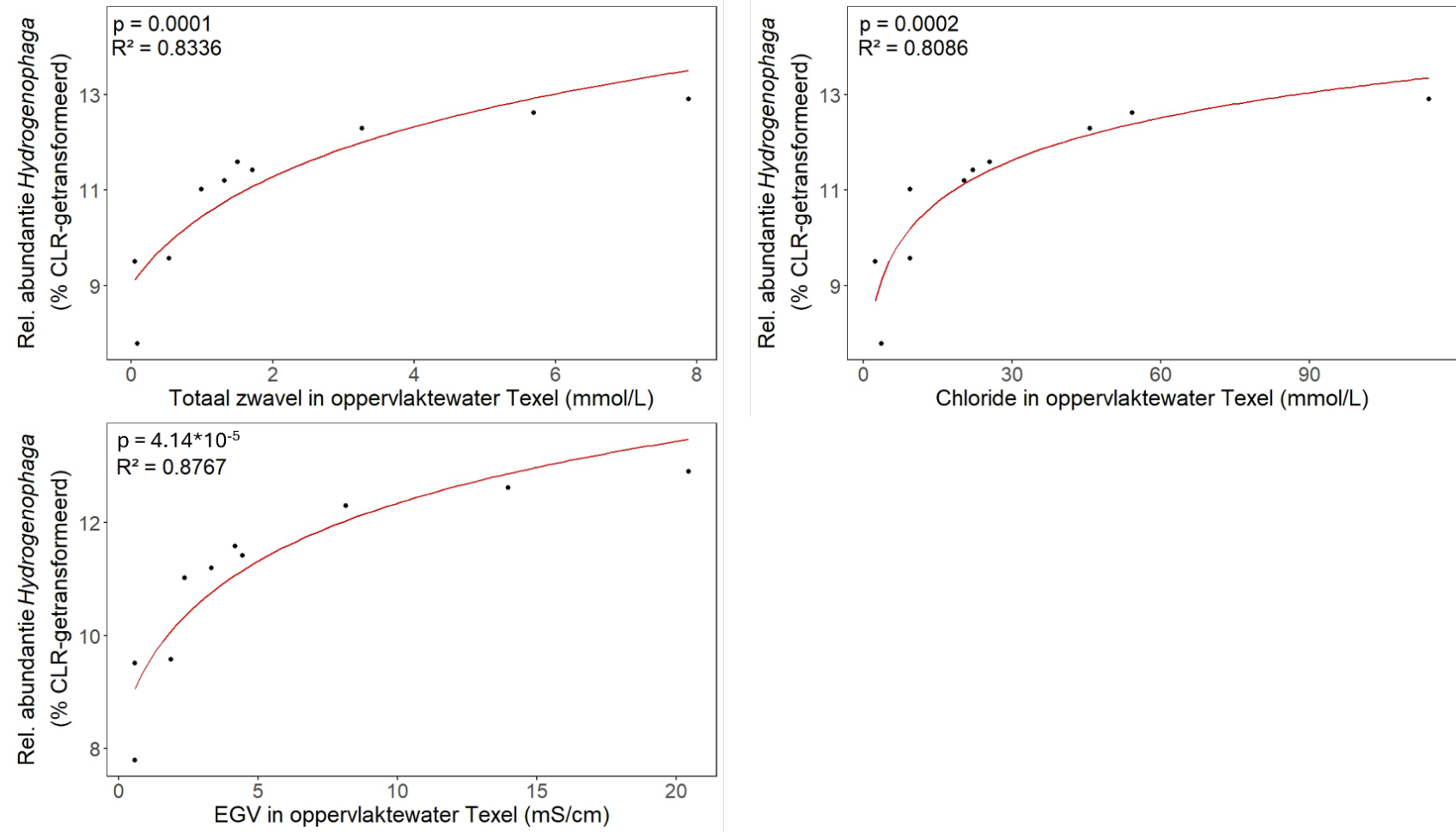
Figuur 7

Relatie tussen de totale concentratie van zwavel en de relatieve abundantie van *Psychromonas* in Texels slootsediment. Met regressielijn ($y \sim x$) en bijbehorende adjusted R-squared. Er is een positief verband gevonden



Daarnaast viel het op dat op Texel de concentraties van zwavel en chloride en de gemeten elektrische geleidbaarheid vaak alle drie correleren met eenzelfde genus, vermoedelijk als gevolg van hun co-correlatie, bijvoorbeeld door de zwavel en chloriderijke samenstelling van zeewater (Figuur 8).

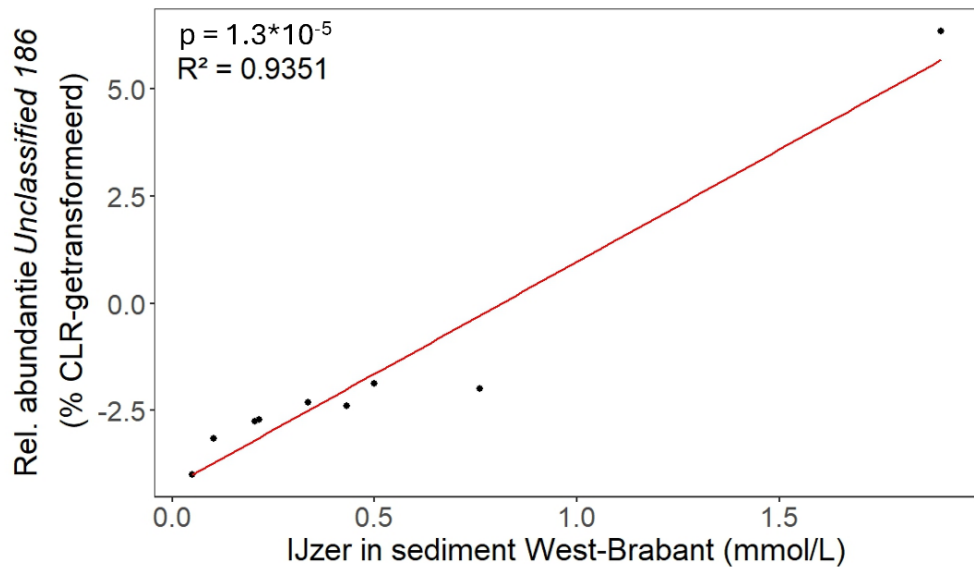
Figuur 8 Relaties tussen zwavel, chloride en elektrische geleidbaarheid, en de relatieve abundantie van *Hydrogenophaga* in het oppervlaktewater van Texelse sloten, met regressielijnen ($y \sim \log(x)$) en bijbehorende adjusted R-squared. Relatieve abundantie is CLR-getransformeerd: Positieve y-waardes wijzen op een hoger-dan-gemiddelde abundantie ten opzichte van de rest van de gemeenschap. In alle drie grafieken is er een positief verband gevonden



In West-Brabant correleerden een aantal archaeale genera met de ijzerconcentratie in het sediment, wat verklaard kan worden door de ijzerrijke kwel in dit gebied. Hoewel de genera die met ijzer correleren allemaal ongeclassificeerd zijn, is er een goed verband aan te tonen tussen hun relatieve abundantie en ijzerconcentraties (voorbeeld in Figuur 9). Met nauwkeurigere taxonomische identificatie zou het vermoedelijk dus mogelijk zijn om indicatorgenera voor verhoogde ijzerconcentraties te verkrijgen. Dit resultaat geeft ook aan dat er potentieel nog veel meer van dit soort indicatorgenera te vinden zijn, die met een breed scala aan milieuv variabelen kunnen samenhangen.

Figuur 9

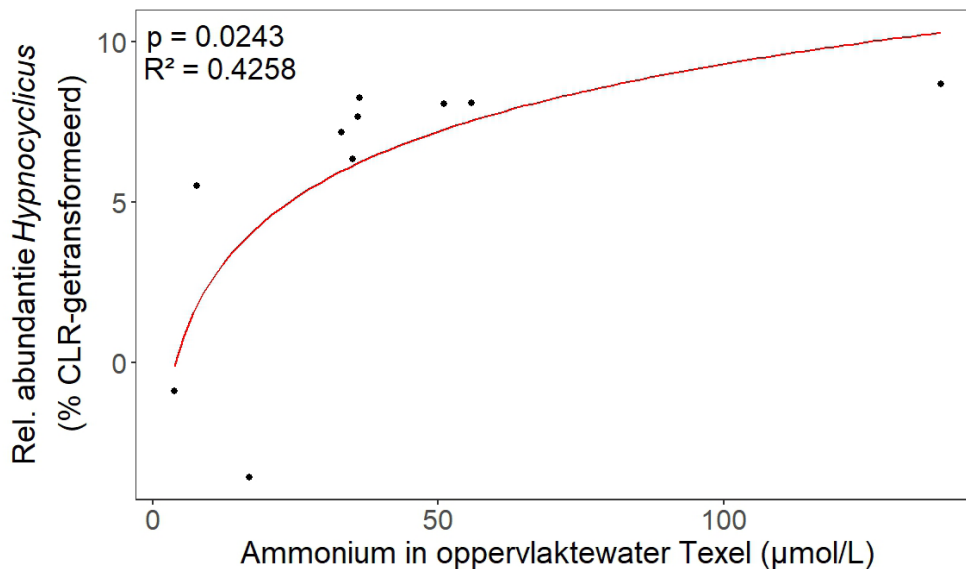
Relatie tussen sediment-ijzergehalte en de relatieve abundantie van een ongeclassificeerd archaeaal genus in het sediment van West-Brabantse sloten, met regressielijn ($y \sim x$) en bijbehorende adjusted R-squared. Relatieve abundantie is CLR-getransformeerd: Positieve y-waarden wijzen op een hoger-dan-gemiddelde abundantie ten opzichte van de rest van de gemeenschap. Er is een positief verband gevonden



Hoewel er maar weinig correlaties tussen geobserveerde genera met nitraat, ammonium of fosfaat zijn gevonden, zijn er wel zwakke verbanden tussen ze te zien, zoals bijvoorbeeld in Figuur 10 is weergegeven. Voor deze stoffen zijn mogelijk de in sectie 4.3.1 beschreven microbiële indices van grotere waarde.

Figuur 10

Relatie tussen ammonium en de relatieve abundantie van *Hypnocyclus* in het oppervlaktewater van Texelse sloten, met regressielijn ($y \sim \log(x)$) en bijbehorende adjusted R-squared. Relatieve abundantie is CLR-getransformeerd: Positieve y-waarden wijzen op een hoger-dan-gemiddelde abundantie ten opzichte van de rest van de gemeenschap. Er is een positief verband gevonden



Bij het beoordelen van de resultaten moet in acht worden genomen dat de bemonsteringen in het eind van de winter hebben plaatsgevonden, toen temperaturen nog onder de 10 °C lagen. In winterperiodes zijn veel ecologische processen door de lagere temperaturen vertraagd, zoals plantengroei of afbraak van organisch materiaal, maar ook omzettingen van stikstof, zoals nitrificatie en denitrificatie. De microbiële gemeenschappen die deze processen faciliteren zullen daarom tussen seizoenen verschillen qua abundantie, activiteit, samenstelling van soorten en functionele groepen. Zonder aanvullende data van het microbioom in zomerperiodes, kunnen onze resultaten dus nog niet geëxtrapoleerd worden naar de situatie over een heel jaar. Wel verwachten we dat - omdat abundantie en activiteit van het microbioom lager zijn in winterperiodes - het waarschijnlijk is dat er minder relaties tussen microbioom en omgevingsvariabelen te vinden zijn in de winter, en dus dat resultaten zoals gerapporteerd in dit verslag eerder een onder- dan overschatting zijn van de potentie van het microbioom als indicator van waterkwaliteit.

5

CONCLUSIES

Ons onderzoek laat zien dat het microbioom indicatief kan zijn voor de fysisch-chemische ecosysteemtoestand van sloten, en daarmee een indicator voor belangrijke randvoorwaarden voor het ecosysteemfunctioneren. In de vijftig sloten die we in dit onderzoek hebben bemonsterd zien we dat het microbioom van de waterlaag de meeste informatie geeft over aanwezige gradiënten in macro-ionsamenstelling. Binnen geografische regio's of waterbeheersgebieden zijn duidelijke gradiënten te zien in de totale soortsamenvatting, die samenhangen met gehalten van ijzer, zwavel, ammonium en organisch materiaal. Dit geeft aan dat juist de totale microbiële samenstelling een gevoelige indicator kan zijn voor ecosysteemfunctioneren, mits voldoende gebiedsspecifieke referentiedata beschikbaar zijn. Momenteel is voor de analyse van microbioomdata echter nog specialistische kennis nodig, waardoor opschalen van deze stap nog niet binnen handbereik ligt.

Naast het totale microbioom kunnen ook de aangetroffen aantallen genkopieën die coderen voor de microbiële omzettingen van stikstof, koolstof en sulfaat, gebruikt worden als indicator van de in het veld spelende biogeochemische processen. Het bepalen van deze genabundantie is goed uitvoerbaar en gestandaardiseerde protocollen zijn voor een aantal genen al aanwezig. Ons onderzoek liet bijvoorbeeld zien dat de genen *mcrA* (indicator voor methaan-productie) en *dsrB* (indicator voor sulfaat-reductie) positief correleren met de beschikbaarheid van organisch materiaal, en *amoA* (indicator voor ammoniumoxidatie) vaak — maar gebiedsafhankelijk — samenhangt met ammoniumbeschikbaarheid. Daarnaast zijn er diverse microbiële genera die correleren met concentraties van macroïonen en sporenelementen binnen de bemonsterde regio's. Vervolgonderzoek naar specifieke indicatorgenera en microbiële indices wordt daarom als kansrijk gezien, en hiervoor kan de huidige dataset als startpunt gebruikt worden.

AANBEVELINGEN VOOR DE TOEKOMST

Kortom, ons onderzoek toont aan dat het gebruik van microbioomanalyse voor waterkwaliteitsdiagnostiek zowel praktisch uitvoerbaar, als veelbelovend is. Om deze aanpak daadwerkelijk als diagnostische methode te kunnen inzetten, zijn echter nog enkele stappen noodzakelijk, zoals I) het standaardiseren van procedures voor monsternamen, opslag, extractie, sequencing en data-analyse, waardoor data onderling te vergelijken zijn, II) het verwerken van de resulterende data en bijbehorende metadata (zoals waterkwaliteitsgegevens) in een referentiedatabase, waardoor opvallende verschillen tussen microbiomen zowel over ruimte als tijd geïdentificeerd kunnen worden, III) het ontwikkelen van statistische methoden waarmee afwijkende of indicatieve microbiële gemeenschappen (automatisch) kunnen worden herkend.

Via bijvoorbeeld machine learning zou er in de toekomst een diagnostische tool kunnen worden ontwikkeld om aan de hand van microbiële data een inschatting te kunnen maken van de biogeochemische toestand van een systeem. De bemonstering kan gemakkelijk worden toegevoegd aan de al bestaande methoden van waterkwaliteitsmonitoring, en daaraan een waardevolle toevoeging leveren. Het kan aanvullend worden gebruikt op al regulier gemonitorde chemische parameters, omdat het niet slechts een momentopname is, maar inzicht

geeft in onderliggende processen die een oorzaak of gevolg zijn van een bepaalde staat van de biogeochemie. Inzicht in hoe het bemonsterde microbiom afwijkt van dat van soortgelijke systemen kan bijvoorbeeld ook bijdragen aan een diagnose over het ecosysteemfunctioneren.

AANBEVELINGEN VOOR OPSLAG, DNA-EXTRACTIE EN BEMONSTERING

Naar aanleiding van ons onderzoek komen we tot de volgende aanbevelingen m.b.t. de monsternamen, opslag en DNA-extractie:

Bemonstering van water en sediment

- Neem een mengmonster van minimaal zes watermonsters of vier sedimentmonsters per locatie om een betrouwbaar beeld van de microbiële samenstelling te verkrijgen.
- Watermonsters hebben de voorkeur boven sedimentmonsters, voor het leggen van verbanden met waterkwaliteit.
- Vermijd contact met water en sediment, draag handschoenen en gebruik schoon materiaal of wegwerpmateriaal

Opslag en extractie van DNA

- Koel monsters zo snel mogelijk, het liefst direct, bij 4 °C.
- Voer DNA-extractie zo snel mogelijk uit, bij voorkeur binnen enkele dagen na bemonstering.
- Filter watermonsters binnen 48 uur na bemonstering. Vries ze in wanneer de opslagtijd langer zal duren.
- Vries monsters in bij –20 °C of –80 °C wanneer extractie niet direct mogelijk is. Het toevoegen van stabilisatoren is niet nodig. Vermijd veelvuldig ontdooien en invriezen.
- Gebruik standaard extractiekits die specifiek geschikt zijn voor water, biofilm of sediment.

6

AI-VERKLARING

Bij het maken van deze tekst is geen gebruik gemaakt van *large language models* (LLMs) voor het genereren van tekst. In hoofdstuk 3 is wel gebruikt gemaakt van LLMs voor het vertalen van Engelse naar Nederlandse tekst.

7

REFERENTIES

- Aylagas, E., Atalah, J., Sánchez-Jerez, P., Pearman, J. K., Casado, N., Asensi, J., Toledo-Guedes, K., & Carvalho, S. (2021). A step towards the validation of bacteria biotic indices using DNA metabarcoding for benthic monitoring. *Molecular Ecology Resources*, 21(6), 1889–1903. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13395>
- Brandt, F. B., Breidenbach, B., Brenzinger, K., & Conrad, R. (2014). Impact of short-term storage temperature on determination of microbial community composition and abundance in aerated forest soil and anoxic pond sediment samples. *Systematic and Applied Microbiology*, 37(8), 570–577. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.10.007>
- Brandt, J., & Albertsen, M. (2018). Investigation of Detection Limits and the Influence of DNA Extraction and Primer Choice on the Observed Microbial Communities in Drinking Water Samples Using 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02140>
- Bustin, S. A., & Nolan, T. (2004). Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. *Journal of Biomolecular Techniques : JBT*, 15(3), 155–166.
- Černohlávková, J., Jarkovský, J., Nešporová, M., & Hofman, J. (2009). Variability of soil microbial properties: Effects of sampling, handling and storage. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(8), 2102–2108. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.04.023>
- Chen, Z., Hui, P. C., Hui, M., Yeoh, Y. K., Wong, P. Y., Chan, M. C. W., Wong, M. C. S., Ng, S. C., Chan, F. K. L., & Chan, P. K. S. (2019). Impact of Preservation Method and 16S rRNA Hypervariable Region on Gut Microbiota Profiling. *mSystems*, 4(1), e00271-18. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00271-18>
- Chopyk, J., Allard, S., Nasko, D. J., Bui, A., Mongodin, E. F., & Sapkota, A. R. (2018). Agricultural Freshwater Pond Supports Diverse and Dynamic Bacterial and Viral Populations. *Frontiers in Microbiology*, 9, 792. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00792>
- Cook, L. S. J., Briscoe, A. G., Fonseca, V. G., Boenigk, J., Woodward, G., & Bass, D. (2025). Microbial, holobiont, and Tree of Life eDNA/eRNA for enhanced ecological assessment. *Trends in Microbiology*, 33(1), 48–65. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2024.07.003>
- Cross, J., Honnavar, P., Quidet, X. L. T., Butler, T., Shivaprasad, A., & Christian, L. (2023). Assessing Freshwater Microbiomes from Different Storage Sources in the Caribbean Using DNA Metabarcoding. *Microorganisms*, 11(12), 2945. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11122945>
- Gilpin, B., Devane, M., Nourozi, F., Robson, B., Scholes, P., & Lin, S. (2013). Recommendations for the processing and storage of water samples before polymerase chain reaction (PCR) analysis. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 47(4), 582–586. <https://doi.org/10.1080/00288330.2013.797915>

- Harry, M., Gambier, B., & Garnier-Sillam, E. (2000). Soil conservation for DNA preservation for bacterial molecular studies. *European Journal of Soil Biology*, 36(1), 51–55. [https://doi.org/10.1016/S1164-5563\(00\)00044-3](https://doi.org/10.1016/S1164-5563(00)00044-3)
- Hinlo, R., Gleeson, D., Lintermans, M., & Furlan, E. (2017). Methods to maximise recovery of environmental DNA from water samples. *PLOS ONE*, 12(6), e0179251. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179251>
- Iturbe-Espinoza, P., Brandt, B. W., Braster, M., Bonte, M., Brown, D. M., & van Spanning, R. J. M. (2021). Effects of DNA preservation solution and DNA extraction methods on microbial community profiling of soil. *Folia Microbiologica*, 66(4), 597–606. <https://doi.org/10.1007/s12223-021-00866-0>
- Kerrigan, Z., Kirkpatrick, J. B., & D'Hondt, S. (2019). Influence of 16S rRNA Hypervariable Region on Estimates of Bacterial Diversity and Community Composition in Seawater and Marine Sediment. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01640>
- Kim, M., Morrison, M., & Yu, Z. (2011). Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. *Journal of Microbiological Methods*, 84(1), 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.10.020>
- KleinJan, H., Frioux, C., Califano, G., Aite, M., Fremy, E., Karimi, E., Corre, E., Wichard, T., Siegel, A., Boyen, C., & Dittami, S. M. (2023). Insights into the potential for mutualistic and harmful host–microbe interactions affecting brown alga freshwater acclimation. *Molecular Ecology*, 32(3), 703–723. <https://doi.org/10.1111/mec.16766>
- Lauber, C. L., Zhou, N., Gordon, J. I., Knight, R., & Fierer, N. (2010). Effect of storage conditions on the assessment of bacterial community structure in soil and human-associated samples. *FEMS Microbiology Letters*, 307(1), 80–86. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01965.x>
- Lear, G., Dickie, I., Banks, J., Boyer, S., Buckley, H. L., Buckley, T. R., Cruickshank, R., Dopheide, A., Handley, K. M., Hermans, S., Kamke, J., Lee, C. K., MacDiarmid, R., Morales, S. E., Orlovich, D. A., Smissen, R., Wood, J., & Holdaway, R. (2018). Methods for the extraction, storage, amplification and sequencing of DNA from environmental samples. *New Zealand Journal of Ecology*, 42(1), 10-50A.
- Lee, Y. B., Lorenz, N., Dick, L. K., & Dick, R. P. (2007). Cold Storage and Pretreatment Incubation Effects on Soil Microbial Properties. *Soil Science Society of America Journal*, 71(4), 1299–1305. <https://doi.org/10.2136/sssaj2006.0245>
- Lin †, Y.-S., Biddle †, J. F., Lipp, J. S., Orcutt, B. N., Holler, T., Teske, A., & Hinrichs, K.-U. (2010). Effect of Storage Conditions on Archaeal and Bacterial Communities in Subsurface Marine Sediments. *Geomicrobiology Journal*, 27(3), 261–272. <https://doi.org/10.1080/01490450903410423>
- Lipus, D., Vikram, A., Hammack, R., Bibby, K., & Gulliver, D. (2019). The Effects of Sample Storage Conditions on the Microbial Community Composition in Hydraulic Fracturing Produced Water. *Geomicrobiology Journal*, 36(7), 630–638. <https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1599470>
- NEN. (2013). *Water – Detectie en kwantificering van Legionella pneumophila – Methode met kwantitatieve polymerase chain reaction (qPCR)*. NEN.

- Nikrad, M. P., Kerkhof, L. J., & Häggblom, M. M. (2016). The subzero microbiome: Microbial activity in frozen and thawing soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(6), fiw081. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw081>
- Niu, L., Li, Y., Wang, P., Zhang, W., Wang, C., Li, J., & Wu, H. (2018). Development of a microbial community-based index of biotic integrity (MC-IBI) for the assessment of ecological status of rivers in the Taihu Basin, China. *Ecological Indicators*, 85, 204–213. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.10.051>
- Parulekar, N. N., Kolekar, P., Jenkins, A., Kleiven, S., Utkilen, H., Johansen, A., Sawant, S., Kulkarni-Kale, U., Kale, M., & Sæbø, M. (2017). Characterization of bacterial community associated with phytoplankton bloom in a eutrophic lake in South Norway using 16S rRNA gene amplicon sequence analysis. *PLOS ONE*, 12(3), e0173408. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173408>
- Paulus, G. K. (2021). *Dissemination Of Antibiotic Resistance Via Wastewater And Surface Water. [Dissertation (TU Delft), Delft University of Technology]*. <https://doi.org/10.4233/uuid:70c78e3e-618c-4ede-a0ee-e1379a6e598a>
- Pearman, J. K., Keeley, N. B., Wood, S. A., Laroche, O., Zaiko, A., Thomson-Laing, G., Biessy, L., Atalah, J., & Pochon, X. (2020). Comparing sediment DNA extraction methods for assessing organic enrichment associated with marine aquaculture. *PeerJ*, 8, e10231. <https://doi.org/10.7717/peerj.10231>
- Pearman, J. K., Wood, S. A., Vandergoes, M. J., Atalah, J., Waters, S., Adamson, J., Thomson-Laing, G., Thompson, L., Howarth, J. D., Hamilton, D. P., Pochon, X., Biessy, L., Brasell, K. A., Dahl, J., Ellison, R., Fitzsimons, S. J., Gard, H., Gerrard, T., Gregersen, R., ... Tibby, J. (2022). A bacterial index to estimate lake trophic level: National scale validation. *Science of The Total Environment*, 812, 152385. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152385>
- Petersen, S. O., & Klug, M. J. (1994). Effects of Sieving, Storage, and Incubation Temperature on the Phospholipid Fatty Acid Profile of a Soil Microbial Community. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(7), 2421–2430. <https://doi.org/10.1128/aem.60.7.2421-2430.1994>
- Rissanen, A. J., Kurhela, E., Aho, T., Oittinen, T., & Tirola, M. (2010). Storage of environmental samples for guaranteeing nucleic acid yields for molecular microbiological studies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(4), 977–984. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2838-2>
- Roager, L., Sonnenschein, E. C., & Gram, L. (2023). Sequence-Based Characterization of Microalgal Microbiomes: Impact of DNA Extraction Protocol on Yield and Community Composition. *Microbiology Spectrum*, 11(2), e03408-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03408-22>
- Rubin, B. E. R., Gibbons, S. M., Kennedy, S., Hampton-Marcell, J., Owens, S., & Gilbert, J. A. (2013). Investigating the Impact of Storage Conditions on Microbial Community Composition in Soil Samples. *PLoS ONE*, 8(7), e70460. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070460>
- Rubin, B. E. R., Sanders, J. G., Hampton-Marcell, J., Owens, S. M., Gilbert, J. A., & Moreau, C. S. (2014). DNA extraction protocols cause differences in 16S rRNA amplicon sequencing efficiency but not in community profile composition or structure. *MicrobiologyOpen*, 3(6), 910–921. <https://doi.org/10.1002/mbo3.216>
- Shi, Z., Kong, Q., Li, X., Xu, W., Mao, C., Wang, Y., Song, W., & Huang, J. (2022). The Effects of DNA Extraction Kits and Primers on Prokaryotic and Eukaryotic Microbial Community in Freshwater Sediments. *Microorganisms*, 10(6), 1213. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061213>

- Stenberg, B., Johansson, M., Pell, M., Sjö Dahl-Svensson, K., Stenström, J., & Torstensson, L. (1998). Microbial biomass and activities in soil as affected by frozen and cold storage. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(3), 393–402. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(97\)00125-9](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00125-9)
- Stojan, I., Trumbić, Ž., Lepen Pleić, I., & Šantić, D. (2023). Evaluation of DNA extraction methods and direct PCR in metabarcoding of mock and marine bacterial communities. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1151907. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1151907>
- Tatangelo, V., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., & Ambrosini, R. (2014). Effect of preservation method on the assessment of bacterial community structure in soil and water samples. *FEMS Microbiology Letters*, 356(1), 32–38. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12475>
- Vasileiadis, S., Puglisi, E., Arena, M., Cappa, F., Cocconcelli, P. S., & Trevisan, M. (2012). Soil Bacterial Diversity Screening Using Single 16S rRNA Gene V Regions Coupled with Multi-Million Read Generating Sequencing Technologies. *PLOS ONE*, 7(8), e42671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042671>
- Wallenius, K., Rita, H., Simpanen, S., Mikkonen, A., & Niemi, R. M. (2010). Sample storage for soil enzyme activity and bacterial community profiles. *Journal of Microbiological Methods*, 81(1), 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.01.021>
- Wang, S., Zhang, P., Zhang, D., & Chang, J. (2023). Evaluation and comparison of the benthic and microbial indices of biotic integrity for urban lakes based on environmental DNA and its management implications. *Journal of Environmental Management*, 341, 118026. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.118026>
- Wang, Y., Li, X., Chi, Y., Song, W., Yan, Q., & Huang, J. (2022). Changes of the Freshwater Microbial Community Structure and Assembly Processes during Different Sample Storage Conditions. *Microorganisms*, 10(6), 1176. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061176>
- Yang, B., Wang, Y., & Qian, P.-Y. (2016). Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*, 17(1), 135. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-0992-y>
- Zhang, J., Zhu, C., Guan, R., Xiong, Z., Zhang, W., Shi, J., Sheng, Y., Zhu, B., Tu, J., Ge, Q., Chen, T., & Lu, Z. (2017). Microbial profiles of a drinking water resource based on different 16S rRNA V regions during a heavy cyanobacterial bloom in Lake Taihu, China. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(14), 12796–12808. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8693-2>

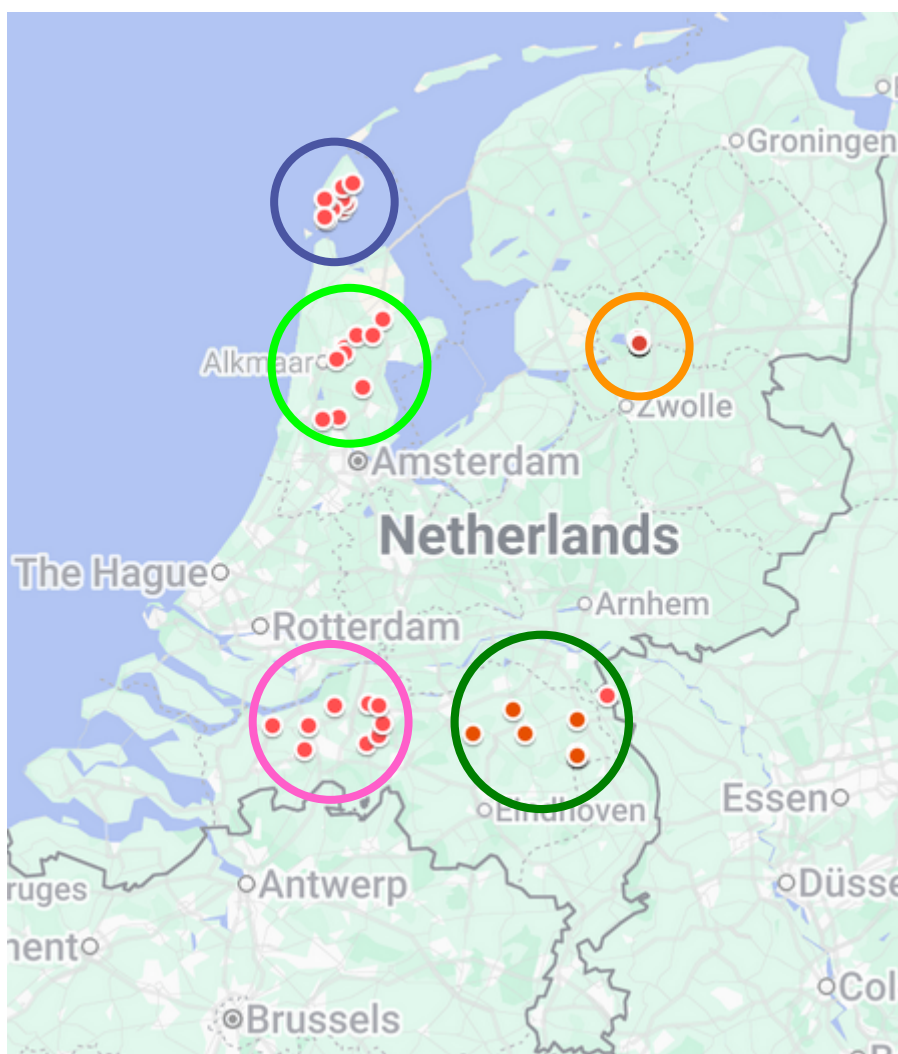
BIJLAGE

BEMONSTERINGSLOCATIES

Tabel B1 Coördinaten van de drie sloten bemonsterd voor het pilotonderzoek

Sloot	Coördinaten (Lat, Lon)
A	52.637823, 4.804228
B	52.680202, 4.785777
C	52.680078, 4.785518

Figuur B1 Alle bemonsteringslocaties van het onderzoek. Blauw: Texel; Lichtgroen: Noord-Holland; Oranje: De Wieden; Paars: West-Brabant; Groen: Oost-Brabant



Figuur B2

Bemonsteringslocaties in de Wieden



Tabel B2 Coördinaten van de 50 sloten bemonsterd voor het onderzoek, de bijbehorende regio's zoals onderscheiden in dit rapport, de codes zoals gehanteerd door de waterschappen, KRW watertypen en bodemprofielen. Sloop 22 en 51 zijn niet in de analyse gebruikt. * geeft sloten aan die vanuit data van WUR en Radboud, en niet de waterschappen, geselecteerd zijn.

Sloop	Regio	Coördinaten (Lat/Lon)	Code waterschap	KRW watertype	Code bodemprofiel	Naam bodemprofiel
1	Oost-Brabant	51.57045, 5.85984	341436	M1a	pZn21	Gooreerdgronden; leemarm en zwak lemig fijn zand
2	Oost-Brabant	51.57075, 5.86059	341432	M2	pZn21	Gooreerdgronden; leemarm en zwak lemig fijn zand
3	Oost-Brabant	51.57594, 5.85712	341433	M1a	pZn21	Gooreerdgronden; leemarm en zwak lemig fijn zand
4	Oost-Brabant	51.57605, 5.85757	341435	M1a	pZn21	Gooreerdgronden; leemarm en zwak lemig fijn zand
5	Oost-Brabant	51.57893, 5.85541	341417	M2	pZn21	Gooreerdgronden; leemarm en zwak lemig fijn zand
6	Oost-Brabant	51.62944, 5.62637	143273	M2	zEZ21	Hoge zwarte enkeerdgronden; leemarm en zwak lemig fijn zand
7	Oost-Brabant	51.69235, 5.56743	140299	M3	zEZ21	Hoge zwarte enkeerdgronden; leemarm en zwak lemig fijn zand
8*	Oost-Brabant	51.73219, 5.98921	N/A	N/A	KRn2g	Poldervaaggronden; zware zavel
9	Oost-Brabant	51.66311, 5.85373	999969	M1a	pZg23g	Beekeerdgronden; lemig fijn zand
10	Oost-Brabant	51.57060, 5.86121	341411	M2	pZn21	Gooreerdgronden; leemarm en zwak lemig fijn zand
11	Oost-Brabant	51.57098, 5.86081	341423	M2	pZn21	Gooreerdgronden; leemarm en zwak lemig fijn zand
12	Oost-Brabant	51.63464, 5.39966	900016	M1a	cHn21	Laarpodzolgronden; lemig fijn zand
13	West-Brabant	51.70536, 4.98864	590935	M1a	eMn35A	Kalkrijke poldervaaggronden; lichte klei, profielverloop 5
14	West-Brabant	51.71330, 4.94092	590601	M1a	eMn35A	Kalkrijke poldervaaggronden; lichte klei, profielverloop 5
15	West-Brabant	51.60464, 4.92771	590809	M1a	pZg23g	Beekeerdgronden; lemig fijn zand
16	West-Brabant	51.62372, 4.98401	590804	M1a	pZn21	Gooreerdgronden; leemarm en zwak lemig fijn zand
17	West-Brabant	51.65633, 4.99881	590928	M1a	cHn21	Laarpodzolgronden; leemarm en zwak lemig fijn zand
18	West-Brabant	51.70418, 4.78650	690222	M1a	Vc	Vlieveengronden op zeggeveen, rietzeggeveen of (mesotroof) broekveen
19	West-Brabant	51.65201, 4.67626	202803	M1a	eMn25A	Kalkrijke poldervaaggronden; zware zavel, profielverloop 5
20	West-Brabant	51.65503, 4.51174	790409	M1a	eMn25A	Kalkrijke poldervaaggronden; zware zavel, profielverloop 5
21	West-Brabant	51.58072, 4.65949	200403	M1a	EZg23w	Lage enkeerdgronden; lemig fijn zand
23*	De Wieden	52.68475, 6.13039	N/A	N/A	zVz	Meerveengronden op zand zonder humuspodzol, beginnend ondieper dan 1.2 m
24*	De Wieden	52.68453, 6.12971	N/A	N/A	zVz	Meerveengronden op zand zonder humuspodzol, beginnend ondieper dan 1.2 m
25*	De Wieden	52.68395, 6.12794	N/A	N/A	zVz	Meerveengronden op zand zonder humuspodzol, beginnend ondieper dan 1.2 m
26*	Noord-Holland	52.74005, 5.00004	N/A	N/A	pMn55A	Kalkrijke leek-/woudeerdgronden; zavel, profielverloop 5

Sloot	Regio	Coördinaten (Lat/Lon)	Code waterschap	KRW watertype	Code bodemprofiel	Naam bodemprofiel
27*	Noord-Holland	52.70221, 4.95062	N/A	N/A	-	(Stedelijk gebied)
28	Noord-Holland	52.70282, 4.89100	313002	-	pMn55C	Kalkarme leek-/woudeerdgronden; zavel, profielverloop 5
29	Noord-Holland	52.66770, 4.83093	315007	-	-	(Stedelijk gebied)
30	Texel	53.01042, 4.75574	BDV001	-	-	-
31	Texel	53.01562, 4.74956	801004	-	Zn21	Vlakvaaggronden; leemarm en zwak lemig fijn zand
32	Texel	53.03231, 4.78319	802014	-	kMn63Cp	Knippoldervaaggronden; zavel en lichte klei, profielverloop 3
33	Texel	53.03409, 4.82691	802002	-	Wol	Moerige eerdgronden met een moerige bovengrond of moerige tussenlaag op niet-gerijpte zavel of klei
34	Texel	53.10960, 4.86716	804001	-	Zn50Ar	Kalkhoudende vlakvaaggronden; matig fijn zand
35	Texel	53.09177, 4.82284	803022	-	Zn21	Vlakvaaggronden; leemarm en zwak lemig fijn zand
36	Texel	53.05531, 4.84754	802003	-	Mv61C	Kalkarme drechtvaaggronden; zavel en lichte klei, profielverloop 1
37	Texel	53.06044, 4.82752	802007	-	Zn23t	Vlakvaaggronden; lemig fijn zand
38	Texel	53.06084, 4.74798	BDV003	-	Zn21	Vlakvaaggronden; leemarm en zwak lemig fijn zand
39	Texel	53.06382, 4.75920	803019	-	pZn21	Gooreerdgronden; leemarm en zwak lemig fijn zand
40	Noord-Holland	52.65619, 4.83776	315014	-	Mn25A	Kalkrijke poldervaaggronden; zware zavel, profielverloop 5
41	Noord-Holland	52.63782, 4.80423	N/A	N/A	pMn55A	Kalkrijke leek-/woudeerdgronden; zavel, profielverloop 5
42*	Noord-Holland	52.56566, 4.91539	N/A	N/A	pMn85C	Kalkarme leek-/woudeerdgronden; klei, profielverloop 5
43*	Noord-Holland	52.48129, 4.81434	N/A	N/A	kVc	Waardveengronden op zeggeveen, rietzeggeveen of (mesotroof) broekveen
44*	Noord-Holland	52.47666, 4.73554	N/A	N/A	hVc	Koopveengronden op zeggeveen, rietzeggeveen of (mesotroof) broekveen
45*	De Wieden	52.68521, 6.13187	N/A	N/A	zWp	Moerige podzolgronden met een humushoudend zanddek en een moerige tussenlaag
46*	De Wieden	52.68497, 6.13111	N/A	N/A	zWp	Moerige podzolgronden met een humushoudend zanddek en een moerige tussenlaag
47*	De Wieden	52.68355, 6.12674	N/A	N/A	zWz	Moerige eerdgronden met een zanddek en een moerige tussenlaag op zand
48*	De Wieden	52.68325, 6.12590	N/A	N/A	zVz	Meerveengronden op zand zonder humuspodzol, beginnend ondieper dan 1.2 m
49*	De Wieden	52.68946, 6.12743	N/A	N/A	Hn21	Veldpodzolgronden; leemarm en zwak lemig fijn zand
50*	De Wieden	52.68985, 6.12962	N/A	N/A	zWp	Moerige podzolgronden met een humushoudend zanddek en een moerige tussenlaag
52*	De Wieden	52.69139, 6.12307	N/A	N/A	zWp	Moerige podzolgronden met een humushoudend zanddek en een moerige tussenlaag

Tabel B3 Minimum en maximumwaarden van nitraat-, ammonium-, fosfaat-, chloride- en zwavelconcentraties ($\mu\text{mol/L}$), Elektrisch Geleidbaar Vermogen ($\mu\text{S/cm}^2$) en pH in het oppervlaktewater, evenals organisch gehalte van het sediment (%). n = aantal sloten bemonsterd per regio.

Regio		Oost-Brabant	West-Brabant	Noord-Holland	Texel	De Wieden
n		12	9	9	10	10
NO_3^-	Min	86.035	4.256	60.648	100.142	35.552
	Max	858.336	664.452	349.732	2988.613	417.732
NH_4^+	Min	2.899	26.14	2.616	3.678	1.267
	Max	61.52	174.118	50.785	138.088	4.33
$\text{PO}_4\text{-P}$	Min	0.07	0.048	0.676	0.161	0.058
	Max	0.772	0.478	5.495	13.199	0.581
IJzer	Min	1.220	0.528	0.462	0.992	0.514
	Max	138.471	75.371	3.371	108.857	3.785
Chloride	Min	349.552	561.594	860.18	2289.14	242.262
	Max	1340.04	1405.38	19512.48	114172.4	642.446
Zwavel	Min	292.205	211.488	452.523	46.652	18.295
	Max	1730.18	898.23	1444.261	7883.578	65.183
EGV	Min	303	315	751	580	84.2
	Max	864	1090	2840	20440	263
Organisch gehalte	Min	0.809	1.369	1.444	0.601	2.765
	Max	2.36	48.32	31.667	13.406	28.376
pH	Min	6.29	6.41	7.34	6.86	6.95
	Max	7.55	7.99	8.56	8.43	7.47