

eDNA onderzoek in natuurverbinding Omval-Kolhorn

**Dansmuggen &
Kiezelwieren**

eDNA onderzoek Omval-Kolhorn

Project 2019.02 | November 2019

Opdrachtnummer

Projectmanager

Berry van der Hoorn

Kwaliteitsborgers

Michiel Hootsmans (KWR), Krijn Trimbos (CML)

Auteur(s)

Berry van der Hoorn

Kevin Beentjes

Verzonden aan

Provincie Noord-Holland

Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier

Samenvatting

In de periode 2007 - 2012 zijn in het Omval-Kolhorn Kanaal op tien plaatsen moerasjes, grasland, plasbermen en natuurvriendelijke oevers (NVO's) aangelegd. De aanleg van ondiepe plantenrijke aquatische zones langs kanalen vormt voor waterbeheerders een belangrijk middel om te werken aan een verbetering van de ecologische waterkwaliteit. De provincie Noord-Holland en Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier willen weten wat het effect is van de aanpassingen op de biodiversiteit. In deze studie hebben we met genetische monitoring gekeken naar effecten op kiezelwieren en dansmuggen. Kiezelwieren vormen een belangrijk onderdeel van het fytoplankton, de primaire producenten in het water. Dansmuggen vormen een belangrijk onderdeel van de macrofauna, een volgende essentiële schakel in het voedselweb van het zoete water. Beide groepen zijn goede indicatoren voor de waterkwaliteit, bestaan uit veel soorten die lastig op naam zijn te brengen, maar die wel goed aantoonbaar zijn met environmental DNA. Hieronder in het kort de belangrijkste conclusies van de studie.

- Natuurvriendelijke oevers lijken bij te dragen aan een grotere diversiteit in kiezelwieren en dansmuggen in het Omval-Kolhorn kanaal.
- Voor kiezelwieren werden 204 taxa vastgesteld langs natuurvriendelijke oevers en 175 langs steile oevers. Voor dansmuggen werden 101 taxa vastgesteld langs natuurvriendelijke oevers en 71 langs steile oevers (zie bijlagen 3 en 4 voor soortenlijsten).
- Zowel bij kiezelwieren als dansmuggen verschilt de soortensamenstelling langs natuurvriendelijke oevers van die langs steile oevers.
- Zowel voor kiezelwieren als dansmuggen werden de meeste taxa vastgesteld langs het type natuurvriendelijke oever met de meeste wateruitwisseling met het kanaal. Het aandeel unieke taxa was daar juist het laagst. Dus meer isolatie van het kanaal leidt tot minder soorten maar tot relatief meer unieke soorten.
- Voor zowel kiezelwieren als dansmuggen werden in september meer soorten gevonden dan in juli.
- De algemene resultaten van deze studie sluiten gedeeltelijk aan bij de resultaten van RAVON. RAVON vond met eDNA onderzoek meer soorten vis langs de natuurvriendelijke oevers dan in het kanaal. Voor kiezelwieren en dansmuggen vonden wij eveneens meer taxa langs de natuurvriendelijke oevers.
- RAVON trof (met conventionele monitoring) de meeste vissoorten aan in de meest geïsoleerde typen natuurvriendelijke oevers. Voor kiezelwieren en dansmuggen vonden we daar juist de laagste aantallen taxa.
- Uit deze studie blijkt dat kiezelwieren en dansmuggen in voldoende mate met eDNA zijn te detecteren om ecologische patronen vast te stellen. Analyse van eDNA toont verschillen in soortensamenstelling tussen natuurvriendelijke oevers en steile oevers, tussen verschillende typen natuurvriendelijke oevers, en tussen individuele locaties en meetmomenten.

Tot slot nog een aantal aanbevelingen:

- Om de resultaten te kunnen generaliseren is uitbreiding van het onderzoek gewenst langs meer natuurvriendelijke oevers in meer kanalen. Nu beperken de resultaten zich tot een zestal locaties in het Omval-Kolhorn kanaal. Meer meetmomenten zullen leiden tot een beter inzicht in het jaarlijkse verloop ('species turnover') van populaties kiezelwieren en dansmuggen.
- In dit verslag geven we een vooruitblik naar een interpretatie op basis van het ecologische profiel van soorten kiezelwieren. Wij voorzien dat dit een meerwaarde gaat krijgen in waterkwaliteit monitoring, zoals bij vissen voor de kaderrichtlijn water al gebruik wordt gemaakt van ecologische gildes. We adviseren meer onderzoek naar deze ecologische profielen en de interpretatie hiervan.
- Deze studie ondersteunt de gedachte dat environmental DNA analyse gericht op verschillende soortgroepen goed werkt en nu al gebruikt kan worden voor maatregel-effect studies waar de effectmeting op biodiversiteit een doel is. Behalve kiezelwieren en dansmuggen kan worden gekeken naar een breed scala aan taxonomische groepen, van bacteriën tot vissen en zoogdieren. Voorwaarde hiervoor zijn betrouwbare referentie databanken met soortspecifieke DNA profielen.

Als BioMon zien we veel potentieel in de toepassingen van environmental DNA en ecologische profielen van soorten. Wij zouden graag de komende jaren bijdragen aan de verdere ontwikkeling van toepassingen in structurele monitoring en maatregel-effect onderzoek.

1 Inleiding

1.1 Kader

In de periode 2007 - 2012 zijn in het Omval-Kolhorn Kanaal op tien plaatsen moerasjes, grasland, plasbermen en natuurvriendelijke oevers (NVO's) aangelegd. De aanleg van ondiepe plantenrijke aquatische zones langs kanalen vormt voor waterbeheerders een belangrijk middel om te werken aan een verbetering van de ecologische waterkwaliteit. In 2015 en 2016 zijn de NVO's onderzocht op macrofyten en macrofauna volgens de KRW-systematiek. In 2017 is onderzoek verricht naar het belang van de NVO's voor vissen (Herder & Kranenburg 2018). De provincie Noord-Holland en Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier willen ook weten wat de bijdrage van NVO's is aan de ecologische waterkwaliteit in bredere zin, in dit voorstel vertaald als de bijdrage aan de aquatische biodiversiteit.

Aquatische biodiversiteit is zeer divers. Voor deze studie is gekozen voor kiezelwieren (diatomeeën of bacillariophyceae) als proxy voor primaire producenten en dansmuggen (chironomidae) als proxy voor de macrofauna. Beide groepen zijn sterk indicatief voor de waterkwaliteit en vormen een belangrijke schakel in het ecosysteem (Moller-Pilot & Buskens 1990, Van Dam 1994, Van Dijk et al. 2013). Soorten binnen beide groepen zijn echter notoir lastig te identificeren en er is slechts een beperkt aantal Nederlandse experts. Uit voorgaande studies is gebleken dat beide groepen zich bijzonder goed lenen voor detectie met environmental DNA, kortweg eDNA (Bista et al. 2017, Vasselon et al. 2017). Organismen en sporen van organismen worden met een watermonster verzameld, waarna hun aanwezigheid wordt vastgesteld door DNA analyse.

1.2 Vraagstelling

Voor deze studie is de volgende onderzoeksvraag geformuleerd:

Wat is de bijdrage van natuurvriendelijke oevers in het Omval-Kolhorn Kanaal aan de diversiteit van dansmuggen en kiezelwieren?

De hoofdvraag is verder uitgesplitst in een aantal deelvragen:

Welke soorten zijn aanwezig langs de natuurvriendelijke en de steile oevers?
Verschilt de soortensamenstelling tussen natuurvriendelijke en steile oevers?
Indien er een verschil is, wat zijn de indicatieve soorten?
Verschilt de soortensamenstelling tussen verschillende NVO's en typen NVO's?
Verschilt de soortensamenstelling tussen twee meetmomenten?
Sluiten de resultaten aan bij die van de vismonitoring door RAVON?

Naast de ecologische is er ook een methodologische vraag:

In hoeverre is eDNA een geschikte techniek voor beantwoording van de onderzoeksvraag?

2 Materiaal en methoden

2.1 Onderzoekslocatie

Het onderzoek is uitgevoerd in natuurverbinding Omval-Kolhorn, een kanaal met een lengte van 25 kilometer, dat loopt van Heerhugowaard tot Kolvoort (figuur 1). Tussen 2007 en 2012 zijn door de Provincie Noord-Holland op tien locaties maatregelen genomen om de natuurwaarden te vergroten. In 2016 en 2017 heeft RAVON een uitgebreide studie uitgevoerd naar vispopulaties in een zestal NVO's, onderverdeeld in drie verschillende typen (figuur 1). Bij het type 'breed aangetakt' is de natuurvriendelijke oever direct aan het kanaal. Bij het type twee doorgangen is de natuurverbetering meer geïsoleerd en via twee openingen met het kanaal verbonden. Het type 'twee duikers' is nog meer geïsoleerd, daar is de natuurverbetering, zoals de naam verwacht, via twee duikers met het kanaal verbonden. Om aan te sluiten op de resultaten van RAVON is in deze studie voor dezelfde NVO's gekozen.



Figuur 1. De verschillende types natuurvriendelijke oevers.

Op 10 juli 2019 hebben medewerkers van BioMon een voorverkenning uitgevoerd. Daarbij zijn de zes NVO locaties bezocht en beoordeeld op bereikbaarheid en haalbaarheid van monsternamen vanaf de oever. Bij alle zes NVO's bleek dit mogelijk, wat monsternamen in het veld eenvoudig uitvoerbaar maakt. Dit kan een meerwaarde zijn van het gebruik van DNA methodieken. Tevens zijn controle locaties gekozen in de vorm van steile oevers (SO) die naast of tegenover de NVO lagen (bijlage 1). Voor een enkele NVO (NVO2) is vanwege de bereikbaarheid een steile oever gekozen die ca. 750 meter verderop langs het kanaal lag. Coördinaten en foto's van de NVO's en de steile kanaaloevers staan in bijlage 1 en 2.



Figuur 1. Onderzoeklocaties langs natuurverbinding Omval-Kolhorn.

2.2 Monstername

Monsters zijn verzameld op 18 en 19 juli en op 25 september. Er is gekozen voor twee momenten, enerzijds als zekerheid mocht een monstername mislukken, anderzijds om de eventuele variatie in de tijd te kunnen vaststellen. Per locatie zijn twintig deelmonsters van vijftig milliliter verzameld langs de oevers van de NVO's en de steile kanaaloevers, resulterend in een mengmonster van een liter. De deelmonsters zijn genomen om de ruimtelijke heterogeniteit te ondervangen. Voor de monstername is gebruik gemaakt van een zestig millimeter spuit bevestigd in een monsterhengel (figuur 2). Alle deelmonsters zijn binnen een meter vanaf de kant genomen en direct in het veld gefilterd met een opschroefbare filterkop met een PES filter, met een poriegrootte van $0.45\ \mu\text{m}$ (figuur 2.2). Meestal volstond een enkel filter, bij sommige locaties waren er meerdere nodig vanwege de troebelheid van het water, met een maximum van vier bij NVO1 waar het water veel kleideeltjes bevatte. Tevens werden in het veld zogenaamde blanco's genomen, waarin alleen demiwater werd gefilterd. Deze blanco's werden tijdens de gehele labanalyse gelijk behandeld als de rest van de monsters.

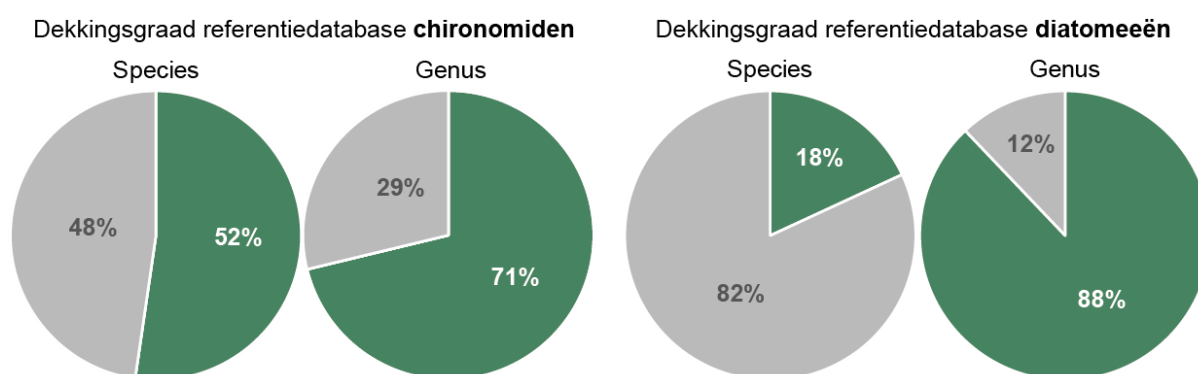


Figuur 2. A) Monstername met een monsterhengel, B) de opschroefbare spuitkop met daarin het PES filter.

2.3 Barcode referenties

Voor de dansmuggen is gebruik gemaakt van een custom referentie database. De afgelopen vijf jaar heeft Naturalis met specialist Alexander Klink enkele honderden dansmuggen verzameld, zoveel mogelijk geïdentificeerd en ge(DNA)barcodeerd. Daarmee heeft Nederland internationaal gezien één van de meest uitgebreide landelijke databases voor dansmuggen met een dekking van 52% van de bekende Nederlandse soorten (Figuur 2.3), gebaseerd op geïdentificeerde soorten vastgelegd in het Nederlands soortenregister (www.nederlandsesoorten.nl) plus een aantal ongeïdentificeerde soorten en genera die wel zijn aangetroffen maar (nog) niet op de Nederlandse lijst staan. De ontbrekende soorten zijn in Nederland schaars, deze worden in overleg met waterlabs en in het buitenland de komende jaren alsnog zoveel mogelijk verzameld.

Voor kiezelwieren bestaat geen Nederlandse referentie database met DNA barcodes. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van een Franse database waaruit de Nederlandse soorten zijn geselecteerd op basis van samengestelde soortenlijsten van de KRW maatlaten. Op basis hiervan bedraagt de dekking voor Nederlandse genera 88% (Figuur 3).



Figuur 3. Dekkingsgraad referentiedatabases voor kiezelwieren en dansmuggen.

2.4 DNA extractie en Next-Gen Sequencing

Een aangepast protocol voor een chloroform/isoamyl DNA extractie is gebruikt om de maximale hoeveelheid DNA veilig te stellen uit de filters. De gebruikte PES filters lossen tijdens de DNA extractie volledig op, zodat er geen biologisch materiaal achterblijft in restanten van het filter. Vanuit het vrijgemaakte DNA werden middels PCR twee barcodes geamplificeerd. Voor dansmuggen werd gebruik gemaakt van een 235 basenparen lang deel van het mitochondriaal COI gen (Bista et al. 2017), voor kiezelwieren werd gebruik gemaakt van een 263 basenparen lang fragment van het chloroplast gen *rbcl* (Vasselon et al. 2018).

In de PCR werden naast de blanco's uit het veld (extractie-blanco's) ook negatieve en positieve PCR controles meegenomen. Met de negatieve controles, waarin alleen water zonder DNA wordt toegevoegd, is te zien of er geen contaminatie is opgetreden in het lab of in de chemicalien. De positieve controle bestond uit een DNA monsters van een organisme dat niet in Nederland voorkomt, welke gebruikt kan worden om te zien of er kruisbesmettingen plaatsvinden tijdens het sequencen, en om daarvoor te kunnen corrigeren. Voor elk monsters werden 12 afzonderlijke PCRs uitgevoerd om daarmee zoveel mogelijk zeldzame soorten te kunnen detecteren. Alle replica's werden afzonderlijk voorzien van een unieke label-combinatie, zodat deze na het sequencen nog te onderscheiden waren. De voorbereiding van de monsters voor het sequencen werd gedaan volgens standaard protocol (Beentjes et al. 2019), de next-generation sequencing (NGS) werd gedaan op twee aparte runs (één voor dansmuggen, één voor kiezelwieren) op de Illumina MiSeq bij BaseClear.

2.5 Bioinformatica en data analyse

Alle ruwe data verkregen uit de NGS is verwerkt in een op maat gemaakte bioinformatica pijplijn die is ontwikkeld door Naturalis Biodiversity Center, bestaande uit diverse beproefde software tools. Ruwe data werd gefilterd om lage kwaliteit data te verwijderen. Vervolgens werden alle sequenties geclusterd op basis van 98% gelijkheid, en werden de clusters (ook wel MOTUs; molecular operation taxonomic units) opgesplitst naar de afzonderlijke monsters en replica's in een MOTU tabel (een kruistabel met monsters op de ene as, en MOTUs op de andere as). Deze tabellen (één voor dansmuggen, één voor kiezelwieren) werden vervolgens opgeschoond op basis van de resultaten uit de negatieve en positieve PCR controles. De twaalf PCR replicates betreffen pseudoreplica's van hetzelfde monster en zijn dus weer samengevoegd.

Het aantal DNA sequenties verschilde, en monsters met een hoger aantal sequenties hebben een grotere kans op de detectie van zeldzame soorten. Om de analyses van de monsters beter vergelijkbaar te maken, is er voor gekozen om de hoeveelheid sequenties die uit elk monster is gekomen gelijk te stellen aan het monster met de laagste hoeveelheid sequenties (140.913 voor dansmuggen en 105.275 voor kiezelwieren).

Vervolgens zijn alle overgebleven MOTUs middels een BLAST ("Basic Local Alignment Search Tool") vergeleken met de referentie databases (zie 2.3). Alle MOTUs met matches boven de 98% met referentie sequenties zijn direct tot op soort gedetermineerd. In een aantal gevallen zijn soorten die op basis van DNA sequentie niet of nauwelijks uit elkaar te houden zijn samengevoegd. Voor de MOTUs zonder matches boven de 98% is een "lowest common ancestor" (LCA) analyse uitgevoerd om de minder goede matches toch nog te kunnen determineren op genus niveau. MOTUs die niet tot op soort of genus niveau konden worden geïdentificeerd zijn weggelaten uit de analyse. MOTUs met dezelfde identificatie zijn samengevoegd.

Statistische analyses zijn uitgevoerd in R met de pakketten vegan (Oksanen et al., 2007) en FSA (Ogle et al., 2019). Verschillen tussen communities zijn getest met ANOSIM. Grafieken zijn gemaakt in R met gebruik van het pakket ggplot2 (Hadley, 2016) en nabewerkt in Adobe Illustrator.

2.5 Ecologische interpretatie

Voor kiezelwieren zijn de ecologische profielen van Herman van Dam (1994) gebruikt om een karakterisering van de natuurvriendelijke oevers en de steile oevers te maken. De hier getoonde bewerkingsresultaten moeten worden gezien als een tipje van de sluier. Voor de kiezelwieren is een subsidieproject in voorbereiding om dit verder uit te werken, en ook voor de dansmuggen bestaan plannen voor toepassing van functionele ecologische groepen voor een verdere interpretatie van de betekenis van aangetroffen soorten.

3 Resultaten

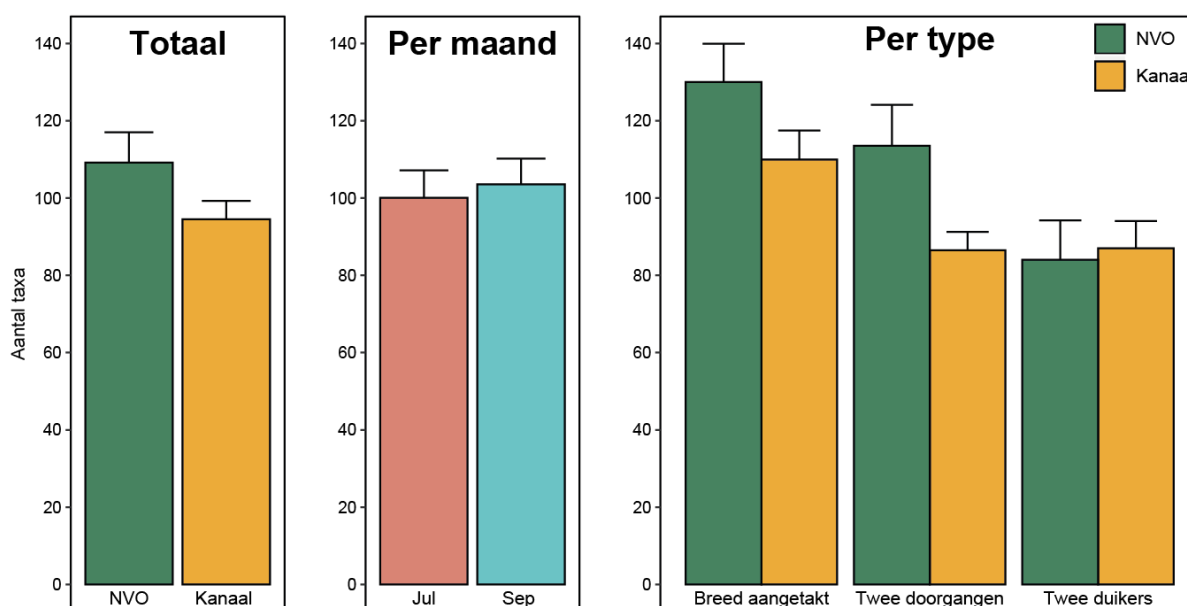
3.1 Soorten kiezelwieren en dansmuggen

In totaal zijn 331 taxa gevonden (dansmuggen en kiezelwieren voor alle monsters samen). Van de dansmuggen zijn 113 taxa aangetroffen uit 45 genera, waarvan 82 tot op soort (of soortgroep) geïdentificeerd konden worden. Van de kiezelwieren zijn 218 taxa aangetroffen uit 74 genera, waarvan 154 tot op soort (of soortgroep) geïdentificeerd konden worden. Alle aangetroffen soorten staan vermeld in de bijlagen 3 en 4, met per locatie het aantal reads dat is vastgesteld.

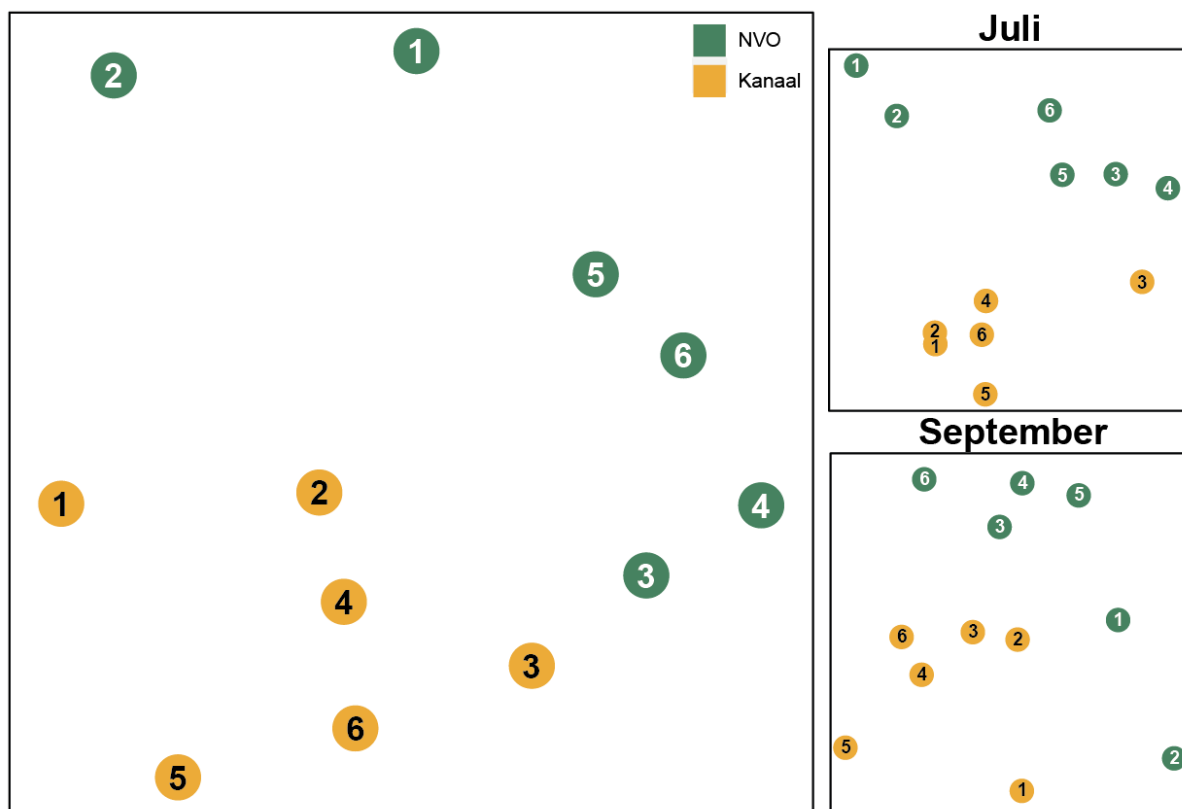
3.2 Patronen in soortensamenstelling kiezelwieren

Langs natuurvriendelijk oevers werden meer soorten kiezelwieren aangetroffen dan langs steile oevers, hoewel het niet significant hoger was (figuur 4). De soortenaantallen waren in de twee bemonsterde maanden ongeveer gelijk. Voor de soortenaantallen per type werden voor zowel de breed aangetakte NVO's als de NVO's met twee doorgangen meer taxa gevonden dan in de controle locaties in het kanaal, echter was dit verschil alleen bij de NVO's met twee doorgangen significant (Dunn's Test, $p = 0,021$).

De soortensamenstelling langs NVO's verschilt van de soortensamenstelling langs de locaties met een steile oever (figuur 5). De groepering van de zes NVO's en de zes controle locaties werd in alle gevallen ondersteund door ANOSIM, zowel in totaal ($R = 0,527$, $p = 0,002$), als voor de individuele maanden juli ($R = 0,450$, $p = 0,016$) en september ($R = 0,486$, $p = 0,005$).



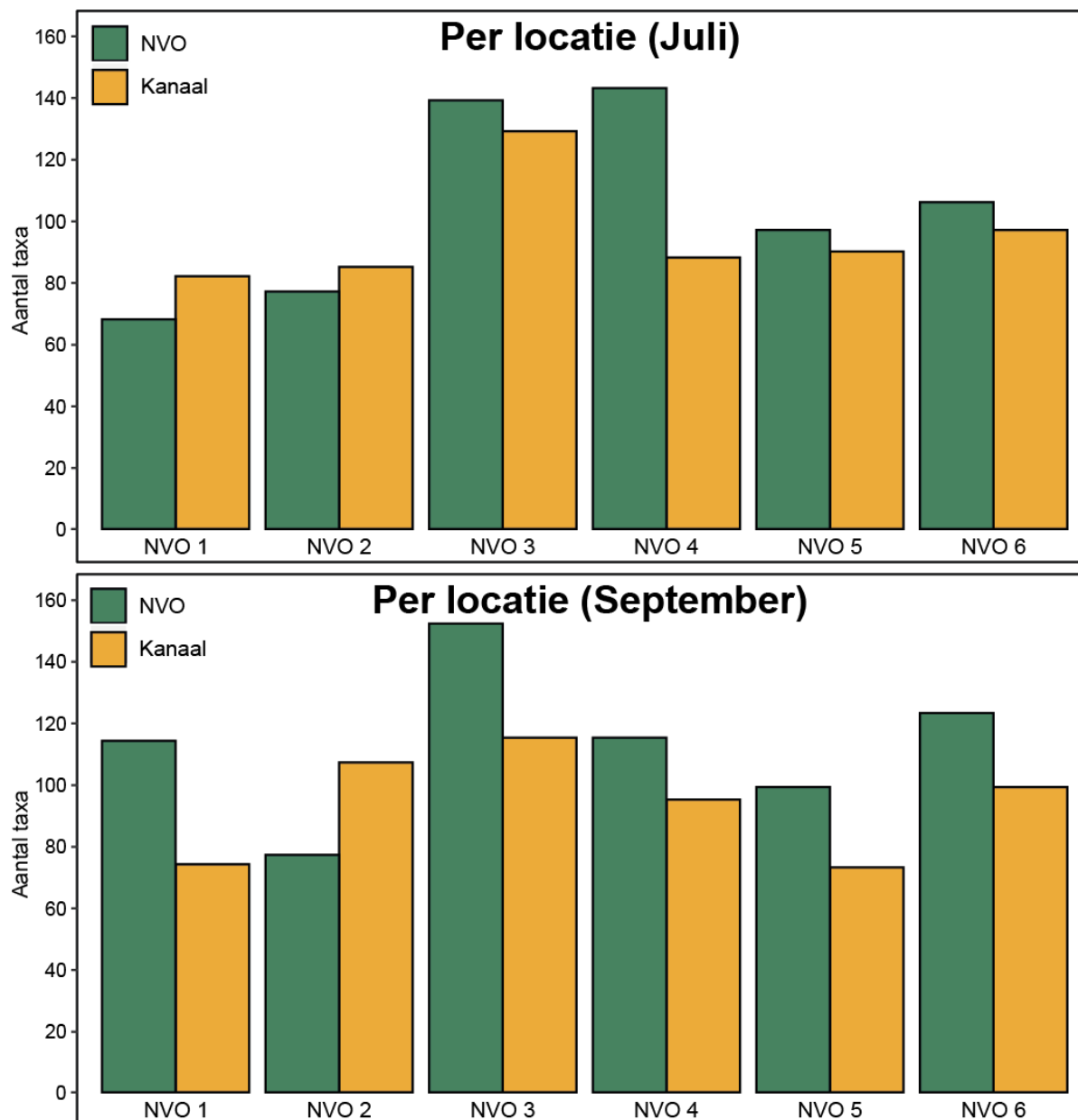
Figuur 4. Bar chart met het aantal vastgestelde taxa kiezelwieren Links) totaal voor de natuurvriendelijke oevers (NVO) en steile kanaaloevers (Kanaal), Midden) totaal voor juli en september, en Rechts) totalen voor NVO en kanaal per type NVO.



Figuur 5. NMDS plots voor het totaal aantal taxa kiezelwieren voor NVO en SO (Kanaal) en voor de maanden juli en september afzonderlijk.

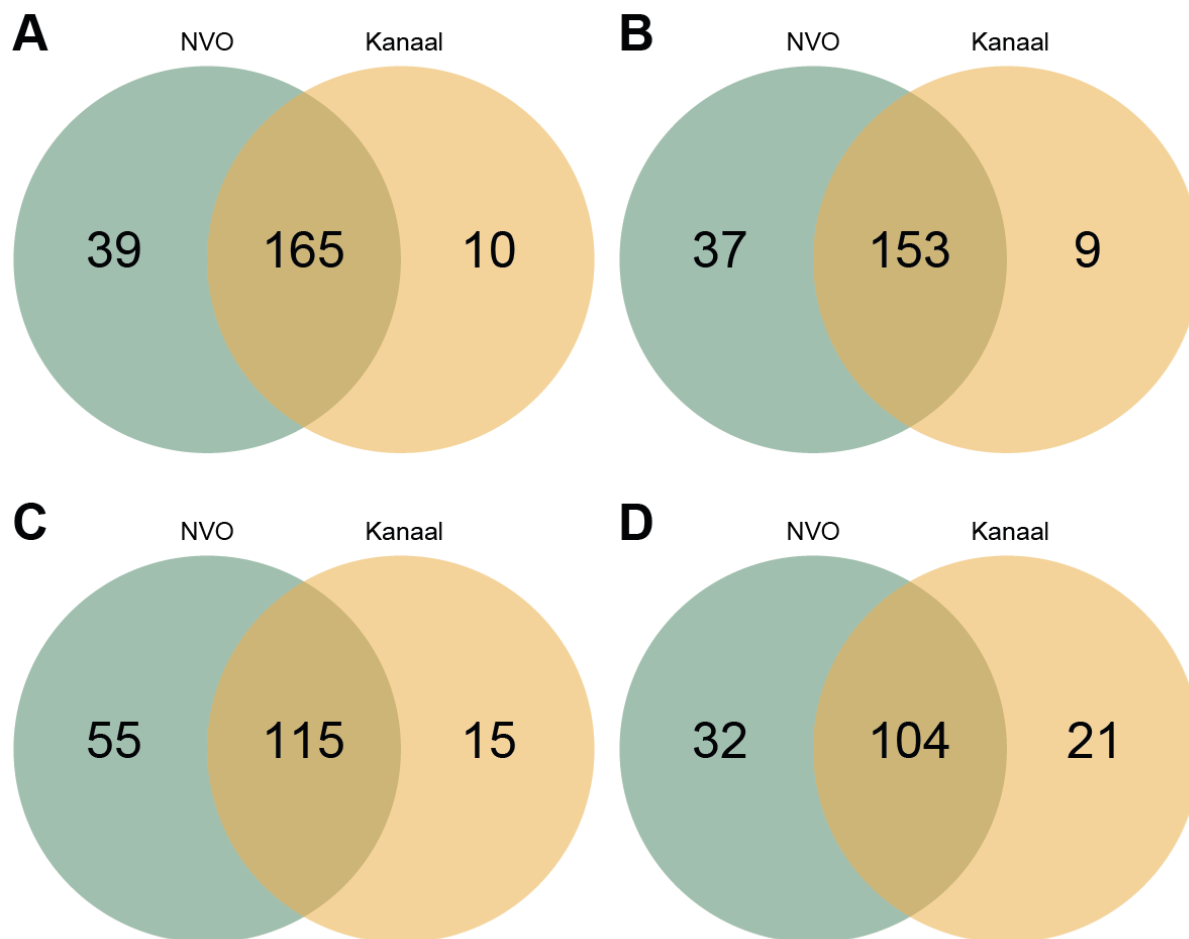
Toelichting op de NMDS plot. In een NMDS plot wordt de overeenkomst (of het verschil) in soortensamenstelling gevisualiseerd. In figuur 6 staan de bemonsterde locaties, zowel de NVO's (groen) als de controles (geel). De afstand tussen de punten is een maat voor de overeenkomst in soortensamenstelling; punten die dicht bij elkaar liggen vertonen meer overeenkomsten in soortensamenstelling dan punten die ver uit elkaar liggen. In bovenstaande plot zien we dat de natuurvriendelijke oevers niet mengen met de steile oevers, wat erop duidt dat de soortensamenstellingen van deze twee groepen verschillen. Dit is het geval voor de twee meetmomenten samen en ook voor de twee meetmomenten afzonderlijk. Een NMDS plot is een visualisatie om patronen te detecteren, of de soortensamenstelling werkelijk verschilt wordt vervolgens statistisch getoetst.

Uitgesplitst naar individuele locaties en maand variëren de aantallen en patronen (figuur 6). Zo zien we bij locatie 1 in juli meer soorten langs de SO dan langs de NVO. In september is dit juist andersom. Bij locatie 2 zien we in beide maanden meer soorten langs de SO dan langs de NVO. In juli worden de grootste aantallen soorten vastgesteld langs NVO3 en 4, in september vooral langs NVO 3.



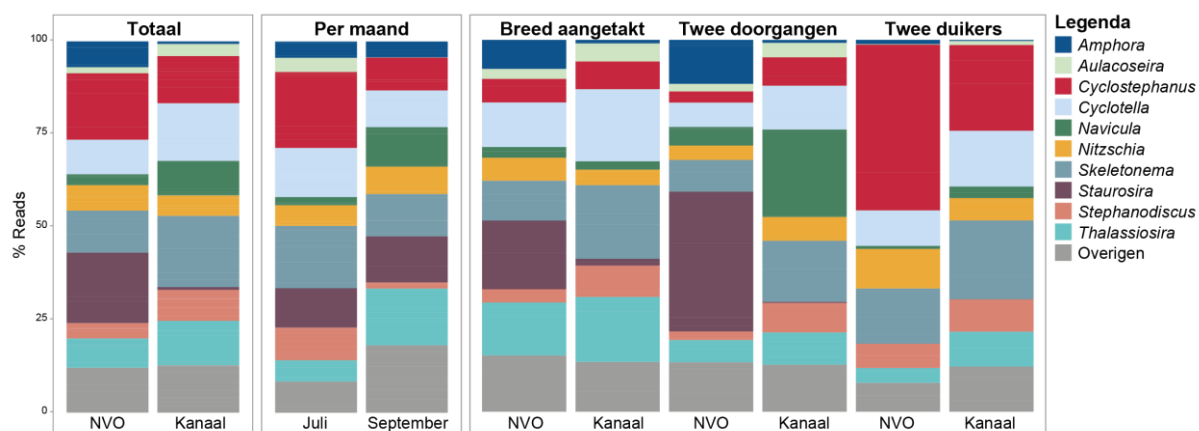
Figuur 6. Bar chart van de aantallen taxa kiezelwieren per locatie (NVO en SO) per maand.

De overlap tussen de soorten kiezelwieren langs NVO's en SO's is groot (Figuur 7); toch zijn 39 soorten soorten uniek voor de NVO's en komen dus op geen enkele locatie voor in een SO. Tien soorten zijn uniek voor de gecombineerde data van alle SO's. De overlap betreft 165 soorten. Voor de verschillende typen NVO's is het aantal unieke soorten het hoogst (55) voor NVO type 'twee doorgangen'.



Figuur 7. Venn diagram met overlappende taxa kiezelwieren voor NVO's (groen) en SO's (geel) voor A) Totaal, B) type 'breed aangetakt', C) type 'twee doorgangen' en D) type 'twee duikers'.

De DNA read abundanties van de tien meest voorkomende genera verschillen langs NVO en SO, tussen juli en september, en tussen de verschillende typen NVO's en hun nabijgelegen SO (figuur 8). De meest voorkomende genera langs de NVO zijn *Cyclostephanos* en *Staurosira*, langs de SO *Skeletonema* en *Cyclotella*.

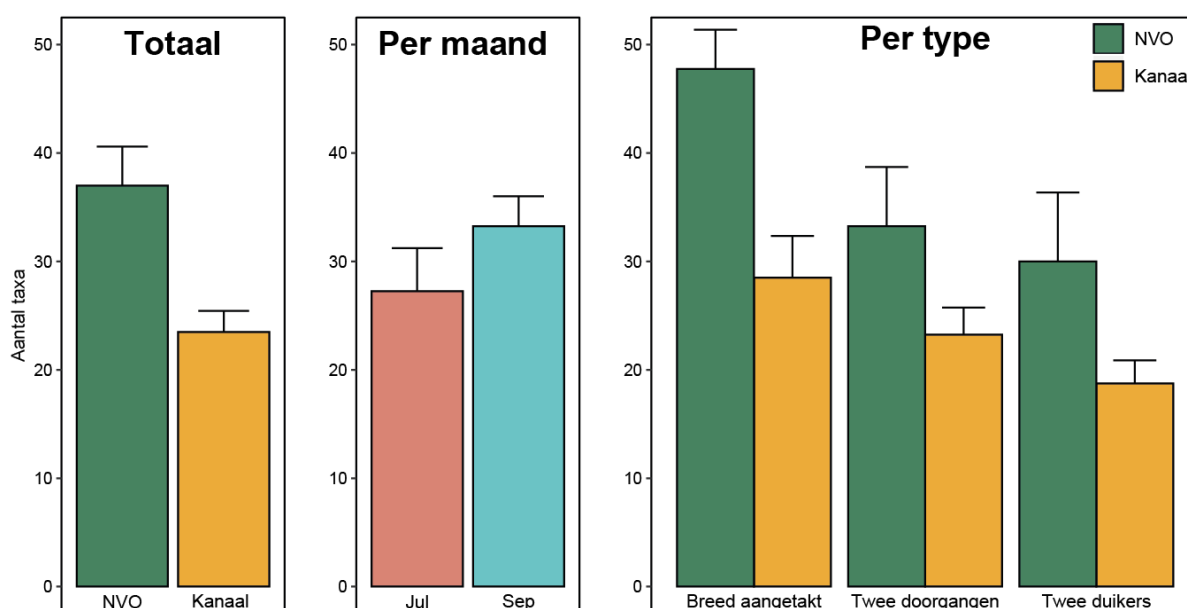


Figuur 8. Gestandaardiseerde DNA read abundanties van kiezelwieren voor A) totaal voor de natuurvriendelijke oevers (NVO) en steile oevers (Kanaal), B) totaal voor juli en september, en C) totalen voor NVO en kanaal per type NVO.

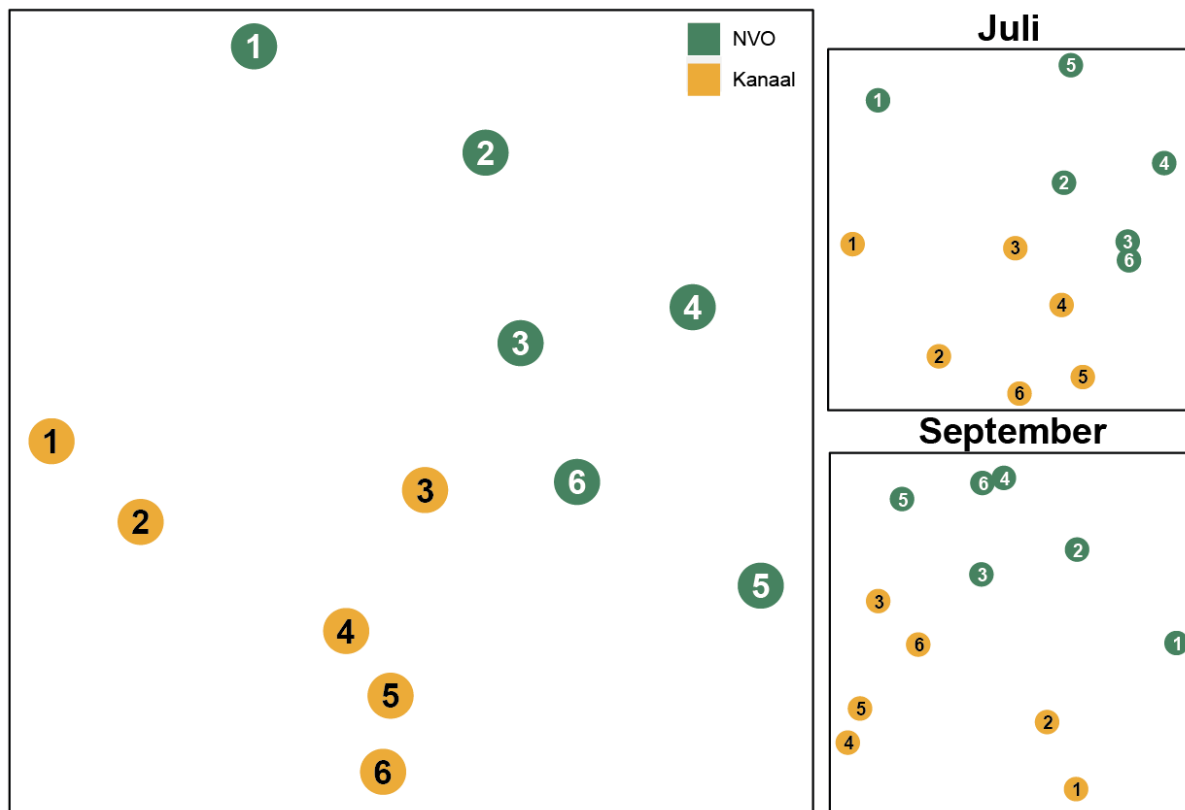
3.3 Patronen in soortensamenstelling dansmuggen

Langs natuurvriendelijk oevers werden significant (Dunn's Test, $p = 0,008$) meer soorten dansmuggen aangetroffen dan langs steile oevers (figuur 9). In september werden ook significant meer soorten gevonden dan in juli (Dunn's Test, $p = 0,016$). Voor de soortenaantallen per type werden voor alle drie de typen meer taxa gevonden in de NVO's dan in de controle locaties in het kanaal, dit verschil was alleen bij de breed aangetakte NVO's significant (Dunn's Test, $p = 0,021$).

Ook de soortensamenstelling langs NVO's verschilt van de soortensamenstelling langs SO's (figuur 10). De groepering van de zes NVO's en de zes controle locaties werd in alle gevallen ondersteund door ANOSIM, zowel in totaal $R = 0,532$, $p = 0,007$), als voor de individuele maanden juli ($R = 0,386$, $p = 0,005$) en september ($R = 0,633$, $p = 0,003$).

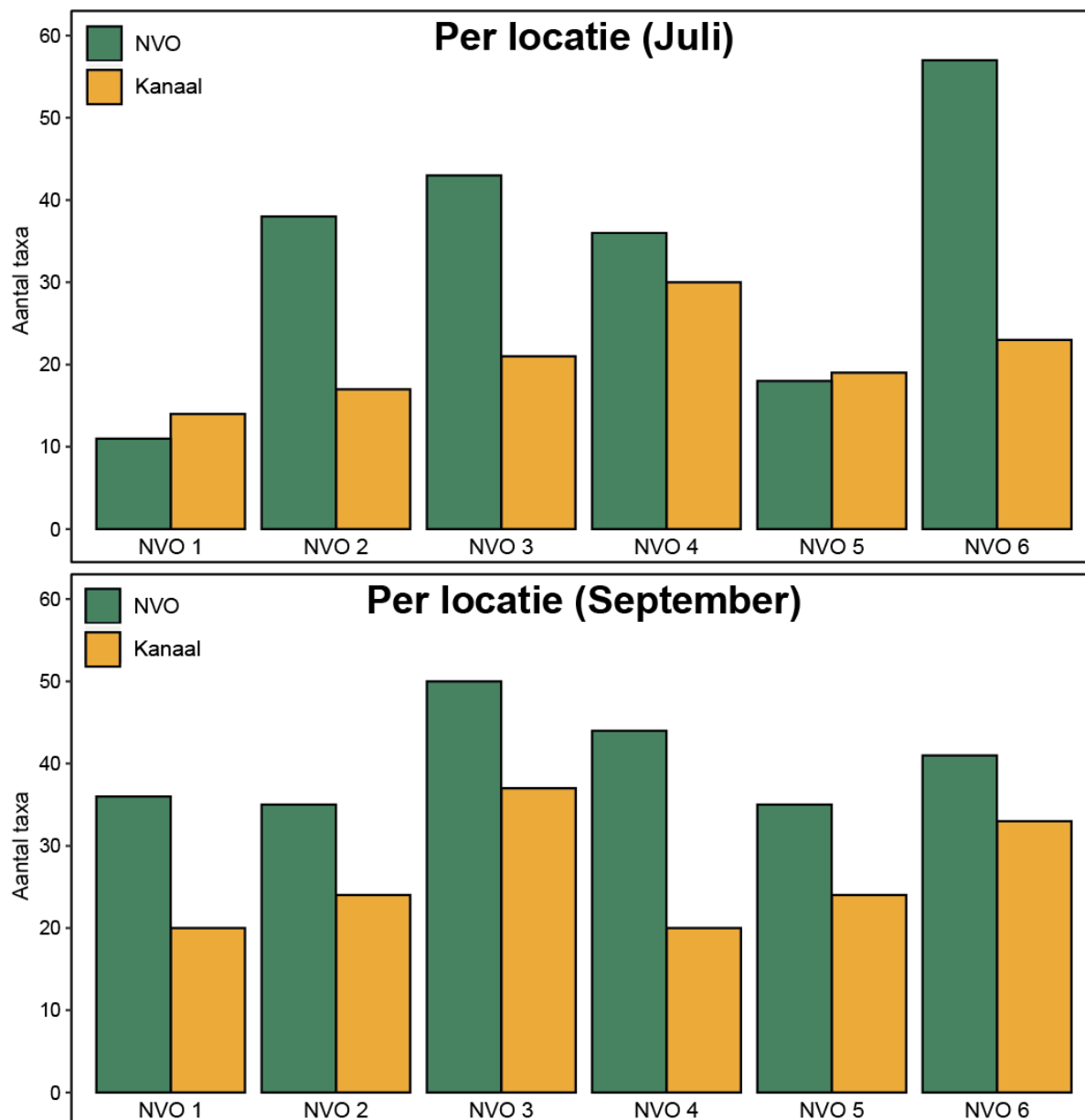


Figuur 9. Barchart met het aantal vastgestelde taxa dansmuggen A) totaal voor de natuurvriendelijke oevers (NVO) en steile kanaaloevers (Kanaal), B) totaal voor juli en september, en C) totalen voor NVO en kanaal per type NVO.



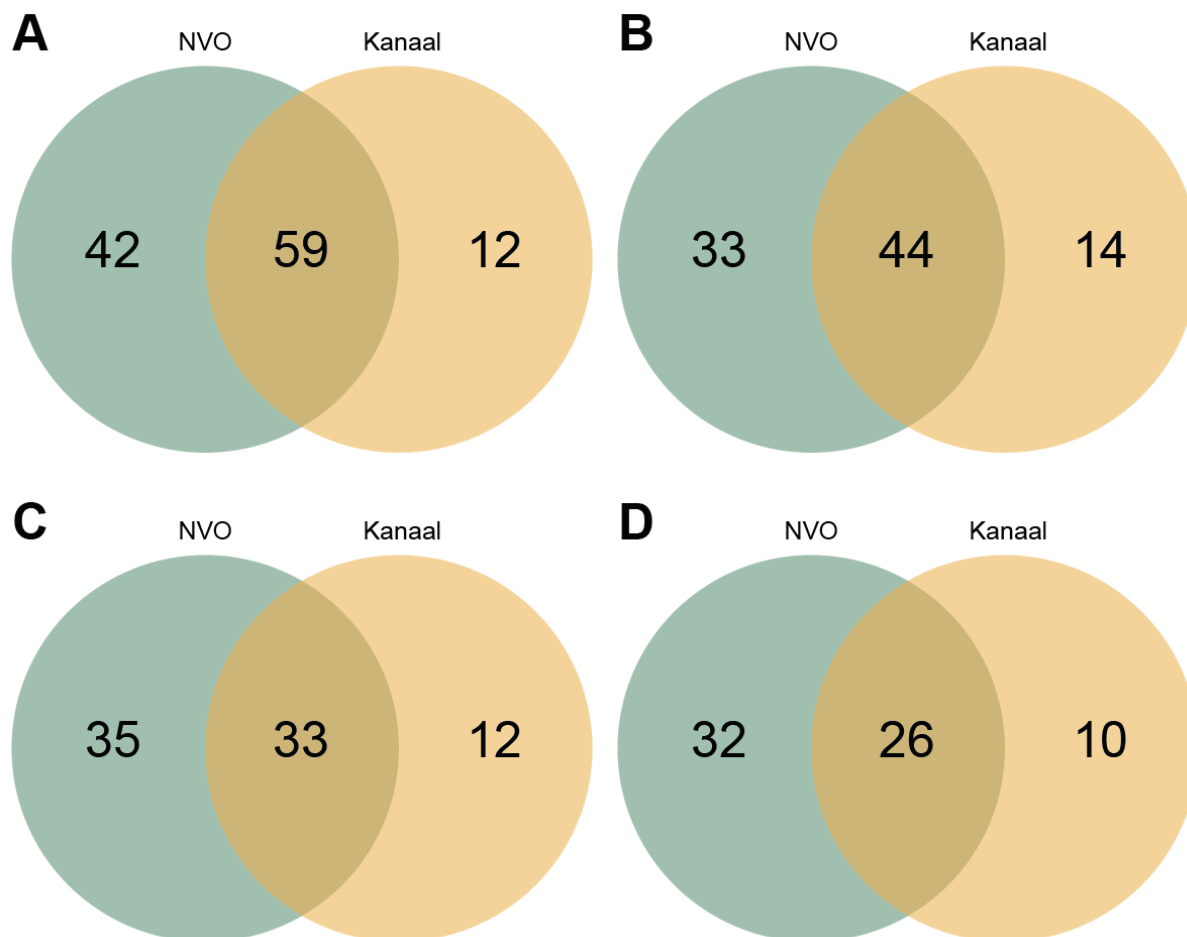
Figuur 10. NMDS plots voor het totaal aantal taxa dansmuggen voor NVO en SO (Kanaal) en voor de maanden juli en september afzonderlijk.

Uitgesplitst naar individuele locaties en maand variëren de aantallen en patronen (figuur 11). Zo zien we bij locatie 1 en 5 in juli meer soorten langs de SO dan langs de NVO. In september is dit bij geen van de locaties het geval. Bij locaties 2, 3 en 6 zien we in juli aanzienlijk meer soorten langs de NVO dan langs de SO, in september is dit verschil veel kleiner. In juli worden de meeste soorten gevonden langs NVO6, in september zijn de verschillen ten aanzien van de andere locaties kleiner en zijn meer soorten gevonden langs NVO3 en NVO4.



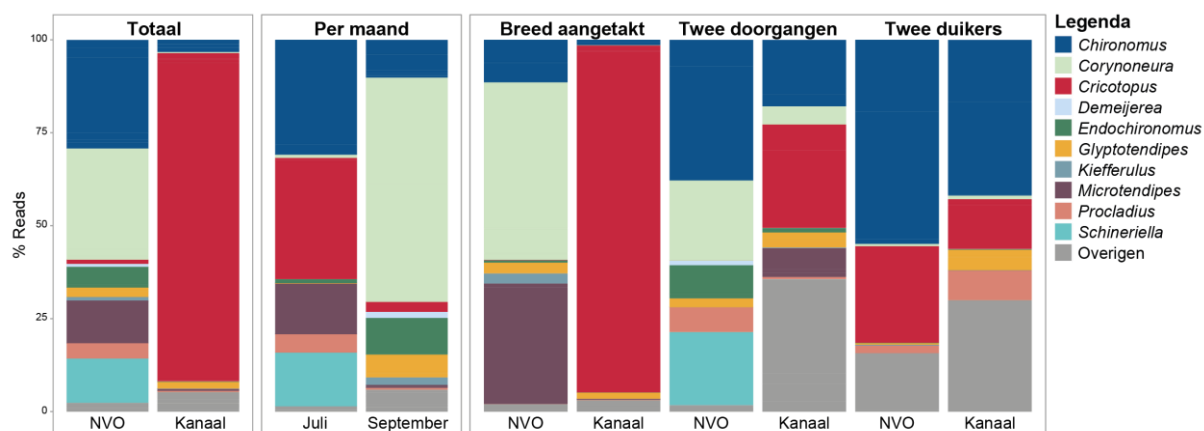
Figuur 11. Barchart van de aantallen taxa dansmuggen per locatie (NVO en SO) per maand.

De overlap tussen de soorten langs NVO's en SO's is minder groot dan bij de kiezelwieren (Figuur 12); 42 taxa zijn uniek voor de NVO's en komen op geen enkele locatie voor in een SO. Er zijn 12 taxa uniek voor de SO's. De overlap betreft 59 taxa. Voor de verschillende typen NVO's bedraagt het aantal unieke taxa 32 tot 35.



Figuur 12. Venn diagram met overlappende taxa dansmuggen voor NVO's (groen) en SO's (geel) voor A) Totaal, B) type 'breed aangetakt', C) type 'twee doorgangen' en D) type 'twee duikers'.

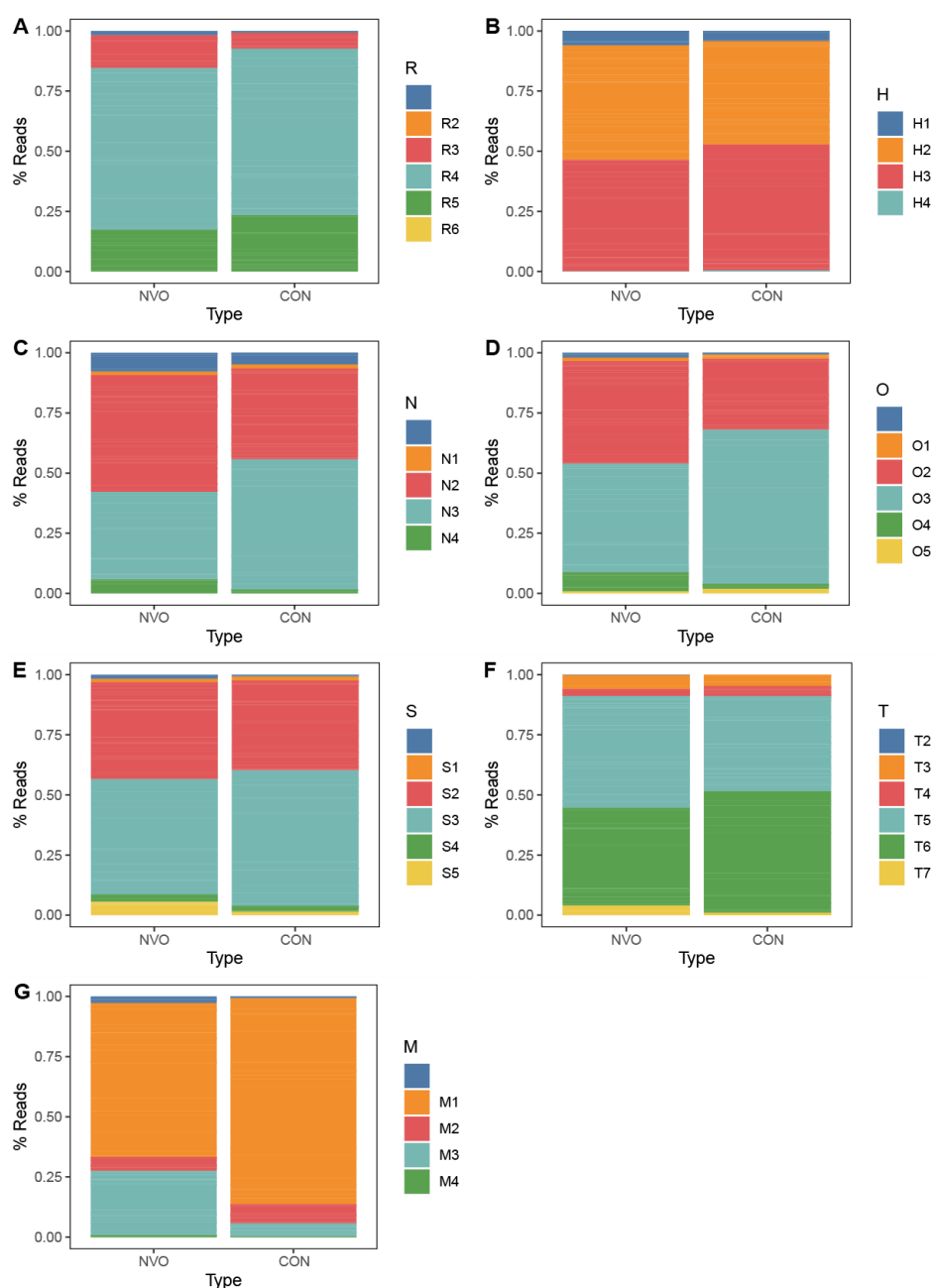
De DNA read abundanties van de tien meest voorkomende genera verschillen langs NVO en SO, tussen juli en september, en tussen de individuele NVO's en hun nabijgelegen SO (figuur 13). De meest voorkomende genera langs de NVO zijn *Chironomus* en *Coryneura*, langs de SO *Cricotopus*.



Figuur 13. Gestandaardiseerde DNA read abundanties van dansmuggen voor A) totaal voor de natuurvriendelijke oevers (NVO) en steile oevers (Kanaal), B) totaal voor juli en september, en C) totalen voor NVO en kanaal per type NVO.

3.5 Ecologische interpretatie kiezelwieren

Voorlopige resultaten van toepassing van de ecologische karakterisering van Van Dam (1994) laten subtiele verschillen zien in de verdeling van taxa over ecologische groepen tussen de natuurvriendelijke oevers en steile oevers. Langs steile oevers lijken de leefgemeenschappen een iets sterkere voorkeur te hebben voor een wat hogere pH, wat hogere saliniteit en hogere stikstofgehalten en voor wat lagere zuurstofwaarden. Voor stikstof, zuurstof, saprobie en trofie zijn er bij de NVO's zowel relatief wat meer taxa die indicatief zijn voor hogere waarden en ook relatief wat meer taxa die indicatief zijn voor lagere waarden. Dat kan te maken hebben met meer diversiteit in habitats bij NVO's (zowel meer zuurstofrijke als meer zuurstofarme omstandigheden). Bij steile oevers zijn relatief meer taxa aanwezig die indiceren voor een wat hogere saprobie en trofiegraad, en met een sterkere koppeling aan water.



Figuur 14. Ecologische karakterisering van kiezelwieren voor natuurvriendelijke versus steile oevers voor A) zuurgraad pH, B) zoutgehalte, C) stikstof, D) zuurstof, E) saprobie, F) trofische status en G) water afhankelijkheid.

4 Discussie, conclusies en aanbevelingen

Wat is de bijdrage van natuurvriendelijke oevers in het Omval-Kolhorn Kanaal aan de diversiteit van dansmuggen en kiezelwieren?

De resultaten laten zien dat zowel voor dansmuggen als kiezelwieren meer taxa voorkomen langs de natuurvriendelijke oevers dan langs de steile oevers. Dit duidt op een toename van biodiversiteit langs de natuurvriendelijke oevers. De steekproef is uiteraard beperkt tot het Omval-Kolhorn kanaal en tot een zestal locaties. Voor meer algemene uitspraken over de effecten van natuurvriendelijke oevers zou onderzoek van een groter aantal oevers op meer locaties in Nederland nuttig zijn.

Welke soorten zijn aanwezig langs de natuurvriendelijke en de steile oevers?

Langs de natuurvriendelijke oevers werden 204 taxa vastgesteld voor kiezelwieren en 101 voor dansmuggen. Langs de steile oevers werden 175 taxa vastgesteld voor kiezelwieren en 71 voor dansmuggen. De namen van de taxa met hun presentie langs de verschillende natuurvriendelijke en steile oevers staan vermeld in bijlagen 3 en 4.

Verschilt de soortensamenstelling tussen natuurvriendelijke en steile oevers?

De soortensamenstelling langs natuurvriendelijke oevers verschilt van die langs steile oevers, zowel voor kiezelwieren als dansmuggen. Dit verschil geldt wanneer je de kiezelwieren en dansmuggen bij elkaar optelt, maar ook wanneer je de taxonomische groepen afzonderlijk bekijkt, en wanneer je de taxonomische groepen voor juli en september apart bekijkt.

Verschilt het aantal taxa tussen verschillende NVO's en typen NVO's?

Het aantal waargenomen taxa van kiezelwieren en dansmuggen verschilt tussen de locaties. Zo werden in juli bijna tweemaal zoveel kiezelwieren taxa vastgesteld langs de natuurvriendelijke oevers van locatie 3 en 4 dan langs locatie 1. In diezelfde maand werden vijf maal zoveel taxa dansmuggen vastgesteld langs de natuurvriendelijke oever van locatie 6 dan langs locatie 1.

Ook tussen de typen zijn er verschillen. Zowel voor kiezelwieren als dansmuggen werden de meeste taxa vastgesteld langs het type 'breed aangetakt', de minste langs 'twee duikers', en het type 'twee doorgangen' zit daar tussenin. Dit patroon bleek niet alleen voor de natuurvriendelijke oevers, maar ook (grotendeels) voor de nabijgelegen steile oevers. Voor de dansmuggen was het verschil in aantal taxa tussen de natuurvriendelijke oevers en steile oevers per type groter dan voor kiezelwieren. Kiezelwieren zijn mogelijk minder afhankelijk van de natuurvriendelijke oever dan dansmuggen.

Het relatieve aantal unieke taxa dansmuggen neemt licht toe van het breed aangetakte type naar twee doorgangen naar twee duikers. Bij de kiezelwieren geldt dit ook voor de unieke soorten langs de steile oevers, maar worden de meeste unieke taxa langs natuurvriendelijke oevers bij het type twee doorgangen gevonden.

Concluderend lijkt er een positief verband te bestaan tussen de sterkte van de wateruitwisseling van de natuurvriendelijke oever met het kanaal en het aantal waargenomen taxa langs de natuurvriendelijke oever, en een negatief verband met het relatieve aantal unieke soorten langs de steile oever.

Verschilt het aantal taxa tussen twee meetmomenten?

De aantallen waargenomen taxa verschillen tussen de twee meetmomenten. Voor kiezelwieren werden in september iets meer soorten gevonden dan in juli. Voor dansmuggen is dit patroon nog sterker. We hebben hier vooralsnog geen verklaring voor.

Voor individuele locaties zijn er eveneens duidelijke verschillen tussen de maanden, en kan het per maand variëren waar de meeste taxa worden gevonden, langs de natuurvriendelijke oever of langs de steile oever. Zo werden in juli op locatie 1 meer soorten kiezelwieren aangetroffen langs de steile oevers dan langs de natuurvriendelijke oevers, in september was dat andersom en met een groter verschil. Voor de dansmuggen werden slechts op één locatie in juli iets meer soorten langs een steile oever aangetroffen.

Sluiten de resultaten aan bij die van de vismonitoring door RAVON?

De algemene resultaten van deze studie sluiten gedeeltelijk aan bij de resultaten van RAVON. RAVON heeft eDNA onderzoek uitgevoerd naar vissen en trof meer soorten aan langs de natuurvriendelijke oevers dan in het kanaal (respectievelijk 22 en 19). Voor kiezelwieren en dansmuggen vonden wij ook meer taxa langs de natuurvriendelijke oevers.

De eDNA resultaten zijn door RAVON niet uitgesplitst naar de verschillende typen NVO's, maar de resultaten van conventionele monitoring wel. De meeste vissoorten (19) werden aangetroffen in de meest geïsoleerde typen 'twee duikers' en 'twee doorgangen', de laagste aantallen soorten (17) in type 'breed aangetakt'. De hoogste dichtheden aan vis werden aangetroffen in type 'twee duikers', daarna in type 'twee doorgangen' en dan in 'breed aangetakt'. Voor kiezelwieren en chironomiden vonden we de hoogste aantallen taxa juist in type 'breed aangetakt' en de laagste aantallen in type 'twee duikers'. Naar DNA concentraties is niet gekeken.

In hoeverre is eDNA een geschikte techniek voor beantwoording van de onderzoeksvraag?

Uit deze studie blijkt dat kiezelwieren en dansmuggen in voldoende mate met eDNA zijn te detecteren om ecologische patronen vast te stellen. Analyse van eDNA toont verschillen in soortensamenstelling tussen natuurvriendelijke oevers en steile oevers, tussen verschillende typen natuurvriendelijke oevers, en tussen individuele locaties en meetmomenten. Een aanbeveling is om meer onderzoek te doen om de resultaten te kunnen generaliseren. Het onderzoek zou herhaald kunnen worden op dezelfde locatie, of liever nog worden opgeschaald naar andere kanalen.

Literatuur

- Beentjes, K. K., Speksnijder, A. G. C. L., Schilthuizen, M., Hoogeveen, M., & van der Hoorn, B. B. (2019). The effects of spatial and temporal replicate sampling on eDNA metabarcoding. *PeerJ*, 7, e7335. <https://doi.org/10.7717/peerj.7335>
- Bista, I., Carvalho, G. R., Walsh, K., Seymour, M., Hajibabaei, M., Lallias, D., ... Creer, S. (2017). Annual time-series analysis of aqueous eDNA reveals ecologically relevant dynamics of lake ecosystem biodiversity. *Nature Communications*, 8, 14087. <https://doi.org/10.1038/ncomms14087>
- Herder J.E. & Kranenbarg J. (2018) Effectiviteit van natuurvriendelijke oevers voor vis in het Omval-Kolhorn Kanaal. RAVON rapport 2017-052.
- Ogle, D. H., Wheeler, P., & Dinno, A. (2017). FSA: Fisheries Stock Analysis. R package version 0.8.25, <https://github.com/droglenc/FSA>
- Oksanen, J., Kindt, R., Legendre, P., & O'Hara, R. (2007). Vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-5. <https://www.rdocumentation.org/packages/vegan>
- Pillot, H. K. M. M., & Buskens, R. F. M. (1990). De larven der Nederlandse Chironomidae (Diptera). Deel C: Autoekologie en verspreiding. (The larvae of the Dutch Chironomidae (Diptera). Part C: Autecology and distribution. *Ned. faun. Meded.* 1C.
- Van Dam, H., Mertens, A., & Sinkeldam, J. (1994). A coded checklist and ecological indicator values of freshwater diatoms from The Netherlands. *Netherlands Journal of Aquatic Ecology*, 28(1), 117–133. <https://doi.org/10.1007/BF02334251>
- Van Dijk TC, Van Staalduinen MA, Van der Sluijs JP. 2013. Macro-invertebrate decline in surface water polluted with imidacloprid. *PLoS ONE* 8:e62374. DOI: 10.1371/journal.pone.0062374.
- Vasselon, V., Rimet, F., Tapolczai, K., & Bouchez, A. (2017). Assessing ecological status with diatoms DNA metabarcoding: Scaling-up on a WFD monitoring network (Mayotte island, France). *Ecological Indicators*, 82(March), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.06.024>
- Vasselon, V., Rimet, F., & Bouchez, A. (2018). R-Syst::diatom_rbcl_align_312bp database: A database adapted to DNA metabarcoding (version v7: 23-02-2018). <https://doi.org/https://doi.org/10.15454/HYRVUH>
- Wickham, H. (2016). ggplot2: elegant graphics for data analysis. R package version 3.2.1. <https://ggplot2.tidyverse.org>

Bijlagen

Bijlage 1 Coördinaten van NVO's en steile oevers

Locatie	Type	Natuurvriendelijke oever	Steile kanaaloever
NVO1	Twee duikers	52.781059, 4.892489	52.782915, 4.894506
NVO2	Twee duikers	52.776943, 4.890471	52.770011, 4.892075
NVO3	Breed aangetakt	52.727313, 4.872049	52.727911, 4.870461
NVO4	Twee doorgangen	52.723043, 4.857021	52.722959, 4.855390
NVO5	Twee doorgangen	52.718721, 4.842860	52.719494, 4.841615
NVO6	Breed aangetakt	52.717495, 4.829486	52.717924, 4.829958

Bijlage 2 Foto's van NVO's en steile oevers

Van boven naar beneden van NVO1 tot en met 6. De linker foto's betreffen de natuurvriendelijke oevers, de rechter oevers de nabijgelegen steile kanaaloevers.





Bijlage 3 Aantallen DNA reads van kiezelwieren per locatie

Taxon	NVO1	CON1	NVO2	CON2	NVO3	CON3	NVO4	CON4	NVO5	CON5	NVO6	CON6
Acanthoceras	11	19	7	3	1	13				6	2	1
Achnanthidium												
Achnanthidium eutrophilum	2	1		2	15	11	1	1		15	17	31
Achnanthidium minutissimum / pyrenaicum					5	1	27				2	
Achnanthidium minutissimum / pyrenaicum / subatomus											12	
Amphora	889	24	89	60	1700	173	6555	244	702	63	2179	250
Amphora copulata	116		9		22	2	620				1001	1
Amphora copulata / ovalis	3				13	2	32				72	
Amphora copulata / ovalis / pediculus	639	41	71	122	1521	192	3383	380	944	105	3132	408
Amphora copulata / pediculus	13			1	36		96		14		85	2
Amphora ovalis	25	2		15	76	17	40	8	65	13	364	31
Amphora pediculus			3	11	1465	81	7558	81	641	20	767	40
Amphora pediculus / aff atomoides			2	3	74		304	5	4		83	9
Anomoeoneis fogedii / sculpta / sphaerophora	2				21		56		12		13	
Arcocellulus	1	4		1			1				1	
Asterionellopsis	14	16	4	1	5	14	1	8				
Asteroplanus										8	1	13
Attheya	177	336	204	376	647	562	214	535	805	222	361	206
Aulacoseira	44	226	76	345	2076	3065	1240	1530	328	448	215	424
Aulacoseira ambigua	23	253	80	418	1496	2058	560	1104	359	554	138	314
Aulacoseira granulata	12	45	24	57	418	368	1048	851	85	179	39	73
Bacillaria	1		2		122		15		19		47	

Bacillaria paxillifera	32				179		1	19	80		224	12
Brachysira	5	8	11	21	49	30	334	101	49	85	29	40
Caloneis	110	401	13	228	132	163	271	92	223	153	145	179
Caloneis amphisbaena	1		49				80				173	8
Caloneis fontinalis				1	1	5	45		33		30	
Caloneis silicula					1		16			3	1	
Chaetoceros calcitrans		12										
Chilomonas	118	609	101	394	276	744	674	711	505	1114	696	583
Cocconeis	9				149	18	1	3	18	13	6	12
Cocconeis placentula									1			
Conticribra	74	88	134	424	110	145	9	17	11	8	18	14
Conticribra weissflogii	3	58	13	791	241	352	3	13			13	16
Coscinodiscus												
Craticula	2		6		20	4	22					
Craticula cuspidata	37		12		59		531					
Craticula subminuscule	28	1		23	5	4		4	25			
Ctenophora pulchella	28			31	112	30					2	
Cyclostephanos	9412	4575	11282	3597	1690	1131	685	851	549	1177	1049	1346
Cyclostephanos dubius	3175	925	3639	311	90	43	32	33	29	79	60	67
Cyclostephanos dubius / invisitatus	13302	9929	34970	8676	4759	2338	2102	2179	1925	4718	2495	4606
Cyclotella	9017	6125	6802	11241	3360	3637	5397	3747	6376	9926	15902	20858
Cyclotella meneghiniana	155	201	319	764	39	69	58	17	48	66	116	87
Cylindrotheca	9		1									
Cymatosira	2	2		1			2		1		2	
Cymbella		2		3	43	25	2	55		14	21	3

Cymbella aspera					39		29				638	
Cymbella baicalensis / proxima / stuxbergii					136							
Cymbella helvetica	1	2		3	15	39		208		66		14
Cymbella helvetica / lanceolata				71	264	291	3	145	5	107	142	8
Cymbella lanceolata					5	4						
Cymbella neocistula		2	2	4	2	18	1	8		14	1	34
Cymbella tumida		43		38	210	57	3	346		157	25	45
Cymbopleura inaequalis							642					
Diadmesmis		2						2				
Diatoma		1				18				4		2
Diatoma moniliformis / tenuis					1	4	1	15		35		14
Diatoma vulgaris		7		14	2	336		27		199		40
Dinobryon	259	555	814	817	1196	1449	6897	524	254	631	68	309
Discostella	352	338	468	214	103	89	46	52	40	36	48	56
Discostella nipponica	284	271	253	228	236	174	58	113	28	21	19	28
Discostella nipponica / stelligera	377	1928	1233	1156	721	523	493	533	261	282	147	233
Discostella pseudostelligera	1174	612	2150	375	18	3	5	3	3		1	1
Discostella stelligera	39	46	30	22	1	5	1	2	3			5
Ellerbeckia					5		5					
Encyonema								2				
Encyonema caespitosum		1			1			7	11	5		7
Encyonema minutum / silesiacum / ventricosum				6	7	10	4	41		16		6
Entomoneis	1	4	18	6							2	

Epithemia			3		955	1						
Epithemia sorex / turgida					1		1		1			
Eunotia		10				3	107	4		18	2	6
Eunotia bilunaris						2						
Eunotia glacialis							15				4	
Extubocellulus cribriger												1
Fallacia							5	2		17		7
Fallacia monoculata											1	
Fistulifera	10	2	2	11	13	7	71	13	2	14	12	11
Fistulifera saprophila	12	3	21	2	14	18	5	2	4	1	21	18
Fragilaria	116			13	27	12		84		3		1
Fragilaria gracilis / rumpens / subconstricta			1	1		1		1				
Fragilaria radians					71	15	17		1		6	
Frustulia			2		1	2	1		6	4		5
Frustulia vulgaris												4
Gomphonema	1379	156	38	693	2940	2754	2358	721	538	335	489	189
Gomphonema bourbonense	6		1	22	27	1	11					
Gomphonema capitatum		6	5	14	45	42	14	15		19	14	13
Gomphonema intricatum			1	3	183	4	427				94	
Gomphonema lagenula	1				2	10	6				5	1
Gomphonema micropus							53					
Gomphonema narodoense / parvulum	33			12	80	61	13	5	4		15	2
Gomphonema parvulum	19			6	21	16	10	6	2		7	
Gomphonema parvulum / saprophilum	291	2	1	79	200	489	218	118	25	4	59	9

Gomphonema pumilum	264	1	1	148	579	165	175	57	163	3	81	
Gomphonema pumilum / subclavatum					33	4	2				2	
Gomphonema rosenstockianum					21	7						
Gomphonema saprophilum	1							7				
Gyrosigma	1				4		66		3			
Gyrosigma acuminatum	31	2	13		39		510		29		26	
Halamphora				8	40	38	4					
Halamphora coloradiana					3							
Hantzschia												6
Haslea howeana	69		2			7		170	5		7	56
Hippodonta	7			1	14	3	54	132	1	2	31	1
Hippodonta capitata	23	1	3	4	90		211	3	20		123	6
Hyalosira	3	13		7		9	6		3	8	4	
Iconella	21	5	10	154	1		2	2	2	56	2	4
Iconella bifrons / capronii	1			130						2	25	2
Iconella splendida				2					62	21	10	
Karayevia												
Karayevia ploenensis	17	2			12		111	1	4		2	4
Lemnicola					13		1					
Lemnicola hungarica		3		21	281	145	45	3			8	
Luticola ventricosa							1					
Mayamaea	15	2		1	3	4	25	19	3	7	2	
Mayamaea permitis	9			8	30	51	38	39	5		42	
Melosira		2		5	30	53	2	214	1	2	16	2
Melosira varians		27	10	94	313	317	94	1618	48	38	113	58

Minutocellus polymorphus											1	
Navicula	929	1826	250	1716	1380	1658	3104	22028	688	758	1101	550
Navicula agatkae / rhynchotella / slesvicensis	3			1	14						3	
Navicula antonii	1	3	4	290	570	468	1100	1710	45	38	257	70
Navicula capitatoradiata	25			4	129	25	16	5	5		170	8
Navicula capitatoradiata / radiosa					101	2	3000		7		105	7
Navicula cincta / germanii	4											
Navicula cryptocephala			8		32	4						
Navicula cryptocephala / trivialis					87		36				132	
Navicula cryptotenella					1		162					
Navicula germanii			1	1	5	5	1	3067				
Navicula gregaria	93		2		110	1	22	3	2		49	
Navicula incertata / tsukamotoi	116										6	1
Navicula phyllepta					3							
Navicula salinarum					3		1	2				
Navicula slesvicensis					8						1	2
Navicula veneta	98		2	21	215	105	398	103	325		288	26
Neodelphineis									1			
Nitzschia	4320	2020	5107	1489	1119	1212	2153	3497	1752	1983	4748	1318
Nitzschia acicularoides	3				76	58	9	3		3	9	4
Nitzschia acicularoides / draveillensis / aff fruticosa	81	62	54	358	369	295	82	154	138	681	167	741
Nitzschia amphibia				14	123	35	56	2	17		23	2
Nitzschia amphibia / denticula					15	2	8		8			

Nitzschia capitellata	299	60	217	53	118	34	259	20	66	80	444	100
Nitzschia communis	4				3		89		20	6		
Nitzschia dissipata	3		1	42	40	61		283	6	9	4	7
Nitzschia dissipata / sublinearis						4		42				8
Nitzschia filiformis	1			32	116	10		207		17	2	70
Nitzschia fonticola		2		10	36	85	35	19	15	14	25	21
Nitzschia frustulum					5							
Nitzschia gracilis	859	1119	3400	1264	33	35	4	13	7	20	11	38
Nitzschia inconspicua	1			1	30	30	13		6		20	
Nitzschia linearis	177	102	12	25	170	100	744	17	34	170	572	235
Nitzschia microcephala						1					10	2
Nitzschia palea	1381	398	1878	267	157	72	236	28	199	103	337	91
Nitzschia paleacea				2	13	30		2		2	7	2
Nitzschia paleacea / pusilla	63	1	2	20	124	136	28	26	3	16	61	37
Nitzschia pusilla	12	1	3	15	84	239	79	8	3	22	667	12
Nitzschia sigma	1				3						2	
Nitzschia sigmoidea	13				1		466		105		214	137
Nitzschia supralitorea	78	24	108	25	77	28	178	11	22	40	97	93
Opephora					25	3	3		31			
Pinnularia	11	40	7	66	61	81	46	165	31	85	46	63
Pinnularia brebissonii	6		1									
Pinnularia neglectiformis / cubcommutata / viridiformis			3		13							
Pinnularia neomajor / viridiformis					3		387		1			
Placoneis elginensis	1						62				1	
Placoneis paraelginensis							11					

Planothidium					134	32	46		20		1	
Planothidium caputium				1	248	39	365		29		97	4
Planothidium caputium / naradoense					50	14	78		7			
Planothidium frequentissimum	5				58	3	234		13		31	
Planothidium lanceolatum							88				3	
Planothidium suncheonmanense											3	1
Pleurosira	1393	36		2	60	1		2969		5		12
Psammodictyon	1	26		24	10	39	29	27	11	58	45	28
Reimeria sinuata							20					
Rhoicosphenia					120	1	118		32		1	
Sellaphora	12	22	3	58	80	112	451	47	57	44	89	30
Sellaphora auldreekie / pupula							127				168	
Sellaphora bacillum / pupula							2				4	
Sellaphora blackfordensis / pupula					25		171		3		25	
Sellaphora joubaudii					5		30		48			
Sellaphora lanceolata												
Sellaphora minima	2				43	3	6	18	6		82	5
Sellaphora pupula							2					
Sellaphora seminulum					5	4	87	6	112	5	15	
Skeletonema	11841	13918	13388	11736	11000	15022	9584	10202	5425	8848	6130	10322
Staurosira		1	4	1	9532	743	1524	16	9974	64	4	1
Staurosira brevistriata			2		17044	1041	4609	28	49160	257		28
Staurosira construens	5		1	2	236	17	52	2	230	2		
Staurosira construens / martyi				1	261	8	560		249			1

Staurosira elliptica / venter					5		5					
Staurosira venter					2947	433	3	4	80			2
Stephanodiscus	1802	1012	1781	861	452	499	148	367	628	1615	1163	1838
Stephanodiscus hantzschii / minutulus / neoastraea	3267	2471	2506	3210	307	360	132	140	211	715	118	648
Stephanodiscus minutulus	401	284	389	314	117	94	28	33	316	91	40	91
Stephanodiscus minutulus / neoastraea	105	81	107	45	26	21	4	14	23	109	39	108
Stephanodiscus neoastraea	109	633	113	583	736	1064	251	824	1144	3902	1614	4137
Stephanodiscus suzukii	313	427	264	527	527	379	262	332	1000	1167	781	1563
Surirella	1	3	2		57	1	10		56	2	242	58
Surirella elliptica / solea	25		1		173	9	74		304		335	92
Surirella minuta / ovalis / striatula	10	1	1		4		16	4	2	12	300	13
Surirella solea	13	9	24	21	115	1	78	6	54	6	587	17
Tabularia	14	3	6	44	710	97	319	64	18	7	35	14
Thalassiosira	2348	1216	628	2531	4354	4002	1621	1756	1135	941	1610	1267
Thalassiosira gessneri												1
Thalassiosira guillardii	46	33	4	161	65	83	8	25	15	6		6
Thalassiosira minima	180	93	69	52	31	24	21	38	3	2	1	2
Thalassiosira minuscula	35	11	21	8	3	1		1	1	3	10	8
Thalassiosira nodulolineata	160	59	49	89	45	85	10	100	601	966	876	2037
Thalassiosira pseudonana	498	1753	625	5216	13000	11589	4610	3650	2580	2865	3170	3467
Thalassiosira spinulifera	1972	220	235	80	9	8	2	5	1			3
Tryblionella	275	18	89	25	263	18	578	17	44	14	1507	35
Tryblionella apiculata	13		4		68	1	76	2	15		127	

Ulnaria	1	14	5	315	524	922	38	56	6	25	55	6
Ulnaria acus / ulna	35	63	32	384	430	481	115	25	15	40	183	22
Ulnaria ulna		42	28	1376	1775	3009	365	442	12	191	288	62
Urosolenia		8		8	3	33	3	10	1	4	6	1

Bijlage 4 Aantallen DNA reads van dansmuggen per locatie

[illegible]

Clinotanypus nervosus			4				15				45	
Corynoneura	70		6		11575	6	9	20	58797		62946	23
Corynoneura carriana				6	12	11	2	267			1	
Corynoneura gratias				10	1643	32	1				1	
Corynoneura scutellata	9		25	21	53	10	18			4	27	
Corynoneura scutellata agg	5					9			6		1	14
Cricotopus	1637	30	2344	3	16	282	1	16	1	14	9	335
Cricotopus intersectus	988	408		66	28	11719 3		109		374		1659
Cricotopus reversus										40	1	
Cricotopus sylvestris	36		24	16	42	37	7	990	5	119	47	19
Cryptochironomus	18										24	
Cryptochironomus obreptans / supplicans	1961		156		124	26	49		2	4	597	41
Cryptochironomus redekei			1									
Cryptochironomus supplicans	12			36	9		4	4		11	112	63
Cryptotendipes usmaensis										7	5	76
Demeijerea rufipes						6	3492	4				
Dicrotendipes					3		336					
Dicrotendipes nervosus	22	247		286	104	255	4	140		328	99	505
Dicrotendipes notatus					1		2					
Dicrotendipes tritonus					2							
Einfeldia											7	
Einfeldia carbonaria	16		4		10						18	
Einfeldia dissidens	10		27		7		7				67	
Endochironomus						2	888		3547		60	

Endochironomus albipennis	9	2	3	7	1	21		2	6		1	1
Endochironomus dispar / impar					19		2349	9			16	
Endochironomus tendens			7		15	15	63	3	17501	55	897	
Glyptotendipes							59				16	
Glyptotendipes cauliginellus			1		25	2040	6286	12		11	4551	7
Glyptotendipes glaucus / pallens	8	77	44	74	72	18	4	68	221	123	15	51
Glyptotendipes paripes	14	29	15	36	11	4		16			7	18
Glyptotendipes signatus								13				
Harnischia curtilamellata												10
Kiefferulus						2			1		1272	
Kiefferulus tendipediformis			39				22	12	7		3040	2
Limnophyes cf bidumus									6			
Limnophyes natalensis	6											
Limnophyes pumilio		3		3				1		22		64
Microchironomus tener	17	19	62	3						60		
Micropsectra junci							14					
Microtendipes					1040		4		1	2	385	
Microtendipes chloris					1816		1				21	
Microtendipes chloris / pedellus	2	1	9		47386	64	44	74	9	101	1024	21
Microtendipes pedellus / pedellus agg					6	2		25	2	258	119	187
Mollerella						9						
Nanocladius bicolor / dichromus / distinctus			1						2		7	
Neozavrelia		54		42		92		177		934	6	375

[illegible]

[illegible]