

# Eindrapportage Fase 1



**November 2023**

**Auteurs**

Paul Brouwer  
Kees van Bochove  
Yuki Fujita

**Projectteam**

Datura: Kees van Bochove, Maria Meijer, Erwin Roze  
OPG: Joukje Bosch  
Eric Brinckmann  
NMI: Yuki Fujita, Brent Riechelman, Gerard Ros  
De Baai: Paul Brouwer

# Inhoud

.....	1
Inhoud.....	3
1. Samenvatting .....	6
2. Inleiding .....	8
2.1 Aanleiding en doelstelling .....	8
2.2 Leeswijzer .....	9
3. eDNA onderzoek.....	10
3.1 Inleiding .....	10
3.2 Materiaal en methode.....	11
3.2.1 Veldonderzoek en bemonstering.....	11
3.2.2 fysisch-chemische analyses .....	13
3.2.3 eDNA metabarcoding analyse .....	14
3.2.4 Kwalificatie van graslandpercelen.....	16
3.2.5 Bodemkwaliteit beoordeling met Open Bodem Index.....	17
3.2.6 Statistische analyse.....	17
3.3 Resultaten .....	18
3.3.1. Beoordeling van bodemkwaliteit met OBI.....	18
3.3.2 Verkennende analyse van regenwormen en PLFA data.....	18
3.3.3 Effect van bodemsoort en beheer op bodemleven .....	20
3.3.4 Verkenning van potentiële indicatoren op basis van eDNA.....	24
4. Cheaptech sensoren .....	70
4.1 Inleiding .....	70
4.2 Methoden .....	70
4.2.1 Beschrijving van de percelen .....	70
4.2.2 Chemische metingen .....	72
4.2.3 Fysische metingen .....	73
4.2.4 Biologische metingen .....	74
4.3 Meetsysteem .....	75
4.4. Validatie Netwerk .....	76
4.4.1 Algemeen.....	76
4.4.2 Validatie Meetkasten .....	78
4.4.3. Down-time .....	78
4.4.4 Netwerk sterkte .....	79
4.4.5 Conclusie.....	79
4.5 Validatie bodemvocht-sensoren.....	80
4.5.1 Stabiliteit.....	80

4.5.2	Accuraatheid.....	81
4.5.3	Bereik en resolutie.....	83
4.6	Validatie Temperatuur en Luchtvochtigheid sensoren (si7021) .....	84
4.6.1	Accuraatheid.....	84
4.6.2	Stabiliteit.....	86
4.7	Validatie CO2 sensor (SDC030) .....	87
4.7.1	Algemeen.....	87
4.7.2	Specificiteit .....	87
4.7.3	Accuraatheid en toepassing van de sensoren .....	89
4.8	Gebruiksscenario's voor de real-time data.....	91
4.8.1	Algemeen.....	91
4.8.2	Beregeningsadvies .....	92
4.8.3	Bemestingstiming voorjaar .....	93
4.9	Prototype indicatoren.....	95
4.9.1	Algemeen.....	95
4.9.2	Infiltratie en drainage .....	97
4.9.3	Watervasthoudend vermogen.....	105
4.9.4	Vochtvoorziening en droogtestress .....	110
4.9.5	Relatie tussen indicatoren, gangbare metingen en beheer.....	115
4.9.6	Gevoeligheid van de indicatoren .....	118
5.	Conclusie en discussie .....	126
5.1	Validatie Sensoren .....	126
5.2	Real-time data .....	127
5.3	Prototype indicatoren voor bodemvitaliteit.....	127
5.3.1	Indicatoren op basis van sensordata .....	127
5.3.2	Indicatoren op basis van eDNA data.....	128
5.4	Open Source .....	129
5.5	Bodemleven & ondergrondse biodiversiteit.....	130
5.6	Bovengrondse biodiversiteit.....	130
5.7	Stikstof .....	130
5.8	Vermindering van broeikasgasemissies.....	131
5.9	Waterregulatie.....	131
5.10	Vervolgonderzoek.....	132
5.10.1	Combineren van eDNA en sensoren.....	132
5.10.2	Beheermaatregelen en ecosysteemdiensten .....	132
5.10.3	Nader te verfijnen prototype indicatoren .....	133
6.	Referenties.....	134

Bijlage 1. Experimenten voor het bepalen van drift in bodemvochtsensoren .....	136
Drift Experiment 1 .....	136
Drift experiment 2 .....	137
Bijlage 2. Metingen van temperatuur effecten in bodemvocht-sensoren.....	138
Temperatuur effect op basis van experimenten.....	138
Temperatuur effect op basis van real-time data.....	139
Bijlage 3. Relatie tussen lokale meting van temperatuur en luchtvochtigheid met het dichtstbijzijnde KNMI station .....	142
Bijlage 4. Laboratoriumanalyse metabarcoding .....	144
Bijlage 5. Bio-informatica pipeline metabarcoding .....	145
Bijlage 6. OBIC input en output .....	147
Bijlage 7. Resultaten van statistische analyse.....	149
Bijlage 8. Organismen die geassocieerd zijn met sulfaat reducerend.....	151

# 1. Samenvatting

Huidige bodemindicatoren richten zich voornamelijk op de vruchtbaarheid van de bodem en het ontbreekt nog aan eenvoudige indicatoren voor andere ecosysteemdiensten, waaronder biodiversiteit, waterregulatie en het beperken van broeikasgasemissies. In het project Sensorisch Landschap onderzoeken we of we deze onderbelichte ecosysteemdiensten kunnen monitoren door de inzet van twee nieuwe technieken: eDNA en cheaptch IoT sensoren. Dit rapport beschrijft de resultaten van de eerste fase van het project, waarin de technieken gevalideerd zijn en een verkennende data-analyse is uitgevoerd op graslandpercelen om te identificeren welke metingen van toegevoegde waarde zijn voor de bepaling van nieuwe bodemindicatoren.

Op basis van de sensormetingen zijn 6 prototype indicatoren ontwikkeld voor de vochtlevering, het vochttransport en het watervasthoudend vermogen van de bodem. De grootste uitdagingen voor het grootschalig inzetten van cheaptch IoT sensoren zijn de onderhoudsgevoeligheid van de meetopstelling en een juiste kalibratie van bodemvochtsensoren. Desondanks bleek de indicator voor vochtleverend vermogen op de 7 onderzochte percelen een betere maat voor het productieverlies door droogte dan bestaande schattingen op basis van grondwaterstand en bodemsoort. De indicatoren voor vochttransport zijn potentieel van grote toegevoegde waarde, omdat drainage en infiltratie nu nog niet betaalbaar bepaald kunnen worden, terwijl zij een cruciale rol spelen in de waterregulatie én een goede waterregulatie ten grondslag ligt aan bijna alle ecosysteemdiensten die de bodem levert.

Met een eDNA meting konden per perceel tot 3521 unieke soort(groepen) in de bodem geïdentificeerd worden. Met de eDNA data van 140 percelen zijn 12 prototype indicatoren ontwikkeld. De totale hoeveelheid eDNA en het aantal soorten zijn op korte termijn te gebruiken als indicatoren voor hoeveelheid en diversiteit van het bodemleven. Wij zien sterke verbanden tussen deze indicatoren en bodemparameters. Klei, zand en veen hebben elk een kenmerkende bodemgemeenschap. Het meeste, en meest diverse bodemleven werd aangetroffen op ongestoord grasland. Daarnaast is organische stof positief gecorreleerd met het bodemleven en beïnvloeden verdichting en bodemvoorraad P het bodemleven negatief. Indicatoren op basis van specifieke groepen organismen in de stikstofcyclus (stikstoffixerende bacteriën, ammonium oxiderende organismen) komen meer of minder voor op percelen waar de plantendiversiteit hoger is. Zo biedt eDNA analyse een inzichtgevend instrument om te sturen op biodiversiteit in agrarische graslanden en behoud van biodiversiteit in natuur. Indicatoren tussen bodemleven en potentiële broeikasgasuitstoot zijn vooralsnog alleen gevonden voor lachgas: de potentiële uitstoot is lager wanneer er relatief minder lachgas producerende organismen ten opzichte van afbrekende organismen aanwezig zijn in de bodem. Voor CO<sub>2</sub> geldt dat hoe meer microbiële biomassa en organische koolstof in de bodem, des te hoger de potentiële uitstoot. Voor methaan namen 75% van de onderzochte bodems juist netto methaan op. Nader onderzoek met sensoren, eDNA en referentie broeikasgasmetingen is nodig om te komen tot praktische aanbevelingen.

Voor 102 van de 140 percelen is de verzamelde data geanonimiseerd en publiek beschikbaar gesteld, zodat ook andere onderzoekers uit deze waardevolle dataset aanvullende inzichten kunnen halen. In de beoogde fase 2 van dit project zal er nader worden ingezoomd op de validatie van de indicatoren over meerdere jaren, de effecten van specifieke beheermaatregelen en het stellen van streefwaarden voor de indicatoren.

Op basis van de data gepresenteerd in dit rapport zijn een aantal onderzoeksvragen geformuleerd voor dit vervolg:

- Welke maatregelen zijn effectief om (de negatieve effecten van) verdichting tegen te gaan zonder negatief effect op het bodemleven?
- Kunnen eDNA analyses meer inzicht geven in de relatie tussen productiviteit, stikstof en biodiversiteit, en welke maatregelen stimuleren zowel productiviteit als biodiversiteit?
- Kunnen bodemvochtmetingen gebruikt worden om koolstofvastlegging beter in te schatten en zijn maatregelen die het bodemvocht verhogen effectief om koolstofvastlegging te verhogen?
- Hoe verandert het bodemleven in natuurgebieden onder de invloed van stikstofdepositie, en met welke maatregelen kan de invloed van stikstofdepositie gemitigeerd worden?

## 2. Inleiding

### 2.1 Aanleiding en doelstelling

Graslanden vervullen tal van functies binnen verschillende thema's als voedselvoorziening, waterhuishouding, erosie, biodiversiteit en recreatie. Nederland bestaat voor bijna 25 %, ongeveer 1 miljoen hectare, uit agrarisch grasland. Voor het functioneren van graslanden is één component van het grootste belang: de bodem. Een gezonde, levende bodem waarborgt de productiviteit en is weerbaar ten opzichte van wisselende invloeden. Veel landeigenaren en boeren doen daarom hun uiterste best om de bodem gezond te houden of gezonder te krijgen. Om te weten hoe het met de bodem gesteld is, wordt de kwaliteit veelal bepaald aan de hand van fysische, chemische, en een beperkt aantal biologische metingen. Deze metingen vertellen veel over de vruchtbaarheid en productiviteit van de bodem maar geven een incompleet inzicht in de bodemvitaliteit (de weerbaarheid van het bodemecosysteem tegen in- en externe invloeden). Er is steeds meer behoefte vanuit boeren en landeigenaren om de vitaliteit van de bodem te relateren aan de cruciale rol van het bodemleven, en deze inzichten te gebruiken om het begrip van vitaliteit te versterken. Het project Sensorisch landschap speelt in op deze behoefte door indicatoren voor bodemvitaliteit te ontwikkelen en dit in te bedden binnen het in Nederland ontwikkelde framework om bodemkwaliteit te beoordelen (de bekende Open Bodemindex als ook de Bodemindicatorenset Landbouwgronden Nederland). Er zijn daarvoor diverse prototype indicatoren ontwikkeld op basis van praktijkonderzoek op 136 uiteenlopende graslanden en 10 akkerlandpercelen in de provincies Noord-Brabant, Gelderland en Overijssel.

De vitaliteit van de bodem is afhankelijk van chemische, fysische en biologische eigenschappen die op hun beurt bepalen welke ecosystemediensten de bodem kan leveren. In dit project richten wij ons specifiek op ecosystemediensten die tot nu toe onderbelicht zijn gebleven én sterk afhankelijk zijn van de rol van het bodemleven: (ondergrondse) biodiversiteit, waterhuishouding en het beperken van broeikasgasemissies.

Om uitspraken te kunnen doen over deze ecosystemediensten is meer informatie nodig over bodembioologie en waterhuishouding, omdat het bodemvochtgehalte een grote rol heeft in het functioneren van het bodemleven en de daarmee samenhangende diensten die het bodemleven levert. Tot nu toe was het verzamelen van deze informatie erg kostbaar en daardoor niet breed inzetbaar. Binnen het project Sensorisch Landschap zetten wij in op twee relatief nieuwe technieken om hier verandering in te brengen:

- eDNA analyses die het bodemleven en de diversiteit hiervan in beeld brengen.
- Cheaptch Internet of Things (IoT) sensoren die real-time verandering van o.a. bodemvochtgehalte (waterregulatie) en temperatuur meten.

Door het combineren van gangbare chemisch-fysische metingen met eDNA analyses en sensor-data van bodemvocht/temperatuur krijgen we meer inzicht in de complexe interacties tussen het bodemleven, nutriëntencycli, bodemstructuur, bodemvocht en broeikasgasuitstoot. Door resultaten uit deze combinatie van metingen grondig te analyseren willen wij de cruciale factoren waarmee de bodem zorgt voor (ondergrondse) biodiversiteit, een goede waterhuishouding en het beperken van broeikasgasemissies onderscheiden. De resultaten van verschillende analyses worden uitgewerkt in rekenmodellen voor bodemindicatoren en succesvolle indicatoren zijn beschikbaar om te worden ingebed binnen de Open Bodem Index (OBI; <https://www.openbodemindex.nl>) en de BLN (Bodemindicatoren voor Landbouwgronden). Het doel is dat boeren en grondeigenaren in de toekomst de OBI meetresultaten direct kunnen laten vertalen naar een helder beeld van de bodemvitaliteit op hun perceel.

Sensorisch Landschap wil de bestaande OBI-BLN systematiek aanvullen op die onderdelen van bodemvitaliteit die nu nog onderbelicht zijn. We sluiten aan bij deze systematiek, omdat deze transparant is



(Open Source) onderbouwd is met wetenschappelijke kennisbasis, ontwikkeld is met alle bodemkundige instellingen in Nederland, en bovendien ondersteund wordt door een groot aantal grondeigenaren. Mede op basis van deze aanvullende indicatoren kunnen er efficiëntere maatregelen getroffen worden die zich richten op een stabiele en weerbare bodem waardoor er bespaard kan worden op abrupte of overbodige behandelingen. Door bodemvitaliteit breder te kwantificeren, willen we een onderbouwing bieden voor een beloning voor boeren en grondeigenaren die beheermaatregelen nemen om maatschappelijke baten (bodemdiensten) zoals meer biodiversiteit, betere waterhuishouding en vermindering van broeikasgasuitstoot te realiseren.

## 2.2 Leeswijzer

Het rapport is opgebouwd uit 5 delen.

- Hoofdstuk 1. Samenvatting
- Hoofdstuk 2. Inleiding
- Hoofdstuk 3. Ontwikkeling van indicatoren op basis van data verkregen door middel van eDNA analyse.
- Hoofdstuk 4. Ontwikkeling van indicatoren op basis van data verkregen door middel van Cheaptch Internet of Things (IoT) sensoren.
- Hoofdstuk 5. Conclusie en discussie

## 3. eDNA onderzoek

### 3.1 Inleiding

Bodemgezondheid is een breed begrip en omvat o.a. bodemvruchtbaarheid en -vitaliteit (weerbaarheid). In de context van dit onderzoek wordt de volgende definitie voor bodemgezondheid aangehouden: “Het blijvende vermogen van de bodem om te functioneren als een vitaal levend systeem, binnen de grenzen van ecosystemen en landgebruik, om de biologische productiviteit te waarborgen, de kwaliteit van lucht- en watermilieus te bevorderen en de gezondheid van planten, dieren en mensen te behouden.” (Doran and Safley, 1997). De bodem speelt een belangrijke rol in uiteenlopende processen en functies waaronder biodiversiteit, biologische productie, nutriëntencycli, vochtvasthoudend vermogen, bodemstructuur en koolstofopslag. De mate waarin de bodem in deze processen een rol speelt wordt voornamelijk bepaald door de chemische, fysische en biologische eigenschappen van de bodem. Al deze bodemeigenschappen hebben effect op elkaar en vragen dus om een integrale benadering. Hierin speelt de bodembioïologie een centrale rol en de laatste jaren wordt er dan ook steeds meer onderzoek gedaan naar de samenstelling van het bodemleven in relatie met bodemgezondheid (Toor *et al.*, 2021). Indicatoren gebaseerd op zowel micro- als macro-organismen in de bodem hebben de potentie veel inzicht te geven in de bodemvitaliteit en daarmee de stabiliteit en weerbaarheid van de bodem (Bouchez *et al.*, 2016).

Moleculaire analyses, waaronder eDNA onderzoek, kunnen een belangrijke bijdrage leveren aan verdieping en aanvulling van dit inzicht (Bünemann *et al.*, 2018; Schloter *et al.*, 2018). eDNA staat hierbij voor *environmental DNA* oftewel al het DNA aanwezig in een bepaald milieu, bijvoorbeeld de bodem. Organismen hebben DNA in hun cellen en laten DNA in hun omgeving achter. Dat kan onder andere via huidcellen, haar, slijm of feces. Het DNA dat is achtergelaten of, in geval van micro-organismen, het DNA in de cellen kan uit een bodemmonster geëxtraheerd worden en vervolgens uitgelezen (gesequenced) worden. Omdat organismen van verschillende soorten een unieke DNA sequentie hebben, kan op basis van dit DNA bepaald worden welke soorten er in een specifieke bodem voorkomen. Door de ontwikkeling van specifieke en gevoelige DNA analyses in combinatie met sequentie-databases zijn arbeidsintensieve methoden om de soortensamenstelling te bepalen niet meer nodig. Dit biedt de kans om (op grotere schaal) te meten wat er in een bodem leeft. Vooral voor de detectie van micro-organismen is dit een uitkomst. Zij hebben veel invloed op bijvoorbeeld de nutriëntencycli, maar waren voorheen lastig te meten. Ook zijn micro-organismen zeer gevoelig voor kleine veranderingen in de directe omgeving. Inzicht in (veranderingen in) de soortensamenstelling of -verhouding van micro-organismen kan dus bijdragen aan vroegtijdige signalering van ontwikkelingen in de bodem van bijvoorbeeld een gras- of akkerland.

Met behulp van eDNA metabarcoding zijn bodemmonsters geanalyseerd die verzameld zijn op in totaal 136 gras- en 10 akkerlandpercelen. Doel van de analyse is om een globaal beeld te vormen van de variatie aan organismen in de bodem, met name organismen die talrijk voorkomen of hoge concentraties DNA hebben achtergelaten. Dit geeft inzicht in de aanwezigheid van enkele honderden soorten die het meest dominant in de bodem aanwezig zijn. Deze data kan gebruikt worden om het biologisch functioneren van de bodem van de verschillende gras- en akkerlandpercelen verder te analyseren.

## 3.2 Materiaal en methode

### 3.2.1 Veldonderzoek en bemonstering

**Onderzoeklocaties**– Totaal zijn er 136 graslanden en 10 akkers bemonsterd in de periode oktober-december 2021 (Figuur 1). De bemonsterde locaties liggen in provincies Noord-Brabant, Overijssel en Gelderland en betreffen voornamelijk bodems bestaand uit dekzand en rivierklei. De locaties zijn zo gekozen dat er grote variatie in organische stof, pH en grondwatertrap is.

Onder de bemonsterde percelen bevinden zich onder andere de Ossekampen, een aantal proefvlakken van de Wageningen Universiteit & Research waar sinds de jaren 50' specifieke behandelingen uitgevoerd worden. Er vindt maaibeheer (maaien en afvoeren) plaats op deze proefvlakken. Proefvlakken die bemonsterd zijn, worden bemest met kunstmest. Van de volgende behandelingen is één proefvlak bemonsterd (P-bemesting, N-bemesting, K-bemesting, PK-bemesting, NPK-bemesting, bekalking en tenslotte een controle vlak waar geen bemesting plaats vindt). Omdat van elke behandeling slechts één proefvlak bemonsterd is zijn de resultaten indicatief van aard en is het niet mogelijk om statistische analyses uit te voeren. De resultaten bespreken we echter wel, omdat de resultaten eenvoudiger te interpreteren zijn dan een zeer gevarieerde dataset waarin talloze parameters de uitkomsten van de eDNA analyses beïnvloeden. De resultaten van de Ossekampen plots hebben daarmee richting gegeven aan de analyses van de totale dataset. Een overzicht van de bemonsteringen per locatie is opgenomen in Figuur 2.

**Verzamelen bodemmateriaal**– Binnen een cirkel met een diameter van 6 meter zijn verspreid over het vlak met een guts (diameter 2,5 cm) in totaal 90 steken genomen. Een deel van elk monster is na het verzamelen ingevroren bij -20 °C tot het moment van (e)DNA-extractie en analyse. De locatie van bemonstering is zo gekozen dat deze representatief is voor het betreffende perceel.

**Wormen**– Regenwormen zijn bemonsterd in het midden van het proefvlak. Wormen zijn omhoog “getrokken” met behulp van een mosterdextract (AITC). Vervolgens is een kuil van 30 x 30 x 30 gegraven en zijn alle wormen in dit volume verzameld. Alle verzamelde wormen zijn in ethanol bij 4 °C bewaard voor telling en soortendeterminatie.

**Bodemconditiescore**– De kuil is vervolgens verder uitgegraven tot een profielkuil van 50x50x50 cm ten behoeve van een visuele bodembeoordeling aan de hand van de bodemconditiescore (<https://mijnbodemconditie.nl/>).

**Bulkdichtheid**– De bulkdichtheid van de betreffende bodem is bepaald op basis van een monster dat met behulp van een bulkdichtheidsring op 5-10 cm diepte verzameld is. In het laboratorium is het gewicht van grond in het gegeven volume bepaald. Hoe hoger het bulkgewicht (kg/liter) van een bodem hoe moeilijker wortelgroei kan plaatsvinden. De bulkdichtheid geeft een indicatie van grootte, vorm en samenhang van bodemdeeltjes en daarmee van de bodemstructuur.

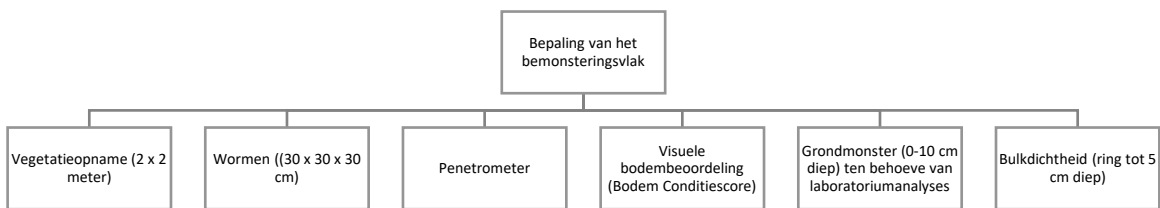
**Verdichte lagen**– De aanwezigheid van verdichte lagen in het bemonsteringsvlak is vastgesteld door vijf maal met een penetrometer tot minstens 80 cm diepte in de bodem te steken en de maximale gemeten weerstand van 0-40 cm en 40-80 cm te noteren.

**Vegetatieopname**– De vegetatieopnames zijn gemaakt in de periode juni-augustus 2021. Op elk perceel is een representatief proefvlak van 2x2 meter geselecteerd voor een vegetatieopname op basis van de Braun-Blanquet methode (Braun-Blanquet, 1932). Binnen dit proefvlak is de totale bodembedekking door vegetatie vastgesteld en de bedekking door de kruid- en moslaag (in %). Binnen het proefvlak zijn alle plantensoorten tot op soort (in sommige gevallen genus) gedetermineerd en is per soort genoteerd wat de

bedekking/abundantie was. Hiervoor is per plantensoort een Braun-Blanquet code op een opnameformulier genoteerd waarna deze gegevens in Turboveg ingevoerd zijn.



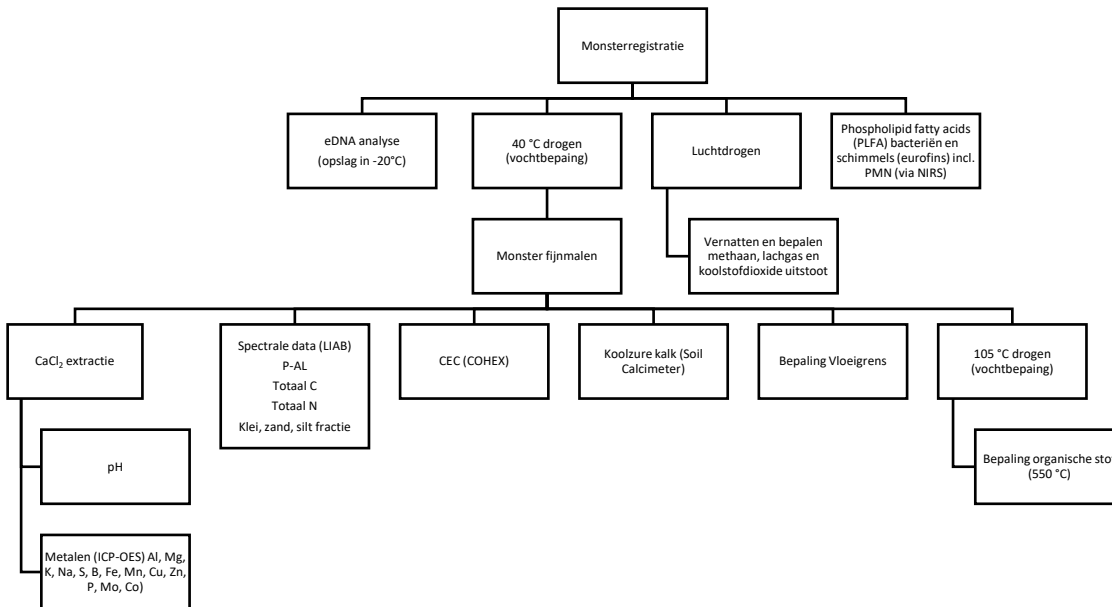
Figuur 1. Bemonsterde locaties.



Figuur 2. Overzicht van de bemonsteringen binnen het bemonsteringsvlak, waaronder monsternamen ten behoeve van vervolganalyses.

## 3.2.2 fysisch-chemische analyses

De verzameld grondmonsters zijn onderzocht op tal van chemische en fysische eigenschappen. Een overzicht van de uitgevoerde analyses is weergegeven in een flowschema (Figuur 3).



Figuur 3. Overzicht van laboratorium analyse.

Hieronder volgt een korte toelichting op de uitgevoerde chemisch-fysische analyses.

**PMN**– Bepaling van de hoeveelheid stikstof dat beschikbaar kan komen via mineralisatie gedurende het groeiseizoen.

**PLFA**– Kwalitatieve en kwantitatieve analyse van aanwezige fosfolipidenvetzuren. Samenstelling en type van deze vetzuren verschilt o.a. tussen schimmels en bacteriën en wordt gebruikt voor bepaling van biomassa van schimmels en bacteriën in een bodemmonster.

**Vloeigrens**– Is een maat voor de plastische eigenschappen van grond. Door toenemend watergehalte neemt de stevigheid van de bodem af waarbij op enig ogenblik de bodem volledig verzadigd is en van een vaste stof overgaat in een 'vloeistof'. Het watergehalte waarbij deze overgang plaatsvindt wordt de vloeigrens genoemd.

**CaCl<sub>2</sub> extractie**– Met deze extractie wordt de fractie voor de plant eenvoudig opneembare nutriënten vrijgemaakt. Deze extractie simuleert als het ware een regenbui.

**CEC-COHEX**– Deze analyse extraheert de nutriënten die gehecht zijn in het klei-humus complex. Daarmee simuleert deze extractie de bodemvoorraad nutriënten. De totale CEC en de verhoudingen tussen de elementen zijn bepaald door middel van ICP-OES.

**Spectrale analyse (LIAB)**– Op basis van spectrale data is een inschatting verkregen van diverse parameters zoals de totale hoeveelheid organische koolstof en de totale hoeveelheid stikstof in de bodem. Daarnaast is ook een inschatting verkregen van de bodemvoorraad fosfaat (P-AL).

**Koolzure kalk**– Deze bepaling is uitgevoerd met een Calcimeter. Daarbij zijn de carbonaten in de bodem opgelost in zoutzuur en aan de hand van de hoeveelheid CO<sub>2</sub> die daarbij vrijkomt is bepaald hoeveel carbonaten in de bodem aanwezig zijn.

**Organische stof**– Vocht is uit de bodem verwijderd door deze te drogen bij 105 °C. Vervolgens is het gewicht bepaald van de bodemmonsters, voor en na verbranden bij 550 °C.

**Gasmetingen**– De monsters zijn langzaam aan de lucht gedroogd. Vervolgens zijn de monsters weer nat gemaakt tot 60% van de vloeigrens. Na 7 dagen incubatie bij kamertemperatuur is de uitstoot van lachgas, methaan en koolstofdioxide bepaald. Vervolgens is het vochtgehalte verhoogd tot 90% van de vloeigrens, om daarmee een regenbui te simuleren. Na twee dagen incubatie is wederom de uitstoot van lachgas, methaan en koolstofdioxide bepaald.

### 3.2.3 eDNA metabarcoding analyse

In een bodemmonster is zeer veel DNA aanwezig. Veel hiervan zit in de organismen zelf, denk daarbij aan micro-organismen als schimmels en bacteriën. Echter kan er ook DNA gedetecteerd worden van organismen die niet in het monster aanwezig zijn. Regenwormen zijn daar een goed voorbeeld van. Regenwormen laten veel DNA in de bodem achter doordat ze organisch materiaal via de mond innemen, en het afval via de achterzijde uitscheiden. Dit ‘afval’ bevat enorme hoeveelheden DNA van regenwormen, en kan daardoor goed gedetecteerd worden in een bodemmonster.

De bodemmonsters zijn onderzocht met behulp van een eDNA analyse genaamd ‘metabarcoding’. Een samenvatting van het metabarcoding analyse proces is weergegeven in Figuur 5. Deze techniek is ingezet om de bodemmonsters te onderzoeken op de aanwezigheid van eDNA van het bodemleven. Het resultaat van deze analyse is een lijst met organismen waarvan eDNA in het monster is aangetroffen. Elke unieke DNA-sequentie wordt een OTU (*Operational Taxonomic Unit*) genoemd. Dit kan een soort zijn, maar vaak zullen meerdere nauwverwante organismen dezelfde DNA-sequentie dragen. De precieze soort kan dan niet vastgesteld worden. De aantallen OTU’s geven een goede indicatie van de diversiteit in het algemeen, of bijvoorbeeld de diversiteit binnen een bepaalde soortgroep. Om naast dit kwalitatieve resultaat ook een kwantitatief beeld te kunnen geven is bij de PCR gebruik gemaakt van interne DNA standaarden. Hieronder worden in het kort de hoofdstappen van deze analyse beschreven. Voor een uitgebreidere technische beschrijving wordt verwezen naar Bijlage 4.

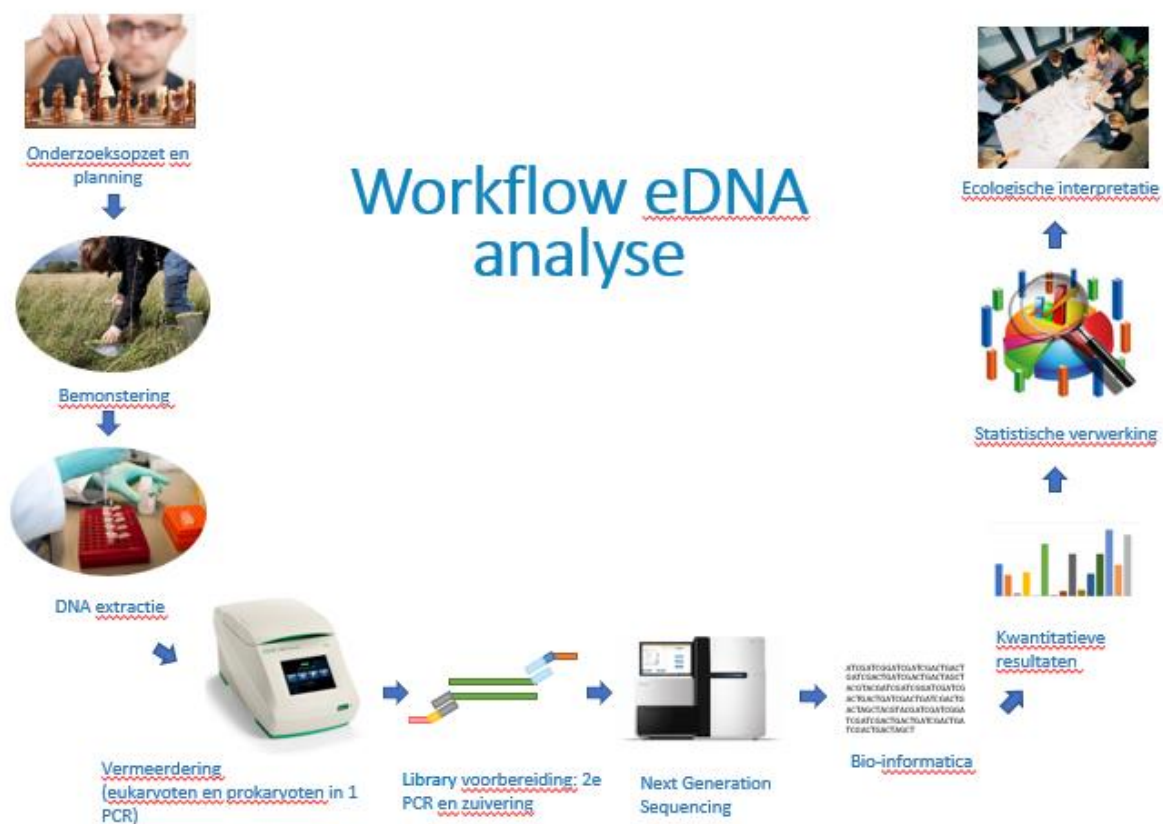


Figuur 4. Impressie van laboratoriumsetting waarin eDNA analyses uitgevoerd worden.

- 1) **DNA extractie:** DNA van het aanwezige bodemleven, zogenaamd *environmental* DNA (eDNA), in het bodemmonster wordt geëxtraheerd en gezuiverd.
- 2) **PCR:** Het gezuiverde en geconcentreerde eDNA is vermenigvuldigd met behulp van een PCR reactie waarbij gebruik gemaakt is van een universele primer waarmee zowel bacteriën, archaea en eukaryoten gedetecteerd kunnen worden. Deze primers hechten aan een specifiek deel van het DNA, de zogeheten ‘marker’. Hierdoor wordt alleen een kort fragment van het eDNA vermeerderd, waardoor

het makkelijker te analyseren is. Daarnaast worden interne DNA standaarden toegevoegd om de hoeveelheid en concentratie eDNA (DNA moleculen/gram grond) per OTU te kunnen bepalen.

- 3) **Samenstellen DNA bank:** De verkregen vermenigvuldigde PCR-fragmenten worden gezuiverd en gecontroleerd op de juiste fragmentlengte en vervolgens in een zogeheten DNA bank ("DNA library") opgenomen. Deze DNA bank bestaat uit een grote verzameling DNA fragmenten van alle onderzochte monsters. Elk DNA fragment wordt gelabeld zodat herleid kan worden tot welk monster het DNA fragment behoort.
- 4) **DNA sequencing:** Vervolgens wordt de DNA code van de PCR fragmenten in de DNA bank gelezen, dit proces wordt 'sequencen' genoemd. In deze stap wordt het fysieke DNA molecuul dus vertaald in de DNA code bestaande uit de DNA-bouwstenen weergegeven met de letters A (adenine), C (cytosine), G (guanine) en T (thymine). Samen vormen deze letters de specifieke sequenties (ook wel *reads* genoemd). In elke soort(groep) is de volgorde van de DNA bouwstenen verschillend. Aan de hand daarvan kan herkend worden welke soort(groepen) in het monster aanwezig zijn.
- 5) **Bio-informatica:** Met behulp van een bio-informatica pipeline (zie bijlage 5) wordt geanalyseerd van welke soort(groepen) er DNA gedetecteerd is. Ook wordt berekend hoeveel DNA van elke soort(groep) gedetecteerd is.
- 6) **Statistische verwerking:** Tenslotte worden diverse tools gebruikt om statistisch significante verbanden in de data aan te tonen.



Figuur 5. Overzicht van de eDNA metabarcoding analyse workflow.

### 3.2.4 Kwalificatie van graslandpercelen

De kwaliteit en het ontwikkelingsstadium van de graslandpercelen zijn bepaald op basis van de vegetatieopnames. Voor de bepaling van de kruidenrijkheid en het ontwikkelingsstadium van een graslandperceel is de kwaliteitsindex gebruikt, uitgedrukt in een Q-waarde. Hiervoor is gebruik gemaakt van de methodiek beschreven in van 't Veer (2022). Dit resulteert in een kwalificatie van graslanden op een schaal van intensief beheerd en soortenarm grasland (Q-waarde 1-2) tot extensief beheerd en soortenrijk grasland (Q-waarde 6-9).

De Braun-Blanquet opnamecodes zijn omgezet naar een bedekkingscode op een schaal van 1 t/m 9 en het rekenkundig gemiddelde van de bedekking is bepaald (Tabel 1). Voor de berekening van de Q-waarde van een perceel wordt gebruik gemaakt van dit gemiddelde. Q-waardes van individuele plantensoorten zijn ontleend aan van 't Veer (2022) en zijn bepaald op basis van de ecologie van de soort en de zeldzaamheid. Als plantensoorten uit de vegetatieopnames niet in deze lijst stonden is een Q-waarde bepaald op basis van verspreiding en voorkomen in Nederland ([www.verspreidingsatlas.nl](http://www.verspreidingsatlas.nl)). Hoe lager het aantal atlasblokken waarin de soort in Nederland voorkomt en dus hoe zeldzamer de soort, hoe hoger de Q-waarde (Tabel 2). De rationale hierachter is dat een hoge botanische kwaliteit van een grasland meestal samenhangt met de aanwezigheid van zeldzame soorten. In Tabel 3. Relatie tussen graslandontwikkelingsstadia en Q-waarde (Bax & Schippers, 1998; van 't Veer, 2022). is de samenhang tussen opeenvolgende ontwikkelingsstadia van grasland en de Q-indexwaarden weergegeven (Bax & Schippers, 1998; van 't Veer, 2022).

Tabel 1. Getransformeerde bedekkingscores op basis van Braun-Blanquet schaal.

Symbol (Braun-Blanquet)	Bedekking (%)	Abundantie	Bedekkingscode	Rekenkundig gemiddelde
r	≤ 1	1 individu (zeer weinig)	1	1
+	≤ 1	2-5 individuen (weinig)	2	2
1	≤ 5	6-50 individuen (talrijk)	3	3
2m	≤ 5	> 50 individuen (zeer talrijk)	4	4
2a	5 - 12,5	willekeurig	5	8
2b	12,5 - 25	willekeurig	6	18
3	25 - 50	willekeurig	7	38
4	50 - 75	willekeurig	8	63
5	75 - 100	willekeurig	9	88

Tabel 2. Kwaliteitsindex (Q-index) op basis van zeldzaamheid en voorkomen (van 't Veer, 2022).

Q-waarde	Zeldzaamheid en voorkomen
1	Zeer algemene soorten indicatief voor intensief gebruikte (raai-)graslanden
2	Algemene tot zeer algemene soorten indicatief voor intensief en matig intensief gebruikte graslanden, plaatselijk met nat-droog gradiënten of tredvegetatie (greppels, open plekken)
3	Algemene, vaak dominante soorten van matig intensief tot extensief gebruikte graslanden (gewoonlijk in een verschrallingsreeks van intensief naar extensief gebruikt grasland)
4	Algemene tot vrij algemene soorten van matig kruidenrijke tot kruidenrijke graslanden met matig intensief tot matig extensief gebruik
5	Vrij algemene tot minder algemene soorten van vochtige hooilanden en kruidenrijke, brakke of droge graslanden; de soorten zijn indicatief voor extensief gebruik
6	Vrij zeldzame tot zeldzame soorten van kruidenrijke graslanden en vochtige hooilanden (dotterbloemhooiland, kamgrasweiden, bloemdijken, zilverschoongraslanden); de soorten zijn indicatief voor extensief gebruik
7	Als 6, maar nu zijn het kritische, veelal zeldzame en/of bedreigde soorten
8	Vrij zeldzame tot zeldzame soorten van kritische graslandgemeenschappen (nat schraalland, heischraal grasland, kalkgrasland, soortenrijk brak grasland)
9	Zeldzame tot zeer zeldzame soorten van kritische tot zeer kritische graslandgemeenschappen (nat schraalland, heischraal grasland, kalkgrasland, soortenrijk brak grasland)



Tabel 3. Relatie tussen graslandontwikkelingsstadia en Q-waarde (Bax & Schippers, 1998; van 't Veer, 2022).

Fase	Ontwikkelingsstadium	Q-waarde
0	Raaigrasweide	1
1	Grassenmix	2
2	Dominant stadium	3
3	Grassen-kruidenmix	4
4	Bloemrijk grasland	5
5	Schraalland	6-9

### 3.2.5 Bodemkwaliteit beoordeling met Open Bodem Index

Open Bodem Index (OBI) is een rekensystematiek voor een holistische beoordeling van bodemkwaliteit m.b.t. duurzame productiviteit van landbouwgrond (Ros et al., 2022). Van alle percelen is de OBI score bepaald met OBIC versie 2.0.4 (Verweij et al., 2023). Hiervoor zijn, indien beschikbaar, de chemische bodemgegevens verzameld en aangevuld met openbaar beschikbare data (zie bijlage 3 voor details). Van de visuele beoordeling van bodem, BodemConditieScore, zijn vier parameters beschikbaar: storende laag, bodemleven, beworteling en structuur. De BodemConditieScore wordt niet gebruikt als invoerwaarde van OBI, maar geeft inzicht in de lokale toestand van de fysische en biologische eigenschappen van de bodem. Er is een vragenlijst naar de deelnemers (eigenaren of gebruikers van percelen) verstuurd waarin onder andere gevraagd werd naar beheermaatregelen. Indien mogelijk werden de antwoorden uit deze vragenlijst gebruikt om management inputs voor OBIC in te stellen. Bij percelen waar niet (alle) data voor het invullen van de management inputs beschikbaar was, zijn standaardwaarden gebruikt.

### 3.2.6 Statistische analyse

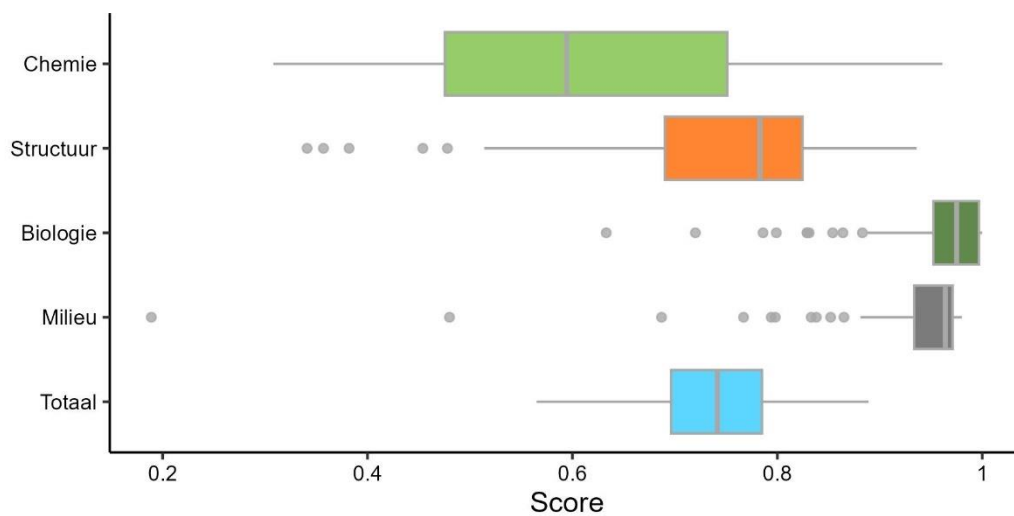
Om een beter beeld te krijgen van de verschillen in bodemleven tussen percelen is een ordinatie-analyse uitgevoerd (Nonmetric Multidimensional Scaling, NMDS). Deze analyse resulteert in een figuur waarin percelen waarvan het bodemleven op elkaar lijkt dicht bij elkaar komen te staan. Percelen die ver van elkaar verwijderd zijn in de figuur hebben een erg verschillend bodemleven. Door percelen met een overeenkomstige eigenschap eenzelfde kleur te geven kan een beeld gevormd worden van factoren die van invloed zijn op de samenstelling van het bodemleven.

Om mogelijke verbanden tussen de beschikbare parameters systematisch te onderzoeken, zijn een reeks statistische tests uitgevoerd. Eerst werden effecten van bodem- en perceeieigenschappen op alle biologische indicatoren (wormen, PLFA, eDNA) getoetst met Spearman's rangcorrelatie (voor continue variabelen) en met ANOVA (voor categorische variabelen). De geteste bodem- en perceeieigenschappen waren: bodem totaal C, pH, kleigehalte, grondwaterniveau, penetrometer meting van 40 cm diepte, gewastype, grondsoort, beheertype en gebruik van kunstmest. Verder werd de voorspelbaarheid van de biologische indicatoren op basis van gangbare bodem- en perceeieigenschappen getest door lineaire multivariate regressie met stepwise selectie toe te passen. De gebruikte voorspellende variabelen waren alle chemische input parameters van OBI, zand-, zilt- en kleigehalte, grondwaterniveau, leeftijd van grasland, fractie van grasland in de afgelopen 10 jaar en plant beschikbare water (dat is berekend met OBI functie). Deze parameters kunnen eenvoudig worden geschat voor alle percelen in Nederland. Vervolgens werd een ander lineair model toegepast na toevoeging van enkele extra perceelmetingen (BodemConditieScore en penetrometer meting).

## 3.3 Resultaten

### 3.3.1. Beoordeling van bodemkwaliteit met OBI

De bodemkwaliteit van de onderzochte percelen werd over het algemeen als goed beoordeeld, met een mediaanwaarde van 0,7 (Figuur 6). Biologische en milieuscores waren meestal goed, terwijl chemische scores vaak het knelpunt zijn. In Bijlage 4 worden de gedetailleerde scores van elke bodemfunctie weergegeven. Een lage chemische score komt vaak voor in natuur en/of extensieve beheerde percelen. Deze percelen zijn meestal niet bekalkt, waardoor hun pH lager is dan voor agrarische productie optimaal zou zijn. Een ander veelvoorkomend knelpunt voor agrarische productie is de levering van zwavel en zink. Bij de fysische score is verdichting het meest voorkomende knelpunt.



*Figuur 6. OBI scores van 137 percelen. De geïntegreerde eindscore ('Totaal') is berekend uit vier sub-scores (Chemische, fysische / structuur, biologische en milieu scores). De score varieert tussen 0 (slecht) en 1 (goed).*

### 3.3.2 Verkennende analyse van regenwormen en PLFA data

De relatie tussen regenwormen, PLFA data en de biodiversiteitsindex (aantal plantsoorten, Q-waarde) is systematisch getest (Tabel 1; zie Bijlage 7 voor de volledige resultaten van de statistische analyse). Een aantal indicatoren zijn gerelateerd met biodiversiteit, hoewel alle correlaties vrij zwak waren, met geen enkele correlatiecoëfficiënt die buiten het bereik van -0,5 tot +0,5 ligt.

Een opvallend resultaat is de negatieve correlatie tussen het aantal regenwormen en de kruidenrijkheid. Vermoedelijk heeft dit te maken met het feit dat regenwormen profiteren van bemesting terwijl de kruidenrijkdom over het algemeen juist lager is op percelen die bemest worden.

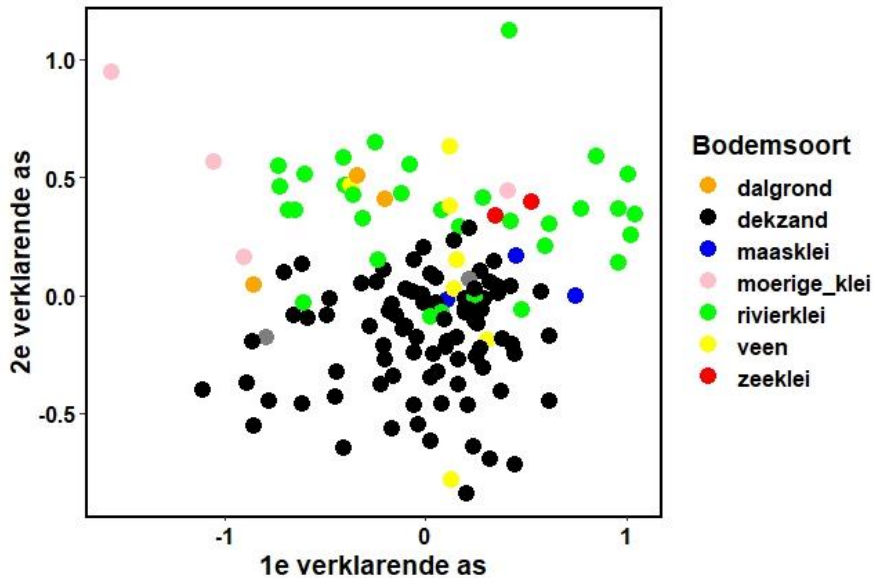
Daarnaast blijkt uit de analyse dat de microbiële biomassa (gemeten door middel van PLFA) positief gecorreleerd is met de respiratie van de bodem (hoeveelheid CO<sub>2</sub> uitstoot in het laboratoriumexperiment). Meer microben betekent dus dat de organische stof sneller afgebroken kan worden als de milieuomstandigheden daarvoor geschikt zijn.

Tabel 4. Correlatie met plantdiversiteit (aantal plantensoorten, Q-waardes) en broeikasgasemissie (CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, CH<sub>4</sub> emissie, gestandaardiseerd door totaal C gehalte) zijn ook weergegeven. '+' en '-' geven respectievelijk positieve (>0,2) en negatieve (<-0,2) correlaties aan. De symbolen tussen haakjes betekenen dat de correlatie alleen significant was voor een deel van de drie GHG parameters. Zie Bijlage 7 voor de volledige resultaten van de statistische analyse.

Indicatoren	Relatie met plant biodiversiteit	Relatie met GHG
<b>Wormen</b>		
Aantal wormen	-	
Fractie anec		
Fractie epi		
Fractie endo		
<b>PLFA</b>		
diversity	-	
microbe totaal	+	(+)
Fungi:bacteria ratio		
bacteria GP:GN ratio	-	
frac_bacterialGP	-	(-)
frac_Actynomyceten	-	(-)
frac_bacterialGN	+	
frac_Arbusculaire	-	
frac_fungi_other		
frac_protozoa		

### 3.3.3 Effect van bodemsoort en beheer op bodemleven

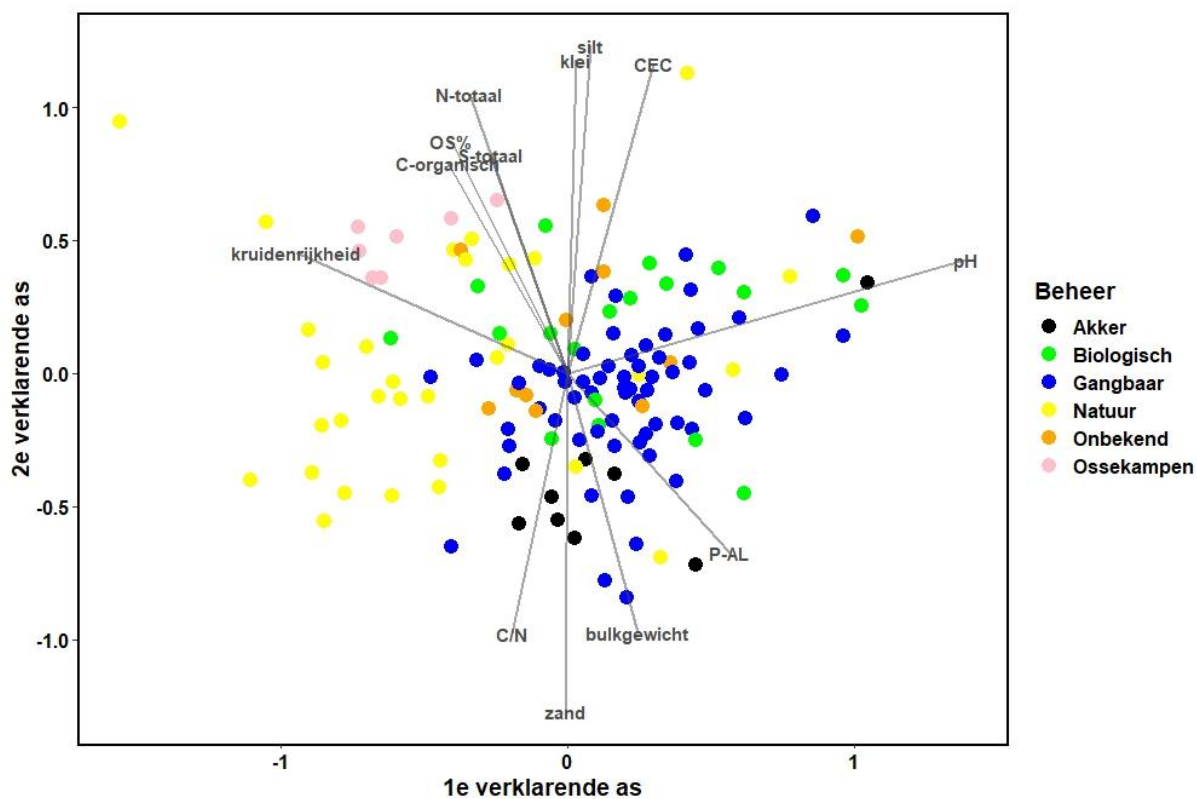
Uit de NMDS ordinatie blijkt dat de samenstelling van het bodemleven sterk beïnvloed wordt door de bodemsoort (Figuur 7). De dataset bestaat voornamelijk uit monsters verzameld op dekzand en rivierklei. Er is weinig overlap tussen beide, wat aangeeft dat rivierkleibodems en zandbodems een ander bodemgemeenschap kennen.



Figuur 7. Ordinatie met behulp van de NMDS techniek. Percelen die op elkaar lijken clusteren samen. De kleuren geven verschillende bodemtypes weer.

Een vergelijkbare analyse is ook uitgevoerd voor het beheertype (Figuur 8). Daarbij is onderscheid gemaakt tussen akkers, graslanden met een biologisch bedrijfsvoering, graslanden met een gangbare bedrijfsvoering, natuurgraslanden en de Ossekampen. Er is een duidelijk verschil te zien in bodemleven tussen percelen waarop natuurbeheer plaats vindt, en percelen die in agrarisch beheer zijn. Ook clusteren akkers samen, wat aangeeft dat akkers een ander bodemleven kennen dan (permanente) graslanden. Er zijn ook verschillen waarneembaar tussen graslanden met een biologisch bedrijfsvoering en een gangbare bedrijfsvoering, maar deze zijn minder uitgesproken. Graslandpercelen kunnen bodemleven hebben dat lijkt op bodemleven dat gevonden wordt in natuurlijke graslanden. Dat is echter vaker niet, dan wel het geval.

De samenstelling van het bodemleven hangt samen met talloze parameters. De pH, bodemtype en bodemvoorraad nutriënten blijken de samenstelling van het bodemleven het sterkst te beïnvloeden (Tabel 5). De variatie binnen grondsoorten is daarbij groot. Dit impliceert dat het management van het perceel grote invloed heeft op de soortensamenstelling.

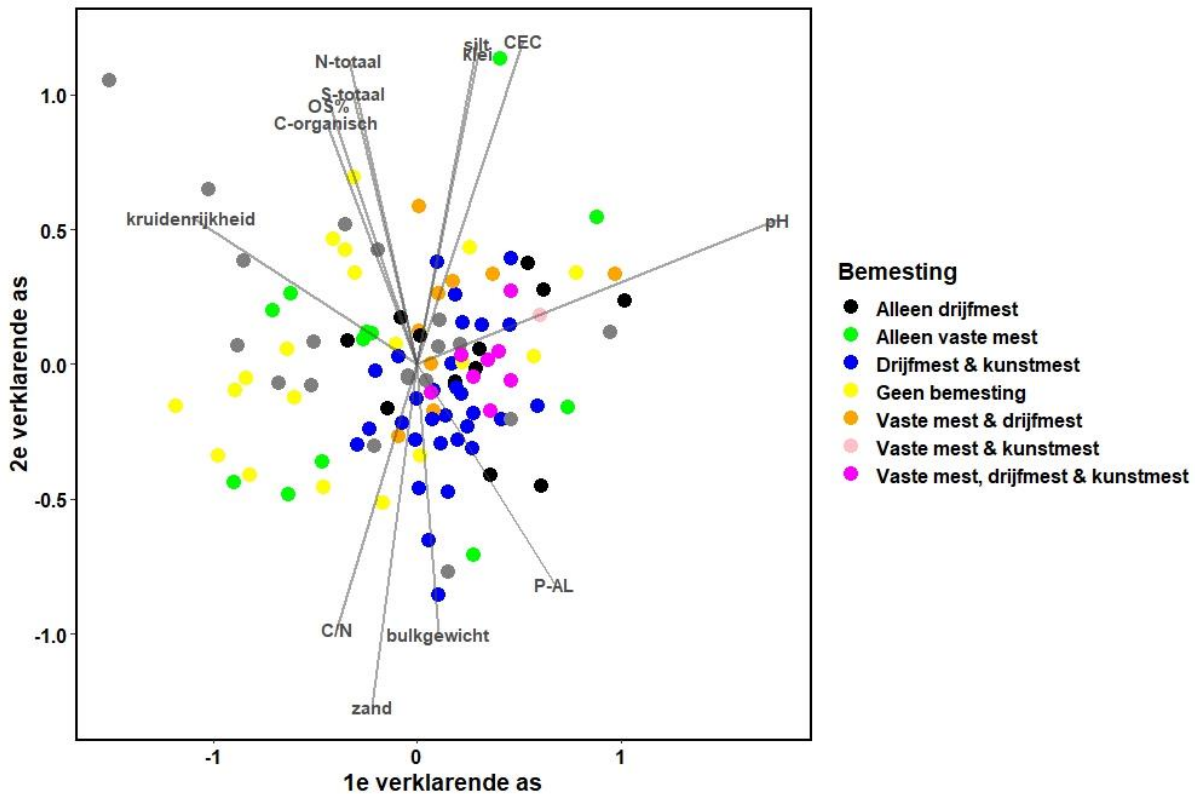


Figuur 8. Ordinatie met behulp van de NMDS techniek op basis van de eDNA data (universele marker). Verschillend beheer is weergegeven met verschillende kleuren. Locaties waar het bodemleven op elkaar lijkt worden in de figuur dicht bij elkaar weergegeven. Eigenschappen van de percelen zijn weergegeven als pijlen. Hoe langer pijl, hoe sterker de correlatie tussen de samenstelling van het bodemleven, en de betreffende parameter. De waarde van de betreffende parameter is hoger in percelen waar de pijl naartoe wijst. Alle getoonde parameters correleren significant met de samenstelling van het bodemleven.

Tabel 5. De samenstelling van het bodemleven hangt samen met talloze factoren. Een hoge  $R^2$  geeft aan dat er een sterke relatie is tussen de samenstelling van het bodemleven en de betreffende parameter. Een p-waarde kleiner dan 0,05 geeft aan dat er sprake is van een statistisch significant verband.

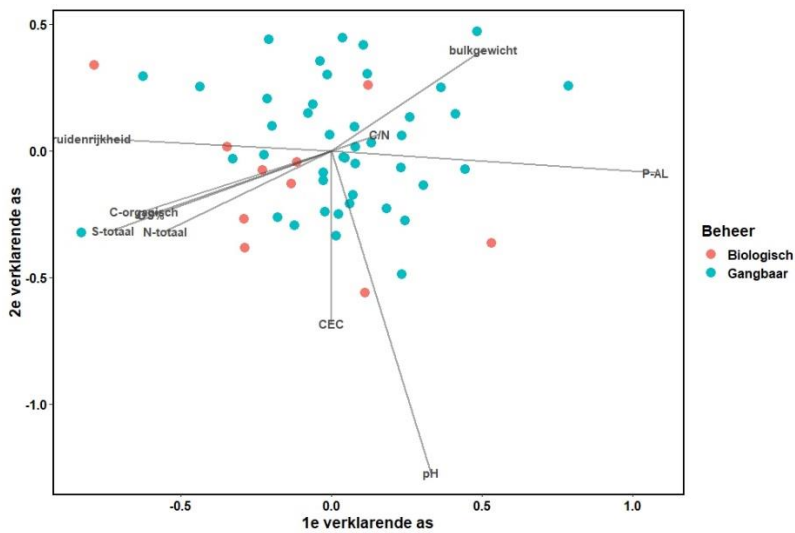
Parameter	$R^2$	p-waarde
pH	0,7299	<0,001
zand	0,5587	<0,001
silt	0,5267	<0,001
CEC	0,501	<0,001
klei	0,4812	<0,001
N-totaal	0,4234	<0,001
kruidenrijkheid	0,381	<0,001
bulkgewicht	0,348	<0,001
C/N	0,3446	<0,001
OS%	0,3215	<0,001
grondwatertrap	0,2921	<0,001
C-organisch	0,2764	<0,001
P-AL	0,2675	<0,001
S-totaal	0,2596	<0,001

Na bodemeigenschappen die samenhangen met bodemtype (pH, CEC) lijkt bemesting de meest belangrijke factor te zijn die de samenstelling van het bodemleven beïnvloedt (Figuur 9). Aan de linkerkant van Figuur 9 clusteren percelen samen waar niet bemest wordt, of alleen vaste mest gebruikt wordt. Aan de rechterkant bevinden zich de percelen waar drijfmest gebruikt wordt, al dan niet in combinatie met kunstmest of vaste mest. Het toepassen van drijfmest lijkt dus een belangrijke factor te zijn die sterk beïnvloedt welk type bodemleven er aanwezig is op een perceel. Deze percelen kennen over het algemeen een hoge bodemvoorraad fosfor (P-AL).



Figuur 9. Ordinatie met behulp van de NMDS techniek op basis van de eDNA data (universele marker). Locaties waar het bodemleven op elkaar lijkt worden in de figuur dicht bij elkaar weergegeven. Eigenschappen van de percelen zijn weergegeven als pijlen. Hoe langer de pijl, hoe sterker de correlatie tussen de samenstelling van het bodemleven, en de betreffende parameter. De waarde van de betreffende parameter is hoger in percelen waar de pijl naartoe wijst.

Op dekzandgronden kennen biologische graslandpercelen over het algemeen een ander bodemleven dan gangbare landbouwpercelen (Figuur 10). Percelen met een bodemleven dat typisch is voor biologische graslanden hebben hogere kruidrijkdom en een hoger organische stof percentage. Percelen met een bodemleven dat typisch is voor gangbare bedrijven kennen een hoger bulkgewicht (meer verdichting) en een grotere bodemvoorraad fosfor (als gevolg van intensievere bemesting). Tenslotte wordt het bodemleven in graslanden op dekzand ook sterk beïnvloed door de pH.



*Figuur 10. Ordinatie van eDNA data van agrarische graslanden op dekzand waarvan bekend is of er sprake is van gangbare of biologische bedrijfsvoering. Locaties waar het bodemleven op elkaar lijkt worden in de figuur dicht bij elkaar weergegeven. Eigenschappen van de percelen zijn weergegeven als pijlen. Hoe langer pijl, hoe sterker de correlatie tussen de samenstelling van het bodemleven, en de betreffende parameter. De waarde van de betreffende parameter is hoger in percelen waar de pijl naartoe wijst.*

## 3.3.4 Verkenning van potentiële indicatoren op basis van eDNA

### 3.3.4.1 eDNA concentratie

#### Introductie

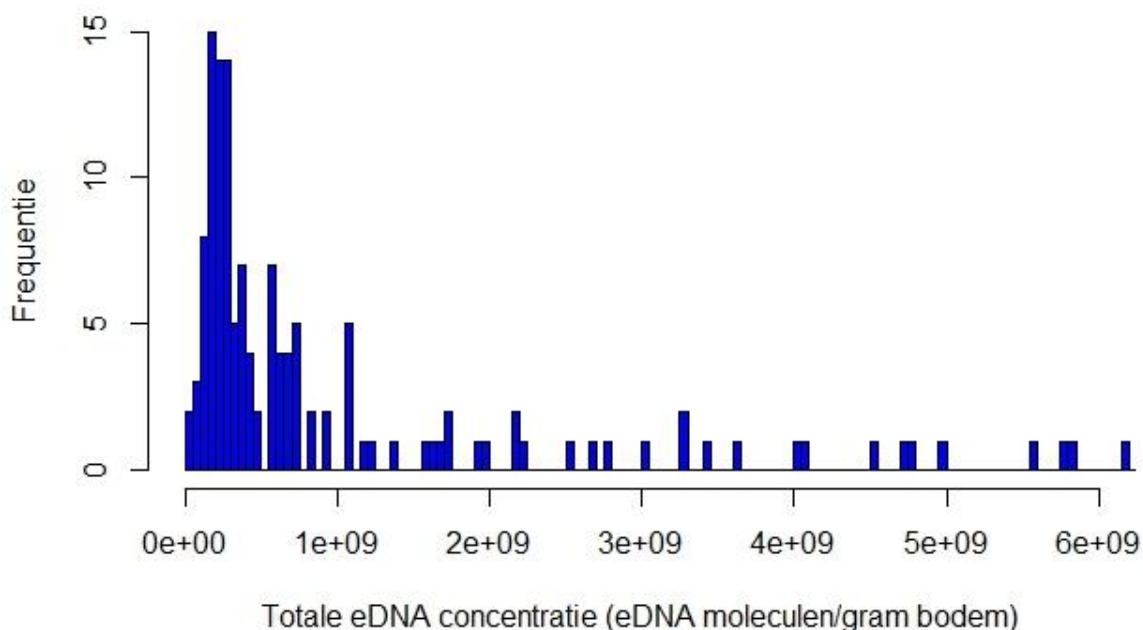
De totale eDNA concentratie (van alle micro-organismen bij elkaar) kan gezien worden als maat voor de hoeveelheid bodemleven. De veronderstelling is dat als er meer bodemleven is, er ook meer eDNA in de bodem aanwezig is.

#### Berekening

De totale eDNA concentratie is berekend door de hoeveelheid eDNA van alle organismen te sommeren.

#### Resultaat

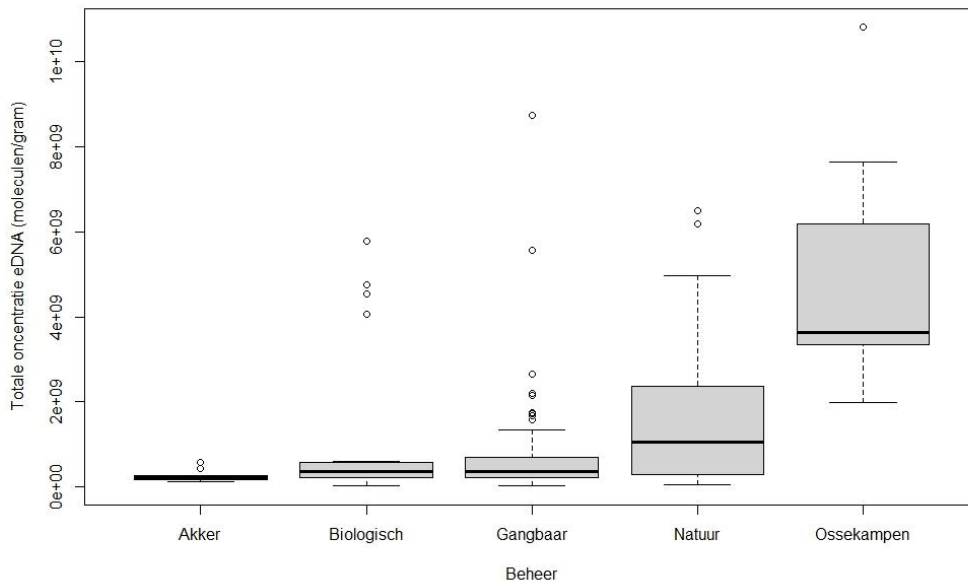
De totale hoeveelheid eDNA dat gedetecteerd is in de monsters varieerde van  $1,8 \times 10^7$  tot  $1,1 \times 10^{10}$ . De meeste locaties bevonden zich in de range van  $3 \times 10^7$  en  $7,5 \times 10^8$ . De verdeling van de eDNA concentraties is weergegeven in Figuur 11.



Figuur 11. De verdeling van de totale gemeten eDNA concentratie op de bemonsterde percelen.

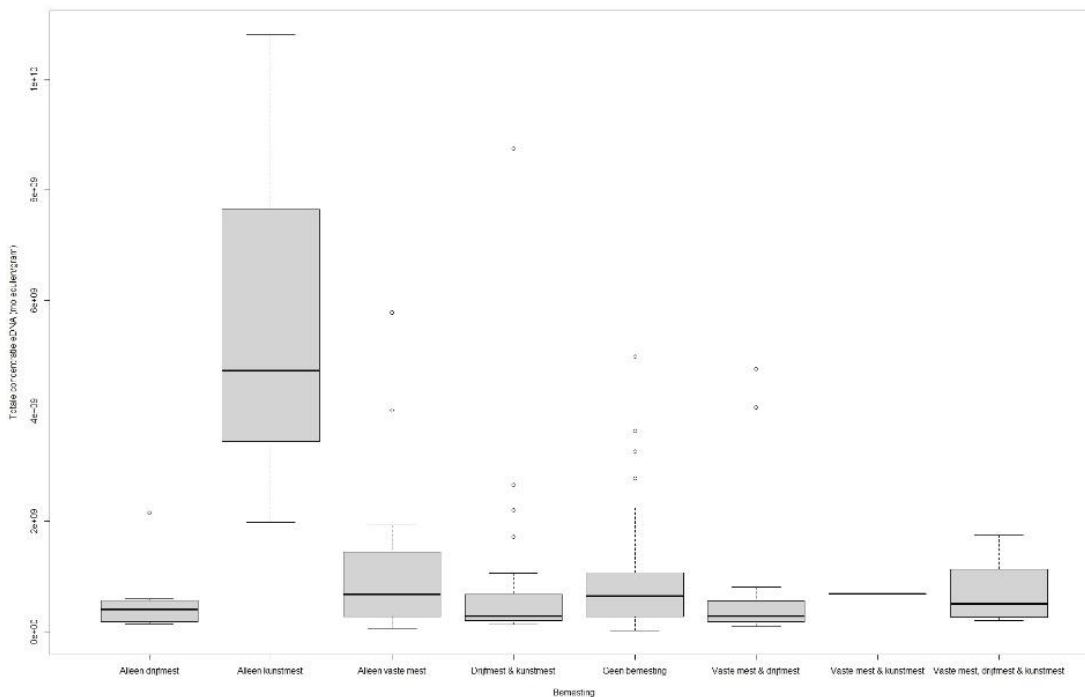
Er is veel variatie tussen de verschillende “beheertypes” (Figuur 12). Globaal is er een trend zichtbaar waarbij gemiddeld de laagste concentraties eDNA gemeten worden in akkers en gemiddeld iets meer eDNA in biologische en gangbare agrarische percelen, uitgaande van een gemiddelde analyse over alle grondsoorten en locaties. Aanzienlijk meer eDNA is gedetecteerd in percelen die aangemerkt zijn als ‘natuur’. Het meeste eDNA is gemeten in proefvlakken van de Ossekampen. Op deze proefvlakken wordt sinds de jaren '50 hetzelfde beheer (maaien en afvoeren) gevoerd. Deze stabiliteit maakt dat het bodemleven goed tot ontwikkeling gekomen is.





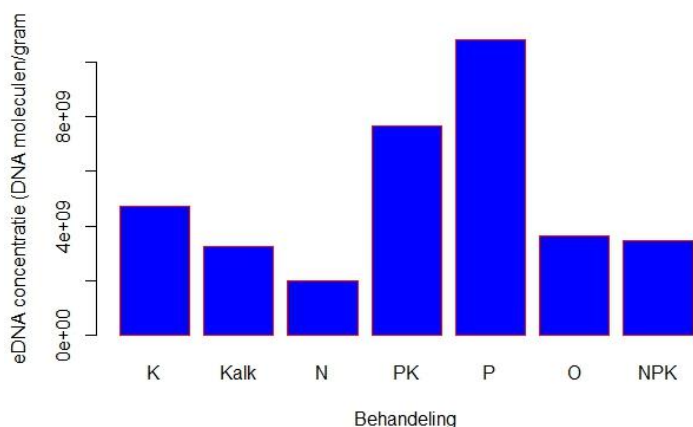
Figuur 12. eDNA concentraties (moleculen/gram) per beheertype. 'Biologisch' en 'Gangbaar' staan voor respectievelijk biologisch en gangbaar beheerde graslanden. De gemiddeld laagste concentraties eDNA zijn gemeten in akkerpercelen. De hoogste concentraties eDNA zijn aangetroffen in relatief ongestoorde graslanden als natuurpercelen en de Ossekampen.

De concentratie eDNA is gemiddeld het laagste op percelen waar drijfmest toegepast wordt, al zijn deze verschillen niet significant (Figuur 13). Onafhankelijk van het mestgebruik kan er in de praktijk een grote variatie optreden: ook percelen bemest met drijfmest laten soms hoge eDNA concentraties zien. Bemesting alleen kan daarmee dus niet alle verschillen in eDNA concentratie tussen agrarische percelen en natuurpercelen verklaren.



Figuur 13. Effecten bemesting op de totale concentratie eDNA.

Opvallend is de hoge concentratie eDNA die gemeten is in graslanden waar alleen kunstmest toegepast is. Dit betreft de plots in de Ossekampen, waar reeds tientallen jaren hetzelfde bemest wordt met verschillende types kunstmest. Hier lijkt het effect van jarenlang ongewijzigd beheer te leiden tot hoge concentratie eDNA (veel bodemleven). Daarnaast zal ook meespelen dat deze graslanden relatief voedselrijk zijn (rivierklei). Het toedienen van kunstmest zelf lijkt dus niet te leiden tot afname van totale hoeveelheid eDNA. Opvallend is dat het type kunstmest wel grote invloed heeft. De grootste hoeveelheid eDNA werden gemeten in de P en PK plots (Figuur 14). De P-AL van de Ossekampen plots is echter relatief laag ten opzichte van graslanden die gangbaar beheerd worden (bemest worden met drijfmest).



*Figuur 14. Resultaten van verschillende bemestingsplots bij de Ossekampen. De totale concentratie eDNA zoals gemeten met de universele primers, per behandeling.*

De totale hoeveelheid eDNA is positief gecorreleerd met onder andere de kruidenrijkdom, bewortelingsdiepte, voedselrijkdom (CEC), organisch stofgehalte, stikstofvoorraad (N-totaal), en zwavelvoorraad (S-totaal), zie Tabel 6. De totale hoeveelheid eDNA is negatief gecorreleerd met P-AL en de bulkdichtheid. Verdichte percelen bevatten dus minder bodemleven. De impact van het bemestingsverleden was lastig vast te stellen: de meetmethodiek voor P-AL is te onzeker (maar wel negatief), terwijl er geen relatie te vinden was met P-CaCl<sub>2</sub>, de P concentratie in bodemoplossing die hoger is in percelen met een rijk bemestingsverleden. Er is geen correlatie gevonden tussen de totale hoeveelheid eDNA en de pH, CN-ratio, Na-totaal en de potentiële methaanuitstoot.

Tabel 6. Spearman's rank correlaties tussen de totale concentratie eDNA met diverse chemische-fysische parameters, gewaseigenschappen en potentiële broeikasgasuitstoot. De gegeven correlatiecoëfficiënten voor CO<sub>2</sub> en CH<sub>4</sub> (methaan) zijn gemeten bij 60% van de vloeigrens en N<sub>2</sub>O (lachgas) bij 90% van de vloeigrens. Statistisch significante positieve relaties zijn groen gemarkeerd, significante negatieve relaties zijn rood gemarkeerd.

#### Chemisch-fysische eigenschappen

Omschrijving	p-waarde	rho
OS%	5,66E-10	0,513
C-organisch	8,29E-10	0,501
N-Totaal	1,46E-09	0,488
CN-ratio	0,058	-0,162
P-AL	0,005	-0,241
P-CaCl	0,101	0,141
S-Totaal	1,87E-05	0,357
Na-Totaal	0,929	0,008
Ca-Cohex	8,90E-06	0,369
K-Cohex	0,0422	0,174
Mg-Cohex	1,63E-08	0,460
Fe-Totaal	3,03E-05	0,348
CEC-Cohex	1,55E-06	0,397
Klei %	4,12E-06	0,381
pH-CaCl	0,346	-0,081
Bulkgewicht	3,10E-06	-0,411
Vocht % bij bemonstering	3,58E-07	0,437

#### Ecosysteemdiensten en gewaseigenschappen

Omschrijving	p-waarde	rho
Maximale bewortelingsdiepte	0,005	0,255
Kruidenrijkdom (Q-waarde)	0,009	0,230
Pot. CH <sub>4</sub> uitstoot	0,303	0,097
Pot. CO <sub>2</sub> uitstoot	7,20E-05	0,362
Pot. N <sub>2</sub> O uitstoot	5,85E-06	0,409

#### Perspectief als indicator

De totale hoeveelheid eDNA lijkt sterk samen te hangen met de stabiliteit van het systeem, waarbij vruchtbare en kleirijke bodems meer eDNA hebben. Ongestoorde graslanden kennen hoge eDNA concentratie (veel bodemleven). In verdichte bodems wordt minder eDNA gevonden. Ook correleert de totale hoeveelheid eDNA positief met kruidenrijkdom en maximale bewortelingsdiepte. Bovendien correleert de totale hoeveelheid eDNA met de uitstoot van CO<sub>2</sub> en N<sub>2</sub>O. Er blijkt dus een verband te zijn tussen allerlei parameters en de totale hoeveelheid eDNA. De totale hoeveelheid eDNA lijkt daarom een zeer geschikte om toe te passen als biologische indicator voor bodemkwaliteit. De verwachting is dat het bodemleven, en daarmee de totale eDNA concentratie, toeneemt naarmate een grasland tot een stabiel ecosysteem ontwikkelt.

### 3.3.4.2 eDNA diversiteit

#### Introductie

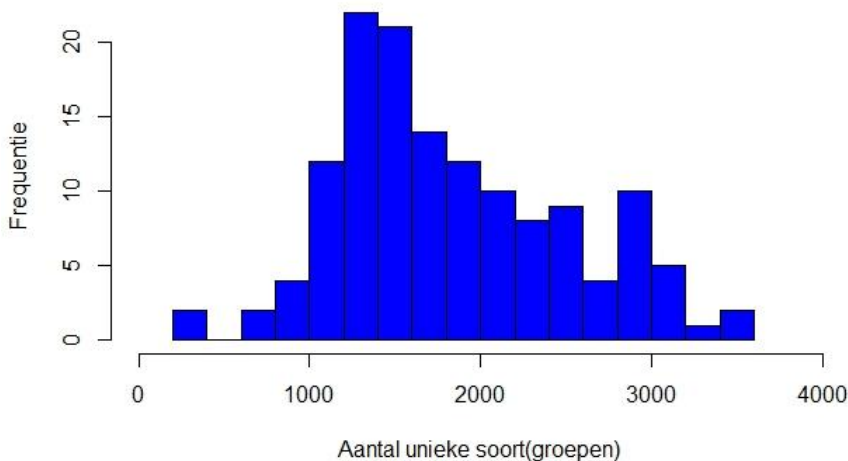
Biodiversiteit is een maat voor de verscheidenheid aan soorten die in een bepaald gebied voorkomen. Hoe meer soorten er in een gebied voorkomen hoe hoger de biodiversiteit. Omdat verschillende soorten en soortgroepen verschillende functies hebben betekent een hogere biodiversiteit meestal ook dat er meer functies in een gebied voorkomen. In dat geval gaat de functionele diversiteit ook omhoog waardoor de bodem beter instaat is om drukken (zoals droogte) op het systeem op te vangen (Zhang *et al.*, 2020). Bodemstabiliteit wordt verder bevorderd door een hogere biodiversiteit doordat er een sterkere samenwerking tussen verschillende bodemorganismen tot stand komt. Deze samenwerking kan een positief effect hebben op de aanwezige vegetatie, en daarmee de bovengrondse biodiversiteit, of het mineralisatieproces (Saleem, Hu & Jousset, 2019; Morriën *et al.*, 2017).

#### Berekening

Het aantal unieke DNA-codes dat in een bodemmonster gemeten wordt kan gebruikt worden als maat voor de diversiteit aan bodemleven. Elke unieke DNA-code staat daarbij voor een unieke soort, of groep van verwante soorten. Bij eDNA metabarcoding analyses kan gevoeliger gedetecteerd worden bij monsters waarin de totale eDNA concentratie laag is. Als gevolg daarvan kunnen soorten die in lage concentraties voorkomen alleen gedetecteerd worden in monsters waarin de totale eDNA concentratie laag is. Om de gevoeligheid waarmee het aantal soorten bepaald wordt te normaliseren is er een threshold ingesteld. Soorten die met minder dan 20.000 moleculen per gram grond voorkomen zijn verwijderd uit de dataset. Zodoende kon in alle monsters met dezelfde gevoeligheid het aantal unieke DNA-codes vastgesteld worden.

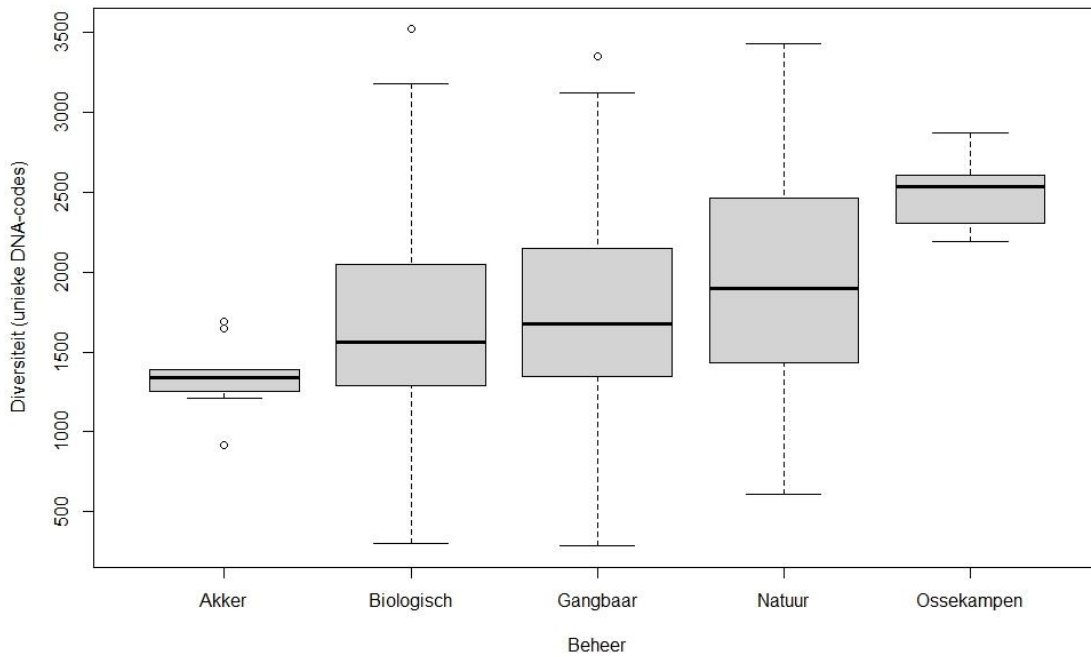
#### Resultaten

De hoeveelheid soort(groepen) varieert van 238 tot 3521 soort(groepen) per monster (Figuur 15).



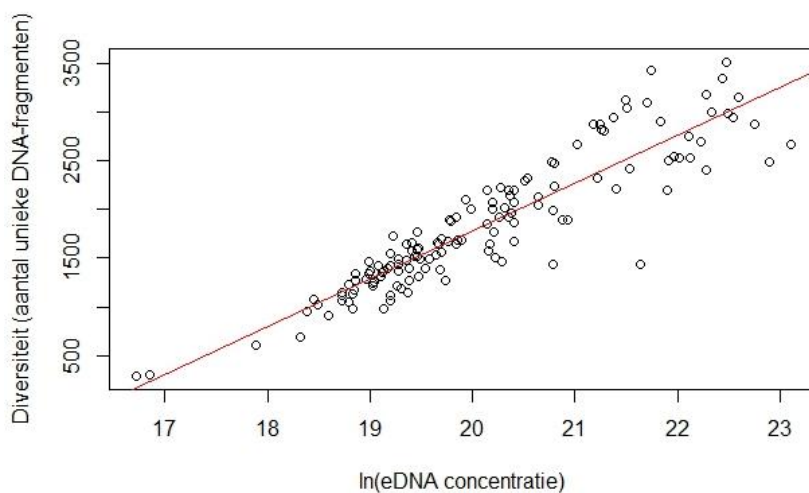
Figuur 15. De verdeling van de totale gemeten eDNA diversiteit op de bemonsterde percelen.

In Figuur 16 is de gemeten diversiteit uitgezet per beheertype. Op akkers werd gemiddeld de laagste diversiteit gemeten. De hoogste diversiteit werd gemeten op de zeer oude proefvlakken van de Ossekampen.



*Figuur 16. Ondergrondse biodiversiteit per beheertype. ‘Biologisch’ en ‘Gangbaar’ staan voor respectievelijk biologisch en gangbaar beheerde graslanden. De gemiddeld laagste biodiversiteit werd gemeten in akkerpercelen. De hoogste biodiversiteit is aangetroffen in relatief ongestoorde graslanden als de Ossekampen.*

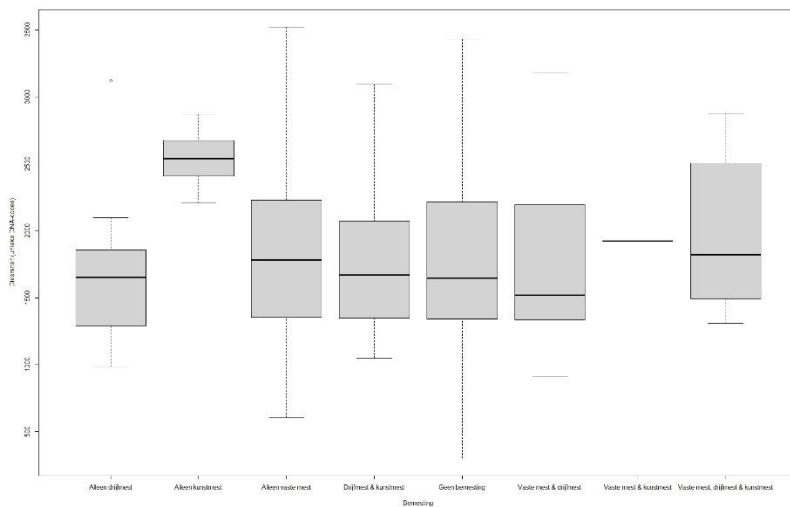
Monsters met een hogere eDNA concentratie hebben overigens ook een hogere diversiteit, zie Figuur 17 (Lineaire regressie op ln-getransformeerde eDNA concentratie data;  $F=678$ ;  $p$ -waarde  $< 2.2e-16$ ;  $R^2=0,833$ ). Meer bodemleven betekent dus ook een hogere diversiteit boven een threshold van 20.000 moleculen per gram grond.



*Figuur 17. Er is sprake van een sterk significant verband tussen de totale eDNA concentratie en de diversiteit (aantal unieke DNA-fragmenten in een monster).*

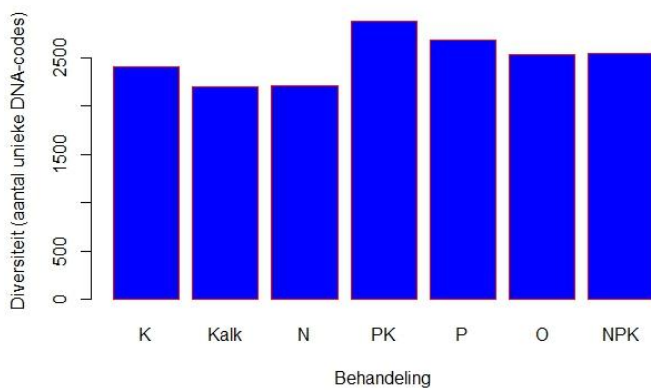
De diversiteit werd slechts in beperkte mate beïnvloed door het type bemesting (Figuur 18). De variatie tussen percelen die op een verschillende manier bemest worden is tamelijk groot. De hoge diversiteit in Ossekampen proefvlakken (de ‘alleen kunstmest’ groep in Figuur 18) is waarschijnlijk een gevolg van een

combinatie van het feit dat dit vruchtbare rivierkleigrond betreft en dat op deze graslanden al tientallen jaren hetzelfde hooilandbeheer toegepast wordt. Wel is er sprake van een negatieve correlatie met de geschatte P-AL (Tabel 7). Dit geeft aan dat een intensief bemestingsverleden een negatief effect kan hebben op de diversiteit van het bodemleven.



Figuur 18. Effecten bemesting op de diversiteit (aantal unieke DNA-codes die gemeten zijn).

Binnen de proefvlakken bij de Ossekampen werden beperkte verschillen in diversiteit waargenomen tussen de verschillende behandelingen. Een lichte verhoging van diversiteit in het P- en PK-plot en verlaging van diversiteit in het kalk- en N-plot lijken vooral een afspiegeling te zijn van de totale eDNA concentratie (Figuur 19).



Figuur 19. Resultaten van verschillende bemestingsplots bij de Ossekampen. De totale diversiteit werd beperkt beïnvloed door de verschillende behandelingen.

De eDNA diversiteit in de bodem is positief gecorreleerd met de concentratie van de meeste nutriënten (Tabel 7). Ook is er een negatieve correlatie met de bulkdichtheid. Verdichte bodems kennen dus een minder divers bodemleven. Er zijn geen significante relaties vastgesteld tussen de eDNA diversiteit en kruidenrijkheid. Een hoge kruidenrijkdom bovengronds wil dus niet zeggen dat de biodiversiteit ondergronds ook hoog is.

Tabel 7. Spearman's rank correlaties tussen de eDNA diversiteit met diverse chemisch-fysische parameters, gewaseigenschappen en potentiële broeikasgasuitstoot. De gegeven correlatiecoëfficiënten voor CO<sub>2</sub> en CH<sub>4</sub> (methaan) zijn gemeten bij 60% van de vloeigrens en N<sub>2</sub>O (lachgas) bij 90% van de vloeigrens. Statistisch significante positieve relaties zijn groen gemarkeerd, significante negatieve relaties zijn rood gemarkeerd.

#### Chemisch-fysische eigenschappen

Omschrijving	p-waarde	rho
OS %	0,003	0,259
C-organisch	0,005	0,248
N-Totaal	2,21E-05	0,354
CN-ratio	0,008	-0,225
P-AL	0,006	-0,234
P-CaCl	0,031	0,184
S-Totaal	0,002	0,263
Na-Totaal	0,457	-0,04
Ca-Cohex	8,67E-05	0,329
K-Cohex	0,010	0,221
Mg-Cohex	3,11E-06	0,386
Fe-Totaal	0,002	0,262
CEC-Cohex	4,98E-06	0,379
Klei %	0,000	0,308
pH-CaCl	0,612	0,043
Bulkgewicht	0,000	-0,345
Vocht % bij bemonstering	0,003	0,262

#### Ecosysteemdiensten en gewaseigenschappen

Omschrijving	p-waarde	rho
Maximale bewortelingsdiepte	0,221	0,112
Kruidenrijkdom (Q-waarde)	0,308	0,092
Pot. CH <sub>4</sub> uitstoot	0,750	-0,030
Pot. CO <sub>2</sub> uitstoot	0,123	0,145
Pot. N <sub>2</sub> O uitstoot	0,282	0,101

#### Perspectief als indicator

De eDNA diversiteit correleert positief met de stabiliteit van de bodem (natuurlijke graslanden hebben een grotere eDNA diversiteit), en mogelijk negatief met historische P-bemesting (P-AL) en verdichting (bulkgewicht). Er is geen correlatie gevonden tussen de bovengrondse diversiteit en potentiële broeikasgasuitstoot. De ondergrondse diversiteit blijkt dus slecht voorspeld te kunnen worden op basis van de bovengrondse diversiteit (kruidenrijkheid). Het toepassen van eDNA om een beeld te verkrijgen van de ondergrondse biodiversiteit heeft daarmee veel toegevoegde waarde, zeker als agrariërs gevraagd wordt (ondergrondse) biodiversiteit te stimuleren. De indicator 'eDNA diversiteit' is daarmee van toegevoegde waarde.

## Rol van micro-organismen in de stikstofcyclus

Stikstof is, in verschillende vormen, van groot belang voor al het leven op aarde. Daarmee is stikstof ook het belangrijkste nutriënt dat van nature limiterend is voor de groei van veel organismen. Micro-organismen vormen in (natuurlijke) ecosystemen complexe netwerken waardoor reacties waarbij stikstofverbindingen afgebroken of gevormd worden met elkaar verbonden zijn (Kuypers, Marchant & Kartal, 2018). De stikstofkringloop ziet er als volgt uit:

De lucht bestaat voor een groot deel uit stikstofgas ( $N_2$ ). Stikstofbindende bacteriën kunnen dit stikstofgas binden en gebruiken als bouwstenen om eiwitten aan te maken, of geven deze stikstof direct door aan de plant (vlinderbloemigen).

Wanneer zo'n bacterie of plant doodgaat dan komt deze stikstof beschikbaar in de vorm van ammonium ( $NH_4^+$ ). Ook kan ammonium kunstmatig toegediend worden in de vorm van organische bemesting (drijfmest, vaste mest, compost) of in de vorm van kunstmest. Tenslotte kan de concentratie ammonium ( $NH_4^+$ ) in de bodem ook verhoogd worden door stikstofdepositie afkomstig van veehouderij, industrie en verkeer.

Ammonium kan door ammonium-oxiderende bacteriën en archaea omgezet worden in nitriet ( $NO_2^-$ ). Bij deze omzetting komt  $H^+$  vrij, wat leidt tot verzuring van de bodem.

Nitriet wordt door nitrificerende bacteriën omgezet in nitraat ( $NO_3^-$ ).

Nitraat en ammonium kunnen door de plant opgenomen worden. Veel gewassen zijn voor goede groei afhankelijk van nitraatstikstof. Veel planten in de natuur daarentegen zijn juist aangepast aan overleven in afwezigheid van nitraatervan. Deze planten worden dan verdrongen door planten die juist profiteren van de verhoogde concentratie nitraat stikstof (zoals brandnetels). Veel nitraat stikstof (als gevolg van ammoniumdepositie) in de natuur leidt daardoor tot afname van bijzondere planten en bloemen.

Als laatste stap in de stikstofkringloop kunnen denitrificerende bacteriën nitraat omzetten in stikstofgas ( $N_2$ ). Denitrificatie vindt plaats onder relatief zuurstofarme omstandigheden. Met name als er na bemesting sprake is van flinke regenval dan kan veel nitraat omgezet worden in stikstofgas. Deze stap gaat gepaard met uitstoot van lachgas ( $N_2O$ ), een zeer sterk broeikasgas.

De organismen die verantwoordelijk zijn voor de verschillende stappen in de stikstofkringloop kunnen gemeten worden met de eDNA zoals deze is uitgevoerd in dit project. In de volgende paragrafen worden een aantal van de genoemde organismen onder de loep genomen.



### 3.3.4.3 Stikstofbindende bacteriën

#### *Introductie*

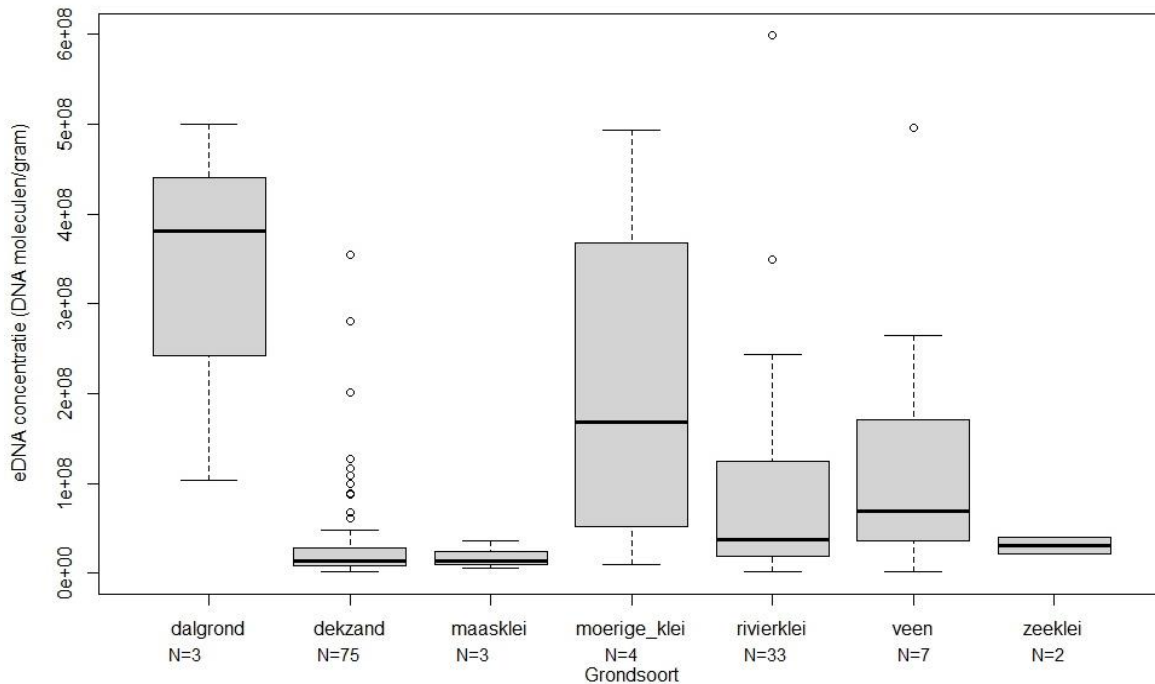
Bacteriën die moleculair stikstof ( $N_2$ ) kunnen opnemen uit de lucht (diazotrofie) worden stikstofbindende bacteriën genoemd. Deze stikstofbindende bacteriën zorgen ervoor dat extra stikstof vanuit de lucht de bodem in wordt gebracht in de vorm van  $NH_3/NH_4^+$ . Een bekende stikstofbindende bacterie is *Rhizobium*. Deze bacterie leeft in symbiose met vlinderbloemige in stikstofwortelknolletjes, en voorziet vanuit daar de plant van stikstof. Naast bacteriën die in symbiose met een plant leven zijn er ook bacteriën die vrij in de bodem leven zoals cyanobacteriën (Issa *et al.*, 2014). Sommige bacteriën die stikstof fixeren leven onder aerobe omstandigheden, zoals Rhizobiaceae, terwijl andere juist onder (lokale) anaerobe omstandigheden voorkomen zoals veel *Clostridium* soorten. Plantenwortels zijn zoveel mogelijk uit de monsters verwijderd. Als gevolg daarvan worden stikstofbindende bacteriën die in wortelknolletjes voorkomen slechts beperkt gemeten. De stikstofbindende bacteriën die gemeten zijn met de eDNA methode (universele primer) betreffen dus voornamelijk vrij levende soorten.

#### *Berekening*

Het nifH gen codeert voor enzymen die betrokken zijn bij stikstoffixatie. De volgende zoekopdracht is in april 2023 toegepast op de UniProtKB database: “(gene:nifh) AND (taxonomy\_id:2)”. Alle genera die meer dan 10X voorkwamen in de database zijn beschouwd als stikstof-fixerend. DNA-sequenties in de dataset waarvan alle best matches met organismen in referentie database stikstof-fixerend zijn, worden ook beschouwd als stikstof-fixerend. De hoeveelheid eDNA van stikstof-fixerende bacteriën is berekend door de hoeveelheid eDNA van alle stikstof-fixerende organismen in de dataset te sommeren. Het aandeel stikstof-fixerende organismen is berekend door de som van eDNA van stikstof-fixerende organismen te delen door de totale hoeveelheid eDNA van prokaryoten.

#### *Resultaten*

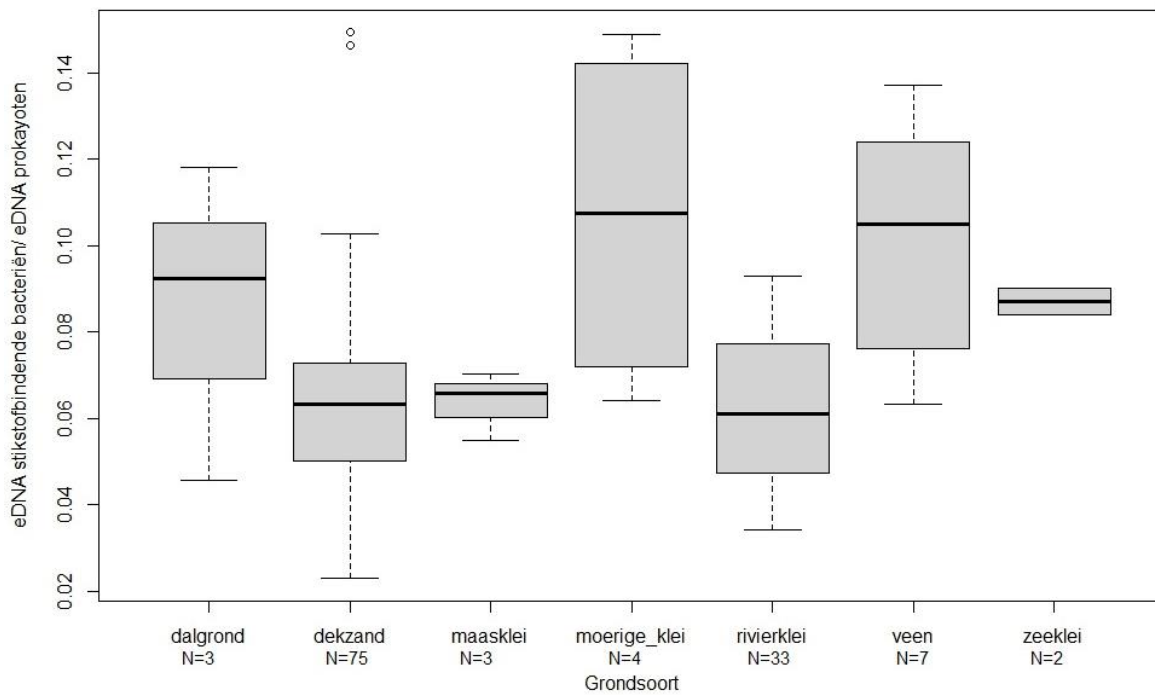
Er was sprake van een significant verband tussen organische koolstof in de bodem en de hoeveelheid stikstofbindende bacteriën (lineaire regressie;  $F=68,35$ ;  $p$ -waarde= $1,641 \times 10^{-13}$ ;  $R^2=0,352$ ) en het aandeel eDNA van stikstofbindende bacteriën ten opzichte van de totale hoeveelheid eDNA van prokaryoten (lineaire regressie;  $F=14,55$ ;  $p$ -waarde= $0,0002$ ;  $R^2=0,104$ ). De grootste hoeveelheden stikstofbindende bacteriën zijn dan ook aangetroffen in bodems met een hoog organisch stofgehalte (Figuur 20).



Figuur 20. eDNA concentratie van stikstofbindende bacteriën. De grootste hoeveelheden eDNA van stikstofbindende bacteriën werden gemeten in bodems met een hoog organisch stofgehalte.

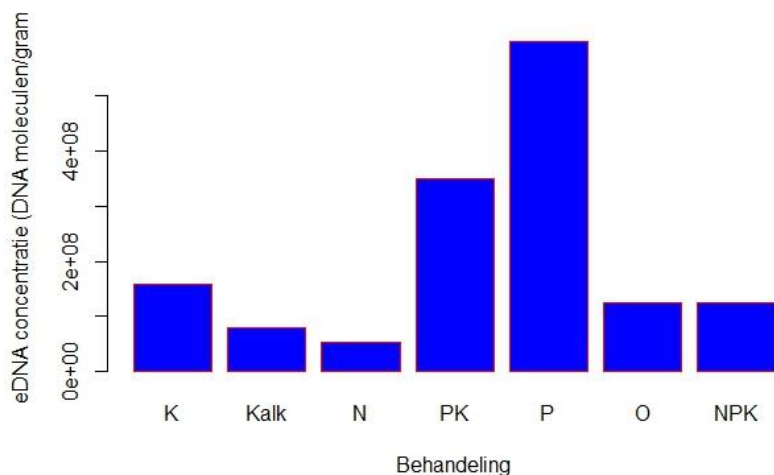
Figuur 21 toont het aandeel stikstofbindende bacteriën per bodemsoort. Ook wanneer specifiek gekeken wordt naar dekzandgraslanden was er een zwakke, maar significante relatie tussen de hoeveelheid organische koolstof in de bodem en het aandeel stikstofbindende bacteriën (lineaire regressie;  $F=9,091$ ;  $p$ -waarde= $0,003$ ;  $R^2=0,1056$ ). Bij een hoger organisch stofgehalte was er sprake van een hoger aandeel stikstofbindende bacteriën. De relatie tussen organische koolstof en de absolute concentratie stikstofbindende bacteriën was niet significant (lineaire regressie;  $F=0,06792$ ;  $p$ -waarde= $0,795$ ;  $R^2=0,0008$ ).

Opvallend is dat in rivierkleibodems het aandeel stikstofbindende bacteriën geen significante relatie toont met C-organisch (lineaire regressie;  $F=0,452$ ;  $p$ -waarde= $0,507$ ;  $R^2=0,016$ ). Wel was er sprake van een significante relatie tussen C-organisch en de concentratie stikstofbindende bacteriën (lineaire regressie;  $F=10,61$ ;  $p$ -waarde= $0,003$ ;  $R^2=0,275$ ). Waarschijnlijk is dit echter het gevolg van het feit dat er bij een hoge C-organisch in het algemeen meer eDNA (en dus bodemleven) gemeten is. Het aandeel stikstofbindende bacteriën is niet hoger in rivierkleibodems met een hoge C-organisch waarde, maar de totale concentratie stikstofbindende bacteriën is wel groter omdat er in het algemeen meer bodemleven aanwezig is in rivierkleibodems met een hoge C-organisch waarde.



Figuur 21. Aandeel van stikstofbindende bacteriën in verschillende bodemtypes. De grootste aandelen eDNA van stikstofbindende bacteriën werden gemeten in bodems met een hoog organisch stofgehalte.

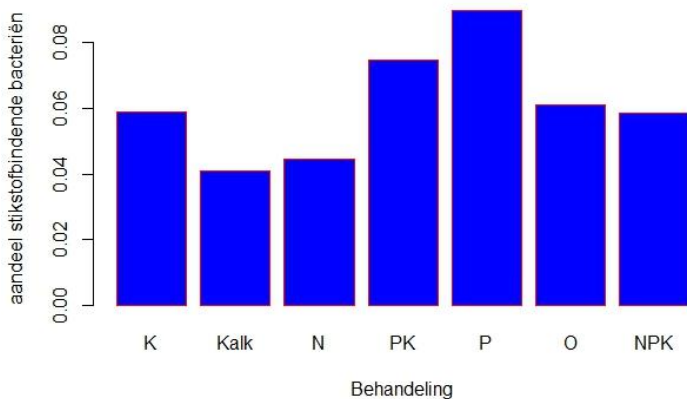
Bij de Ossekampen werden de hoogste concentraties eDNA van stikstofbindende bacteriën gemeten in de plots waar P-bemesting plaats vond, maar geen N-bemesting (Figuur 22). In het plot waar bekalkt is en waar N-bemesting heeft plaatsgevonden is juist sprake van een afname van stikstofbindende bacteriën.



Figuur 22. Resultaten van verschillende bemestingsplots bij de Ossekampen. Hoeveelheid eDNA van stikstofbindende bacteriën.

In de proefvlakken waar PK- en P-bemesting plaatsvond was de totale concentratie eDNA (van alle gemeten organismen) het hoogste. Om uit te sluiten dat de verhoging van stikstofbindende bacteriën puur een effect was van de gehele toename van eDNA is ook de verhouding tussen stikstofbindende bacteriën ten opzichte van eDNA van prokaryoten in het algemeen in beeld gebracht (Figuur 23). Dit geeft echter een vergelijkbaar

beeld. Het aandeel bacteriën dat stikstof uit de lucht fixeert is groter in de PK- en P-proefvlakken. In deze plots is stikstof kennelijk limiterend, en heeft het dus een voordeel om stikstof vast te kunnen leggen.



*Figuur 23. Resultaten van verschillende bemestingsplots bij de Ossekampen. Aandeel stikstofbindende bacteriën ten opzichte van totale hoeveelheid prokaryoten.*

Een overzicht van correlaties tussen de hoeveelheid en het aandeel stikstofbindende bacteriën is opgenomen in Tabel 8. Er was sprake van een positieve correlatie tussen de hoeveelheid eDNA en het aandeel van stikstofbindende bacteriën, CEC, organische stof %, C-organisch en N-totaal. Opvallend is dat de C/N ratio niet correleert met de hoeveelheid en het aandeel van stikstofbindende bacteriën. Vermoedelijk is vooral de beschikbaarheid van minerale stikstof (via meststoffen of afbraak van organisch materiaal) sturend. Helaas is daar geen data van beschikbaar. De pH van de bodem correleert niet met de hoeveelheid of het aandeel stikstofbindende bacteriën.

De hoeveelheid en het aandeel eDNA van stikstofbindende bacteriën correleert negatief met P-AL en de bulkdichtheid. Er zijn dus minder stikstofbindende bacteriën aanwezig op percelen die in het verleden zwaar bemest zijn of verdicht zijn.

De CO<sub>2</sub> die vrijkwam in het laboratoriumexperiment bij een vochtigheid van 60% van de vloeigrens is gecorreleerd met de hoeveelheid en het aandeel stikstofbindende bacteriën. De hoeveelheid lachgasuitstoot bij 90% van de vloeigrens correleert met de hoeveelheid eDNA van stikstofbindende bacteriën, maar niet met het aandeel eDNA van stikstofbindende bacteriën.

Tenslotte was er een zwak (maar statistisch significant) verband tussen de hoeveelheid eDNA en de kruidrijkdom (Q-waarde). Het aandeel eDNA van stikstofbindende bacteriën is niet significant gecorreleerd met de kruidrijkdom.

Tabel 8. Spearman's rank correlaties tussen de eDNA concentratie en het aandeel stikstofbindende bacteriën en diverse chemisch-fysische parameters, gewaseigenschappen en potentiële broeikasgasuitstoot. De gegeven correlatiecoëfficiënten voor CO<sub>2</sub> en CH<sub>4</sub> (methaan) zijn gemeten bij 60% van de vloeigrens en N<sub>2</sub>O (lachgas) bij 90% van de vloeigrens. Statistisch significante positieve relaties zijn groen gemarkeerd, significante negatieve relaties zijn rood gemarkeerd.

#### Chemisch-fysische eigenschappen

Omschrijving	eDNA concentratie		Aandeel	
	p-waarde	rho	p-waarde	rho
OS %	1,02E-13	0,597	6,04E-08	0,457
C-organisch	3,38E-13	0,587	7,50E-08	0,454
N-Totaal	7,27E-11	0,520	1,62E-07	0,430
CN-ratio	0,459	-0,064	0,547	0,052
P-AL	0,012	-0,214	0,001	-0,291
P-CaCl	0,137	0,128	0,501	0,058
S-Totaal	5,77E-08	0,443	3,87E-09	0,477
Na-Totaal	0,266	-0,096	0,002	-0,262
Ca-Cohex	4,05E-06	0,382	0,003	0,250
K-Cohex	0,062	0,160	0,348	0,081
Mg-Cohex	1,26E-06	0,400	0,002	0,266
Fe-Totaal	0,000	0,323	0,072	0,154
CEC-Cohex	7,54E-07	0,408	0,001	0,289
Klei %	0,000	0,300	0,202	0,110
pH-CaCl	0,898	-0,011	0,203	0,109
Bulkgewicht	1,45E-06	-0,423	1,08E-05	-0,390
Vocht % bij bemonstering	8,75E-07	0,423	0,001	0,292

#### Ecosysteemdiensten en gewaseigenschappen

Omschrijving	eDNA concentratie		Aandeel	
	p-waarde	rho	p-waarde	rho
Max. bewortelingsdiepte	0,002	0,283	0,000	0,329
Kruidenrijkdom (Q-waarde)	0,037	0,186	0,091	0,151
Pot. CH <sub>4</sub> uitstoot	0,267	0,104	0,030	0,202
Pot. CO <sub>2</sub> uitstoot	0,000	0,328	0,011	0,238
Pot. N <sub>2</sub> O uitstoot	2,17E-05	0,385	0,486	0,066

#### Perspectief als indicator

Er is sprake van een sterke correlatie tussen het aandeel en de hoeveelheid eDNA van stikstofbindende bacteriën en diverse milieuparameters en gewaseigenschappen. Met name de correlatie met organische stof blijkt sterk te zijn. Enerzijds is de toegevoegde waarde van deze indicator beperkt, omdat de correlatie met organische stof zeer sterk is. Sturen op het verhogen van organische stof zal dus waarschijnlijk ook leiden tot een toename van stikstofbindende bacteriën. Anderzijds kan niet alle variatie in eDNA concentratie van stikstofbindende bacteriën verklaard worden door organische stof. Het is nuttig om in beeld te krijgen welke beheermaatregelen bijdragen aan het stimuleren van vrij-levende stikstofbindende bacteriën. Het heeft dus toegevoegde waarde om de hoeveelheid eDNA van stikstofbindende bacteriën als indicator in de praktijk in te zetten. Naast deze indicator kan ook het aandeel stikstofbindende bacteriën ingezet worden als indicator. Met name in de Ossekampen lijkt het aandeel stikstofbindende bacteriën sterker te reageren op beheermaatregelen dan de absolute hoeveelheid eDNA van stikstofbindende

bacteriën. Het lijkt daarmee dus relevant om naast de absolute hoeveelheid eDNA ook te kijken naar verschuivingen in de microbiële gemeenschap, en dus ook mee te nemen welk aandeel van de microbiële gemeenschap in staat is om stikstof vast te leggen.

### 3.3.4.4 Nitrificerende organismen

#### *Introductie*

Nitrificatie is een centraal onderdeel van de stikstofcyclus. Tijdens dit proces wordt ammoniak ( $\text{NH}_3$ ) via nitriet ( $\text{NO}_2^-$ ) omgezet naar nitraat ( $\text{NO}_3^-$ ). De oxidatie van ammonium is hierbij de eerste stap en wordt o.a. door ammonium-oxiderende archaea uitgevoerd. Omdat nitraat relatief makkelijk uitspoelt en omgezet kan worden in moleculair stikstof ( $\text{N}_2$ ) of lachgas ( $\text{N}_2\text{O}$ , een sterk broeikasgas) draagt nitrificatie bij aan stikstofverlies uit de bodem. In agrarische bodems zijn ammonium-oxiderende organismen enerzijds nodig om ammonium om te zetten in voor het gewas goed op te nemen nitraat. Anderzijds kan te snelle nitrificatie ook leiden tot het verliezen van stikstof aan de atmosfeer, of via uitspoeling naar het grondwater (Huang *et al.*, 2021). In natuurgraslanden duiden hoge concentraties ammonium-oxiderende organismen juist op een overschot aan nitraat, hetgeen in natuurpercelen ongewenst is (Sims *et al.*, 2012).

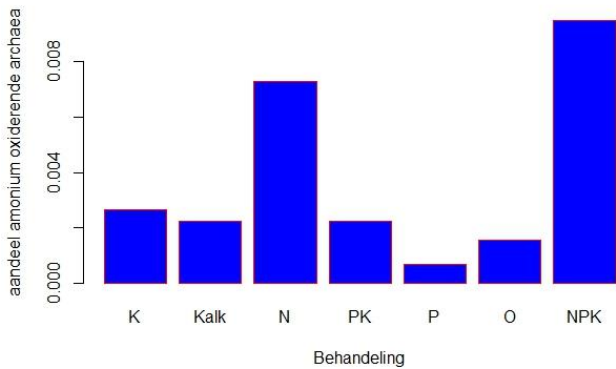
#### *Berekening*

In deze studie is gekeken naar ammonium-oxiderende bacteriën en archaea. Het Ammonia monooxygenase alpha subunit gen codeert voor enzymen die betrokken zijn bij de omzetting van ammonia naar nitriet. De volgende zoekopdracht is in augustus 2023 toegepast op de UniProtKB database: “(gene:amoA) AND (taxonomy\_id:2) OR (gene:amoA) AND (taxonomy\_id:2157)”. Alle genera die meer dan 3 keer voorkwamen in de database zijn beschouwd als ammonium oxiderend. Drie genera van ammonium oxiderende organismen bleken niet naar boven te komen bij de zoekopdracht: *Alcaligenes*, *Nitrosarchaeum* en *Nitrosocosmicus*. Deze zijn handmatig toegevoegd. De DNA-sequenties in de dataset waarvan alle best matches met organismen in referentie database ammonium-oxiderend zijn, worden als dusdanig beschouwd. De hoeveelheid eDNA van ammonium-oxiderende bacteriën is berekend door de hoeveelheid eDNA van alle ammonium-oxiderende organismen in de dataset te sommeren. Het aandeel ammonium-oxiderende organismen is berekend door de som van eDNA van ammonium-oxiderende organismen te delen door de totale hoeveelheid eDNA van prokaryoten.

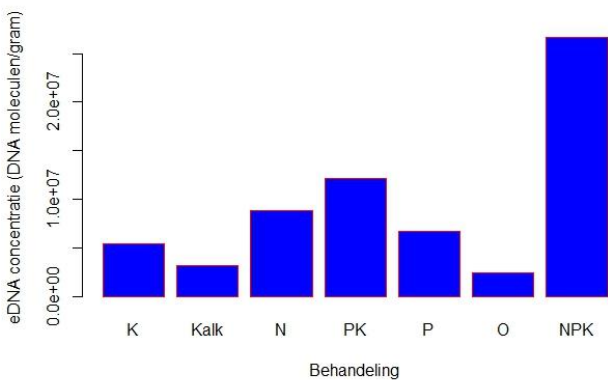
#### *Resultaten*

Correlaties tussen de hoeveelheid en het aandeel ammonium oxiderende organismen zijn opgenomen in Tabel 9. Over het algemeen was de hoeveelheid ammonium oxiderende organismen het hoogste in percelen met hoge vruchtbaarheid en hoge concentraties van diverse nutriënten en een hoge CEC, C-organisch en N-totaal. Het aandeel eDNA van ammonium oxiderende organismen is echter niet gecorreleerd met de algemene nutriënten beschikbaarheid in de bodem.

In de Ossekampen wordt de stikstofbemesting toegediend in de vorm van kalkammonsalpeter ( $\text{NH}_4\text{NO}_3 + 6\% \text{CaCO}_3$ ). Het aandeel eDNA van ammonium oxiderende organismen is relatief laag in de Ossekampen, vermoedelijk omdat er geen drijfmest of andere organische bemestingsvorm toegepast wordt in de Ossekampen. Opvallend is dat de hoeveelheid eDNA van ammonium oxiderende organismen niet alleen toeneemt in de plots waar stikstofbemesting plaats vindt, maar ook in de plots die K en/of P bemest zijn (Figuur 25). Het aandeel ammonium oxiderende organismen is daarentegen specifiek verhoogd in de plots waar sprake is van N-bemesting (Figuur 24). Dit is een aanwijzing dat het aandeel eDNA van ammonium oxiderende organismen een betere indicator zou kunnen zijn voor de stikstofdruk op de bodem dan de absolute hoeveelheid eDNA van ammonium oxiderende organismen.



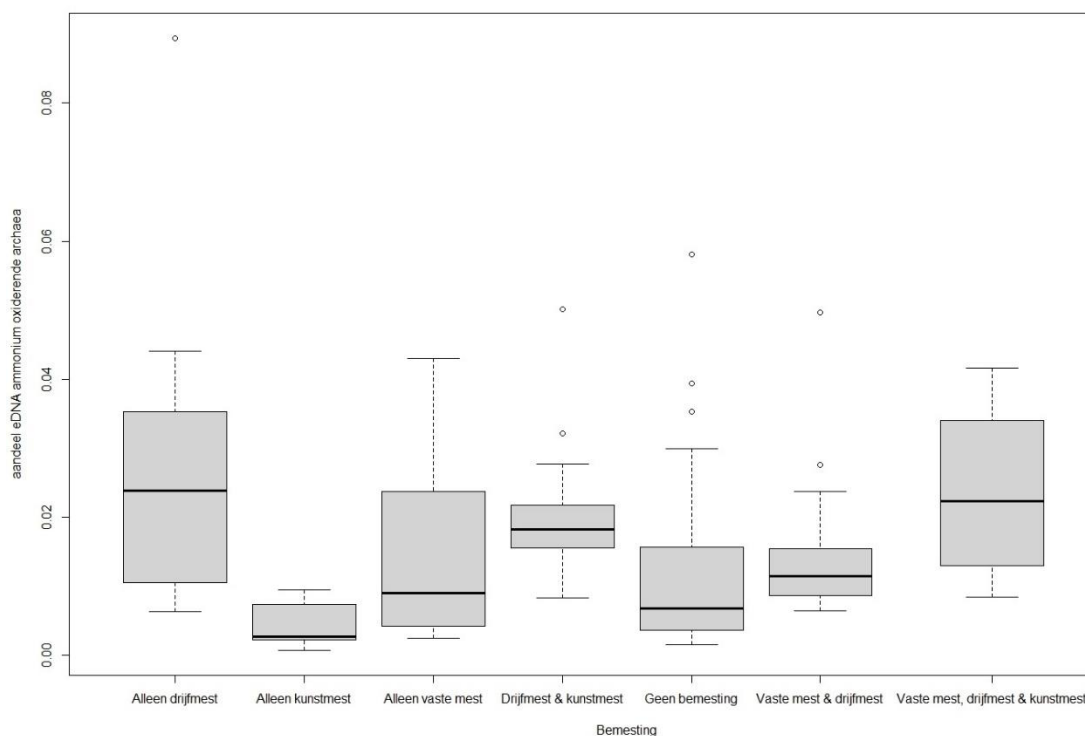
*Figuur 24. Resultaten van verschillende behandelingen bij de Ossekampen. Aandeel ammonium oxiderende organismen ten opzichte van totale hoeveelheid prokaryoten.*



*Figuur 25. Resultaten van verschillende behandelingen bij de Ossekampen. Hoeveelheid ammonium oxiderende organismen.*

Drijfmest bevat in vergelijking met vaste mest een hoge concentratie ammonium. Dit is duidelijk terug te zien in de aandelen ammonium-oxiderende organismen in de bodem. Op percelen waar drijfmest toegepast wordt is het aandeel van deze organismen aanmerkelijk hoger (Figuur 26). Het toepassen van vaste mest alleen resulteert niet of nauwelijks in een verhoging van ammonium-oxiderende organismen. Dat ammonium-oxiderende organismen reageren op de ammonium component in de bemesting wordt bevestigd door de afwezigheid van een correlatie tussen N-totaal (som van ammonium, nitraat en organische stikstof) en het aandeel ammonium-oxiderende organismen (lineaire regressie;  $F= 0,574$ ;  $P$ -waarde= $0,499$ ;  $R^2=0,004$ ).

De kruidenrijkdom is niet significant gecorreleerd met de hoeveelheid eDNA van ammonium oxiderende organismen. Wel is er sprake van een statistisch significante negatieve relatie tussen het aandeel ammonium oxiderende organismen en de kruidenrijkdom.



Figuur 26. Het aandeel ammonium-oxiderende organismen bij verschillende bemestingsniveaus.

Tabel 9. Spearman's rank correlaties tussen de eDNA concentratie en het aandeel ammonium oxiderende organismen & diverse chemische-fysische parameters, gewaseigenschappen en potentiële broeikasgasuitstoot. De gegeven correlatiecoëfficiënten voor CO<sub>2</sub> en CH<sub>4</sub> (methaan) zijn gemeten bij 60% van de vloeigrens en N<sub>2</sub>O (lachgas) bij 90% van de vloeigrens. Statistisch significante positieve relaties zijn groen gemarkeerd, significante negatieve relaties zijn rood gemarkeerd.

#### Chemisch-fysische eigenschappen

Omschrijving	eDNA concentratie		Aandeel	
	p-waarde	rho	p-waarde	rho
OS %	2,2E-06	0,404	0,550	-0,053
C-organisch	1,47E-06	0,411	0,492	-0,061
N-totaal	0,000	0,312	0,837	-0,018
CN-ratio	0,405	-0,072	0,146	-0,125
P-AL	0,093	-0,144	0,387	0,075
P-CaCl	0,064	0,159	0,312	0,087
S-totaal	0,000	0,301	0,838	0,018
Na-totaal	0,637	-0,041	0,138	0,127
Ca-Cohex	0,000	0,316	0,054	0,165
K-Cohex	0,014	0,209	0,006	0,232
Mg-Cohex	0,083	0,148	0,415	-0,070
Fe-totaal	0,015	0,207	0,919	-0,009
CEC-Cohex	0,001	0,292	0,207	0,108
Klei %	0,125	0,132	0,743	-0,028
pH-CaCl	0,008	0,223	3,46E-08	0,447
Bulkgewicht	0,001	-0,290	0,248	0,106
Vocht % bij bemonstering	0,006	0,243	0,035	-0,188



### Ecosysteemdiensten en gewaseigenschappen

Omschrijving	eDNA concentratie		Aandeel	
	p-waarde	rho	p-waarde	rho
Maximale bewortelingsdiepte	0,035	0,192	0,224	0,111
Kruidenrijkdom (Q-waarde)	0,873	0,014	0,001	-0,303
Pot. CH <sub>4</sub> uitstoot	0,424	0,075	0,399	0,079
Pot. CO <sub>2</sub> uitstoot	0,192	0,123	0,136	-0,140
Pot. N <sub>2</sub> O uitstoot	2,25E-07	0,460	0,583	0,052

#### *Perspectief als indicator*

Op basis van de metingen bij de Ossekampen lijkt het aandeel eDNA van ammonium-oxiderende organismen sterker te reageren op de stikstofbemesting dan de absolute hoeveelheid eDNA. Ook is er sprake van een negatieve correlatie tussen het aandeel ammonium-oxiderende organismen en de kruidenrijkdom, terwijl deze correlatie afwezig is bij de absolute hoeveelheid eDNA van ammonium oxiderende organismen. Hoewel het ook zinvol is om de hoeveelheid ammonium oxiderende organismen te rapporteren, lijkt met name het aandeel ammonium oxiderende organismen een goede indicator te zijn voor de stikstofdruk op de bodem.

### 3.3.4.5 Detrificerende bacteriën

#### *Introductie*

Denitrificerende bacteriën zijn micro-organismen die de capaciteit hebben om denitrificatie uit te voeren, een proces waarbij minerale stikstofverbindingen zoals nitraat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) en nitriet (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) worden afgebroken en omgezet in stikstofgas (N<sub>2</sub>).

Denitrificatie heeft ook een klimaatimpact vanwege de productie van lachgas (N<sub>2</sub>O, een sterk broeikasgas) als bijproduct. Sommige denitrificerende bacteriën kunnen lachgas produceren tijdens de denitrificatieprocessen, vooral wanneer er onvolledige omzetting van nitraat naar stikstofgas plaatsvindt.

Denitrificatie (en dus lachgasuitstoot) vindt vooral plaats onder zuurstofarme omstandigheden. Deze kunnen optreden na bijvoorbeeld een regenbui, zeker in aanwezigheid van veel minerale stikstof doordat kort daarvoor bemest is.

#### *Berekening*

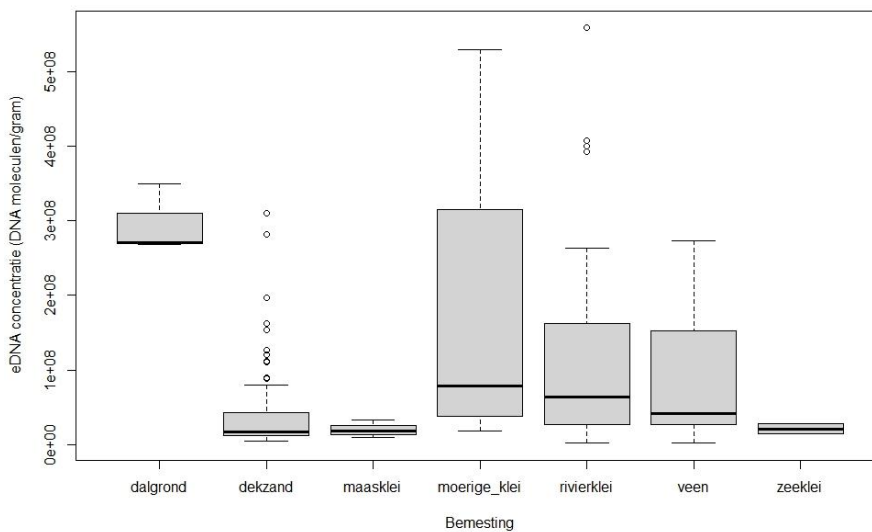
Het NirK en NirS genen coderen voor nitriet reductase enzymen die betrokken zijn bij het denitrificatie proces. De volgende zoekopdracht is in april 2023 toegepast op de UniProtKB database: “(gene:NirK) AND (taxonomy\_id:2)” OR “(gene:NirS) AND (taxonomy\_id:2)”. Alle genera die meer dan 10X voorkwamen in de database zijn beschouwd als denitrificerend. DNA-sequenties in de dataset waarvan alle best matches met organismen in referentie database denitrificerend zijn, worden beschouwd als nitrificerend. De hoeveelheid eDNA van denitrificerende bacteriën is berekend door de hoeveelheid eDNA van alle denitrificerende organismen in de dataset te sommeren. Het aandeel denitrificerende organismen is berekend door de som van eDNA van denitrificerende organismen te delen door de totale hoeveelheid eDNA van prokaryoten.

## Resultaten

Er was sprake van een sterke correlatie tussen de totale hoeveelheid eDNA en de hoeveelheid eDNA van denitrificerende organismen (lineaire regressie;  $F= 1838$ ;  $P\text{-waarde} < 2.2e^{-16}$ ;  $R^2=0,9311$ ). Denitrificerende bacteriën zijn in alle graslanden in meer of mindere mate aanwezig. Als er veel bodemleven aanwezig is, dan betekent dit dat er vrijwel per definitie ook veel denitrificerende bacteriën aanwezig zijn.

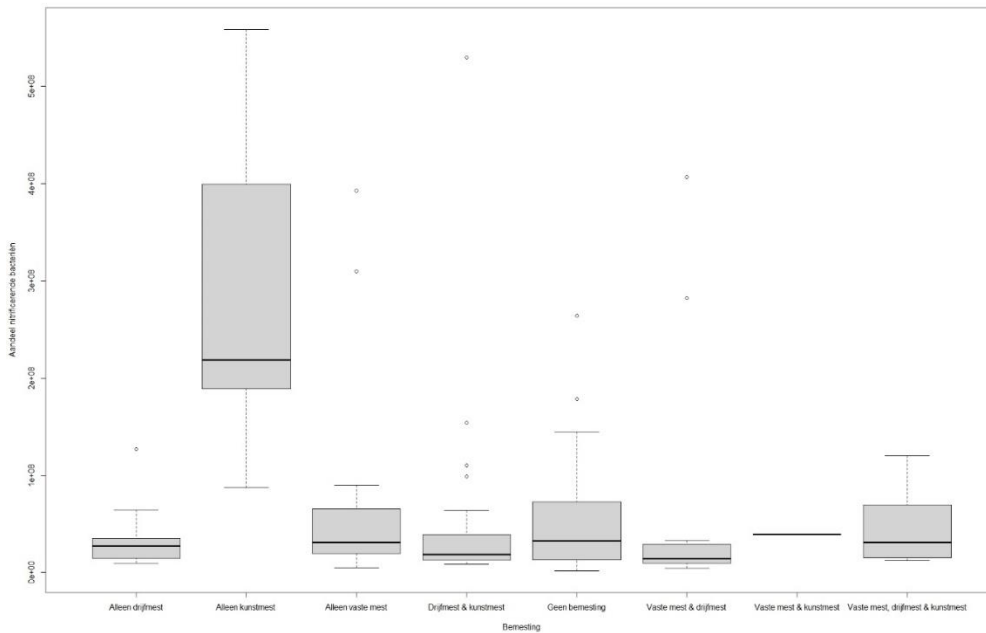
Er was sprake van een sterke correlatie tussen de hoeveelheid eDNA van denitrificerende bacteriën en N-totaal (Spearman's rank test;  $p\text{-waarde}=2,89E-07$ ;  $\rho=0,421$ ). Dit suggereert dat N-totaal een drijvende factor is die bepaalt hoeveel denitrificerende bacteriën er aanwezig zijn.

Er is geen significant effect aangetoond van bodemtype op het aandeel eDNA van denitrificerende bacteriën (Kruskal-Wallis; chi-kwadraat 6,4232,  $p\text{-waarde} = 0,38$ ). Wel was er een significant effect van bodemtype op de absolute hoeveelheid eDNA van denitrificerende bacteriën (Kruskal-Wallis; chi-kwadraat 29,092  $p\text{-waarde} = 0,000$ ), zie Figuur 27. Statistisch significante verschillen waren aanwezig tussen dekzand en dalgrond (dunn's test;  $p\text{-waarde}=0,020$ ) en dekzand en rivierklei (dunn's test;  $p\text{-waarde}=0,0003$ ). Dalgrond en rivierklei zijn van nature vruchtbare bodems, met als gevolg dat er meer eDNA in het algemeen, en specifiek van denitrificerende bacteriën aanwezig is. De aantallen monsters op andere bodemtypes zijn te laag om verschillen statistisch betrouwbaar aan te tonen.



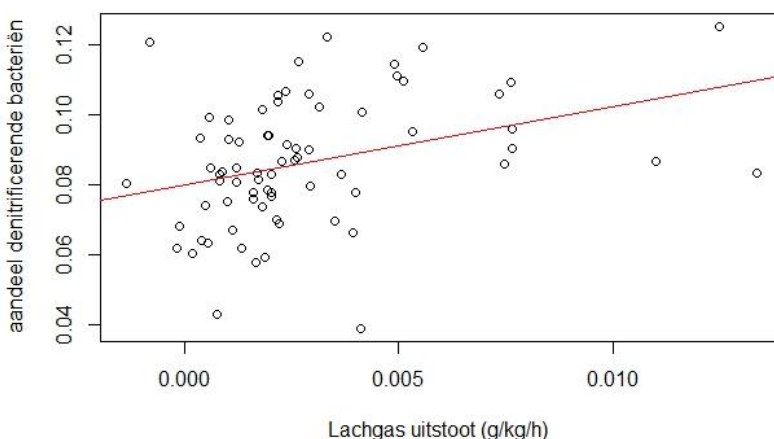
Figuur 27. Hoeveelheid eDNA van denitrificerende organismen per bodemtype.

Er is geen significant effect aangetoond van bemesting op het aandeel eDNA van denitrificerende bacteriën (Kruskal-Wallis; chi-kwadraat = 8,144,  $p\text{-waarde} = 0,3201$ ). Er was wel een significant effect van bemesting op de totale hoeveelheid eDNA van denitrificerende bacteriën (Kruskal-Wallis; chi-kwadraat = 16,2931,  $p\text{-waarde} = 0,02$ ), zie Figuur 28. Alleen de verschillen tussen "alleen kunstmest" (de Ossekampen) en het bemestingstype "alleen drijfmest", "vaste mest en drijfmest", "drijfmest en kunstmest" waren statistisch significant (dunn's test). Doordat de hoeveelheid bodemleven bij de oude graslanden van de Ossekampen in het algemeen relatief groot is, zijn er ook meer denitrificerende bacteriën aanwezig bij de Ossekampen dan in percelen waar drijfmest toegepast wordt (relatief verstoorde percelen).

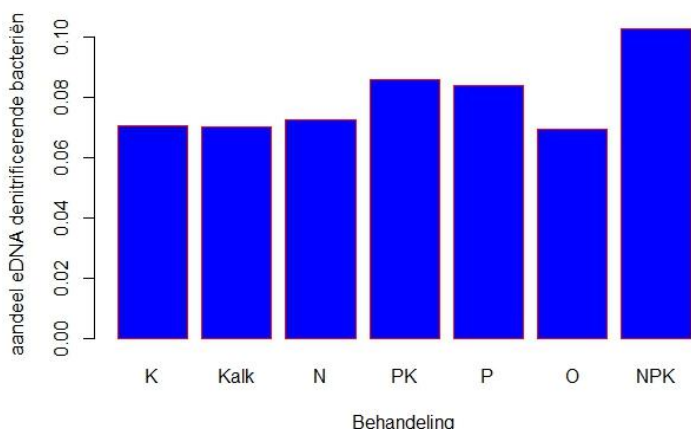


*Figuur 28. Effecten van bemesting op de hoeveelheid denitrificerende organismen.*

Om te onderzoeken of er sprake is van een relatie tussen de potentiële lachgasuitstoot en de hoeveelheid en het aandeel denitrificerende bacteriën is gebruik gemaakt van de data uit het laboratoriumexperiment waarbij bodems bevochtigd zijn tot 90% van de vloeigrens. Er is op rivierkleigronden geen relatie gevonden tussen de hoeveelheid eDNA van denitrificerende bacteriën en de mate van lachgasuitstoot in het laboratorium (lineaire regressie;  $F= 0,329$ ;  $P$ -waarde= $0,572$ ;  $R^2=0,0141$ ). Ook is er op rivierkleigronden geen relatie gevonden tussen het aandeel eDNA van denitrificerende bacteriën ten opzichte van eDNA van prokaryoten en de mate van lachgasuitstoot in het laboratorium (lineaire regressie;  $F= 1,361$ ;  $P$ -waarde= $0,2554$ ;  $R^2=0,0148$ ). Op dekzandgronden is geen relatie gevonden tussen de hoeveelheid eDNA van denitrificerende bacteriën en de mate van lachgasuitstoot in het laboratorium (lineaire regressie;  $F= 0,6331$ ;  $P$ -waarde= $0,4289$ ;  $R^2=0,009$ ). Wel is er op dekzandgronden een relatie gevonden tussen het aandeel eDNA van denitrificerende bacteriën en de mate van lachgasuitstoot in het laboratorium (lineaire regressie;  $F= 9,599$ ;  $P$ -waarde= $0,0028$ ;  $R^2=0,1206$ ), zie Figuur 29.



*Figuur 29. Aandeel denitrificerende bacteriën in dekzandbodems uitgezet tegen de potentiële lachgasuitstoot zoals deze gemeten is in het laboratoriumexperiment.*



Figuur 30. Aandeel denitrificerende bacteriën in de verschillende behandelingen bij de Ossekampen.

Het aandeel eDNA van denitrificerende bacteriën lijkt in de Ossekampen niet sterk beïnvloed te worden door het wel of niet toepassen van stikstofbemesting (zie Figuur 30).

Er is geen significantante correlatie gevonden tussen het aandeel denitrificerende bacteriën en milieuparameters (Tabel 10). Wel waren er significante correlaties tussen de eDNA concentratie van denitrificerende bacteriën en diverse milieuparameters. Dit is echter vermoedelijk gerelateerd aan de totale hoeveelheid eDNA en niet zo zeer de hoeveelheid van denitrificerende bacteriën.

Tabel 10. Spearman's rank correlaties tussen de eDNA concentratie en het aandeel denitrificerende bacteriën & diverse chemische-fysische parameters, gewaseigenschappen en potentiële broeikasgasuitstoot. De gegeven correlatiecoëfficiënten voor CO<sub>2</sub> en CH<sub>4</sub> (methaan) zijn gemeten bij 60% van de vloeigrens en N<sub>2</sub>O (lachgas) bij 90% van de vloeigrens. Statistisch significante positieve relaties zijn groen gemarkeerd, significante negatieve relaties zijn rood gemarkeerd.

#### Chemisch-fysische eigenschappen

Omschrijving	eDNA concentratie		Aandeel	
	p-waarde	rho	p-waarde	rho
OS %	1,97E-07	0,440	0,531	-0,056
C-organisch	2,06E-07	0,440	0,559	-0,052
N-Totaal	2,89E-07	0,421	0,579	0,048
CN-ratio	0,055	-0,164	0,061	-0,160
P-AL	0,005	-0,240	0,457	-0,064
P-CaCl	0,060	0,161	0,577	0,048
S-Totaal	0,000	0,303	0,415	0,070
Na-Totaal	0,721	0,031	0,777	0,024
Ca-Cohex	7,28E-05	0,332	0,717	-0,031
K-Cohex	0,030	0,186	0,398	0,073
Mg-Cohex	3,35E-06	0,385	0,519	-0,056
Fe-Totaal	0,000	0,302	0,571	-0,049
CEC-Cohex	2,35E-05	0,353	0,666	-0,037
Klei %	7,36E-05	0,332	0,712	-0,032
pH-CaCl	0,671	-0,036	0,628	-0,041
Bulkgewicht	4,64E-05	-0,363	0,908	-0,010
Vocht % bij bemonstering	6,11E-06	0,392	0,985	-0,002

## Ecosysteemdiensten en gewaseigenschappen

Omschrijving	eDNA concentratie		Aandeel	
	p-waarde	rho	p-waarde	rho
Maximale bewortelingsdiepte	0,009	0,237	0,097	0,152
Kruidenrijkdom (Q-waarde)	0,025	0,199	0,612	-0,045
Pot. CH <sub>4</sub> uitstoot	0,336	0,090	0,833	0,020
Pot. CO <sub>2</sub> uitstoot	0,000	0,323	0,531	0,059
Pot. N <sub>2</sub> O uitstoot (60% vloeigrens)	0,015	0,226	0,330	0,092
Pot. N <sub>2</sub> O uitstoot (90% vloeigrens)	1,97E-06	0,427	0,731	0,032

### *Perspectief als indicator*

Er is sprake van een sterke correlatie tussen de totale hoeveelheid eDNA en de hoeveelheid eDNA van denitrificerende bacteriën. Toepassing van deze indicator lijkt daarmee van beperkte toegevoegde waarde. Wel is de correlatie tussen de gemeten lachgasuitstoot in het laboratoriumexperiment (90% van de vloeigrens) sterker met de hoeveelheid eDNA van denitrificerende bacteriën ( $\rho=0,4268$ ) dan met de totale hoeveelheid eDNA ( $\rho=0,4085$ ). Daarmee blijkt de hoeveelheid denitrificerende bacteriën dus de beste indicator te zijn om de potentiële lachgasuitstoot te voorspellen. Echter is het in de praktijk waarschijnlijk niet nuttig om alleen te sturen op het beperken van de hoeveelheid denitrificerende bacteriën. Het is vermoedelijk relevanter om omstandigheden te voorkomen waarbij denitrificerende bacteriën daadwerkelijk lachgas gaan produceren. De uitstoot van lachgas kan onder andere beperkt worden door efficiënte stikstofbemesting toe te passen, meststoffen met lage emissie te gebruiken en door te voorkomen dat er bemest wordt vóór regenval.

Samenvattend kan de hoeveelheid eDNA van denitrificerende bacteriën gebruikt worden als indicator voor de potentiële lachgas uitstoot. Deze indicator heeft praktisch gezien waarschijnlijk beperkte toegevoegde waarde, omdat hoge lachgas uitstoot beter voorkomen kan worden ondanks de aanwezigheid van grote hoeveelheden denitrificerende bacteriën.

### 3.3.4.6 Lachgas afbrekende bacteriën

#### *Introductie*

Lachgas (N<sub>2</sub>O) reducerende bacteriën spelen een belangrijke rol in het verminderen van de emissie van lachgas, dat een potentieel schadelijk broeikasgas is. Deze bacteriën hebben het NosZ-gen, dat codeert voor het enzym nitreuze oxide-reductase. Deze bacteriën kunnen met behulp van dit enzym lachgas in de bodem omzetten in het onschadelijke stikstofgas N<sub>2</sub>.

Het NosZ-gen wordt gevonden in verschillende bacteriële groepen, waaronder denitrificerende bacteriën zoals *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Bradyrhizobium* en vele andere. Deze bacteriën kunnen lachgas als een substraat gebruiken en het NosZ-enzym helpt bij de afbraak ervan tot onschadelijk stikstofgas.

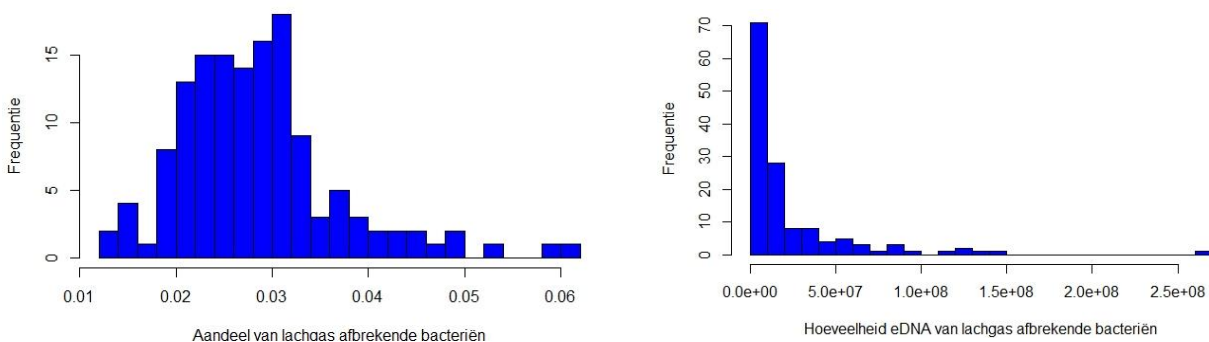
Organismen die NosZ-gen bevatten zouden gebruikt kunnen worden als indicator voor lachgas productie. Immers, die organismen komen alleen voor als er lachgas in de bodem geproduceerd wordt. Bij de interpretatie van de resultaten dient echter rekening gehouden te worden met dat de aanwezigheid van deze organismen niet persé slecht is. Immers, deze organismen zetten lachgas om in het onschadelijke stikstofgas.

## Berekening

Het NosZ gen codeert voor enzymen die betrokken zijn bij het omzetten van lachgas in stikstofgas (lachgas reductase). De volgende zoekopdracht is in april 2023 toegepast op de UniProtKB database: "(gene:NosZ) AND (taxonomy\_id:2)". Alle genera die meer dan 10X voorkwamen in de database zijn beschouwd als lachgas reducerende bacteriën. DNA-sequenties in de dataset waarvan alle best matches met organismen in referentie database lachgas reducerend zijn, worden beschouwd als lachgas reducerend. De hoeveelheid eDNA van lachgas reducerende bacteriën is berekend door de hoeveelheid eDNA van alle lachgas reducerende organismen in de dataset te sommeren. Het aandeel lachgas reducerende organismen is berekend door de som van eDNA van lachgas reducerende organismen te delen door de totale hoeveelheid eDNA van prokaryoten.

## Resultaten

Net als bij denitrificerende bacteriën is er sprake van een sterke correlatie tussen de hoeveelheid lachgas afbrekende organismen en de totale eDNA concentratie (lineaire regressie; R-squared=0,8961; F-waarde=1172; p-waarde < 2.2e-16).



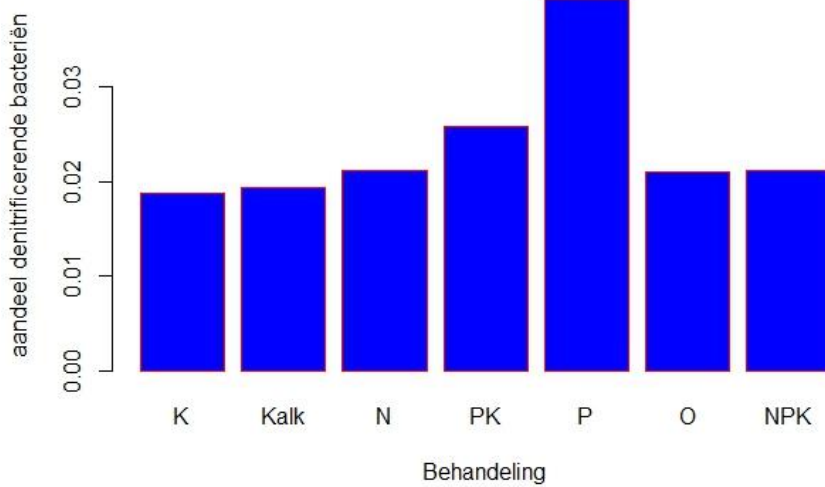
*Figuur 31. Histogrammen van de hoeveelheid en het aandeel lachgas afbrekende bacteriën in de monsters.*

Een overzicht van correlaties tussen de hoeveelheid en het aandeel lachgas afbrekende bacteriën is opgenomen in Tabel 11. De hoeveelheid eDNA van lachgas afbrekende bacteriën is gecorreleerd met de hoeveelheid lachgas dat gemeten werd in het laboratoriumexperiment bij 90% van de vloeigrens (Spearman's rank test; p-waarde=0,0008; rho=0,3081). Er was geen correlatie tussen het aandeel lachgas afbrekende bacteriën en de hoeveelheid lachgas in het laboratoriumexperiment bij 90% van de vloeigrens (Spearman's rank test; p-waarde=0,5080; rho=-0,0623).

Er was sprake van een sterke correlatie tussen de hoeveelheid eDNA van lachgas afbrekende organismen en N-totaal (Spearman's rank test; p-waarde=1,01E-06; rho=-0,404). Dit suggereert dat N-totaal een drijvende factor zou kunnen zijn die bepaalt hoeveel lachgas er geproduceerd wordt en dus hoeveel lachgas afbrekende organismen er aanwezig zijn.

De concentratie eDNA van lachgas afbrekende bacteriën is positief gecorreleerd met de hoeveelheid vocht in de bodemmonsters op het moment van bemonstering (Spearman's rank test; p-waarde=<0,0000; rho=0,3790). Dit ligt in de lijn van verwachting aangezien lachgas met name geproduceerd wordt onder anaerobe omstandigheden.

In de Ossekampen was het aandeel lachgas afbrekende bacteriën in de meeste behandelingen vrij laag. Uitzondering daarop is met name het P-bemeste plot. Daar werd juist een relatief hoog aandeel lachgas afbrekende bacteriën gevonden (Figuur 32).



Figuur 32. Aandeel lachgas afbrekende bacteriën in verschillende behandelingen van de Ossekampen.

Tabel 11. Spearman's rank correlaties tussen de eDNA concentratie en het aandeel lachgas afbrekende bacteriën & diverse chemische/fysische parameters, gewaseigenschappen en potentiële broeikasgasuitstoot. Statistisch significante positieve relaties zijn groen gemarkeerd, significante negatieve relaties zijn rood gemarkeerd.

#### Chemisch-fysische eigenschappen

Omschrijving	eDNA concentratie		Aandeel	
	p-waarde	rho	p-waarde	rho
OS %	2,09E-06	0,405	0,321	-0,088
C-organisch	3,42E-06	0,397	0,340	-0,085
N-Totaal	1,01E-06	0,404	0,735	-0,029
CN-ratio	0,118	-0,134	0,765	0,026
P-AL	0,013	-0,212	0,447	0,066
P-CaCl	0,068	0,156	0,689	0,035
S-Totaal	0,000	0,301	0,644	0,040
Na-Totaal	0,991	-0,001	0,087	-0,147
Ca-Cohex	0,000	0,320	0,441	-0,066
K-Cohex	0,055	0,164	0,752	-0,027
Mg-Cohex	2,46E-06	0,390	0,573	-0,049
Fe-Totaal	9,66E-05	0,327	0,564	-0,050
CEC-Cohex	2E-05	0,356	0,687	-0,035
Klei %	0,000	0,319	0,200	-0,110
pH-CaCl	0,884	-0,013	0,266	0,095
Bulkgewicht	0,000	-0,325	0,079	0,161
Vocht % bij bemonstering	1,31E-05	0,379	0,330	-0,088

## Ecosysteemdiensten en gewaseigenschappen

Omschrijving	eDNA concentratie		Aandeel	
	p-waarde	rho	p-waarde	rho
Maximale bewortelingsdiepte	0,004	0,258	0,78-	0,026
Kruidenrijkdom (Q-waarde)	0,042	0,181	0,019	-0,209
Pot. CH <sub>4</sub> uitstoot	0,210	0,118	0,970	-0,004
Pot. CO <sub>2</sub> uitstoot	0,002	0,344	0,735	-0,0320
Pot. N <sub>2</sub> O uitstoot (60% vloeigrens)	0,191	0,123	0,020	-0,206
Pot. N <sub>2</sub> O uitstoot (90% vloeigrens)	0,000	0,308	0,508	-0,062

De correlatie tussen de potentiële lachgasuitstoot en de hoeveelheid eDNA van lachgas afbrekende bacteriën ( $\rho=0,3082$ ) is minder sterk dan de correlatie tussen potentiële lachgasuitstoot en hoeveelheid eDNA van denitrificerende (lachgas producerende) bacteriën ( $\rho=0,4268$ ). Daarmee lijken denitrificerende bacteriën een betere indicator te vormen voor de potentiële lachgasuitstoot. Echt is het niet zinvol om te sturen op meer lachgas afbrekende bacteriën. Immers, grote hoeveelheden lachgas afbrekende bacteriën komen juist voor in bodems waar veel lachgas geproduceerd wordt. Om lachgas emissies in de praktijk te beperken zou er gestreefd moeten worden naar een kleine populatie lachgas producerende bacteriën, en een grote populatie bacteriën die het lachgas dat geproduceerd wordt afbreken voordat het lachgas de bodem verlaat. Kortom, om lachgasuitstoot te beperken zou gestreefd moeten worden naar een lage ratio tussen denitrificerende bacteriën/lachgas afbrekende bacteriën. Uit de data blijkt dat geen enkele milieuparameter correleert met deze ratio, behalve de hoeveelheid lachgas productie bij 60% van de vloeigrens (Tabel 12), omstandigheden die in een veldsituatie geregeld voorkomen. Kortom, het lijkt inderdaad zo te zijn dat deze ratio inderdaad samenhangt met de potentiële lachgasuitstoot.

*Tabel 12. Spearman's rank correlaties tussen de verhouding van eDNA concentratie van denitrificerende bacteriën / lachgas afbrekende bacteriën & diverse chemische-fysische parameters, gewaseigenschappen en potentiële broeikasgasuitstoot. Statistisch significante positieve relaties zijn groen gemarkeerd, significante negatieve relaties zijn rood gemarkeerd.*

### Chemisch-fysische eigenschappen

Omschrijving	Hoeveel eDNA van denitrificerende bacteriën / lachgas afbrekende bacteriën	
	p-waarde	rho
OS %	0,719	0,032
C-organisch	0,690	0,036
N-Totaal	0,584	0,047
CN-ratio	0,145	-0,126
P-AL	0,288	-0,092
P-CaCl	0,944	0,006
S-Totaal	0,801	0,022
Na-Totaal	0,151	0,124
Ca-Cohex	0,774	0,025
K-Cohex	0,356	0,080
Mg-Cohex	0,747	-0,028
Fe-Totaal	0,933	-0,007
CEC-Cohex	0,956	-0,005
Klei %	0,494	0,059
pH-CaCl	0,175	-0,116
Bulkgewicht	0,152	-0,132
Vocht % bij bemonstering	0,431	0,071



## Ecosysteemdiensten en gewaseigenschappen

Omschrijving		
Maximale bewortelingsdiepte	0,585	0,050
Kruidenrijkdom (Q-waarde)	0,087	0,153
Pot. CH <sub>4</sub> uitstoot	0,979	-0,003
Pot. CO <sub>2</sub> uitstoot	0,585	0,051
Pot. N <sub>2</sub> O uitstoot (60% vloeigrens)	0,012	0,234
Pot. N <sub>2</sub> O uitstoot (90% vloeigrens)	0,479	0,067

### *Perspectief als indicator*

Hoewel er zowel een sterke positieve correlatie is tussen potentiële lachgasproductie en de hoeveelheid eDNA van denitrificerende bacteriën en lachgas afbrekende bacteriën lijken beide indicatoren niet zinvol om toe te passen als indicator in de praktijk. Immers, zowel de hoeveelheid eDNA van denitrificerende bacteriën als van lachgas afbrekende bacteriën blijkt sterk gecorreleerd te zijn met de totale eDNA concentratie. Beheermaatregelen die leiden tot een afname van denitrificerende en lachgas afbrekende bacteriën hebben waarschijnlijk als ongewenst neveneffect dat de totale hoeveelheid bodemleven afneemt. De verhouding denitrificerende/lachgas afbrekende bacteriën heeft echter wel de potentie om toegepast te worden in de praktijk, zeker gezien de correlatie van deze verhouding met de potentiële lachgasemissie van 60% van de vloeigrens (een vochtigheid van de bodem die in veldsituatie veel voorkomt). Het is daarom zeer interessant om in de toekomst te onderzoeken welke beheermaatregelen bijdragen aan het verkleinen van deze ratio, en om in veldsituatie te meten of een lage ratio denitrificerende/lachgas afbrekende bacteriën inderdaad leidt tot lage lachgasemissies.

### 3.3.4.7 Methaan producerende bacteriën

#### *Introductie*

Methaan producerende organismen zijn micro-organismen die betrokken zijn bij de productie van het broeikasgas methaan (CH<sub>4</sub>). De belangrijkste groepen van methaan producerende organismen in de bodem zijn methanogenen, die behoren tot het Archaea-domein. Deze organismen gedijen in zuurstofarme (meestal natte) omstandigheden en kunnen organisch materiaal afbreken via een proces dat methanogenese wordt genoemd, waarbij methaan als eindproduct wordt geproduceerd.

#### *Berekening*

Op basis van literatuuronderzoek zijn de volgende genera beschouwd als methanogenen:

<i>Methanobacterium</i>	<i>Methanofollis</i>	<i>Methanosarcina</i>
<i>Methanobrevibacter</i>	<i>Methanogenium</i>	<i>Methanosphaera</i>
<i>Methanococcus</i>	<i>Methanomicrobium</i>	<i>Methanospirillum</i>
<i>Methanocorpusculum</i>	<i>Methanopyrus</i>	<i>Methanothermobacter</i>
<i>Methanoculleus</i>	<i>Methanoregula</i>	<i>Methanotherix</i>
<i>Methanoflorens</i>	<i>Methanosaeta</i>	

DNA-sequenties in de dataset waarvan alle best matches met organismen in referentie database methaanproducerend zijn, worden beschouwd als methaanproducerend. De hoeveelheid eDNA van methaanproducerende bacteriën is berekend door de hoeveelheid eDNA van alle methaanproducerend organismen in de dataset te sommeren. Het aandeel methaanproducerende organismen is berekend door de som van eDNA van methaanproducerende organismen te delen door de totale hoeveelheid eDNA van prokaryoten.

## Resultaten

Correlaties tussen de hoeveelheid eDNA en het aandeel van methaan producerende organismen & diverse chemische-fysische eigenschappen, gewaseigenschappen en potentiële broeikasgasuitstoot zijn weergegeven in Tabel 13. Waar de meeste organismen positief correleren met de CEC, is dat bij methaanproducerende organismen niet het geval. Opvallend is bovendien de afwezigheid van een negatieve relatie tussen de hoeveelheid methaanproducerende organismen en P-AL en de zelfs positieve correlatie tussen het aandeel methaanproducerende organismen en P-AL gezien de hoeveelheid eDNA van vrijwel alle andere organismen negatief correleren met P-AL. Methaan-producerende organismen lijken dus voordeel te hebben bij sterk bemeste omstandigheden. Mogelijk wordt de populatie methaanproducerende organismen gevoed door de aanvoer van mest en/of worden de methaan-producerende organismen geïntroduceerd via de mest.

Er is geen relatie gevonden tussen methaanproducerende organismen en de hoeveelheid potentiële methaanuitstoot. De potentiële methaanproductie (lab metingen) op alle percelen was echter laag, gezien er slechts enkele veenpercelen in de dataset aanwezig waren.

*Tabel 13. Spearman's rank correlaties tussen de eDNA concentratie en het aandeel methaanproducerende organismen en diverse chemische-fysische parameters, gewaseigenschappen en potentiële broeikasgasuitstoot. De gegeven correlatiecoëfficiënten voor CO<sub>2</sub> en CH<sub>4</sub> (methaan) zijn gemeten bij 60% van de vloeigrens en N<sub>2</sub>O (lachgas) bij 90% van de vloeigrens. Statistisch significante positieve relaties zijn groen gemarkeerd, significante negatieve relaties zijn rood gemarkeerd.*

### Chemisch-fysische eigenschappen

Omschrijving	eDNA concentratie		Aandeel	
	p-waarde	rho	p-waarde	rho
OS %	0,014	0,216	0,682	-0,037
C-organisch	0,012	0,222	0,708	-0,033
N-Totaal	0,042	0,174	0,597	-0,046
CN-ratio	0,660	-0,038	0,622	0,043
P-AL	0,423	0,069	0,005	0,239
P-CaCl	0,976	-0,003	0,854	0,016
S-Totaal	0,009	0,222	0,848	0,017
Na-Totaal	0,227	-0,104	0,498	-0,058
Ca-Cohex	0,182	0,115	0,578	-0,048
K-Cohex	0,158	0,121	0,982	0,002
Mg-Cohex	0,571	0,049	0,151	-0,123
Fe-Totaal	0,332	0,084	0,115	-0,135
CEC-Cohex	0,151	0,123	0,473	-0,062
Klei %	0,499	0,058	0,138	-0,127
pH-CaCl	0,346	0,080	0,325	0,084
Bulkgewicht	0,040	-0,188	0,116	0,144
Vocht % bij bemonstering	0,040	0,184	0,301	-0,093

### Ecosysteemdiensten en gewaseigenschappen

Omschrijving	eDNA concentratie		Aandeel	
	p-waarde	rho	p-waarde	rho
Maximale bewortelingsdiepte	0,853	0,017	1,26E-05	-0,386
Kruidenrijkdom (Q-waarde)	0,739	0,030	0,170	-0,123
Pot. CH <sub>4</sub> uitstoot	0,952	0,006	0,256	-0,107
Pot. CO <sub>2</sub> uitstoot	0,612	0,048	0,808	0,023
Pot. N <sub>2</sub> O uitstoot	0,913	-0,010	0,565	-0,054

#### *Perspectief als indicator*

De potentiële methaanproductie (lab metingen) op alle percelen was laag, gezien er slechts enkele veenpercelen in de dataset aanwezig waren. Toekomstig onderzoek op veengronden moet duidelijk maken of er sprake is van een relatie tussen de hoeveelheid of aandeel methaanproducerende organismen en de potentiële methaanuitstoot van een perceel. De waarde van deze indicator is niet te beoordelen op basis van het huidige onderzoek.

### 3.3.4.8 Methaan oxiderende organismen

#### *Introductie*

Methaan-oxiderende organismen gebruiken methaan als energiebron. Ze zetten daarbij methaan om in methanol of formaldehyde. Ze kunnen daardoor helpen de methaanuitstoot te beperken. Methaan producerende organismen leven over het algemeen dieper in de bodem, omdat deze organismen gedijen onder zuurstofloze omstandigheden. Methaan-oxiderende organismen gedijen in de grenslaag tussen zuurstofrijke- en zuurstofarme bodem, waar ze methaan gebruiken als energiebron.

#### *Berekening*

De hoeveelheid eDNA van methaan-oxiderende organismen is bepaald op basis van de aanwezigheid van organismen die het pmoA of het mmoX gen bezitten. Het pmoA-gen codeert voor een subeenheid van het enzym methaanmonooxygenase (PMO) en wordt voornamelijk gevonden in methaan-oxiderende bacteriën van het type I en type II. Deze bacteriën oxideren methaan tot methanol als onderdeel van hun metabolisme. Het mmoX-gen codeert voor een subeenheid van het enzym methaanmonooxygenase (MMO) dat voornamelijk voorkomt in methaan-oxiderende archaea. Deze archaea gebruiken het MMO-enzym om methaan te oxideren tot methanol of formaldehyde.

De volgende zoekopdracht is in augustus 2023 toegepast op de UniProtKB database: "(gene:pmoA) AND (taxonomy\_id:2) OR (gene:pmoA) AND (taxonomy\_id:2157)" OR "(gene:mmoX) AND (taxonomy\_id:2) OR (gene:mmoX) AND (taxonomy\_id:2157)". Alle genera die meer dan 10X voorkwamen in de database zijn beschouwd als methaan-oxiderende organismen. De DNA-sequenties in de dataset waarvan alle best matches met organismen in referentie database methaan-oxiderend zijn, worden als dusdanig beschouwd. De hoeveelheid eDNA van methaan-oxiderende organismen is berekend door de hoeveelheid eDNA van alle methaan-oxiderende organismen in de dataset te sommeren. Het aandeel methaan-oxiderende organismen is berekend door de som van eDNA van methaan-oxiderende organismen te delen door de totale hoeveelheid eDNA van prokaryoten.

## Resultaten

Correlaties tussen methaan oxiderende bacteriën en diverse chemische/fysische parameters, gewaseigenschappen en potentiële broeikasgasuitstoot zijn weergegeven in Tabel 14. De totale hoeveelheid methaan-afbrekende organismen is negatief gecorreleerd met de bulkdichtheid van de bodem. Het aandeel eDNA van de meeste functionele groepen die onderzocht zijn in deze studie is niet gecorreleerd met bulkdichtheid of neemt af bij toenemende bulkdichtheid. Opvallend is echter dat het aandeel methaan-oxiderende organismen juist toeneemt bij hogere bulkdichtheid. Dit betekent dat methaan-oxiderende organismen meer voorkomen in verdichte bodems. Ook is er (net als bij methaan-producerende organismen) sprake van positieve correlatie met P-AL.

*Tabel 14. Spearman's rank correlaties tussen de eDNA concentratie en het aandeel methaan afbrekende organismen en diverse chemische-fysische parameters, gewaseigenschappen en potentiële broeikasgasuitstoot. De gegeven correlatiecoëfficiënten voor CO<sub>2</sub> en CH<sub>4</sub> (methaan) zijn gemeten bij 60% van de vloeigrens en N<sub>2</sub>O (lachgas) bij 90% van de vloeigrens. Statistisch significante positieve relaties zijn groen gemarkeerd, significante negatieve relaties zijn rood gemarkeerd.*

### Chemisch-fysische eigenschappen

Omschrijving	eDNA concentratie		Aandeel	
	p-waarde	rho	p-waarde	rho
OS %	1,21E-05	0,376	0,001	-0,295
C-organisch	1,11E-05	0,378	0,001	-0,301
N-Totaal	0,000	0,319	0,000	-0,304
CN-ratio	0,209	-0,108	0,809	0,021
P-AL	0,056	-0,164	3,76E-06	0,383
P-CaCl	0,030	0,185	0,916	-0,009
S-Totaal	0,003	0,252	0,001	-0,279
Na-Totaal	0,602	-0,045	0,549	-0,052
Ca-Cohex	0,001	0,291	0,155	-0,122
K-Cohex	0,038	0,178	0,595	0,046
Mg-Cohex	0,002	0,266	0,013	-0,212
Fe-Totaal	0,003	0,251	0,093	-0,144
CEC-Cohex	0,000	0,305	0,110	-0,137
Klei %	0,008	0,224	0,047	-0,170
pH-CaCl	0,358	0,079	0,001	0,270
Bulkgewicht	0,001	-0,304	0,000	0,338
Vocht % bij bemonstering	0,000	0,330	0,002	-0,277

### Ecosysteemdiensten en gewaseigenschappen

Omschrijving	eDNA concentratie		Aandeel	
	p-waarde	rho	p-waarde	rho
Maximale bewortelingsdiepte	0,014	0,222	0,158	-0,129
Kruidenrijkdom (Q-waarde)	0,176	0,121	0,000	-0,338
Pot. CH <sub>4</sub> uitstoot	0,640	0,044	0,562	-0,055
Pot. CO <sub>2</sub> uitstoot	0,024	0,210	0,007	-0,251
Pot. N <sub>2</sub> O uitstoot	3,96E-06	0,415	0,612	-0,048

### *Perspectief als indicator*

De potentiële methaanproductie (lab metingen) op alle percelen was laag, gezien er slechts enkele veenpercelen in de dataset aanwezig waren. Toekomstig onderzoek op veengronden moet duidelijk maken of er sprake is van een relatie tussen de hoeveelheid of het aandeel van methaan oxiderende organismen en de potentiële methaanuitstoot van een perceel. De waarde van deze indicator is niet te beoordelen op basis van het huidige onderzoek.

### 3.3.4.9 Sulfaat reducerende bacteriën

Sulfaat reducerende bacteriën zijn anaerobe micro-organismen die sulfaat gebruiken als alternatieve elektronenacceptor in de bodem. Ze spelen een rol in waterverzadigde bodems en breken organisch materiaal af door sulfaatreductie, waarbij sulfide ontstaat. Dit proces heeft invloed op de bodemchemie, biogeochemische cycli en broeikasgasemissies. Sulfaat reducerende organismen zijn essentieel voor de mineralisatie van organische stoffen en hebben een impact op de beschikbaarheid van voedingsstoffen. Ze vormen een belangrijke schakel in de bodemecologie en dragen bij aan de vorming van anaerobe omstandigheden en kenmerkende chemische processen in anaerobe bodems.

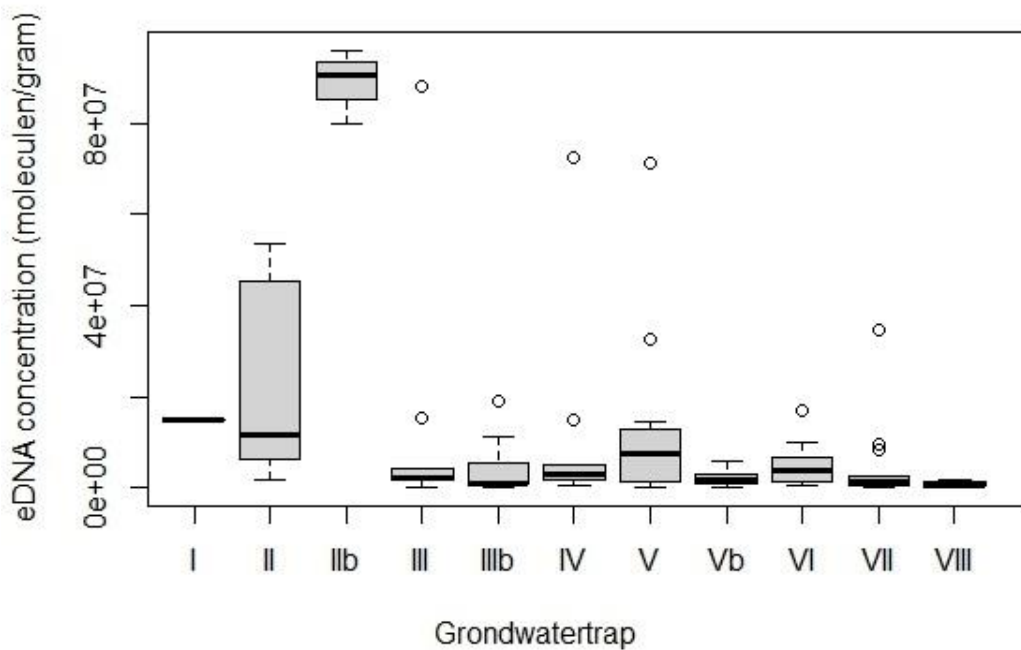
#### *Berekening*

In Bijlage 8 is een overzicht opgenomen welke genera gerekend zijn tot sulfaat reducerende bacteriën.

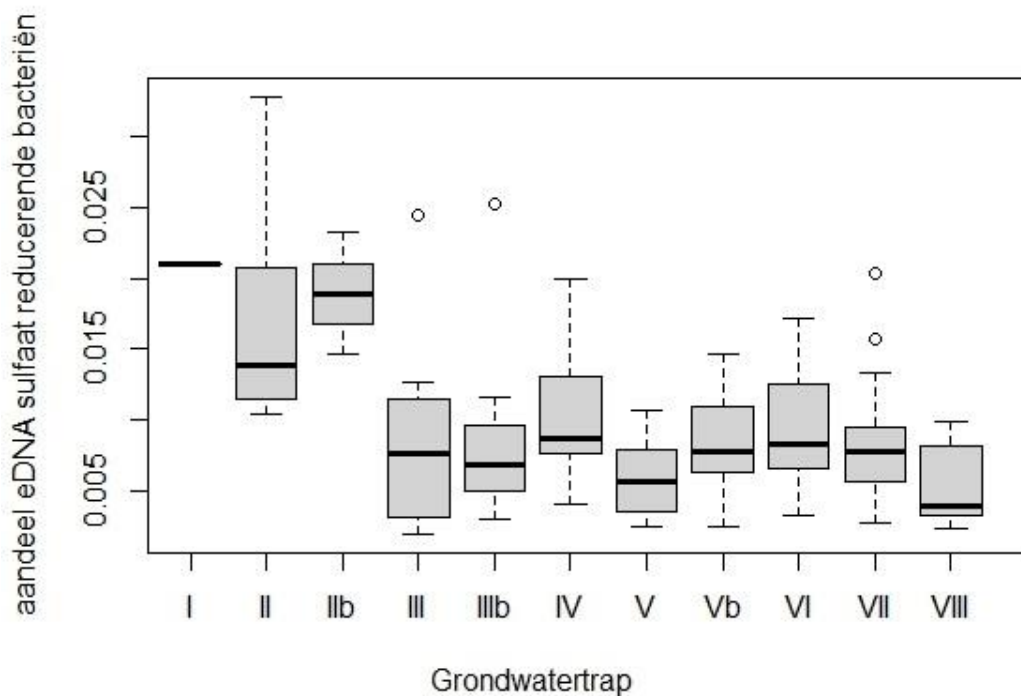
De hoeveelheid eDNA van sulfaat reducerende bacteriën is berekend door de hoeveelheid eDNA van de sulfaat reducerende bacteriën te sommeren. Het aandeel sulfaat reducerende bacteriën is berekend door de som van de hoeveelheid eDNA van sulfaat reducerende bacteriën te delen door de totale hoeveelheid eDNA.

#### *Resultaat*

Zowel de absolute hoeveelheid eDNA als het aandeel van sulfaat reducerende bacteriën zijn gecorreleerd met de grondwatertrap (Kruskal-Wallis; resp. chi-kwadraat = 31,5887 p-waarde = 0,00 en chi-kwadraat = 29,3122; p-waarde = 0,00) (Figuur 33, Figuur 34). Met name in percelen met grondwatertrap I, II en IIB was de hoeveelheid en het aandeel eDNA van sulfaat reducerende bacteriën verhoogd. De hoge grondwaterstand in deze percelen veroorzaakt waarschijnlijk anaerobe omstandigheden waar deze bacteriën goed gedijen.



Figuur 33. eDNA concentratie van sulfaat reducerende bacteriën per grondwatertrap.

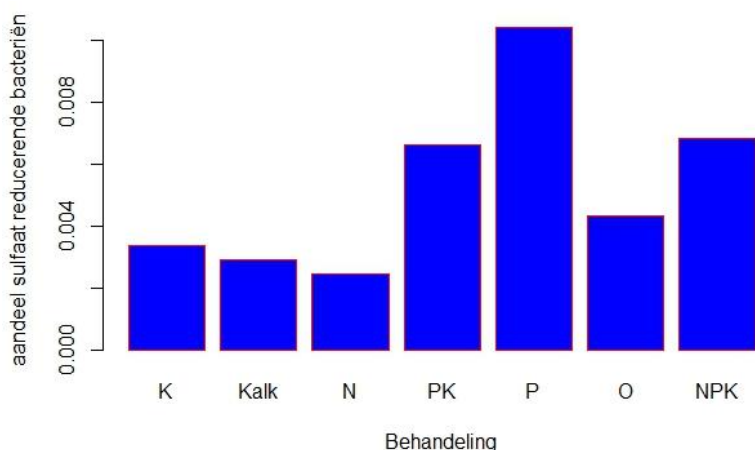


Figuur 34. Aandeel eDNA van sulfaat reducerende bacteriën per grondwatertrap.

Correlaties tussen de hoeveelheid en het aandeel eDNA van sulfaat reducerende bacteriën en diverse chemische-fysische parameters, gewaseigenschappen en potentiële broeikasgasuitstoot zijn weergegeven

in Tabel 15. De bulkdichtheid is negatief gecorreleerd met het aandeel eDNA van sulfaat reducerende bacteriën (Spearman's rank test; p-waarde=0,0002 rho=-0,3330). De verwachting was dat met toenemende verdichting (hogere bulkdichtheid) het aandeel sulfaat reducerende bacteriën toe zou nemen, als gevolg van de grotere kans op anaerobe omstandigheden in verdichte bodems. Opvallend is dat het tegenovergestelde waar blijkt te zijn.

Bij de Ossekampen is het aandeel sulfaat reducerende bacteriën verhoogd in de percelen met P-behandelingen ten opzichte van de controle (Figuur 35). Dit is vermoedelijk een direct effect van de toediening van het fosfaatzout, waarin sulfaat aanwezig is (tripel superfosfaat;  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 + \text{CaSO}_4$ ).



Figuur 35. Resultaten van verschillende behandelingen bij de Ossekampen. Het aandeel sulfaat reducerende bacteriën.

Tabel 15. Spearman's rank correlaties tussen de eDNA concentratie en het aandeel sulfaat reducerende bacteriën en diverse chemisch-fysische parameters, gewaseigenschappen en de potentiële broeikasgasuitstoot. De gegeven correlatiecoëfficiënten voor  $\text{CO}_2$  en  $\text{CH}_4$  (methaan) zijn gemeten bij 60% van de vloeigrens en  $\text{N}_2\text{O}$  (lachgas) bij 90% van de vloeigrens. Statistisch significante positieve relaties zijn groen gemarkeerd, significante negatieve relaties zijn rood gemarkeerd.

#### Chemisch-fysische eigenschappen

Omschrijving	eDNA concentratie		Aandeel	
	p-waarde	rho	p-waarde	rho
OS %	4,1E-12	0,564	3,6E-06	0,397
C-organisch	9,81E-12	0,556	9,46E-06	0,380
N-Totaal	2,58E-10	0,507	5,71E-08	0,443
CN-ratio	0,353	-0,080	0,057	-0,163
P-AL	0,022	-0,196	0,015	-0,208
P-CaCl	0,091	0,145	0,085	0,1479
S-Totaal	9,8E-09	0,466	1,02E-09	0,492
Na-Totaal	0,408	-0,071	0,553	-0,051
Ca-Cohex	7,32E-08	0,440	1,38E-09	0,489
K-Cohex	0,005	0,239	3,74E-05	0,345
Mg-Cohex	8,02E-05	0,330	0,003	0,251
Fe-Totaal	2,54E-05	0,351	0,000	0,299
CEC-Cohex	1,66E-07	0,429	8,84E-09	0,467
Klei %	0,003	0,250	0,013	0,212
pH-CaCl	0,069	0,154	3,68E-09	0,474
Bulkgewicht	6,34E-06	-0,399	0,000	-0,333
Vocht % bij bemonstering	5,54E-05	0,353	0,015	0,216

### Ecosysteemdiensten en gewaseigenschappen

Omschrijving	eDNA concentratie		Aandeel	
	p-waarde	rho	p-waarde	rho
Maximale bewortelingsdiepte	0,008	0,240	0,004	0,258
Kruidenrijkdom (Q-waarde)	0,222	0,110	0,822	0,020
Pot. CH <sub>4</sub> uitstoot	0,249	0,108	0,134	0,140
Pot. CO <sub>2</sub> uitstoot	0,004	0,266	0,157	0,133
Pot. N <sub>2</sub> O uitstoot	2,34E-05	0,383	0,367	0,084

#### *Perspectief als indicator*

Zowel het aandeel als de totale hoeveelheid eDNA van sulfaat reducerende bacteriën was sterk verhoogd op percelen met een hoge grondwaterstand. Sulfaat reducerende bacteriën profiteren sterk van de daarmee gepaard gaande anaerobe omstandigheden. Daarmee vormen het aandeel en de hoeveelheid eDNA van sulfaat reducerende bacteriën in potentie goede indicatoren voor het optreden van anaerobe omstandigheden.

### 3.3.4.10 Schimmels en schimmel/bacterie ratio

#### *Introductie*

Schimmels zijn in de bodem o.a. betrokken bij de mineralisatie van organische stof. Als zogeheten reducers produceren zij bij dit biologische afbraakproces anorganische voedingszouten (bijv. nitraten en fosfaten), koolstofdioxide en water. Deze stoffen zijn weer van belang voor de groei en ontwikkeling van o.a. planten en daarmee de productie van biomassa. In dit kader is de eukaryote DNA-data onderzocht op de aanwezigheid van sequenties van saprotrofen, i.e. organismen die leven van dood organisch materiaal. Saprotrofen worden vaak ingedeeld op basis van het type dood organisch materiaal waarop zij leven; hout, kruiden, strooisel (terrestrisch) of mest.

De schimmel/bacterie verhouding kan inzicht geven in de (dynamiek van) organische stof in de bodem. Een hogere schimmel/bacterie ratio, dus wanneer er relatief meer schimmels aanwezig zijn, is een indicatie voor organische stof die overwegend uit moeilijk afbreekbare C-verbindingen (bijv. lignine) bestaat. In het algemeen vindt in schimmelrijke bodems meer humificatie (opbouw van organische stof) plaats doordat de afbraak langzamer plaats vindt. Een bodem waarin veel schimmels voorkomen duidt op een onverstoorde bodem. Een lage schimmel/bacterie verhouding, dus relatief veel bacteriën, duidt op organische stof die uit eenvoudiger afbreekbare C-bronnen bestaat. Resultaat hiervan is een hogere mineralisatiesnelheid vanwege snellere afbraak van organische stof. Een lage schimmel/bacterie ratio kan duiden op (mechanisch) verstoorde bodems, welke ook vatbaarder kunnen zijn voor bijv. ziektes en droogte, of op een bodem die (in het verleden) sterk verrijkt is met stikstof (lage C/N ratio).

Bacteriën produceren suikers waardoor bodemdeeltjes aan elkaar plakken. Dit verbetert de bodemstructuur en houdt nutriënten vast waardoor deze minder snel uitspoelen (*reviewed in: Costa et al., 2018*). Ook schimmels verbeteren de bodemstructuur; door het vormen van schimmeldraden wordt de grond bij elkaar gehouden in zogeheten aggregaten en wordt de doorlaatbaarheid bevorderd. Bodemaggregaten vormen verschillende (besloten) niches voor uiteenlopende en specifiek daarop aangepaste soorten micro-organismen (*Custódio et al., 2022*). Op hun beurt beïnvloeden deze micro-



organismen de vorming en afbraak van aggregaten. De interactie tussen bodemstructuur en micro-organismen is daarmee een belangrijke drijvende factor in de microbiële soortenrijkdom en bodemgezondheid.

Verschillende wetenschappelijke studies hebben de positieve relatie tussen schimmels en het watervasthoudende vermogen van de bodem aangetoond. Een studie uitgevoerd door Kögel-Knabner et al. (2010) toonde aan dat schimmels een belangrijke rol spelen bij de vorming van stabiele aggregaten, wat resulteert in een verbeterde waterretentie. Bovendien toonde een onderzoek van Tisdall en Oades (1982) aan dat de aanwezigheid van schimmels de structuur en stabiliteit van de bodem verbetert, wat leidt tot een verhoogd watervasthoudend vermogen.

### Berekening

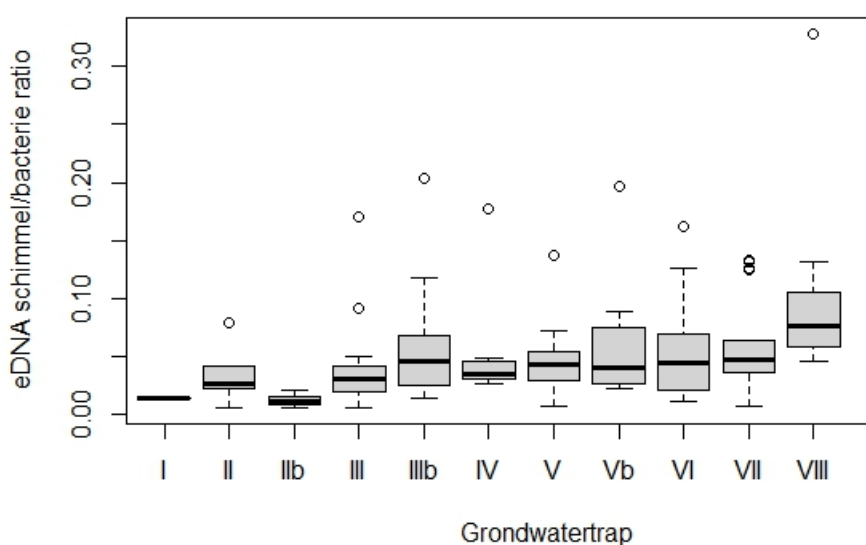
De totale hoeveelheid eDNA van bacteriën en de hoeveelheid eDNA van schimmels is berekend. De eDNA schimmel/bacterie ratio is berekend door de hoeveelheid eDNA van schimmels te delen door de hoeveelheid eDNA van bacteriën.

### Resultaten en discussie

De hoeveelheid eDNA van bacteriën is positief gecorreleerd met de hoeveelheid PLFA's van bacteriën (Spearman's rank test; p-waarde=0,0000 rho=0,5796). Ook is de hoeveelheid eDNA van schimmels positief gecorreleerd met de hoeveelheid PLFA's van schimmels (Spearman's rank test; p-waarde=0,0000; rho=0,4640).

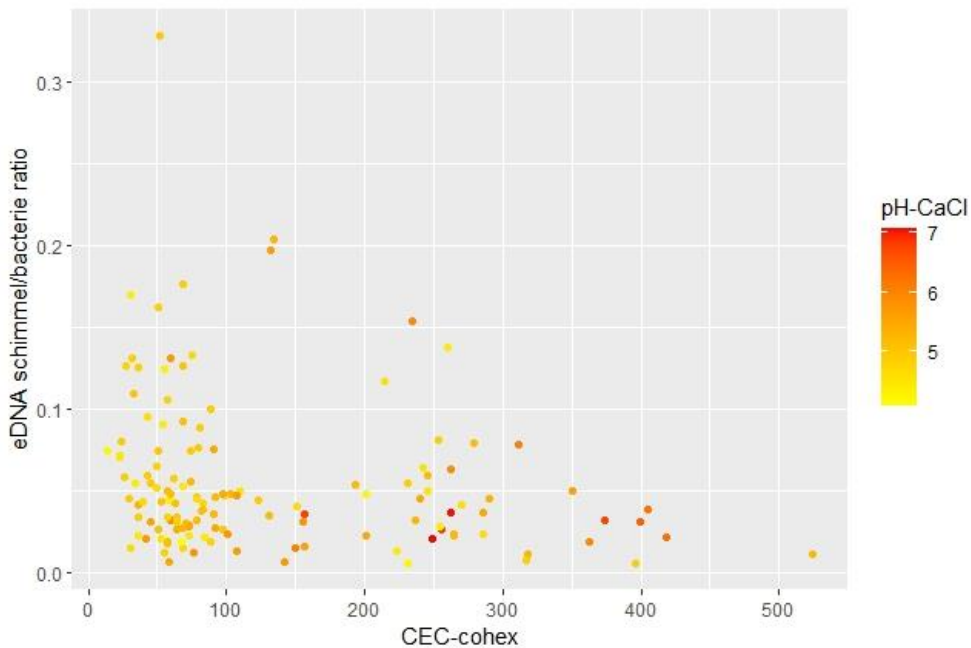
De eDNA schimmel-bacterie ratio was negatief gecorreleerd met de CO<sub>2</sub> uitstoot in het laboratorium bij 60% (Spearman's rank test; p-waarde=0,0145 rho=-0,2275) en 90% (Spearman's rank test; p-waarde=0,0036 rho=-0,2691) van de vloiegrens. Als er relatief veel schimmels aanwezig zijn dan is de respiratiesnelheid van de bodem dus lager. Dit geeft aan dat de eDNA schimmel-bacterie ratio inderdaad inzicht geeft in de afbraaksnelheid van organisch materiaal.

Tenslotte werd de eDNA schimmel/bacterie ratio significant beïnvloed door de grondwatertrap. Hoe dieper het grondwater, hoe hoger de schimmel/bacterie ratio (Kruskal-Wallis; chi-kwadraat = 20,1319 p-waarde = 0,04; Figuur 36).



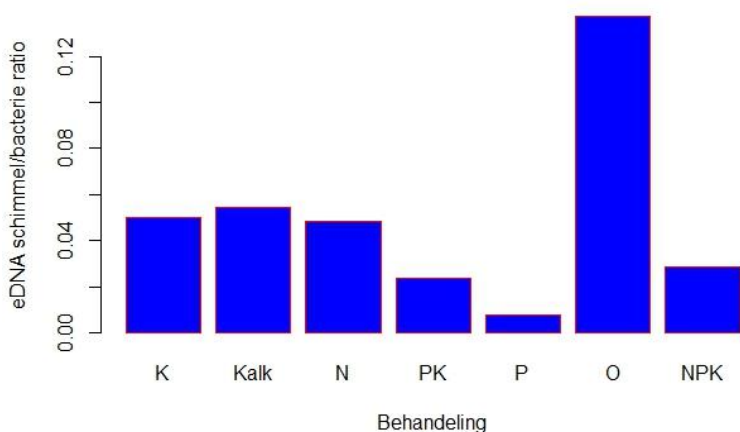
Figuur 36. De schimmel/bacterie ratio is hoger op percelen waar het grondwater diep zit.

Hoewel de hoeveelheid schimmels hoger was op percelen met een hoge CEC, is de eDNA schimmel/bacterie ratio significant lager op percelen met een hoge CEC. Sterk schimmel gedomineerde graslanden komen alleen voor bij een lage CEC (Figuur 37).



Figuur 37. Schimmel/bacterie ratio uitgezet tegen de CEC. Een hoge eDNA schimmel/bacterie ratio komt alleen voor onder voedselarme omstandigheden. Percelen met voedselrijke omstandigheden (hoge CEC) kennen vrijwel altijd een lage eDNA schimmel/bacterie ratio.

Bij de proefpercelen van de Ossekampen werd een sterk negatief effect van alle behandelingen gevonden op de eDNA schimmel/bacterie ratio (Figuur 38). Het verrijken van de bodem met kunstmest of via bekalking resulteert er dus in dat het bodemleven gedomineerd raakt door bacteriën. Indirect zorgt dit ook voor een snellere omzetting van organische stof.



Figuur 38. Resultaten van verschillende behandelingen bij de Ossekampen. Het aandeel eDNA van schimmels ten opzichte van bacteriën is verlaagd in alle plots waar bemesting is toegepast.

De correlaties tussen de eDNA concentratie van schimmels en de schimmel/bacterie ratio, en diverse chemische-fysische parameters, gewaseigenschappen en potentiële broeikasgasuitstoot zijn weergegeven

in Tabel 16. De eDNA schimmel/bacterie ratio is hoger op percelen met een hogere bulkdichtheid (Spearman's rank test; p-waarde=0,0070; rho=0,2448). Over het algemeen wordt een hoge schimmel/bacterie ratio gezien als indicator voor een goede bodemkwaliteit. Echter suggereert deze uitkomst dat een verdichting ook kan leiden tot een hoger aandeel schimmels.

De eDNA schimmel/bacterie ratio correleert niet met de kruidenrijkdom (Q-waarde) (Spearman's rank test; P-waarde=0,2006). De eDNA schimmel/bacterie ratio correleert niet significant met de pH-waarde (Spearman's rank test; p-waarde=0,0708), al was wel opvallend dat de percelen met een pH-CaCl hoger van 6,2 allen een eDNA schimmel/bacterie ratio <0,05 hadden. De eDNA schimmel-bacterie ratio werd niet significant beïnvloed door het type bemesting (Kruskal-Wallis; chi-kwadraat = 8.8657; p-waarde = 0,26).

*Tabel 16. Spearman's rank correlaties tussen de eDNA concentratie van schimmels en de schimmel/bacterie ratio & diverse chemische-fysische parameters, gewaseigenschappen en potentiële broeikasgasuitstoot. De gegeven correlatiecoëfficiënten voor CO<sub>2</sub> en CH<sub>4</sub> (methaan) zijn gemeten bij 60% van de vloeigrens en N<sub>2</sub>O (lachgas) bij 90% van de vloeigrens. Statistisch significante positieve relaties zijn groen gemarkeerd, significante negatieve relaties zijn rood gemarkeerd.*

#### Chemisch-fysische eigenschappen

Omschrijving	eDNA concentratie schimmels		Schimmel/bacterie ratio	
	p-waarde	rho	p-waarde	rho
OS %	0,064	0,164	0,017	-0,211
C-organisch	0,059	0,167	0,020	-0,205
N-Totaal	0,015	0,206	0,004	-0,248
CN-ratio	0,016	-0,206	0,471	0,062
P-AL	0,048	-0,170	0,067	0,157
P-CaCl	0,948	0,006	0,005	-0,238
S-Totaal	0,377	0,076	0,001	-0,275
Na-Totaal	0,269	0,095	0,279	0,093
Ca-Cohex	0,042	0,174	0,016	-0,205
K-Cohex	0,362	0,078	0,099	-0,142
Mg-Cohex	3,03E-05	0,348	0,069	-0,156
Fe-Totaal	0,032	0,184	0,065	-0,158
CEC-Cohex	0,010	0,218	0,016	-0,205
Klei %	0,000	0,322	0,132	-0,129
pH-CaCl	0,034	-0,180	0,071	-0,154
Bulkgewicht	0,004	-0,263	0,007	0,245
Vocht % bij bemonstering	0,001	0,283	0,018	-0,212

#### Ecosysteemdiensten en gewaseigenschappen

Omschrijving	eDNA concentratie		Aandeel	
	p-waarde	rho	p-waarde	rho
Maximale bewortelingsdiepte	0,117	0,143	0,913	-0,010
Kruidenrijkdom (Q-waarde)	0,110	0,143	0,201	-0,115
Pot. CH <sub>4</sub> uitstoot	0,297	-0,098	0,043	-0,189
Pot. CO <sub>2</sub> uitstoot	0,197	0,121	0,014	-0,227
Pot. N <sub>2</sub> O uitstoot	0,016	0,224	0,420	-0,076

### *Perspectief als indicator*

Zowel uit de relatie met CEC (totale dataset) als de proefvlakken van de Ossekampen blijkt dat de eDNA schimmel/bacterie ratio het hoogst kan zijn onder voedselarme (niet bemeste) omstandigheden. De overige variatie in de schimmel/bacterie ratio wordt voor een groot deel verklaard door de vochtigheid van de bodem. Onder vochtige omstandigheden worden bacteriën dominant. Er bleek sprake te zijn van een relatie tussen de schimmel/bacterie ratio en de CO<sub>2</sub> en CH<sub>4</sub> emissie. Mogelijk breekt organische stof minder snel af als de schimmel/bacterie ratio hoog is. Daarmee zou de eDNA schimmel/bacterie ratio een relevante indicator voor de afbraaksnelheid van organische stof kunnen zijn. Er is geen relatie gevonden tussen de kruidenrijkheid en de schimmel/bacterie ratio. Deze indicator geeft waarschijnlijk geen relevante informatie als het gaat om kruidenrijkdom in meest brede zin. Dit is niet verwonderlijk gezien vochtige graslanden bacterie gedomineerd zijn, maar toch zeer kruidenrijk kunnen zijn. Mogelijk dat kruidenrijkdom op hogere zandgronden wel gecorreleerd is met de schimmel/bacterie ratio. Dat is in deze studie echter niet onderzocht.

### 3.3.4.11 Arbusculaire mycorrhiza

#### *Introductie*

Arbusculaire mycorrhiza, ook wel bekend als AM-schimmels zijn een type mycorrhizale schimmels die in symbiose leven met plantenwortels. Deze symbiotische relatie tussen de schimmel en de plant is wederzijds voordelig. De schimmel helpt de plant voedingsstoffen uit de bodem te absorberen, terwijl de plant koolhydraten levert aan de schimmel.

Een opvallend kenmerk van arbusculaire schimmels is hun vermogen om arbuscules te vormen. Arbuscules zijn vertakte, boomachtige structuren die binnen de cellen van plantenwortels groeien. Deze structuren vergroten het oppervlak van de wortels en vergemakkelijken de uitwisseling van voedingsstoffen tussen de schimmel en de plant. Vooral fosfor en stikstof worden op deze manier efficiënter opgenomen. Arbusculaire schimmels kunnen dus helpen bij het verminderen van de behoefte aan bemesting.

#### *Berekening*

Alle soorten uit het subphylum 'Glomeromycotina' worden beschouwd als arbusculaire mycorrhiza. De hoeveelheid eDNA van arbusculaire mycorrhiza is berekend door de hoeveelheid eDNA van alle arbusculaire mycorrhiza in de dataset te sommeren. Het aandeel arbusculaire mycorrhiza ten opzichte schimmels is berekend door de som van eDNA arbusculaire mycorrhiza te delen door de totale hoeveelheid eDNA van schimmels. Het aandeel arbusculaire mycorrhiza ten opzichte van de totale eDNA concentratie is berekend door de som van hoeveelheid van eDNA arbusculaire mycorrhiza te delen door de som van het eDNA van alle organismen.

#### *Resultaten*

De correlaties tussen de eDNA concentratie en het aandeel arbusculaire schimmels, en diverse chemische-fysische parameters, gewaseigenschappen en potentiële broeikasgasuitstoot zijn weergegeven in *Tabel 17*. De hoeveelheid eDNA van arbusculaire schimmels is hoger in bodems met een hoge CEC, en hoog organisch stofgehalte, en is lager in bodems met een hoog bulkgewicht en hoge P-AL. Weinig functionele groepen correleren met de pH. Opvallend is dan ook dat de hoeveelheid eDNA van arbusculaire mycorrhiza negatief correleert met de pH. Ook zijn er meer arbusculaire schimmels gemeten in percelen met een grote maximale bewortelingsdiepte, hoge kruidenrijkdom, en een hoog aantal plantensoorten.

Het aandeel arbusculaire schimmels ten opzichte van de totale schimmelpopulatie laat een vergelijkbaar beeld zien. Echter ontbreekt de relatie met de CEC, het kleigehalte en diverse elementen op de CEC zoals calcium en magnesium.

Het aandeel arbusculaire schimmels ten opzichte van de totale hoeveelheid eDNA geeft een correlatie met andere parameters, behalve een negatieve correlatie met de maximale bewortelingsdiepte. Als de maximale bewortelingsdiepte afneemt dan neemt het aandeel arbusculaire schimmels dus toe.

*Tabel 17. Spearman's rank correlaties tussen de eDNA concentratie van arbusculaire schimmels en het aandeel arbusculaire schimmels en diverse chemische-fysische parameters, gewaseigenschappen en potentiële broeikasgasuitstoot. De gegeven correlatiecoëfficiënten voor CO<sub>2</sub> en CH<sub>4</sub> (methaan) zijn gemeten bij 60% van de vloeigrens en N<sub>2</sub>O (lachgas) bij 90% van de vloeigrens. Statistisch significante positieve relaties zijn groen gemarkeerd, significante negatieve relaties zijn rood gemarkeerd.*

### Chemisch-fysische eigenschappen

Omschrijving	eDNA concentratie AM		AM/schimmels		AM/totale eDNA concentratie	
	p-waarde	rho	p-waarde	rho	p-waarde	rho
OS %	3,61E-07	0,432	1,57E-05	0,372	0,508	-0,059
C-organisch	5,27E-08	0,458	3,05E-05	0,360	0,457	-0,066
N-Totaal	5,56E-06	0,377	3,25E-05	0,347	0,596	-0,046
CN-ratio	0,077	-0,152	0,669	-0,037	0,821	-0,020
P-AL	0,002	-0,265	0,059	-0,162	0,751	0,027
P-CaCl	0,742	0,028	0,839	0,018	0,896	0,011
S-Totaal	0,000	0,304	1,05E-05	0,367	0,728	-0,030
Na-Totaal	0,941	0,006	0,007	-0,231	0,389	-0,074
Ca-Cohex	0,006	0,235	0,586	0,047	0,174	-0,117
K-Cohex	0,130	0,129893	0,642	-0,040	0,327	-0,084
Mg-Cohex	1,68E-07	0,429125	0,255	0,098	0,436	-0,067
Fe-Totaal	0,003	0,256109	0,100	0,141	0,825	0,019
CEC-Cohex	0,001	0,269542	0,488	0,060	0,203	-0,110
Klei %	5,29E-05	0,33824	0,270	0,094	0,712	-0,032
pH-CaCl	0,027	-0,18756	0,014	-0,207	0,094	-0,142
Bulkgewicht	4,4E-05	-0,36387	0,004	-0,264	0,056	0,175
Vocht % bij bemonstering	1,27E-07	0,451414	0,000	0,310	0,484	-0,063

### Ecosysteemdiensten en gewaseigenschappen

Omschrijving	eDNA concentratie AM		AM/schimmels		AM/totale eDNA concentratie	
	p-waarde	rho	p-waarde	rho	p-waarde	rho
Maximale bewortelingsdiepte	0,021	0,209	0,904	-0,011	0,025	-0,204
Aantal plantensoorten Kruidenrijkdom (Q-waarde)	0,023	0,203	0,021	0,205	0,921	-0,009
Pot. CH <sub>4</sub> uitstoot	0,042	0,181	7,36E-05	0,346	0,815	-0,021
Pot. CO <sub>2</sub> uitstoot	0,838	0,019	0,408	0,078	0,814	0,022
Pot. N <sub>2</sub> O uitstoot	0,000	0,329	0,000	0,336	0,858	-0,017
	1,85E-06	0,428	0,165	0,130	0,969	0,004

### *Perspectief als indicator*

Er werd meer eDNA van arbusculaire mycorrhiza gedetecteerd in percelen met een hoog aantal plantensoorten, grote kruidenrijkdom en percelen met een grote maximale bewortelingsdiepte. De vraag is of arbusculaire mycorrhiza de oorzaak zijn van de kruidenrijkdom, of het gevolg. Hoe dan ook blijkt kruidenrijkdom en diepe beworteling samen te gaan met een grotere hoeveelheid arbusculaire mycorrhiza. De hoeveelheid eDNA van arbusculaire mycorrhiza lijkt dus een geschikte biologische indicator te zijn voor een gezonde bodem.

### 3.3.4.12 Regenwormen

#### *Introductie*

Een bodem met een goede structuur zorgt ervoor dat planten beter kunnen wortelen en dat er meer vocht, nutriënten en zuurstof beschikbaar zijn. Zowel grotere macro-organismen als micro-organismen beïnvloeden de bodemstructuur. Regenwormen graven gangen waarbij sommige soorten tot drie meter diep gaan. Deze gangen zorgen ervoor dat de bodem een betere waterdoorlaatbaarheid, -infiltratie en beluchting heeft (Faber en van der Hout, 2009).

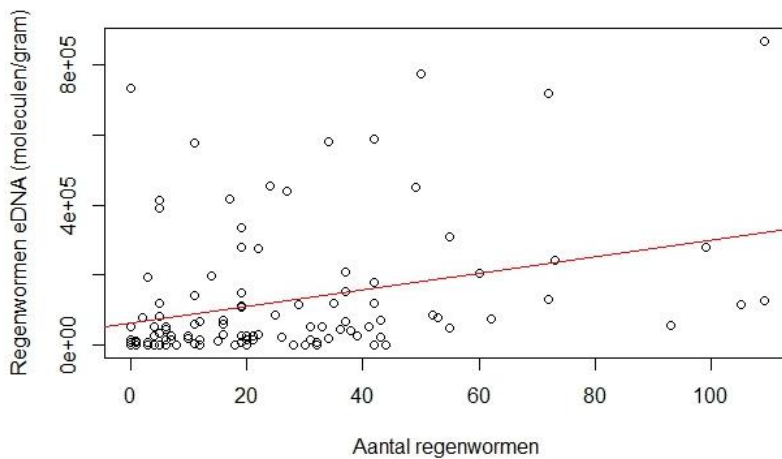
Regenwormen leven voornamelijk van dode plantenresten. Deze plantenresten worden via de voorkant opgenomen en het 'afval' wordt via de achterzijde weer uitgescheiden. Deze wormenpoep bevat hoge concentraties eDNA van wormen. Als gevolg daarvan kunnen wormen goed gedetecteerd worden met universele detectietechnieken (universele eukaryoten en prokaryoten primer) zoals gebruikt in deze studie. Met de gebruikte DNA-techniek kan echter geen onderscheid gemaakt worden tussen verschillende soorten regenwormen.

#### *Berekening*

Er kunnen geen regenwormsoorten onderscheiden worden met behulp van de gebruikte methode. De eDNA concentratie van Lumbricidae in de dataset reflecteert daarmee de eDNA concentratie van regenwormen. Het aandeel eDNA van regenwormen is berekend door de eDNA concentratie van Lumbricidae te delen door de totale eDNA concentratie.

#### *Resultaten*

Er is sprake van een significante relatie tussen het aantal wormen dat aangetroffen is in het veld en de eDNA concentratie (lineaire regressie;  $F=11,4$ ;  $p$ -waarde=0,001,  $R^2=0,096$ , Figuur 39). De lage  $R^2$  duidt er echter op dat slechts een deel van de variatie in eDNA concentratie verklaard kan worden door het aantal regenwormen.



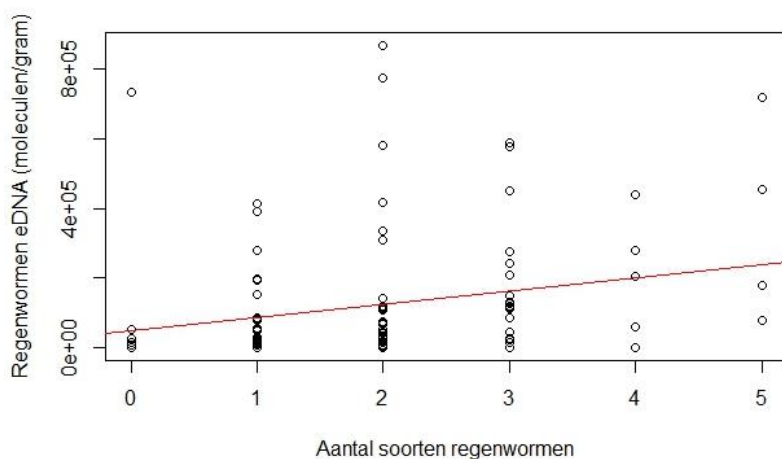
*Figuur 39. Correlatie tussen het aantal regenwormen dat aangetroffen is in het veld en de concentratie eDNA van regenwormen. Er is sprake van een significant verband, echter kan een groot deel van de variatie in eDNA concentratie niet verklaard worden door alleen het aantal regenwormen.*

De hoeveelheid eDNA van regenwormen in de bodem wordt naast de hoeveelheid wormen vermoedelijk ook sterk beïnvloed door de activiteit. Hoe actiever de wormen, hoe meer poep en slijm met daarin DNA van regenwormen in de bodem achtergelaten wordt. De mate waarin de hoeveelheid eDNA voorspeld kon worden door het model kon verbeterd worden door (naast de aantallen wormen) hoeveelheid vocht in de monsters op te nemen, zie Tabel 18 (lineaire regressie;  $F=11,39$ ;  $p\text{-waarde}=3,285e-05$ ,  $R^2=0,176$ ). De hoeveelheid eDNA van wormen in de monsters neemt dus toe onder vochtige omstandigheden. Dit is waarschijnlijk doordat wormen actiever zijn en zich relatief hoog in de grond ophouden onder vochtige omstandigheden, en daardoor meer eDNA in de bovenste 10 cm achterlaten. Er is echter nader onderzoek nodig om het verband tussen regenwormen activiteit en eDNA concentratie nauwkeuriger vast te stellen.

Tabel 18. Samenvatting van het model waarin het aantal regenwormen en het % vocht in de monsters de hoeveelheid eDNA voorspeld wordt. Zowel het aantal regenwormen als de hoeveelheid vocht in de monsters dragen significant bij aan de voorspellende waarde van het model.

	Schatting	Std. fout	t-waarde	p-waarde
<b>Snijpunt</b>	-65196	46368	-1,406	0,162
<b>Aantal regenwormen</b>	2392	670	3,568	0,0005
<b>Vocht %</b>	481520	149407	3,223	0,0017

Er is geen significante relatie gevonden tussen het drooggewicht van de regenwormen en de eDNA concentratie van wormen (lineaire regressie;  $F=0,73$ ;  $p$ -waarde= $0,39$ ;  $R^2=0,007$ ). Zware wormen laten dus kennelijk niet meer eDNA in de bodem achter dan lichte wormen. Wel is er een significante relatie gevonden tussen het aantal regenwormen soorten dat aangetroffen is in het veld en de hoeveelheid eDNA van regenwormen, zie Figuur 40 (lineaire regressie;  $F=6,173$ ;  $p$ -waarde= $0,015$ ;  $R^2=0,054$ ).

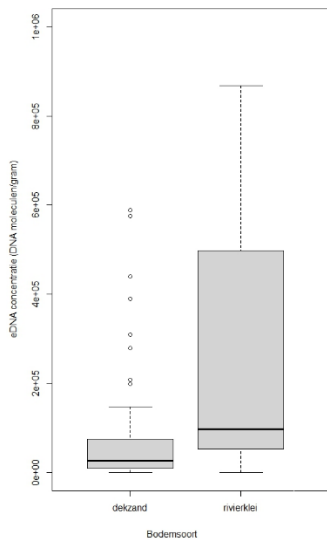


Figuur 40. Correlatie tussen het aantal soorten regenwormen dat aangetroffen zijn in het veld en de concentratie eDNA van regenwormen.

Opvallend is dat er geen enkele significante relatie gevonden is tussen de eDNA concentratie van regenwormen en chemisch-fysische parameters, gewaseigenschappen en broeikasgasuitstoot (Tabel 19).

De hoeveelheid eDNA van wormen werd wel significant beïnvloed door de bodemsoort (Kruskal-Wallis chi-squared = 26.0546,  $df = 6$ ,  $p$ -value = 0). Er werd meer eDNA aangetroffen in rivierkleibodems dan in dekzand bodems (dunn's test;  $p$ -waarde= $0,0017$ ; Figuur 41).





Figuur 41. De hoeveelheid eDNA van regenwormen was groter in rivierklei dan dekzandbodems

Tabel 19. Spearman's rank correlaties tussen de eDNA concentratie en het aandeel regenwormen & diverse chemische-fysische parameters, gewaseigenschappen en potentiële broeikasgasuitstoot. De gegeven correlatiecoëfficiënten voor CO<sub>2</sub> en CH<sub>4</sub> (methaan) zijn gemeten bij 60% van de vloeigrens en N<sub>2</sub>O (lachgas) bij 90% van de vloeigrens. Statistisch significante positieve relaties zijn groen gemarkeerd, significante negatieve relaties zijn rood gemarkeerd.

#### Chemisch-fysische eigenschappen

Omschrijving	eDNA concentratie		Aandeel	
	p-waarde	rho	p-waarde	rho
OS %	0,787	-0,024	0,727	-0,031
C-organisch	0,840	-0,018	0,820	-0,020
N-Totaal	0,786	-0,023	0,776	-0,025
CN-ratio	0,485	-0,060	0,717	-0,031
P-AL	0,952	-0,005	0,565	-0,050
P-CaCl	0,033	0,182	0,031	0,185
S-Totaal	0,849	-0,016	0,987	-0,001
Na-Totaal	0,453	-0,065	0,342	-0,082
Ca-Cohex	0,813	0,020	0,440	0,067
K-Cohex	0,806	0,021	0,718	0,031
Mg-Cohex	0,806	0,021	0,764	0,026
Fe-Totaal	0,938	0,007	0,715	0,031
CEC-Cohex	0,779	0,024	0,586	0,047
Klei %	0,816	0,020	0,640	0,040
pH-CaCl	0,683	0,035	0,406	0,071
Bulkgewicht	0,926	-0,009	0,814	0,022
Vocht % bij bemonstering	0,842	-0,018	0,735	-0,030

## Ecosysteemdiensten en gewaseigenschappen

Omschrijving	eDNA concentratie		Aandeel	
	p-waarde	rho	p-waarde	rho
Maximale bewortelingsdiepte	0,296	0,096	0,811	0,022
Kruidenrijkdom (Q-waarde)	0,782	-0,025	0,852	-0,017
Pot. CH <sub>4</sub> uitstoot	0,838	-0,019	0,452	0,071
Pot. CO <sub>2</sub> uitstoot	0,665	-0,041	0,584	-0,052
Pot. N <sub>2</sub> O uitstoot	0,875	-0,015	0,885	-0,014

### *Perspectief als indicator*

Er is een positieve correlatie gevonden tussen de hoeveelheid regenwormen en de hoeveelheid eDNA van regenwormen. Deze was echter minder sterk dan verwacht. Vermoedelijk wordt de hoeveelheid eDNA van regenwormen niet alleen beïnvloed door de hoeveelheid wormen maar ook door de activiteit van regenwormen. Deze aanname wordt bevestigd door een positieve correlatie tussen de hoeveelheid eDNA van regenwormen en het vochtpercentage in de monsters. Als inderdaad aangetoond kan worden dat de hoeveelheid eDNA van regenwormen afhankelijk is van de activiteit van regenwormen dan vormt de hoeveelheid eDNA van regenwormen een relevante indicator voor de mate van bioturbatie door regenwormen activiteit. Echter is het van belang om door middel van een laboratoriumexperiment aan te tonen dat er inderdaad een relatie is tussen de activiteit van regenwormen en de hoeveelheid eDNA van regenwormen in de bodem. Er is dus nader onderzoek nodig om deze indicator in de praktijk toe te passen.

## 3.3.4.13 Protozoa

### *Introductie*

Protozoa zijn eencellige micro-organismen die behoren tot het domein Eukaryota. Ze vertonen een grote diversiteit in vorm, grootte en levensstijl. Protozoa kunnen worden gevonden in verschillende omgevingen, waaronder de bodem. Ze spelen een essentiële rol in bodemecosystemen en hebben verschillende belangrijke functies.

Allereerst zijn protozoa belangrijk voor de afbraak en recycling van organisch materiaal in de bodem. Ze voeden zich met bacteriën, schimmels, algen en andere organische deeltjes, waardoor ze bijdragen aan de mineralisatie van voedingsstoffen en de vorming van humus.

Daarnaast spelen protozoa een rol in de regulering van de microbiële populaties in de bodem. Ze kunnen dienen als predatoren van bacteriën en andere protozoa, waardoor ze de populatiedichtheid en diversiteit van micro-organismen in balans houden.

### *Berekening*

De volgende stammen (phyla) zijn tot de protozoa gerekend:

Amoebozoa	Dinoflagellata	Evosea
Ciliophora	Choanoflagellida	Discosea
Euglenozoa	Radiolaria	
Apicomplexa	Foraminifera	

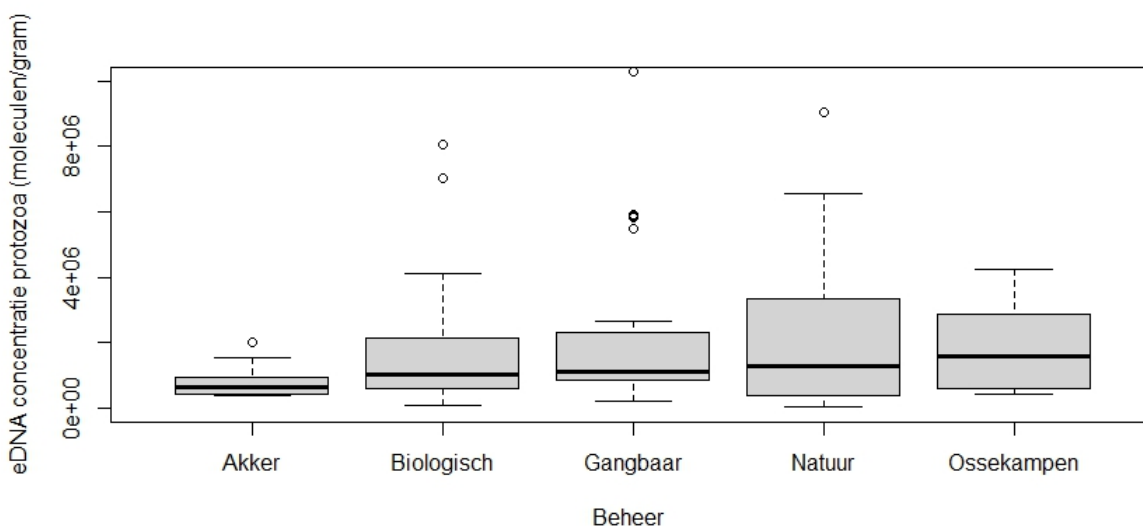
De hoeveelheid eDNA van protozoa is berekend door de hoeveelheid eDNA van de bovenstaande stammen te sommeren. Het aandeel protozoa is berekend door de som van de hoeveelheid eDNA van protozoa te delen door de totale hoeveelheid eDNA.

### Resultaten

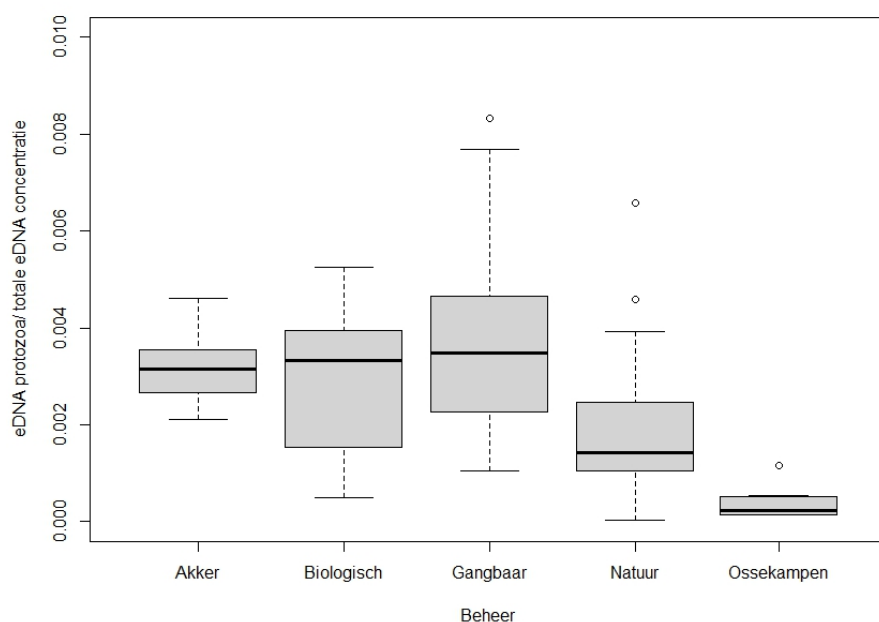
De meest opvallende correlatie is het zeer sterke verband tussen de hoeveelheid eDNA van protozoa en de potentiële lachgasuitstoot zoals gemeten in het laboratorium bij 90% van de vloeigrens. Vermoedelijk wordt dit veroorzaakt doordat veel protozoa het laboratoriumexperiment (eerst luchtdrogen van de monsters, daarna vernatten tot 90% van de vloeigrens) niet overleven. Het is aannemelijk dat er veel stikstof vrijkomt bij de afbraak van de protozoa. Deze stikstof wordt door denitrificerende bacteriën omgezet in lachgas. In de basis veroorzaken protozoa geen grote lachgasuitstoot. Echter, wanneer de bodem verstoord wordt dan kan dit leiden tot sterfte van bodemleven en de daarmee gepaard gaande lachgasemissies.

Ook is opvallend dat het aandeel protozoa negatief beïnvloed wordt door stikstof-totaal, zwavel-totaal en magnesium. Er lijkt dus een verschuiving plaats te vinden in samenstelling van de microbiële gemeenschap onder invloed van stikstof, zwavel en magnesium, waarbij er meer protozoa voorkomen bij lage stikstof, zwavel en magnesium concentraties.

De verwachting was dat er meer protozoa gevonden zouden worden in stabiele ongestoorde bodems. Echter bleek er geen verschil te zijn in eDNA concentratie van protozoa tussen akkers, biologische graslanden, gangbaar beheerde agrarische graslanden en natuurgraslanden (Kruskal-Wallis; chi-squared = 4,5984; p-value = 0,47; Figuur 42). Omdat ander bodemleven (schimmels en bacteriën) wel in hogere aantallen voorkomen in stabiele graslanden was er in het aandeel protozoa zelfs een tegenovergestelde trend zichtbaar. Juist in ongestoorde, stabiele graslanden zoals natuurgraslanden en de Ossekampen plots vormde het eDNA van protozoa een klein aandeel ten opzichte van de totale hoeveelheid eDNA (Kruskal-Wallis; chi-squared = 42,988; p-value = 0; Figuur 43).



Figuur 42. De eDNA concentratie (moleculen/gram) van protozoa per beheertype. 'Biologisch' en 'Gangbaar' staat voor respectievelijk biologisch en gangbaar beheerde graslanden.



Figuur 43. Het aandeel eDNA van protozoa per beheertype. 'Biologisch' en 'Gangbaar' staat voor respectievelijk biologisch en gangbaar beheerde graslanden.

Tabel 20. Spearman's rank correlaties tussen de eDNA concentratie en het aandeel protozoa & diverse chemische-fysische parameters, gewaseigenschappen en potentiële broeikasgasuitstoot. De gegeven correlatiecoëfficiënten voor CO<sub>2</sub> en CH<sub>4</sub> (methaan) zijn gemeten bij 60% van de vloeigrens en N<sub>2</sub>O (lachgas) bij 90% van de vloeigrens. Statistisch significante positieve relaties zijn groen gemarkeerd, significante negatieve relaties zijn rood gemarkeerd.

#### Chemisch-fysische eigenschappen

Omschrijving	eDNA concentratie		Aandeel	
	p-waarde	rho	p-waarde	rho
OS %	0,000	0,307	0,112	-0,141
C-organisch	0,000	0,334	0,179	-0,119
N-Totaal	0,210	0,108	0,006	-0,234
CN-ratio	0,937	-0,007	0,710	0,032
P-AL	0,801	-0,022	0,163	0,120
P-CaCl	0,794	0,023	0,251	-0,099
S-Totaal	0,244	0,100	0,043	-0,173
Na-Totaal	0,146	-0,125	0,942	0,006
Ca-Cohex	0,229	0,103	0,081	-0,150
K-Cohex	0,451	0,065	0,342	-0,082
Mg-Cohex	0,198	0,111	0,036	-0,179
Fe-Totaal	0,743	0,028	0,053	-0,166
CEC-Cohex	0,161	0,120	0,067	-0,157
Klei %	0,481	0,061	0,023	-0,194
pH-CaCl	0,464	0,063	0,120	0,132
Bulkgewicht	0,006	-0,250	0,043	0,185
Vocht % bij bemonstering	0,013	0,222	0,014	-0,220

## Ecosysteemdiensten en gewaseigenschappen

Omschrijving	eDNA concentratie		Aandeel	
	p-waarde	rho	p-waarde	rho
Maximale bewortelingsdiepte	0,080	0,160	0,774	-0,026
Kruidenrijkdom (Q-waarde)	0,203	-0,114	1,63E-05	-0,374
Pot. CH <sub>4</sub> uitstoot	0,231	-0,113	0,668	-0,040
Pot. CO <sub>2</sub> uitstoot	0,536	0,058	0,042	-0,190
Pot. N <sub>2</sub> O uitstoot	0,000	0,724	0,371	0,084

### *Perspectief als indicator*

De verwachting was dat er meer protozoa gevonden zouden worden in stabiele graslanden. Protozoa bevinden zich hoger in het voedselweb en zouden daarmee gevoelig zijn voor verstoring. De resultaten vertellen echter een ander verhaal. Juist in verstoorde graslanden blijkt het aandeel eDNA van protozoa laag te zijn. Er is verdiepend onderzoek nodig. Deels zou dit kunnen op basis van de reeds verzamelde data. Het zou interessant zijn om te onderzoeken om welke soorten protozoa het gaat. Mogelijk profiteren bepaalde soorten protozoa juist van verstoring, terwijl andere soorten juist afnemen als gevolg van verstoring. Ook kan onderzocht worden hoe de diversiteit van protozoa verandert onder invloed van verschillend beheer. Kortom, het aandeel eDNA van protozoa wordt sterk beïnvloed door het beheer, en vormt daarmee in potentie een relevante indicator. Er is echter verdiepend onderzoek nodig om beter te begrijpen waarom het aandeel eDNA van protozoa toeneemt als gevolg verstoring van de bodem.

## 4. Cheapttech sensoren

### 4.1 Inleiding

In dit project hebben we onderzocht hoe sensoren ingezet kunnen worden om bodemvitaliteit beter in kaart te brengen. Hierbij is gefocust op bodemvocht en bodemtemperatuur sensoren, omdat deze direct informatie geven over de bodemfunctie waterregulatie en mogelijk indirect over de uitstoot van broeikasgassen en activiteit van bodemleven. Om onderdeel te worden van een standaard bodemmeting, is het cruciaal dat deze sensoren geproduceerd worden, of kunnen worden, tegen lage kosten. Dit segment hebben we 'cheapttech' genoemd.

In tegenstelling tot sensoren in het duurdere segment, is de sensormeting veelal niet gecorrigeerd voor externe factoren. Ook wordt dit type elektronica vaak op grote schaal geproduceerd voor een specifieke gebruikssituatie, zoals de auto-industrie of huishoudelijke apparaten. Toepassing in een veldsituatie valt veelal buiten de specificaties van de fabrikant.

Daarmee is de grootste uitdaging voor het inzetten van 'cheapttech' sensoren voor metingen aan de bodem, de betrouwbaarheid van de instrumenten en de uiteindelijke meetresultaten. Om deze reden is voor deze fase van het project gekozen om intensief te meten op een klein aantal (6) percelen en ligt de nadruk op de validatie van de meettechniek. In de volgende hoofdstukken worden allereerst de percelen en het meetsysteem beschreven. Vervolgens worden de resultaten van de validatie uiteengezet en tot slot wordt ingegaan op real-time gebruikssituaties en prototype indicatoren voor bodemvitaliteit. Door de keuze voor een kleine set percelen zijn de prototype indicatoren, in tegenstelling tot de indicatoren voor bodemleven, beschrijvend en niet statistisch onderzocht en ligt de nadruk op de inzetbaarheid voor de bodemfunctie waterregulatie.

### 4.2 Methoden

#### 4.2.1 Beschrijving van de percelen

Gezien de grote rol van het bodemtype in de waterregulatie op een perceel, is er gekozen om per bodemtype twee percelen te selecteren om meetopstellingen te plaatsen. Deze bodemtypes zijn: dekzand, rivierklei en veen, hierna afgekort tot zand, klei en veen.

Per bodemtype zijn twee percelen geselecteerd die vergelijkbaar waren op basis van gangbare chemische analyses, maar verschilden in het gevoerde management. Hierbij is de aanname dat verschillen in management wel aantoonbaar zouden zijn in de sensormetingen. De gangbare chemische analyses waarop percelen zijn uitgekozen zijn door de gebruiker zelf aangeleverd bij aanvang van het project.

Gedurende het project is één extra sensorperceel (55) toegevoegd. Dit was aanvankelijk om de plaatsing en werking van de sensor te demonstreren, maar er is gekozen deze sensor te laten staan en mee te nemen als extra perceel.

In Tabel 21 zijn de gegevens weergegeven waarop de sensoren zijn geselecteerd.

Tabel 21. *Chemische analyses waarop de sensorpercelen zijn geselecteerd. Op drie van de percelen werd een speciaal management toegepast, B: Winterdag bevoeiing, V: Vaste mest, D: Drainage.*

Perceel	51	55	85	109	120	11	15
Aantal sensoren	3	1	3	1	1	1	1
Bodemtype	dekzand	dekzand	dekzand	rivierklei	rivierklei	veen	veen
Grondwatertrap	VII	Vb	III	VII	-	II	II
Drainage	Nee	Nee	Nee	Nee	Nee	Ja	Nee
pH	5.1	5.1	5.0	6.4	6.7	5.5	5.8
Organische stof	5.3	5.1	6.9	6.6	7.3	15.3	12.2
Stikstof totaal (mg/kg)	2107	2000	2912	3018	3527	6333	5247
C:N ratio	15	15	12	9	7	9	11
Zand (%)	87	85	91	55	73	66	66
Zilt (%)	10	12	8	29	17	19	19
Klei (%)	3	2	3	13	18	21	12
Management			B		V	D	

Bij de zandpercelen zijn 51 en 55 sterk vergelijkbaar. 85 wijkt af in de grondwatertrap en de winterdagbevoeiing, maar ook in organisch stofgehalte. Tussen de kleipercelen is het voornaamste verschil dat perceel 120, waarschijnlijk door de toepassing van vaste mest, meer organische stof bevat. Daarnaast is het gehalte zand hoger. De veenpercelen hebben beide een hoog organisch stofgehalte, maar dit ligt nog 3% hoger op perceel 11. Daarnaast wordt op perceel 11 ook drainage toegepast.

De gegevens in bovenstaande tabel zijn gebaseerd op historische analyses op het perceel. Gedurende het project zijn alle bovenstaande metingen nogmaals verricht. Daarnaast zijn er ook aanvullende chemische, fysische en biologische metingen gedaan. In onderstaande tabel zijn de bijzonderheden per perceel samengevat, waarbij is gekeken naar metingen die relateren aan de bodemfunctie waterregulatie. Voor perceel 109 zijn door een fout bij de monsternamen niet alle bodemanalyses verricht en is het overzicht mogelijk incompleet. In onderstaande paragrafen wordt uitvoeriger ingegaan op resultaten per perceel in de context van de spreiding in de dataset.

Tabel 22. Samenvatting van verschillen tussen sensorpercelen op basis van geselecteerde chemische, fysische en biologische metingen die mogelijk relevant zijn voor de bodemfunctie waterregulatie.

Perceel	Chemische metingen	Fysische metingen	Biologische metingen
51		Lage verdichting in de laag 40-80cm	
55	C/N ratio onder gemiddeld	Sterk verdicht in de laag 0-40 cm en een hoge bulkdichtheid	Uitzonderlijk veel regenwormen en hoge score voor bodemleven
85	Bovengemiddeld organische stof/koolstof, stikstof voorraad en pH	Lage verdichting in de laag 40-80 cm	Lage score voor bodemleven
109		Extreem verdicht in de laag 0-40 cm en bovengemiddeld 40-80cm	
120		Bovengemiddeld verdicht in de laag 40-80 cm	
11	Bovengemiddeld organische stof en onder gemiddelde CN ratio		Bovengemiddeld aantal regenwormen
15	Bovengemiddeld organische koolstof	Lage verdichting in laag 40-80 cm, onder gemiddelde vloeigrens	Buitengewoon veel microbiële koolstof, maar matig aantal regenwormen

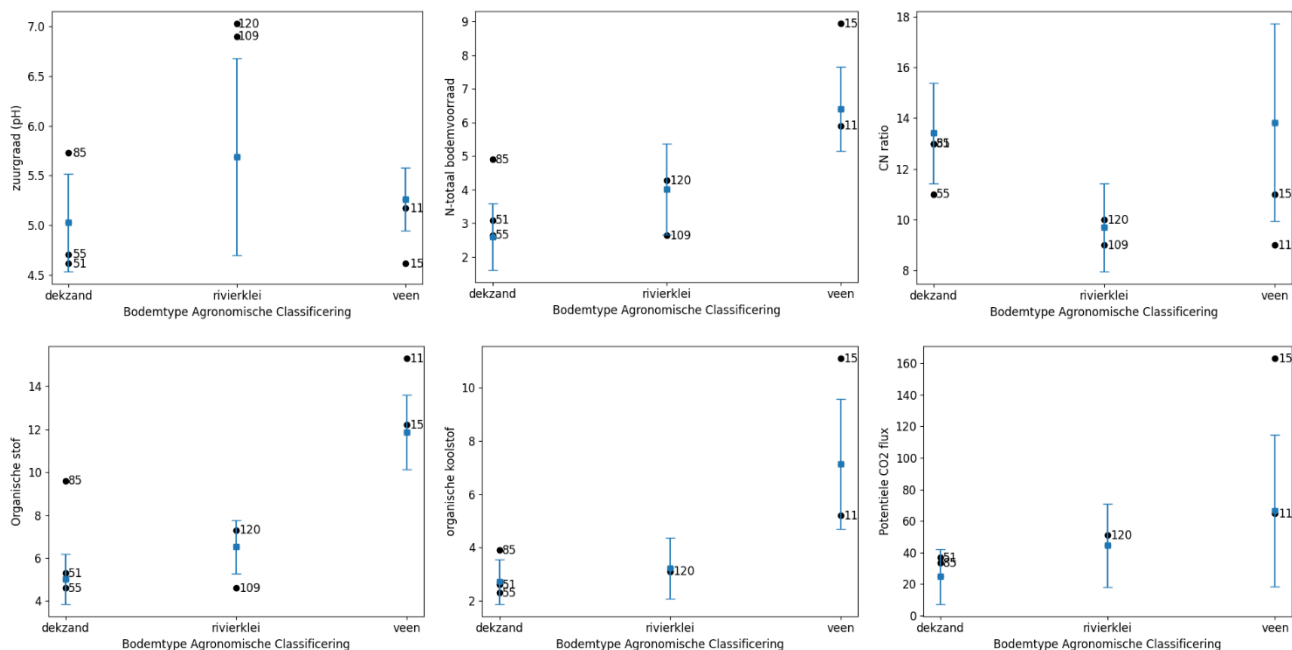
Het doel tijdens de selectie van de sensorpercelen was om per bodemtype twee percelen te selecteren die vergelijkbaar waren op basis van de gangbare bodemanalyses en andere bekende factoren zoals grondwatertrap. Op basis van bovenstaande analyse kan gesteld worden dat dit voor een deel geslaagd is:

- Zandpercelen 51 en 85 verschillen zowel op het beheer, als het organische stofgehalte en de grondwatertrap.
- Kleipercelen 109 en 120 verschillen wat betreft de gangbare analyses hoofdzakelijk op het gehalte organische stof, wat in lijn is met het verschil in beheer, namelijk het uitrijden van meer vaste mest op perceel 120. Uit de aanvullende analyses komt ook naar voren dat perceel 109 ook veel sterker verdicht is in de laag 0-40cm dan perceel 120.
- De veenpercelen verschillen in het gevoerde beheer (wel/geen drainage), maar ook op het organische stofgehalte. Aanvullende metingen laten zien dat de samenstelling van de organische stof eveneens verschilt. Daarnaast is er op perceel 15 sprake van een relatief lage verdichting in de laag 40-80cm.

## 4.2.2 Chemische metingen

De chemische metingen geven een vergelijkbaar beeld met de historische metingen, met uitzondering van de pH. Deze ligt op perceel 85 hoger en voor perceel 15 lager dan bij de historische metingen (Figuur 44). Het verschil in organische stofgehalte is eveneens terug te zien. In de context van de bredere dataset liggen percelen 85 en 11 daarbij boven en perceel 109 onder het gemiddelde. Wel is er een duidelijk verschil in de samenstelling van de organische stof tussen percelen 11 en 15. Op perceel 15 bestaat de organische stof grotendeels uit organische koolstof, terwijl dit aandeel op perceel 11 laag ligt. Dit is ook terug te zien in algehele C:N verhouding.

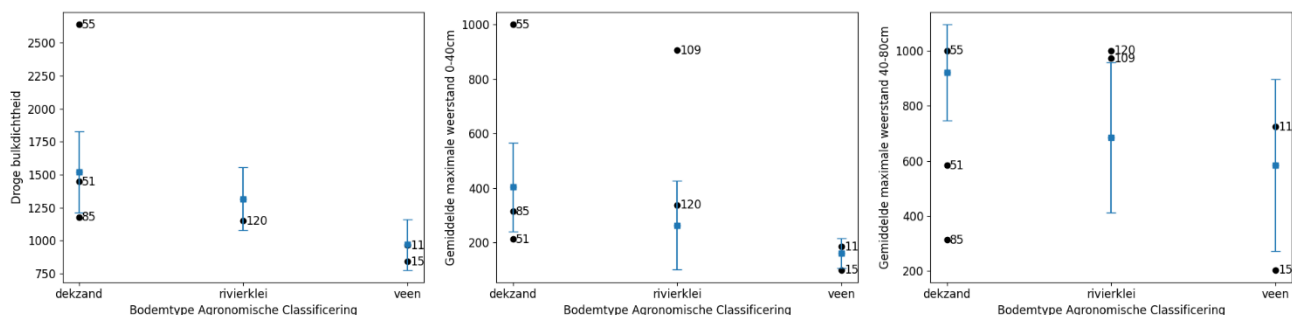




Figuur 44. Vergelijking van relevante chemische metingen. Per bodemtype is in blauw het gemiddelde en de standaarddeviatie weergegeven. De sensorpercelen zijn weergegeven in zwart.

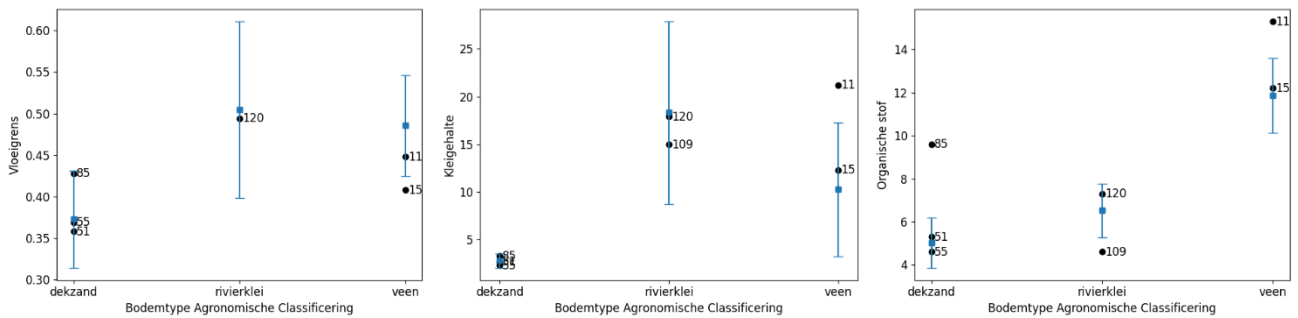
### 4.2.3 Fysische metingen

Wanneer er wordt gekeken naar metingen gerelateerd aan verdichting van de bodem (droge bulkdichtheid, weerstand) is te zien dat de droge bulkdichtheid van de percelen rond het gemiddelde ligt voor het bodemtype, met uitzondering van perceel 55 (Figuur 45). De weerstand gemeten met de penetrometer in de laag 0 tot 40cm is ook erg hoog bij perceel 55, evenals voor perceel 109. De weerstand gemeten in de laag 40 tot 80cm ligt gemiddeld veel hoger. Hierbij is perceel 55 gemiddeld, waar percelen 51 en met name 85 juist een lage verdichting hebben. Beide kleipercelen zijn bovengemiddeld verdicht in deze laag. Veenperceel 15 heeft de laagste verdichting in deze zone.



Figuur 45. Vergelijking van metingen gerelateerd aan verdichting. Per bodemtype is in blauw het gemiddelde en de standaarddeviatie weergegeven. De sensorpercelen zijn weergegeven in zwart.

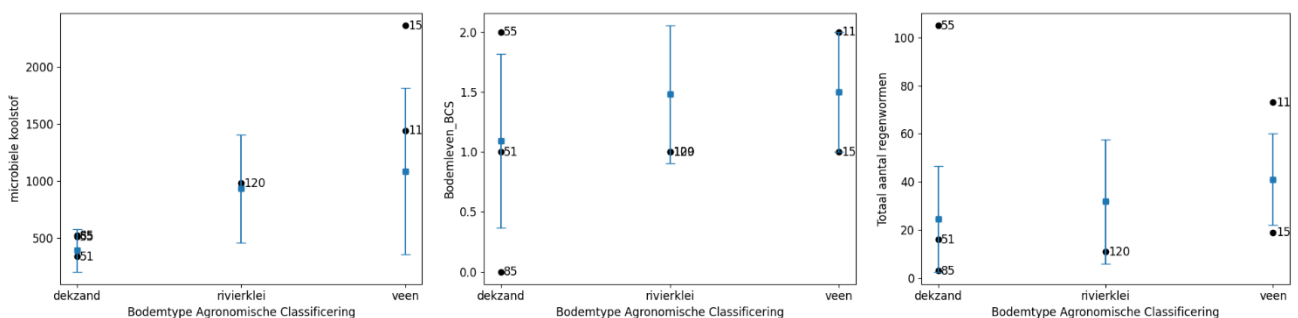
De gemeten vloeigrens ligt nabij het gemiddelde voor alle percelen behalve veenperceel 15. Wel is er een duidelijk verschil tussen zandpercelen 51 en 55 enerzijds en perceel 85 anderzijds (Figuur 46). De vloeigrens wordt sterk beïnvloed door het kleigehalte en het organische stofgehalte. Uit onderstaande vergelijking is te zien dat het verschil in vloeigrens tussen perceel 85 en de andere zandpercelen mogelijk te verklaren is door het hoge organische stofgehalte op dit perceel. Veenperceel 11 heeft echter een bovengemiddeld klei en organische stofgehalte, maar een vloeigrens die net onder het gemiddelde ligt voor veen. Mogelijk heeft dit te maken met het aandeel koolstof in het organische stofgehalte die relatief laag ligt.



*Figuur 46. Vergelijking van de vloegrensbeplating met kleigehalte en organische stof. Per bodemtype is in blauw het gemiddelde en de standaarddeviatie weergegeven. De sensorpercelen zijn weergegeven in zwart.*

## 4.2.4 Biologische metingen

Bepaling van microbiële biomassa met PLFA laat duidelijk het verschil zien tussen zand, klei en veen. De percelen zitten daarbij rond het gemiddelde van hun bodemtype, met uitzondering van perceel 15, dat bovengemiddeld veel microbiële koolstof bevat (*Figuur 47*). In de beoordeling van het macro-bodemleven tijdens de visuele inspectie scoort perceel 55 bovengemiddeld en perceel 85 onder gemiddeld. Dit is ook terug te zien in de tellingen van de regenwormen. Op perceel 55 werden uitzonderlijk veel regenwormen geteld.



*Figuur 47. Vergelijking van uitslagen van metingen aan het bodemleven. Per bodemtype is in blauw het gemiddelde en de standaarddeviatie weergegeven. De sensorpercelen zijn weergegeven in zwart.*

## 4.3 Meetsysteem

De meetsystemen die we in dit project hebben toegepast zijn gekozen op basis van twee eisen:

1. De software en hardware moet waar mogelijk Open Source zijn
2. De systemen moeten beschikbaar zijn tegen lage kosten (cheapttech) of potentie hebben voor kostenreductie in de toekomst.

Deze eisen moeten ervoor zorgen dat de ontwikkelde instrumenten en methoden breed toepasbaar zijn en de ontwikkelde kennis en implementatie niet terecht komt bij één (commerciële) partij, en dat gewaarborgd is dat het ten goede komt aan de gehele sector en maatschappij.

De meetopstelling die we voor dit project hebben ingezet bestaat uit:

1. **Netwerk:** The Things Network (TTN) LoRaWAN. Dit netwerk zorgt voor de afhandeling van het radiosignaal met het data-pakket afkomstig van de meetkasten. Het datapakket wordt ontvangen door publieke gateways die verbonden zijn met het internet. De software van TTN zorgt ervoor dat een datapakket doorgestuurd wordt naar de TTN-server. Vanaf de TTN-server kan het data-pakket weer worden opgehaald door de gebruiker, of in dit geval een centrale server van het project ([sensoren.sensorischlandschap.nl](https://sensoren.sensorischlandschap.nl)). De software die TTN gebruikt is Open Source en de community versie van TTN is kosteloos. Daarbij moet de gebruiker zich houden aan de fair use policy en wordt verwacht dat er actief wordt bijgedragen aan het in stand houden van het community netwerk door bijvoorbeeld de plaatsing van extra publieke gateways.
2. **Meetstation:** Meet Je Stad PCB versie 2 inclusief behuizing. Het meetstation beschikt over een STM32 microcontroller waarmee metingen van sensoren met verschillende interfaces kunnen worden opgehaald. Daarnaast is het meetstation voorzien van GPS, temperatuur en luchtvochtigheid-sensor (si7021), batterijen, oplaadcircuit voor het zonnepaneel en LoRa chip. Wat de elektronica onderscheidt van andere oplossingen is dat deze sterk geoptimaliseerd is voor laag energiegebruik en het ontwerp van de elektronica en de software open source is. Elektronische componenten (microchip, GPS) zijn 'closed source'.
3. **Sensoren:** Aan het meetstation kunnen verschillende typen sensoren gekoppeld worden. In dit project hebben we sensoren voor het meten van bodemvocht, bodemtemperatuur en CO<sub>2</sub> (lucht) getest. Op het niveau van sensoren zijn volledig open source onderdelen schaars. We hebben gekozen voor een beproefde sensor opstelling met vochtsensoren in het betaalbare segment.

Tabel 23. Onderdelen van de meetopstelling.

Systeemonderdeel		Open source
Netwerk	The Things Network LoRaWAN	Volledig
Meetstation	Meet Je Stad Meetstation V2	PCB ontwerp, Software
Sensoren		
Temperatuur en luchtvochtigheid	si7021	Nee
Bodemvocht*	2x Pinotech soilwatch 10	Nee
Bodemtemperatuur	2x NTC	Nee
CO <sub>2</sub>	Sensirion SDC30	Nee

## 4.4. Validatie Network

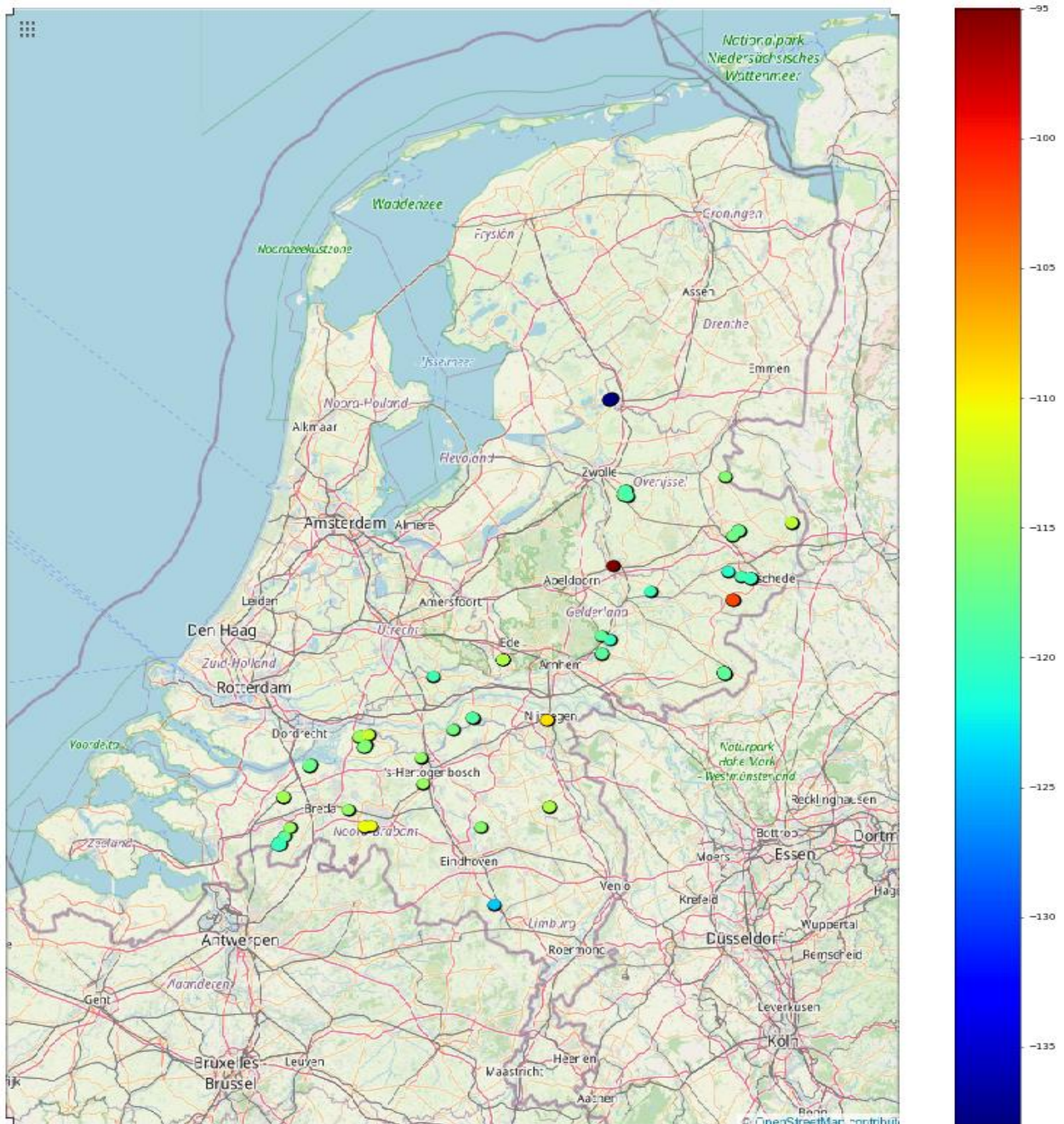
### 4.4.1 Algemeen

Het community LoRa netwerk 'The Things Network' (TTN) is een interessant Open Source communicatienetwerk voor het uitvoeren van veldmetingen. LoRa is bij uitstek geschikt voor het verzenden van kleine datapakketten over grote afstanden en het TTN heeft in Nederland een grote dekking. Echter is de dekking op het platteland nog maar beperkt in kaart gebracht. Dit komt doordat veel gebruikers in de steden zitten. Om zeker te zijn dat de sensoren die in het kader van het Sensorisch Landschap project ontwikkeld en getest worden straks breed inzetbaar zijn op het platteland, is eerst een analyse gemaakt van het TTN netwerk op 130 percelen.

Deze analyse is gedaan door een tweetal TTN Mappers te bouwen en te programmeren, welke zijn meegenomen door de teams van bemonsteraars. De TTN Mappers zijn apparaten die beschikken over een LoRa radio en GPS en geprogrammeerd zijn om op een standaard interval de gps-locatie door te sturen naar het TTN netwerk. Door op de server van het TTN het apparaat aan te merken als TTN Mapper wordt de data automatisch opgeslagen op de server van het TTN Mapper project.

Deze data omvat naast de gps-locatie gegevens over hoe sterk de verbinding met het LoRa netwerk was en via welke gateways er verbinding gemaakt is. De data wordt automatisch gebruikt voor het genereren van netwerk-kaarten (<https://ttnmapper.org/>), maar is ook per apparaat los te downloaden voor analyse. Van de 130 percelen die door de bemonsteraars bezocht zijn, is het op 84 percelen (64%) gelukt om verbinding te maken met het TTN netwerk (Figuur 48).

Het voordeel van het TTN Community Network is dat het kosteloos te gebruiken is. Daar staat tegenover dat de dekking op het platteland onvolledig is. In de praktijk betekent dit dat de projectorganisatie, leverancier of eindgebruiker van de meetopstelling het netwerk in veel gevallen actief uit moet breiden met ontvangstations (gateways) om het op alle percelen toepasbaar te maken. Daarbij is het voor grootschalige toepassing de vraag of de investering en het onderhoud van deze gateways opwegen tegen de periodieke kosten van commerciële LoRa, of andere communicatienetwerken. Ook is het functioneren van het TTN Community netwerk op dit moment afhankelijk van The Things Industries, die limieten kan gaan stellen aan het kosteloze gebruik.



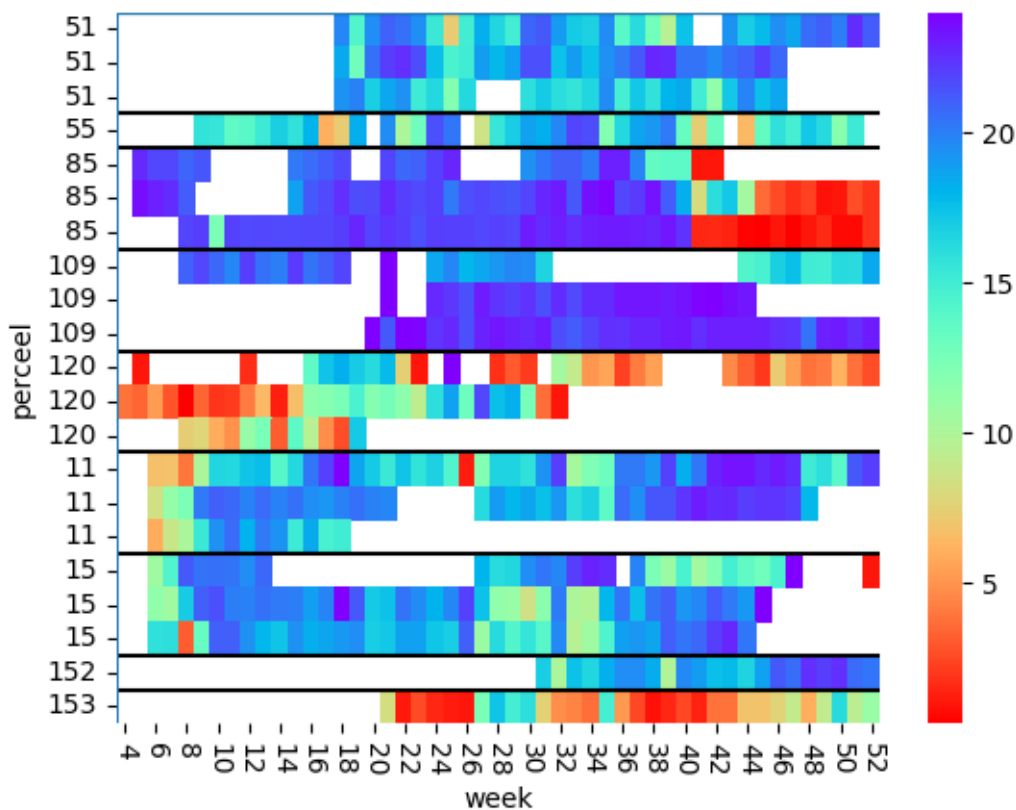
Figuur 48. Signaalsterkte van de verbinding met het TTN LoRa Network. Een rode stip op de kaart geeft aan dat er een hele sterke verbinding was en een blauwe stip geeft een zwakkere verbinding aan.

## 4.4.2 Validatie Meetkasten

Op 6 proefpercelen zijn begin 2021 drie meetkasten met sensoren geplaatst. Daarnaast is er gedurende het project een extra meetkast geplaatst op proefperceel (55). In totaal zijn er daarmee gedurende het project op 19 plekken meetkasten geplaatst. In Figuur 49 is op de y-as het nummer van het perceel weergegeven en op de x-as het weeknummer. Op de heatmap laat de kleur zien hoeveel metingen er gemiddeld per dag zijn ontvangen van de meetkasten op de percelen. De meetkasten zijn ingesteld om elk uur een meting te verzenden, i.e. 24 metingen per dag.

## 4.4.3. Down-time

In Figuur 49 is te zien dat er op alle percelen er meetkasten periodiek geen metingen doorgaven (down-time). Deze down-time had verschillende oorzaken. Sommige meetkasten zijn beschadigd geraakt tijdens een storm of tijdens werkzaamheden op het land, waardoor zonnepanelen losgeraakt zijn en de batterijen zijn uitgevallen. Tijdens maaien werd regelmatig de paal geraakt, waardoor kabels naar vocht-sensoren werden doorgesneden. In perceel 120 werd er beweid in het najaar. De palen waarop de meetkasten waren bevestigd werden gebruikt door de koeien om tegen te schuren en werden op den duur omgeduwd. Vier meetkasten zijn gedurende het project dusdanig beschadigd dat deze niet te herstellen waren: meetkast 1 op perceel 109, meetkast 2 en 3 op perceel 120 en meetkast 3 op perceel 11.



*Figuur 49. Visualisatie van het aantal verzonden metingen per meetstation, van laag (rood) naar hoog (blauw). Witte vlakken geven perioden aan waar metingen ontbreken.*

Een tweede oorzaak voor down-time die is geobserveerd ligt in de software van de meetkast. Deze kan in sommige gevallen vastlopen, waardoor een handmatige reset nodig is. Tijdens het project zijn de meetkasten voorzien van een extra chip, die zorgt voor een reset, wanneer de software vastloopt. Hierdoor is de down-time aanzienlijk afgenomen.

Verschiede verbeteringen zijn gedurende het project doorgevoerd om beschadiging van meetkasten te beperken. Hierbij is de bevestiging van het zonnepaneel verbeterd en zijn meetkasten op palen die door koeien zijn neergehaald bevestigd op hogere en stevigere palen. Er kan geconcludeerd worden dat de

meetkasten op dit moment te veel onderhoud nodig hebben. Dit komt met name door de behuizing van de meetkasten. Deze is eerder toegepast in de stad, maar blijkt onvoldoende robuust voor gebruik in graslanden die actief beheerd of beweid worden. Voor een vervolgfase zullen dus allereerst verbeteringen nodig zijn in de opstelling om de onderhoudsgevoeligheid verminderen.

#### 4.4.4 Netwerk sterkte

Figuur 49 geeft ook een gedetailleerd beeld van de netwerk-sterkte op de percelen. In Tabel 24 zijn deze resultaten vergeleken met de resultaten uit de netwerk-analyse met LoRa Mappers.

Tabel 24

Perceel	Netwerk-sterkte	Signaal-sterkte LoRa Mapper (RSSI)
51	Voldoende	-118
85	Goed*	-102
109	Goed	-101
120	Slecht	-116
11	Voldoende	-118
15	Voldoende	-115

*\* nabij het perceel is een indoor Gateway geplaatst. Het bereik van deze indoor gateway is laag ten opzichte van een outdoor gateway, waardoor de referentie sensor op een naburig perceel slechte dekking heeft.*

De analyse met TTN Mappers geeft voor de meeste percelen een goede indicatie of er verbinding te maken is met het netwerk. Meetkasten op percelen waar van tevoren met de TTN mapper een RSSI waarde rond de -100 werd gemeten, gaven een goede ontvangst. Het aantal metingen per dag ligt daar dicht bij het maximum van 24 (Figuur 49). Meetkasten op percelen waar een RSSI waarde rond de -115 werd gemeten gaven voldoende ontvangst, i.e. van de 24 metingen worden er gemiddeld meer dan de helft ontvangen.

Perceel 120 is een uitzondering. Dit perceel is zeer uitgestrekt en tijdens de meetcampagne met de TTN Mapper werd er een sterk signaal gemeten op het uiterste deel van het perceel. De sensoren werden geplaatst in het midden van het perceel achter een dijk, die de zichtlijn naar de gateway belemmerde. Hierdoor was de signaalsterkte aanzienlijk slechter dan van tevoren ingeschat.

#### 4.4.5 Conclusie

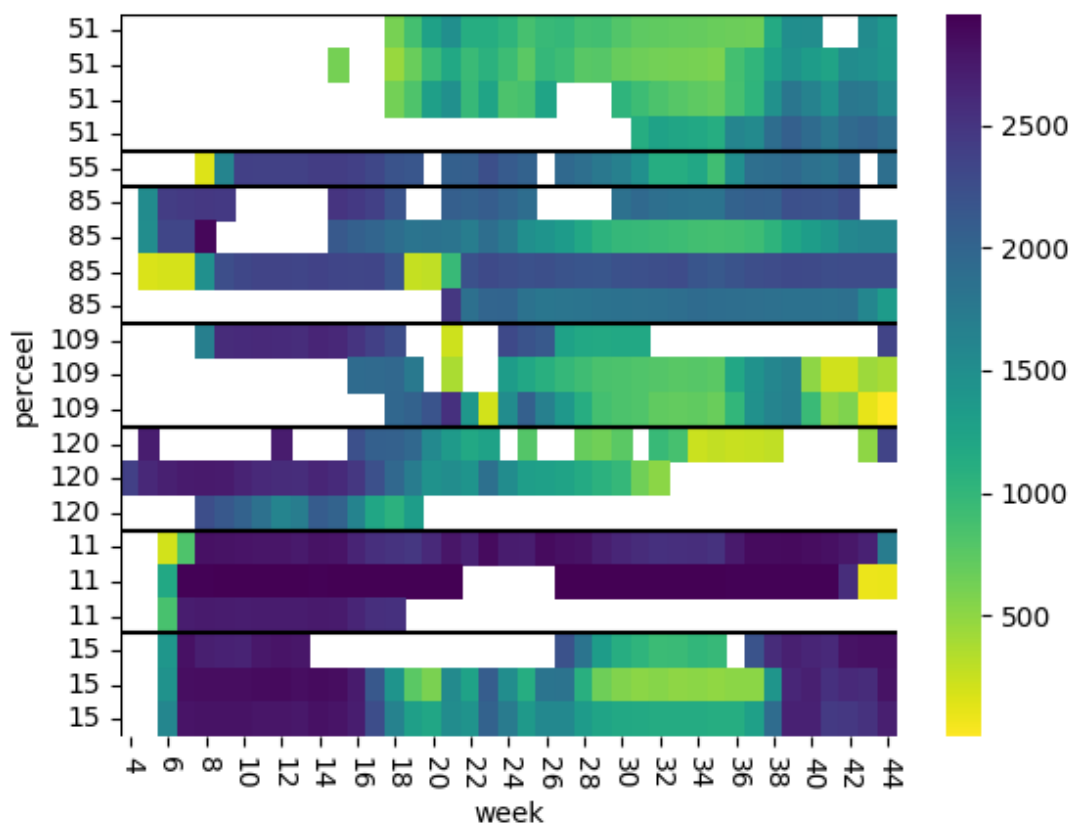
De meetkasten waren te onderhoudsintensief, met name de behuizing van de meetkasten was onvoldoende robuust voor toepassing in actief beheerde graslanden. Hier is verbetering nodig. De netwerksterkte van de meetkasten was zoals verwacht op basis van de eerder uitgevoerde netwerk-analyse. Wel is het bij percelen met veel hoogteverschil belangrijk om vooraf een bepaling van de netwerksterkte op een representatieve plek op het perceel uit te voeren.

## 4.5 Validatie bodemvocht-sensoren

### 4.5.1 Stabiliteit

#### 4.5.1.1 Sensor-output

In Figuur 50 is voor alle sensoren de gemeten ruwe waarde op 10cm diepte weergegeven als heatmap. Ontbrekende waarden in de metingen komen overeen met de perioden dat meetkasten uit zijn gevallen. Daarnaast is voor sommige sensoren een scherpe verandering zichtbaar of gebrek aan verandering. In alle gevallen dat sensoren een snel verloop van een hogere waarde (blauw) naar een lagere waarde (geel) lieten zien, was er sprake van een externe oorzaak, in de meeste gevallen schade aan de meetkast of de kabels, of een foute aansluiting.



*Figuur 50. Visualisatie van de ruwe meetwaarden voor bodemvocht van de meetstations, van laag (geel) naar hoog (blauw). Witte vlakken geven perioden aan waar metingen ontbreken.*



### 4.5.1.2 Drift

Drift is het fenomeen waarbij de relatie tussen de sensormeting en de fysieke waarde, in dit geval bodemvocht, over de tijd verandert. Als deze afwijking groot is zal het nodig zijn sensoren regelmatig te kalibreren. In het geval van bodemvochtsensoren die zijn ingegraven en over meerdere jaren betrouwbare metingen moeten leveren is dit zeer onpraktisch. Een lage drift is daarom cruciaal. In lab-experimenten met de bodemvochtsensoren (bijlage 1) is geen drift waargenomen, waarbij de maximum testperiode 3 maanden bedroeg.

### 4.5.1.3 Specificiteit

De metingen van bodemvocht met deze sensor zijn niet volledig specifiek, ze zijn ook afhankelijk van de temperatuur van de bodem. Bodemvocht-metingen met deze sensor dienen dus gecorrigeerd te worden voor temperatuureffecten. De relatie tussen temperatuur en de bodemvocht-metingen is tijdens dit project op twee manieren in kaart gebracht: experimenteel en op basis van de real-data van de sensoren in het veld. Uit de lab-experimenten blijkt dat de bodemvochtmeting inderdaad afhankelijk is van de bodemtemperatuur, maar dat deze afhankelijkheid ook varieert met het bodemvochtgehalte en de bodemsoort (Bijlage 2).

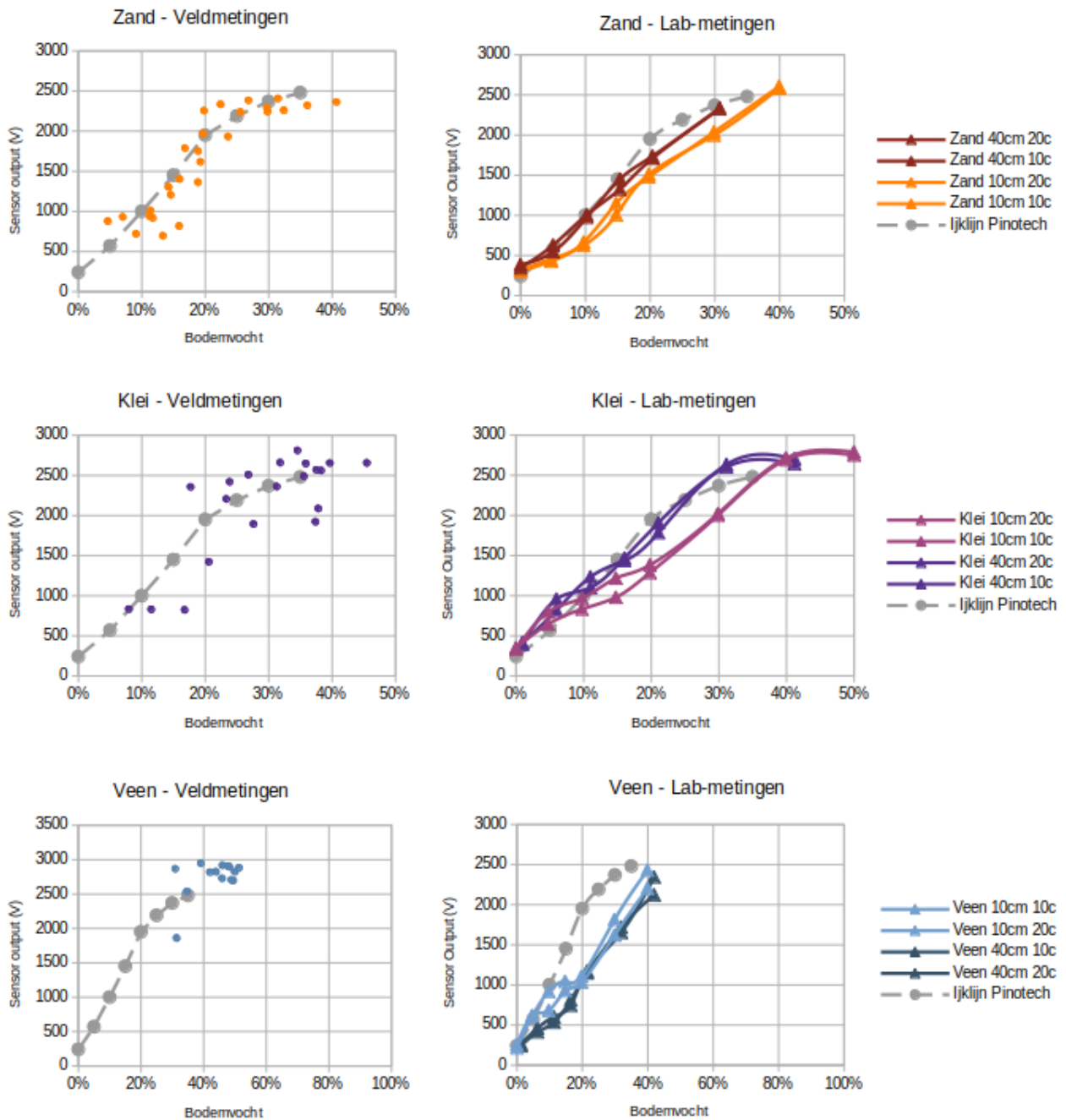
De analyse van real-time data in zand- en kleibodems komt overeen met de observatie van de experimenten. Temperatuurvariatie in de metingen is afhankelijk van het vochtgehalte en de bodemsoort. Het gevonden temperatuur effect op basis van real-time data komt overeen met het temperatuur effect dat experimenteel is bepaald. De temperatuur afhankelijkheid van de sensor is dus achteraf te corrigeren. De inzet van deze sensoren is daarmee niet beperkt tot bodems waar de bodemsamenstelling van in kaart is gebracht (Bijlage 2).

## 4.5.2 Accuraatheid

Om de accuraatheid van de sensormetingen te bepalen zijn gedurende de proefperiode 60 referentiemetingen verricht door op de percelen ringen te steken in de nabijheid en op gelijke diepte van de sensoren. De gestoken monsters zijn geanalyseerd op droge bulkdichtheid en droge stof. Daarnaast zijn op een aantal percelen grotere bodemonsters genomen die gebruikt zijn om in het laboratorium een kalibratie-curve te bepalen. In Figuur 51 zijn de resultaten weergegeven voor de drie bodemtypes: zand, klei en veen, met links de metingen in het veld en rechts de lab experimenten. In alle gevallen zijn de resultaten vergeleken met de ijklijn die is aangeleverd door de leverancier van de sensoren.

Het kan geconcludeerd worden dat bodemtype effect heeft op de reactie van de sensor op het vochtgehalte. Met name bij veen is de output van de sensor structureel lager dan de ijklijn. Voor zand en klei geldt dat de gemeten waarden zich over het algemeen in de buurt van de ijklijn bevinden, maar dat er in segmenten van het bereik afwijkingen zichtbaar zijn. Zo geeft de sensor in droge zandbodems een relatief lagere output dan verwacht, wat kan leiden tot een onderschatting van het bodemvochtgehalte. Het temperatuur effect wat is beschreven in de vorige paragraaf veroorzaakt deels deze onderschatting. Na correctie voor dit temperatuur effect wijken de sensormetingen in zand gemiddeld een factor 0.21 af van het gemeten vochtgehalte. Deze factor is 0.30 voor klei en 0.17 voor veen. Voor toepassingen waar een hoge accuraatheid nodig is, zoals een beregeningsadvies zijn deze afwijkingen nog te hoog. Wel zijn de sensoren al inzetbaar om relatieve verschillen waar te nemen.

Voor een bredere inzet van de sensoren is het van belang een initiële kalibratie te doen met de bodem in kwestie. Een onderzoeksvraag voor vervolgonderzoek is welke componenten van de bodem bepalend zijn voor de vorm van de kalibratie-curve. De kalibratiecurve blijkt in ieder geval afhankelijk van klei-gehalte en organische stof. Dit zijn componenten die niet snel veranderen in de tijd en daardoor mogelijk gebruikt kunnen worden om de kalibratie-curve te schatten. Echter, de invloed van snel veranderende componenten, zoals EC, moet worden uitgesloten wil dit een alternatief zijn voor bodem-specifieke kalibratie.



Figuur 51. Kalibratiecurves en meetwaarden in het veld (links) en het lab (rechts)

### 4.5.3 Bereik en resolutie

In Figuur 51 is te zien dat gedurende de proefperiode het bereik van de sensor in zand volledig benut is, maar dat metingen in klei tegen het maximale bereik van de sensor aanliggen en metingen op het veenperceel zelfs voornamelijk buiten het bereik. Daarbij is te zien dat de output van de sensor richting het maximale bereik asymptotisch gedrag vertoont: de sensor reageert minder op eenzelfde verhoging in bodemvocht. Dit heeft consequenties voor welke doeleinden de sensoren inzetbaar zijn. In Tabel 25 is het bereik vergeleken met het gemiddelde verwelkingspunt, de veldcapaciteit en de vloeigrens van de drie bodemtypes.

*Tabel 25. Bereik, verwelkingspunt, veldcapaciteit en vloeigrens (% v/v) voor drie bodemtypes en consequenties voor de inzetbaarheid van de sensoren.*

	Bereik sensor	Verwelkingspunt (pF 4.2)	Veldcapaciteit (pF 2)	Vloeigrens	Inzetbaarheid
Zand	0% - 35%	5%	26%	38%	Volledige monitoring
Klei	0% - 35%	17%	38%	50%	
Veen	0% - 40%	17%	39%	48%	Droogtemonitoring

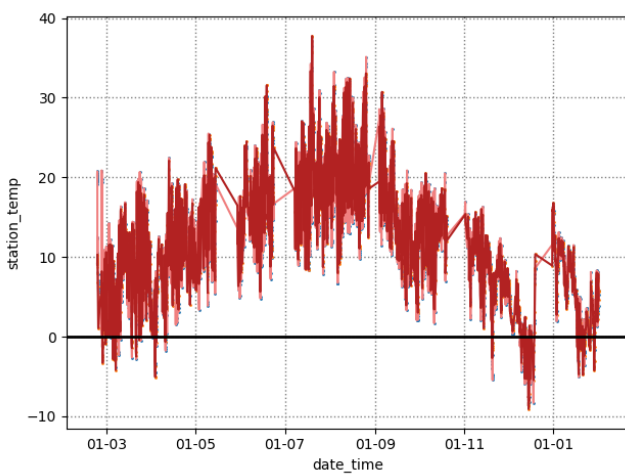
Aan de hand van de tabel kan geconcludeerd worden dat de gebruikte sensoren inzetbaar zijn in zandbodems voor volledige monitoring en voor klei- en veenbodems met name geschikt zijn voor droogtemonitoring. De geteste sensoren zijn daarmee minder goed toepasbaar voor de monitoring van nat schade en CO<sub>2</sub> uitstoot in veenbodems. De CO<sub>2</sub> uitstoot is sterk afhankelijk van het bodemvochtgehalte en doorgaans maximaal rond 60% verzadiging (30% bodemvocht) en neemt af wanneer het bodemvochtgehalte hoger wordt. Een veel toegepaste maatregel om CO<sub>2</sub>-emissies en bodemdaling in veenbodems tegen te gaan is het verhogen van de grondwaterstand. Om ook de effecten van dit soort maatregelen in veenbodems te kunnen monitoren is het noodzakelijk een ander type sensor toe te passen met een hoger bereik.

## 4.6 Validatie Temperatuur en Luchtvochtigheid sensoren (si7021)

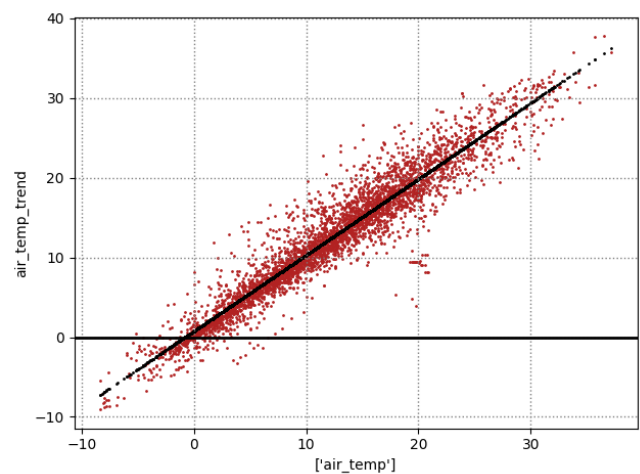
In dit project zijn de prestaties van de si7021 sensor getest bij 19 meetkasten in het veld. Er zijn op basis van de data geen aanwijzingen gevonden dat de metingen niet specifiek waren of het bereik en de resolutie afwaken van de specificaties van de fabrikant. Daarom wordt in dit hoofdstuk enkel de accuraatheid en stabiliteit van de metingen besproken.

### 4.6.1 Accuraatheid

Om de accuraatheid van de temperatuur en luchtvochtigheid sensor te bepalen zijn metingen op het perceel vergeleken met metingen van het dichtstbijzijnde KNMI station.



*Figuur 53. Variatie in lokale temperatuurmetingen*

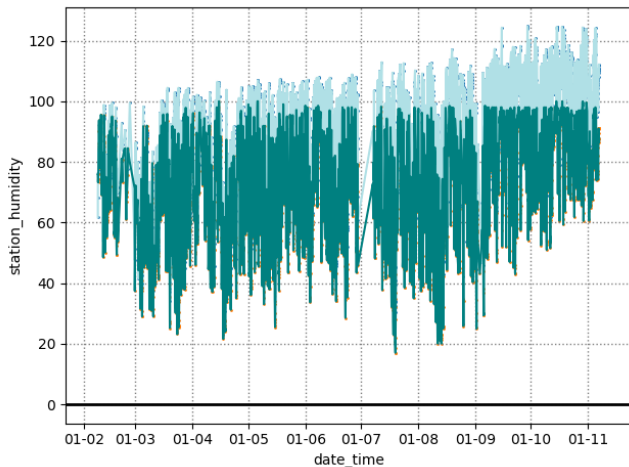


*Figuur 52. Relatie tussen lokale meting en de meting van het dichtstbijzijnde KNMI station*

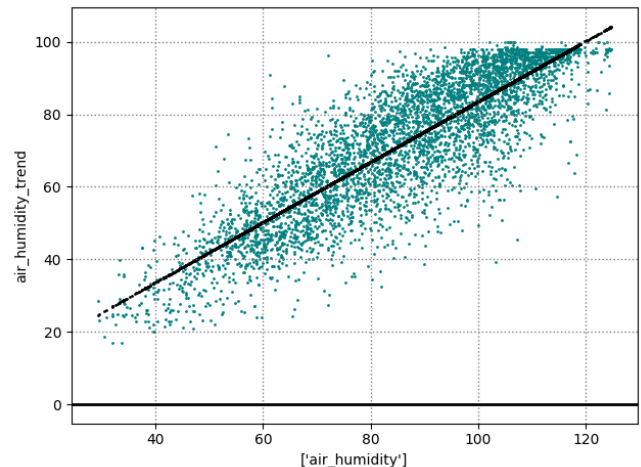
In Figuur 53 is de temperatuur gemeten door het KNMI (donker) weergegeven ten opzichte van de temperatuur gemeten door meetstation SL\_017. Duidelijk is dat de metingen elkaar sterk overlappen. In de rechtergrafiek is de relatie tussen beide metingen weergegeven. Hieruit kan worden opgemaakt dat er op uur-basis wel verschil is tussen beide metingen, maar dat gemiddeld genomen de data van de meetkasten zich lineair verhoudt met de temperatuur gemeten door het KNMI. In bijlage 3 zijn de kengetallen van dit lineaire verband weergegeven per sensor. Een aantal sensoren wijkt bovengemiddeld af. Wanneer deze buiten beschouwing gelaten worden, verhouden de temperatuurmetingen met de si7021 sensor zich met de KNMI-data volgens de formule:

$$T_{\text{knmi}} = 0.91 * T_{\text{si7021}} + 1.21$$

In Figuur 52 is de relatieve luchtvochtigheid gemeten door het KNMI station (donker) weergegeven ten opzichte van de relatieve luchtvochtigheid gemeten door meetstation SL\_008. Hier is te zien dat voor deze sensor de waarde van de luchtvochtigheid gemiddeld genomen overschat wordt ten opzichte van de metingen van het KNMI. De sensor geeft in deze gevallen zelfs een relatieve luchtvochtigheid boven de 100%. De relatie tussen beide metingen is daardoor niet volledig lineair.



*Figuur 55. Variatie in lokale metingen van luchtvochtigheid*



*Figuur 54. Relatie tussen lokale meting en de meting van het dichtstbijzijnde KNMI station*

Op basis van de samenvatting in bijlage 3 is te concluderen dat de sensoren drie typen gedrag laten zien.

- A) Lineaire relatie met data van het KNMI
- B) Overschatting van de luchtvochtigheid ten opzichte van het KNMI
- C) Geen relatie

Acht van de sensoren geven sterk afwijkende metingen en laten geen logische relatie zien met de data van het dichtstbijzijnde KNMI station. Van de sensoren die wel een logisch verband laten zien, is bij 7 sprake van structurele overschatting, zoals te zien in figuur x en bij 4 sprake van een nette lineaire relatie.

De relatie tussen beide metingen voor de beiden type gedrag te benaderen met de formule:

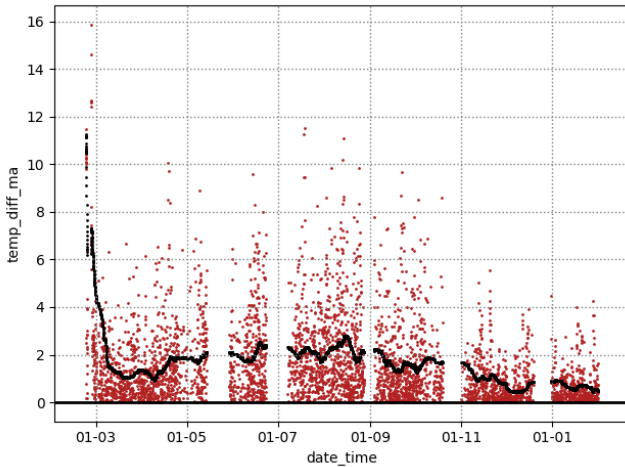
A)  $RH_{knmi} = 0.93 * RH_{si7021} + 1.18$

B)  $RH_{knmi} = 0.80 * RH_{si7021} + 6.61$

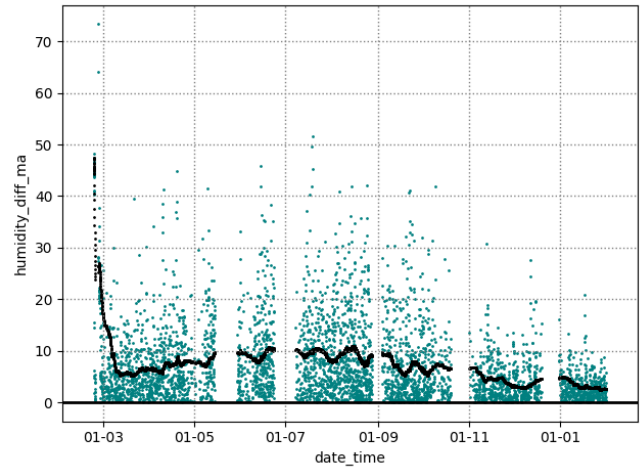
Er kan geconcludeerd dat voor de bepaling van luchtvochtigheid, de prestatie van de si7021 in een veldsituatie slecht is. Er lijkt geen verband te zijn tussen afwijkende luchtvochtigheidsmetingen en afwijkende temperatuurmetingen, de sensoren kunnen dus wel ingezet worden voor temperatuurmeting. Als de sensoren worden ingezet voor luchtvochtigheidsmetingen, is het van belang elke sensor van tevoren te controleren op foutieve metingen.

## 4.6.2 Stabiliteit

Als een maat voor stabiliteit is gekeken naar de afwijking ten opzichte van het dichtstbijzijnde KNMI station over de tijd. In Figuur 56 en Figuur 57 is dit weergegeven voor de meting van temperatuur (rood) en luchtvochtigheid (blauw) voor sensor SL\_019.

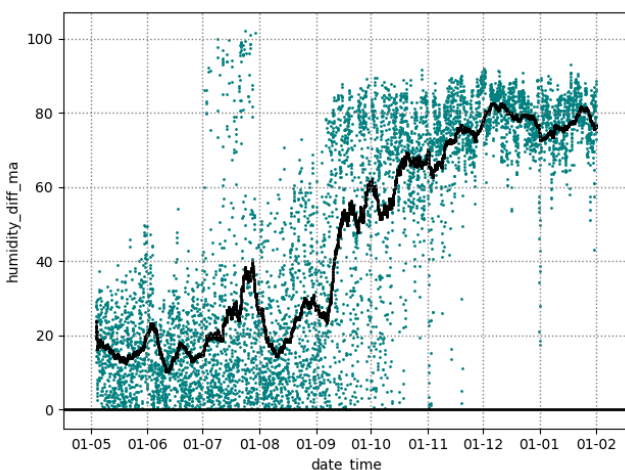


*Figuur 57. Afwijking tussen lokale meting van luchttemperatuur en de meting van het dichtstbijzijnde KNMI station*

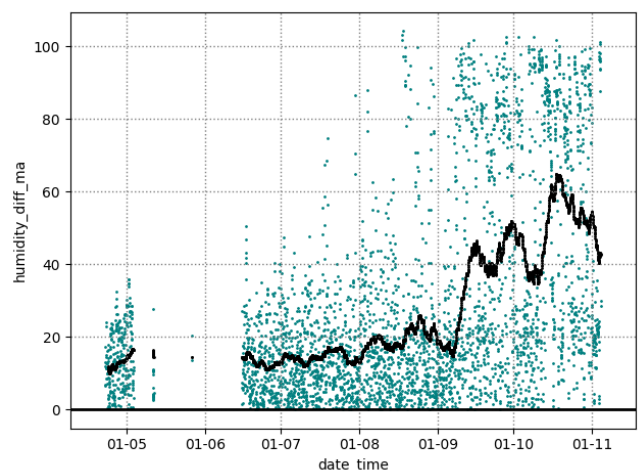


*Figuur 56. Afwijking tussen lokale meting van luchtvochtigheid en de meting van het dichtstbijzijnde KNMI station*

Het is te zien dat gedurende het groeiseizoen de afwijking hoger ligt dan na het groeiseizoen, waarschijnlijk door lokale verschillen in zonnestraling en regenval. Voor de temperatuurmeting is er bij geen van de meetkasten sprake van een toenemende afwijking over de tijd. Gezien het sterke seizoenspatroon zijn metingen over meerdere jaren nodig om een betere indicatie te krijgen van de stabiliteit van de si7021 sensor in een veldsituatie. Voor luchtvochtigheid is te zien dat bij sommige meetkasten het gedrag van de sensor verspringt. In Figuur 59 en Figuur 58 is de afwijking ten opzichte van het KNMI weergegeven voor meetkasten SL\_014 en SL\_020. Beide meetkasten bevonden zich op hetzelfde perceel en zijn begin september door de loonwerker verwijderd. Mogelijk zijn de sensoren hierbij beschadigd geraakt, waardoor de luchtvochtigheidsmeting niet langer betrouwbaar is.



*Figuur 59. Afwijking tussen lokale meting van luchtvochtigheid en de meting van het dichtstbijzijnde KNMI station*



*Figuur 58. Afwijking tussen lokale meting van luchtvochtigheid en de meting van het dichtstbijzijnde KNMI station*

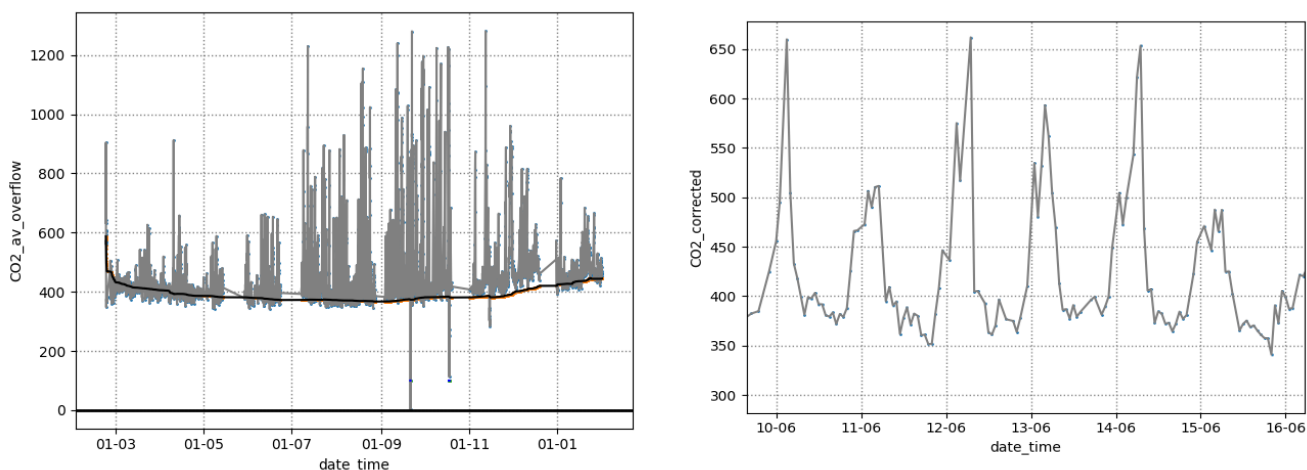
## 4.7 Validatie CO<sub>2</sub> sensor (SDC030)

### 4.7.1 Algemeen

Een subdoel van dit project was de haalbaarheid te onderzoeken van het inzetten van betaalbare CO<sub>2</sub> sensoren voor het bepalen van broeikasgasemissie of netto koolstofopname door graslanden. Hiervoor is allereerst een scan gemaakt van commercieel beschikbare CO<sub>2</sub> sensoren. Op basis van de specificaties van de fabrikanten is de Sensirion SDC30 als meest geschikte kandidaat uitgekozen voor nadere veldmetingen en laboratorium-testen. De specificiteit van de SDC030 sensor is getest bij 7 meetstations in het veld en nader bepaald in het lab. Daarnaast is gekeken naar de accuraatheid van deze sensoren wanneer zij ingezet worden om in het lab fluxmetingen te verrichten.

### 4.7.2 Specificiteit

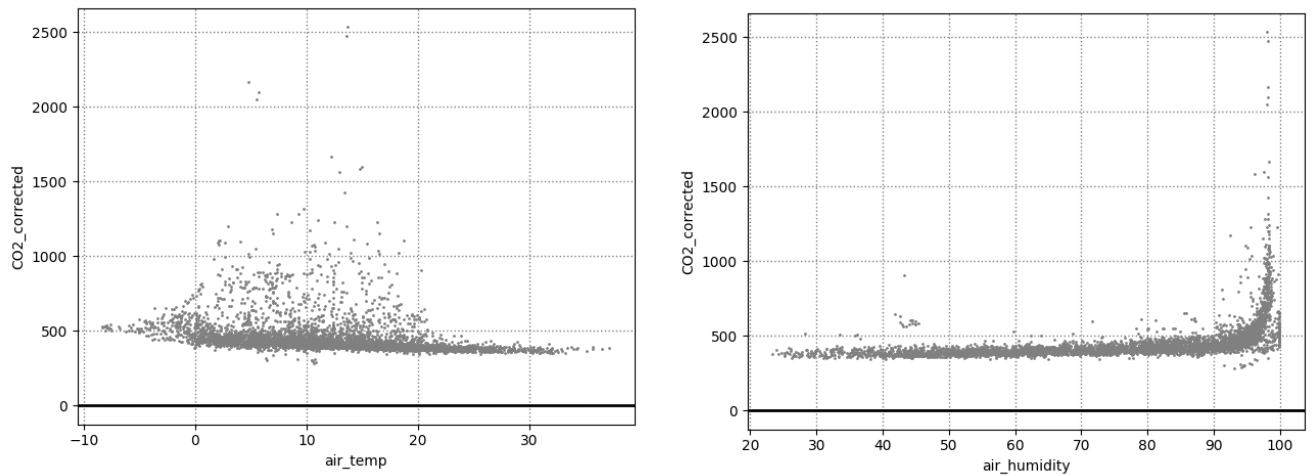
In Figuur 60 zijn de ruwe metingen van CO<sub>2</sub> op perceel 55 weergegeven. De grijze lijn geeft de meetwaarde weer en de zwarte lijn geeft een wekelijks gemiddelde van het 0.25 kwartiel aan, als indicator voor de minimum CO<sub>2</sub> concentratie. Het is te zien dat twee metingen zich ver onder dit minimum bevinden. In werkelijkheid was voor de verzending van de meetgegevens van de meetkast een maximum concentratie van 1300 ppm ingesteld. Metingen boven deze waarde komen voor in de dataset als lage waarde. In de meeste gevallen kon hiervoor achteraf gecorrigeerd worden.



Figuur 60. Ruwe veldmetingen van de CO<sub>2</sub> concentratie op 1.8m boven het maaiveld op een zandperceel (55) gedurende het seizoen (links) en gedurende een week (rechts).

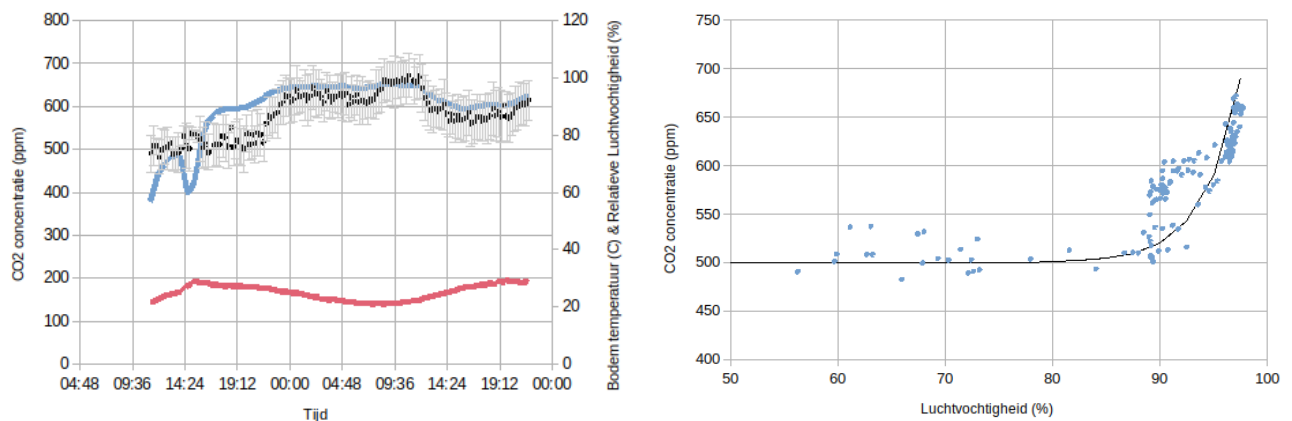
In de nacht is de gemeten CO<sub>2</sub> concentratie aanzienlijk hoger dan gedurende de dag. Zowel de organismen in de bodem als planten stoten 's nachts CO<sub>2</sub> uit. Echter gezien de zeer grote verschillen in meetwaarden, kan er ook sprake zijn van een probleem met de specificiteit van de meting. In Figuur 61 zijn de relaties tussen temperatuur en gemeten CO<sub>2</sub> concentratie (links) en luchtvochtigheid en gemeten CO<sub>2</sub> concentratie (rechts) weergegeven. Hierbij zijn de lokale temperatuurmetingen van de si7021 sensor gebruikt en de luchtvochtigheidsmetingen van het dichtstbijzijnde KNMI station (zie paragraaf 3.6.1 voor achtergrond over de bruikbaarheid van beide metingen).

Er is een lichte relatie tussen temperatuur en CO<sub>2</sub> meting zichtbaar, maar deze verklaart niet het sterke dag-nacht ritme. Daarentegen lijkt de meting van CO<sub>2</sub> sterk beïnvloed bij een hoge luchtvochtigheid. Boven een RH van 85% neemt de gemeten CO<sub>2</sub> concentratie exponentieel toe met luchtvochtigheid. Om te verifiëren dat dit een meeteffect is en niet een biologisch effect zijn er lab-metingen in een CO<sub>2</sub> kamer gedaan.



*Figuur 61. Relatie tussen ruwe veldmetingen van de CO<sub>2</sub> concentratie met temperatuur (links) en met luchtvochtigheid (rechts).*

Op het moment dat er in plaats van een biologisch actieve bodem, enkel gedemineraliseerd water in de CO<sub>2</sub> kamer aanwezig is, loopt de gemeten CO<sub>2</sub> concentratie op met de luchtvochtigheid. De gevonden relatie in de lab metingen is daarbij vergelijkbaar met de veldmetingen: vanaf 85% RH neemt de gemeten CO<sub>2</sub> concentratie exponentieel toe met luchtvochtigheid. Een dergelijk effect wordt vaker waargenomen bij sensoren die werken op basis een absorptie of interferentie van een lichtstraal. Wanneer het vochtgehalte in de lucht hoog wordt ontstaan er condensdruppels die licht kunnen adsorberen of de lichtstraal kunnen onderbreken.



*Figuur 62. Het effect van luchtvochtigheid op de gemeten CO<sub>2</sub> concentratie. Rechts, het verloop van de gemeten CO<sub>2</sub> concentratie (zwart met grijze foutbalken) in vergelijking met de temperatuur (rood) en de luchtvochtigheid (blauw). Links de relatie tussen de luchtvochtigheid en de gemeten CO<sub>2</sub> concentratie.*

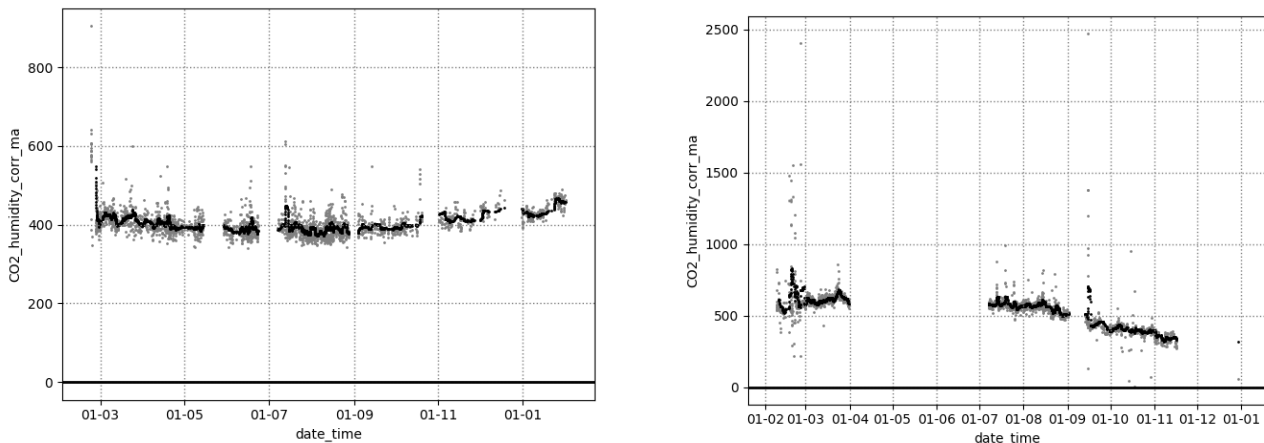
Om de huidige CO<sub>2</sub> metingen te kunnen interpreteren is het noodzakelijk om alle metingen bij een luchtvochtigheid groter dan 85% uit de data te filteren. Voor toekomstige toepassingen van dit (type) sensoren in een veldsituatie is het van belang om het effect van luchtvochtigheid beter te kwantificeren ofwel in de meetopstelling de luchtvochtigheid actief te beperken.

Twee interessante observaties zijn te maken op basis van de gefilterde veldmetingen (Figuur 63). Op beide percelen is een scherpe piek te zien, respectievelijk begin maart, vlak na de plaatsing van de sensor en eind



februari. In beide gevallen viel dit samen met de bemesting van het perceel. Veldmetingen van CO<sub>2</sub> zijn daarmee inzetbaar om bemestingstiming te registreren en in de toekomst mogelijk ook te relateren aan de CO<sub>2</sub> uitstoot na bemesting.

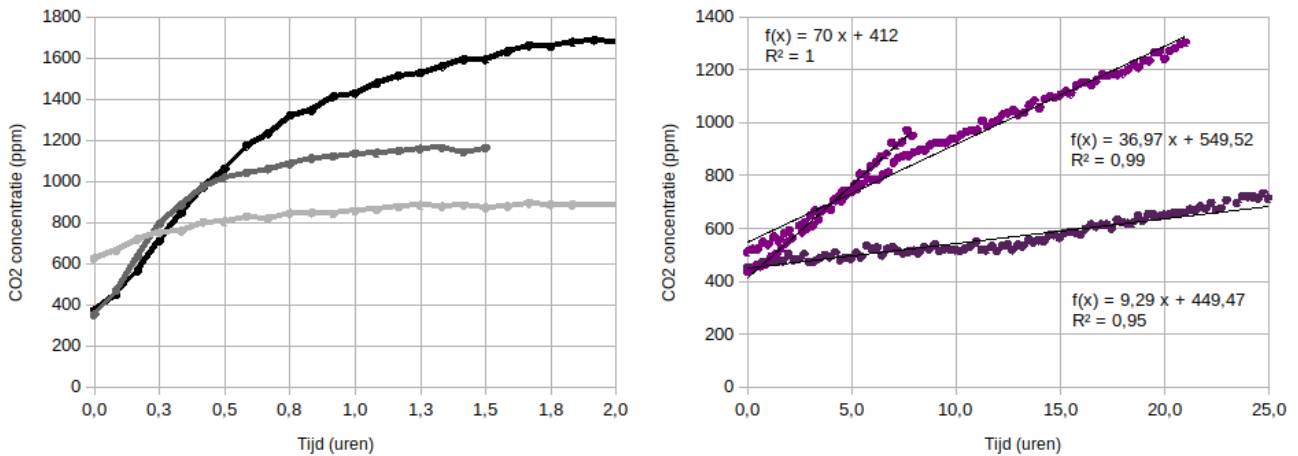
Op zandperceel 55 gedroeg de CO<sub>2</sub> concentratie zich zoals verwacht, concentraties lagen nabij de 400ppm en lager in de zomer, wanneer er veel plantengroei is, dan in de winter. Op veenperceel 15 werd juist een relatief hoge CO<sub>2</sub> concentratie gemeten gedurende de zomer (>500 ppm). Gezien op dit perceel ook het bodemvocht sterk daalde gedurende de zomer is dit waarschijnlijk een direct effect van veen-oxidatie.



*Figuur 63. Veldmetingen van de CO<sub>2</sub> concentratie op 1.8m boven het maaiveld op een zandperceel (55, links) en veenperceel (15, rechts), uitgezonderd metingen waarbij de luchtvochtigheid groter was dan 85% en periodes dat de sensor storingen vertoonde.*

### 4.7.3 Accuraatheid en toepassing van de sensoren

Er vinden op dit moment nog te weinig CO<sub>2</sub> metingen plaats in Nederland om de veldmetingen mee te vergelijken en in te kunnen schatten of de gemeten luchtconcentraties te relateren zijn aan fluxen op perceel, of gebiedsniveau. De bepaling van fluxen wordt doorgaans gedaan door eddy-covariance metingen of met behulp van CO<sub>2</sub> kamers. Eddy-covariance metingen vereisen een zeer grote precisie en een groot aantal sensoren (CO<sub>2</sub>, wind, druk, temperatuur), wat de inzetbaarheid van 'cheapttech' sensoren voor dit type metingen beperkt. Voor CO<sub>2</sub> kamers zijn 'cheapttech' sensoren mogelijk wel inzetbaar. Om de accuraatheid en toepasbaarheid van de sensoren voor deze toepassing in te schatten zijn in het lab metingen gedaan aan referentieoplossingen en een veenbodem.



Figuur 64. Metingen in een eenvoudige CO<sub>2</sub>-kamer uitgerust met de SDC-30 sensor, onder een gecontroleerde luchtvochtigheid. De kalibratiecurves (links) zijn gemaakt door een natriumbicarbonaat referentieoplossing op te lossen in een overmaat aan zuur. Bodemmetingen (rechts) zijn in tweevoud gedaan aan de toplaag (10cm) (paars) en in eenvoud aan de diepere laag (40cm) (donker-paars) van veenperceel 15.

De response van de SDC30 vertoont een goede relatie ( $R=0.98$ ) met de referentieoplossingen in het geteste bereik (400-1700 ppm). Met de opstelling werd op vers gestoken monsters van veenperceel 15 in de toplaag een CO<sub>2</sub> flux gemeten van 117 – 222 mg CO<sub>2</sub> per m<sup>2</sup> bij een bodemvochtpercentage van 31-33%. De diepere laag (40 cm) had op dat moment een vochtpercentage van 40%, nabij de vloeigrens en stootte maar 27 mg CO<sub>2</sub> per m<sup>2</sup> uit. De gemeten waarden in de toplaag komen qua ordegrrootte overeen met professionele potentieel broeikasgasemissie metingen aan dezelfde bodem. In deze meting werd een flux van 160 mg CO<sub>2</sub> per m<sup>2</sup> per uur gemeten op (kamer)gedroogde monsters, die waren vernat tot 25% bodemvocht.

Er kan geconcludeerd worden dat de geteste CO<sub>2</sub> sensor (SDC30) potentie heeft voor het meten van broeikasgasemissies in graslanden. Op korte termijn zijn de sensoren inzetbaar in eenvoudige CO<sub>2</sub> kamers, waarmee in het lab de potentiële CO<sub>2</sub> uitstoot bepaald kan worden. Om deze CO<sub>2</sub> kamers ook real-time in het veld in te kunnen zetten is een oplossing nodig voor de verstoring van de meting bij een hoge relatieve luchtvochtigheid (>85%). In veldmetingen van de CO<sub>2</sub> concentratie van de lucht boven het maaiveld, zijn pieken te observeren na bemesting en trends van veenoxidatie zichtbaar. Er zijn op dit moment echter veel te weinig meetpunten van CO<sub>2</sub> in Nederland om een inschatting te maken of deze observaties ook kwantitatief te relateren zijn aan lokale fluxen.

## 4.8 Gebruiksscenario's voor de real-time data

### 4.8.1 Algemeen

De data die verzameld wordt met de sensoren kan real-time worden afgelezen (op uur-basis) door de gebruiker. Deze data kan direct gebruikt worden om keuzes te maken voor het beheer van het perceel. Op basis van de validatie van de sensoren kan de toepasbaarheid van de data worden ingeschat. Hierbij is gekeken naar twee gebruiksscenario's: beregeningsadvies en bemestingstiming in het voorjaar. In Tabel 26 is voor beide scenario's samengevat in hoeverre de geteste sensoren voor dit doeleinde inzetbaar zijn.

Tabel 26. *Inzetbaarheid van de data van de geteste sensoren voor gebruiksscenario's. De gevoeligheid geeft aan of de kwaliteit van de toepassing sterk beïnvloed wordt door de accuraatheid van de sensor en de analyse. De relevantie geeft aan of de toepassing voor de deelnemende gebruikers in 2022 bruikbaar was geweest.*

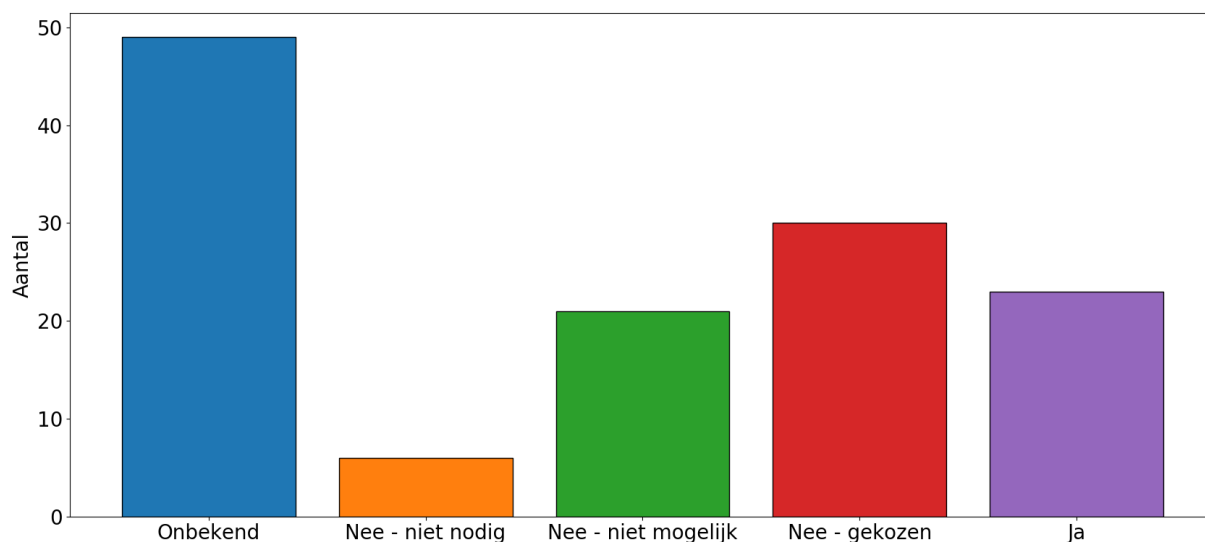
Gebruiksscenario	Gevoeligheid		Relevantie	Advies
	Sensor	Analyse		
Beregeningsadvies	Ja	Ja	Op 29% van de percelen waarvoor gegevens beschikbaar waren is berekend in 2022	Niet direct toepasbaar. Een verbetering van de kalibratie is nodig of als alternatief het leggen van een directe relatie met droogtesignalen van het gewas
Bemestingstiming voorjaar	Ja	Nee	Op 79% van de percelen werden bemest en op 59% van de percelen werd kunstmest gebruikt	Direct toepasbaar, eenvoudige meting en analyse en potentieel grote toegevoegde waarde. Continuïteit van de metingen is een cruciaal aandachtspunt

Op basis van de analyse is geconcludeerd dat de bodemvochtmetingen van 'cheaptech' sensoren nog niet direct toepasbaar zijn voor een beregeningsadvies. De kwaliteit van een advies is zeer gevoelig voor afwijkingen in de sensormetingen, de locatie op het perceel en daarnaast ook afhankelijk van de schatting van het verwelkingspunt, waar ook fouten kunnen optreden. Bovendien blijkt dat zelfs tijdens een extreme droogte, zoals in 2022, relatief weinig gebruikers ervoor (kunnen) kiezen om te beregenen. Een verbetering van de kalibratie van sensoren is nodig, ofwel het maken van een directe link tussen sensorwaarden en droogtestress in de plant.

De bodemtemperatuurmetingen zijn voldoende betrouwbaar om input te geven voor de bemestingstiming. Voor bemesting met kunstmest kunnen bodemtemperatuurmetingen direct dienen als alternatief voor de Tsom. Voor bemesting met dierlijke meststoffen bestaat nog geen advies op basis van (afgeleide) bodemtemperatuur, maar kunnen metingen met sensoren de basis vormen voor experimenten en het formuleren van een advies.

## 4.8.2 Beregeningsadvies

In droge perioden kan er gekozen worden om het gewas te beregenen om productiviteitsverlies en blijvende schade aan het gewas te voorkomen. In onderstaande grafiek is te zien dat er tijdens de droogte in 2022 op 23 percelen is beregend. Op 57 percelen is er niet beregend. In een klein aantal gevallen omdat dit niet nodig was, maar in de meeste gevallen was berekening niet mogelijk of is er gekozen niet te beregenen. Voor 49 percelen is het onbekend. Ervan uitgaande dat bovenstaande resultaten representatief zijn voor de dataset, is op 29% van de percelen beregend.



*Figuur 65. Aantal percelen waarop beregend is. Op percelen waar niet beregend is kon in de vragenlijst worden aangegeven waarom dit het geval was: beregenen was niet nodig, beregenen was niet mogelijk of niet toegestaan of er is actief gekozen om niet te beregenen.*

In de praktijk zullen veel gebruikers het moment van beregenen bepalen aan de hand van de staat van het gewas. Metingen van bodemvocht kunnen helpen om het optimale moment van beregenen en de juiste gift te bepalen. Hoeveel water de wortels van het gewas op kunnen nemen hangt af van de zuigspanning. Bij een zuigspanning van pF 4.2 zijn de meeste gewassen niet meer in staat water uit de bodem op te nemen. Doorgaans wordt daarom geadviseerd om te gaan beregenen vanaf een zuigspanning van pF 3.3. De relatie tussen het bodemvochtgehalte en de zuigspanning wordt gegeven door de pF-curve. Deze pF-curve is specifiek voor elke bodem.

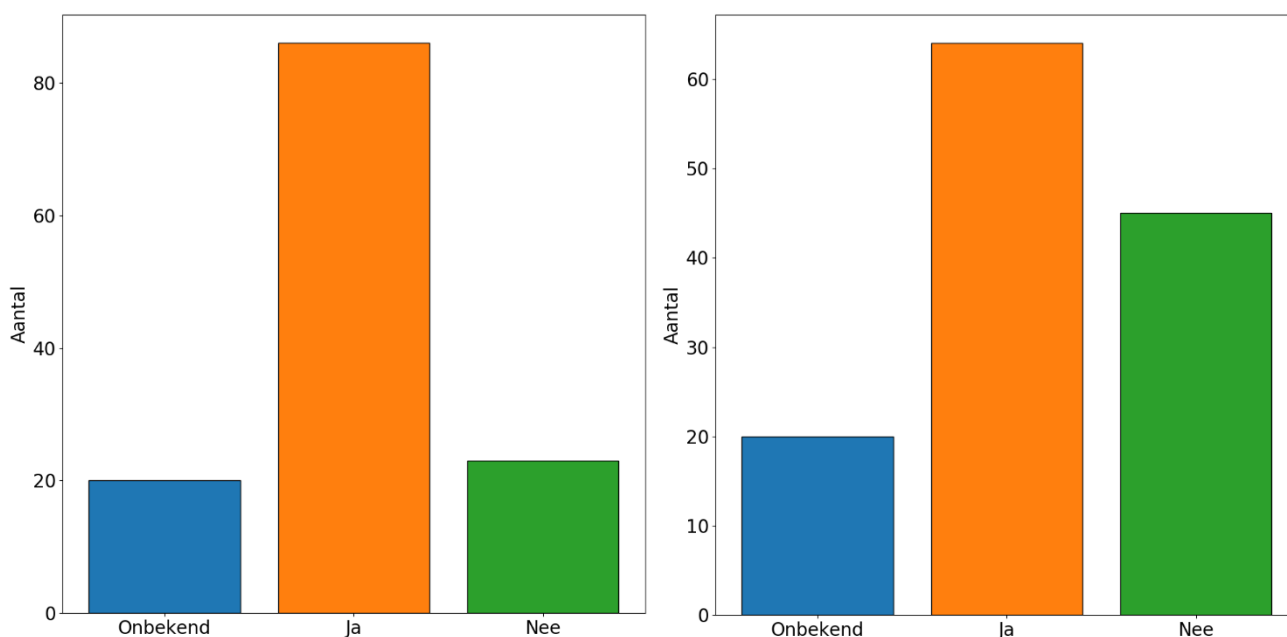
Om vanuit bodemvochtmetingen te komen tot een beregeningsadvies, zal daarom de pF-curve bekend moeten zijn. pF curves worden doorgaans berekend op basis van klei, zilt, zand en organische stof gehalten, en zijn dus te schatten met de resultaten van een gangbare bodemanalyse.

Daarnaast is een accurate meting van bodemvocht nodig. Het verschil tussen pF 3.3 en pF 4.2, kan in een zandbodem minder dan 5% bedragen. Een factor 0.21 afwijking (1% bij dit bodemvochtgehalte) kan dus grote gevolgen hebben voor de waarde van het advies. Zoals aangegeven in vorige paragraaf is de relatie tussen de sensormeting en het gemeten bodemvochtgehalte in het lab en het veld voor droge zandbodems niet lineair. Daarnaast introduceert de schatting van de pF curve een foutmarge. De combinatie van beide foutmarges kan snel leiden tot een verkeerd advies.

Om met de geteste sensoren beregeningsadvies uit te kunnen brengen zal meer werk moeten worden verricht aan de kalibratie van de sensoren. Een interessant alternatief is het leggen van een directe relatie tussen de gemeten waarde en de staat van het gewas. Hiermee worden de foutmarges door de kalibratie en de schatting van de pF-curve grotendeels vermeden. Een dergelijke relatie zou bijvoorbeeld gelegd kunnen worden met behulp van satellietgegevens.

### 4.8.3 Bemestingstiming voorjaar

Van de onderzochte proefpercelen werden 86 percelen actief bemest en 23 percelen niet bemest. Ervan uitgaande dat dit representatief is voor de gehele dataset werd 79% van de percelen bemest. Daarvan werd op 64 percelen ook kunstmest gebruikt (59%).



Figuur 66. Aantal percelen waarop wordt bemest (links) en waar specifiek kunstmest wordt gebruikt (rechts).

Bij de eerste voorjaarsbemesting is het van belang dat de bodem in staat is om de voedingsstoffen op te nemen en het gras in staat is om de aangeleverde voedingsstoffen te benutten. Te vroege bemesting kan de productie en gewaskwaliteit verlagen en verlies van voedingsstoffen naar het milieu veroorzaken. Te late bemesting kan ook een verlaagde productie en gewaskwaliteit veroorzaken.

Voor bemesting met kunstmest, wordt in het gangbare bemestingsadvies voor gras in het voorjaar gebruik gemaakt van de temperatuursom (Tsom) om het optimale tijdstip te bepalen. Voor drijfmest wordt volgens het advies de wettelijke toegestane datum voor uitrijden van mest aangehouden (15 februari), maar in de praktijk veelal gewacht tot begin maart, wanneer de risico's op vorst en neerslagoverschot kleiner zijn (Gollenbeek & Hoving, 2016). De Tsom wordt gezien als goede benadering voor gemiddelde jaren, maar een te grove richtlijn in jaren met afwijkende weersomstandigheden. Voor drijfmest ontbreekt het nog aan duidelijke criteria voor het optimale bemestingstijdstip (Gollenbeek & Hoving, 2016). Experimentele gegevens suggereren dat hoe eerder er bemest wordt hoe langer de tijdsperiode is waarover het grasland de gegeven stikstof kan opnemen (en daarmee bijdraagt aan een hogere benutting).

Directe meting van de bodemtemperatuur kan een alternatief of aanvulling zijn voor de Tsom wanneer het gaat om bemesting met kunstmest. Daarnaast kan het ook ingezet worden voor de bepaling van de optimale bemesting met dierlijke mest, waarvoor de bemestingstiming nog voornamelijk bepaald wordt door wettelijke en praktische overwegingen.

De Tsom wordt berekend door de daggemiddelde temperatuur vanaf 1 januari op te tellen, mits deze boven nul zijn. Er wordt geadviseerd om te bemesten tussen een Tsom van 180 en 280 °C. In onderstaande tabel is voor alle sensorpercelen de start en het eind van deze periode berekend. Hierbij is gebruik gemaakt van de temperatuurmeting van het dichtstbijzijnde KNMI weerstation.

Daarnaast is er gekeken naar mogelijke grenswaarden voor de bodemtemperatuur. Hierbij zijn verschillende temperatuurniveaus vergeleken: 5 dagen > 6°C, jaartrend boven de 8°C (Stienezen et al. 2016)

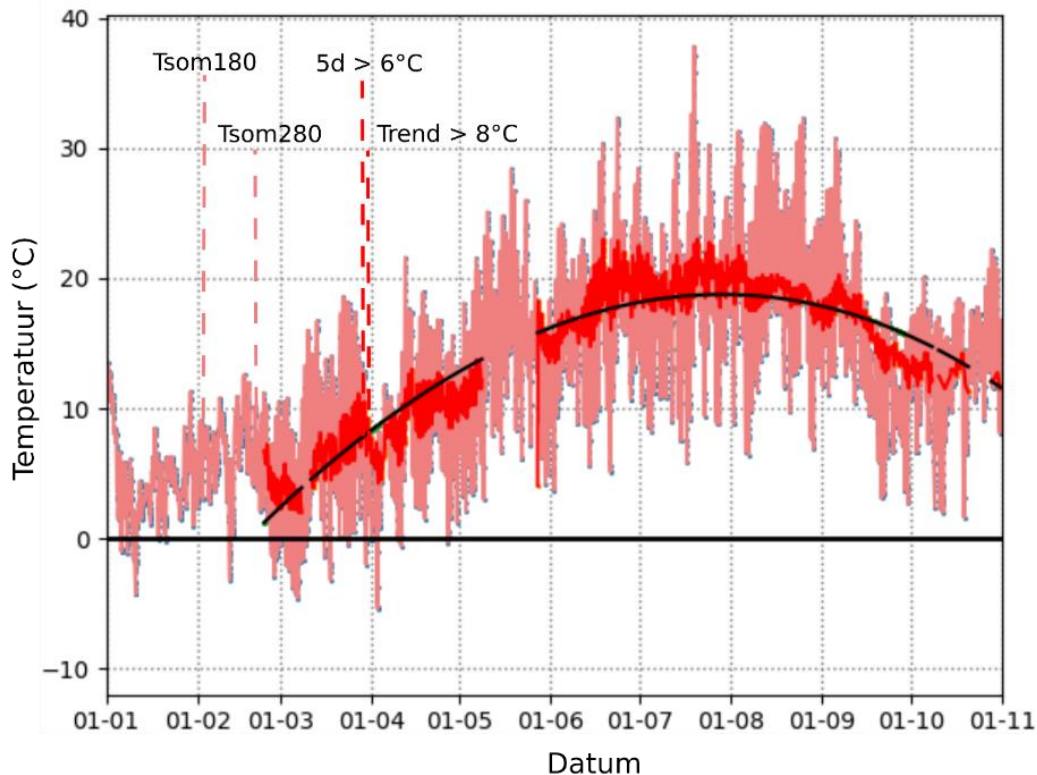
Tabel 27. Datum waarop de grenswaarde van verschillende indicatoren wordt bereikt. De Tsom is berekend op basis van de luchttemperatuur gemeten bij het dichtstbijzijnde KNMI station. De andere indicatoren (5 dagen > 6 en Trend>8) zijn berekend op basis van de bodemtemperatuurmetingen. Sensoren werden op perceel 51 en 109 later geplaatst, waardoor deze gegevens ontbreken.

Perceel		51	55	85	109	120	11	15
Tsom > 180	Lucht	6 feb	6 feb	7 feb	5 feb	7 feb	5 feb	5 feb
Tsom > 280	Lucht	21 feb	20 feb	22 feb	18 feb	22 feb	19 feb	19 feb
5 dagen > 6°C	Bodem (10cm)	-	24 mrt	11 apr	-	4 apr	14 mrt	26 mrt
Trend > 8°C	Bodem (10cm)	-	1 apr	9 apr	-	1 apr	24 mrt	16 mrt

Op percelen 51 en 109 zijn de sensoren geplaatst nadat de grenswaarden voor bodemtemperatuur zijn bereikt. Voor de andere percelen kon de datum dat deze grenswaarde werd bereikt wel berekend worden. Het is in de data te zien dat er wanneer de Tsom niveaus worden bereikt weinig variatie is. Ook lagen deze momenten bijzonder vroeg in het seizoen.

De data waarop bodemtemperatuur grenswaarden werden bereikt variëren echter wel sterk. Beide grenswaarden werden bereikt tussen half maart en half april. Op de veenpercelen (Noord-Brabant), bereikte de bodemtemperatuur relatief vroeg deze grenswaarden. Op percelen 85 en 120 werden deze grenswaarden relatief laat behaald. Een mogelijke verklaring is dat perceel 85 tot half februari is bevoeid en perceel 120 in februari is overstroomd. Beide percelen bevatten daardoor in het begin van het seizoen nog een groot koelend vermogen. In Figuur 67 is het verloop van de luchttemperatuur en bodemtemperatuur weergegeven voor één van de sensoren op perceel 85. De Tsom grenswaarden werden relatief vroeg bereikt door hoge luchttemperaturen begin en eind februari. De bodemtemperatuur bereikt echter pas eind maart de grenswaarden.

Om de indicator "Trend > 8°C" te berekenen moeten de temperatuurgegevens van het hele jaar beschikbaar zijn. De datum waarop de grenswaarde bereikt is wordt dus pas achteraf berekend. Dit betekent dat deze indicator niet bruikbaar is in de praktijk als input voor de bemestingstiming. Het is dus de aanbeveling om een aangesloten periode van 5 dagen boven de 6 graden te hanteren als input voor de bemestingstiming. Continuïteit van de metingen is voor een juiste berekening cruciaal.



Figuur 67. Data waarop de grenswaarde van verschillende indicatoren wordt bereikt voor één van de sensoren op perceel 85.

De toegevoegde waarde van bodemtemperatuur metingen is tweeledig. In jaren, zoals 2022, waarin het temperatuurverloop afwijkt van het gemiddelde, is de Tsom een minder goede indicator van grasgroei en de capaciteit om bemesting op te nemen. Daarnaast is er aanzienlijke variatie tussen percelen, als gevolg van lokale omstandigheden of beheermaatregelen, die niet inzichtelijk is door enkel te kijken naar de Tsom. Het baseren van de bemestingstiming op de Tsom kan op deze percelen gevolgen hebben voor productie, gewaskwaliteit en verlies van nutriënten naar het milieu. Informatie van de bodemtemperatuur kan dus direct ingezet worden voor verbetering van de bedrijfsvoering. Wel is het per bedrijf de vraag of bijvoorbeeld door beperkte capaciteit van de mestopslag, het timen van bemesting op bodemtemperatuur in de praktijk mogelijk is.

## 4.9 Prototype indicatoren

### 4.9.1 Algemeen

In onderstaande Tabel 28 zijn de indicatoren weergegeven die in het kader van dit project zijn onderzocht. In onderstaande paragrafen wordt in detail ingegaan op het principe van de indicator, de resultaten voor de proefpercelen en indien de resultaten voldoende betrouwbaar zijn, de relatie met andere indicatoren of relevante metingen.

De gevoeligheid van de indicator geeft aan of het waarschijnlijk is dat de resultaten van de indicator zeer afhankelijk zijn van de meetresolutie in de tijd, de prestatie van de sensor of het type sensor en tot slot de analyse. Hier wordt in detail op ingegaan in het hoofdstuk 3.9.6 “Gevoeligheid van de indicatoren”.

De toepasbaarheid en de verbeterpunten van de indicatoren worden in de volgende paragrafen toegelicht.

Tabel 28. Onderzochte indicatoren en een samenvatting van de bodemfunctie, de gevoeligheid van de indicatoren, de toepasbaarheid en eventuele verbeterpunten.

Onderzochte indicator	Eenheid	Bodemfunctie	Gevoeligheid			Toepasbaar	Verbeterpunten
			Resolutie	Sensor	Analyse		
1 Vertraging tussen neerslagpiek en bodemvocht piek in de toplaag	Uur	Infiltratie (door grote poriën)	Ja	Nee	Bepaling pieken en kwaliteit neerslaggegevens	Direct op alle ondergronden	Bepalen of correctie voor watervasthoudend vermogen nodig is met referentiemetingen
2 Vertraging tussen bodemvocht piek in de toplaag (10cm) en diepere laag (40cm)	Uur	Drainage (door grote poriën)	Ja	Nee	Bepaling pieken	Direct op alle ondergronden	Corrigeren voor watervasthoudend vermogen
3 Gemiddelde vertraging tussen toplaag (10cm) en diepere laag (40cm)	Uur	Drainage	Nee	Nee	-	Direct op alle ondergronden	Modelmatige aanpak om te corrigeren voor watervasthoudend vermogen.
4 Het stagnatiepunt	% v/v	Watervasthoudend vermogen (verwelkingspunt)	Nee	Ja	Bepaling pieken	Toepasbaar op zand. Op klei en veen onvoldoende interpreteerbaar	Keuze van het stagnatiepunt en interpretatie ten opzichte van het verwelkingspunt
5 Verschil met het verwelkingspunt	% v/v	Vochtvoorziening	Nee	Ja	Bepaling verwelkingspunt	Nee	Accurateren sensoren of betere kalibratie nodig.
6 Tijd dat bodemvocht < stagnatiepunt	% van het groeiseizoen	Vochtvoorziening	Nee	Nee	Bepaling pieken	Zand, klei en veen, mits er gedurende de meetperiode sprake is van stagnatie	Invloed van bodemvocht en beworteling in diepere laag meenemen in de berekening



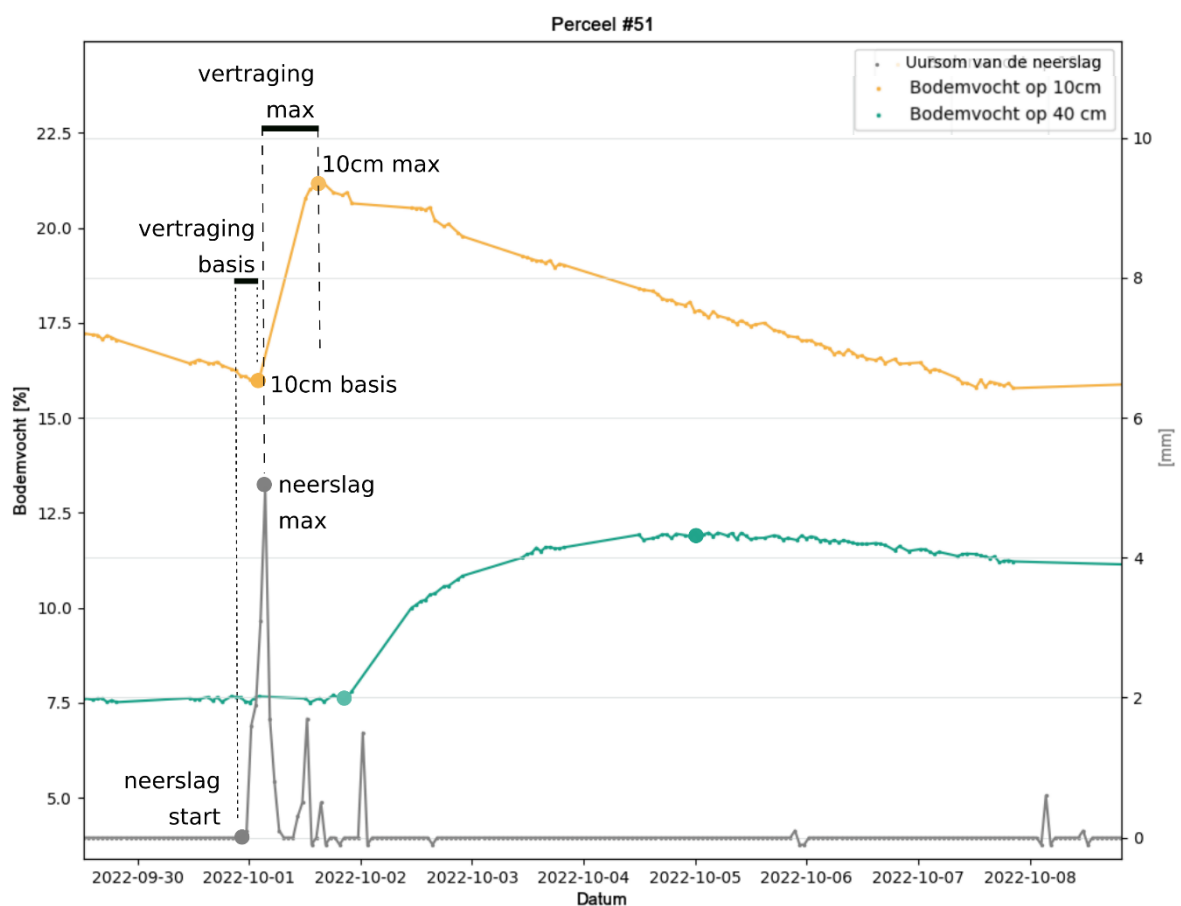
## 4.9.2 Infiltratie en drainage

### 4.9.2.1 Huidige aanpak

Infiltratie kan in het veld gemeten worden met een infiltrometer. Dit is echter een arbeidsintensieve meting en deze wordt daardoor maar zelden uitgevoerd. In zowel in de OBI als de uitvoerige BLN 1.1 beoordelingssystematiek is geen meting voor infiltratie opgenomen. Er zijn in deze systematieken wel metingen opgenomen die effect hebben op de infiltratie, zoals de bepaling van de structuur in het kader van de bodemconditie score en metingen met de penetrometer in de BLN1.1 systematiek. Deze metingen worden echter niet vertaald naar een indicator voor infiltratie. Infiltratie in de OBI wordt ook niet meegenomen bij de bepaling van water gerelateerde indicatoren zoals droogtestress. Drainage tussen verschillende bodemlagen wordt niet gemeten in bodemonderzoek.

### 4.9.2.2 Potentiële indicator 1: Tijd tussen neerslagpiek en bodemvocht piek in de toplaag

Het verloop van het bodemvochtgehalte in de toplaag volgt de timing en intensiteit van de neerslag. De tijd tussen een regenbui en de waarneming van een bodemvocht piek in de toplaag kan informatie geven over de infiltratie in de bodem.



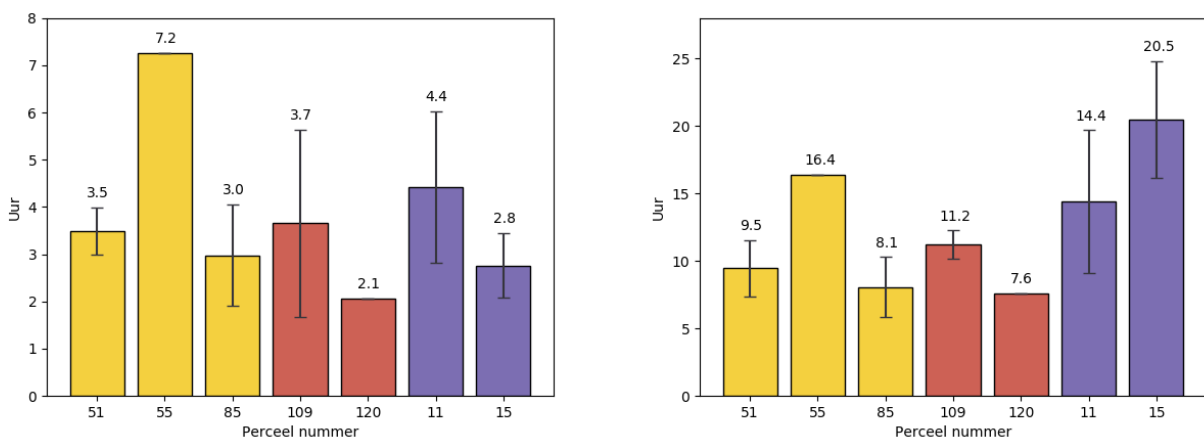
*Figuur 68. Voorbeeld van de vertraging tussen de start en maxima van de neerslag en bodemvochtpiek op 10cm diepte in een zandperceel.*

Om deze vertraging te kunnen berekenen moeten pieken gedetecteerd worden in het bodemvochtssignaal. Deze indicator is dus sterk afhankelijk van de manier hoe deze pieken berekend worden, dit wordt nader toegelicht in de paragraaf 3.9.6 'gevoeligheid van de indicatoren'.

Er zijn gedurende het project geen neerslagmetingen gedaan op de percelen zelf. Neerslaggegevens van KNMI weerstations zijn daarom gebruikt om deze indicator te berekenen. Afhankelijk van de afstand, windrichting en windsnelheid, is er een verschil tussen wanneer de neerslag bij het KNMI gemeten wordt en de daadwerkelijke neerslag op het perceel. Om te corrigeren voor deze fout is de data verrijkt met de radargegevens van het KNMI. Deze gegevens zijn beschikbaar voor heel Nederland op 3 uren en 5 minuten basis. De 3 uren gegevens zijn reeds door het KNMI gekalibreerd op de neerslagmetingen bij de weerstations. Een 3 uur interval was echter te kort in vergelijking met de uursgegevens van bodemvocht en daarom is de data geïnterpoleerd naar 5 minuten.

In Figuur 69 is het resultaat weergegeven op basis van deze radargegevens. Links is de tijd tussen de start van de regenbui en de basis van de piek in bodemvocht in de toplaag weergegeven. Rechts in het figuur is het verschil weergegeven tussen het maximum van de regenbui en de hoogte van de piek in het bodemvochtgehalte.

De keuze voor de basis van de piek of het maximum van die piek als input voor deze indicator heeft consequenties voor hoe deze indicator geïnterpreteerd moet worden. Deze indicator geeft informatie over het korte termijn transport van vocht door de toplaag. In praktijk is dit water dat door de toplaag beweegt via grote poriën, of door gangen gemaakt door regenwormen of wortels. Het gaat hier dus om een specifieke maat voor infiltratie via grote poriën en gangen. Wanneer de basis van de piek wordt gebruikt voor deze indicator wordt nog sterker de nadruk gelegd op de grote poriën of gangen, het gaat hier namelijk om de allereerste detectie van vocht in de diepere laag na een piek in de toplaag. Deze eerste detectie van een regenbui in de toplaag (10cm) vond gemiddeld 4.2 uur na de start van de regenbui plaats, ten opzichte van 14.6 uur voor de detectie van het maximum van de piek.



*Figuur 69. De gemiddelde tijd (mediaan) tussen de bases van de pieken (links) en de maxima van de pieken (rechts). De foutbalken geven de variatie (standaarddeviatie) aan tussen de verschillende meetlocaties op het perceel. De kleuren geven de bodemsoort aan, waarbij geel=zand, rood=klei en paars = veen.*

De detectie van de basis van de neerslagpiek op basis van radarbeelden is echter gecompliceerd doordat bij lage neerslaghoeveelheid, zoals bij miezer en mist radarbeelden minder betrouwbaar zijn. Hierdoor kan een regenbui die nog niet via de radar wordt waargenomen al wel zichtbaar zijn in het

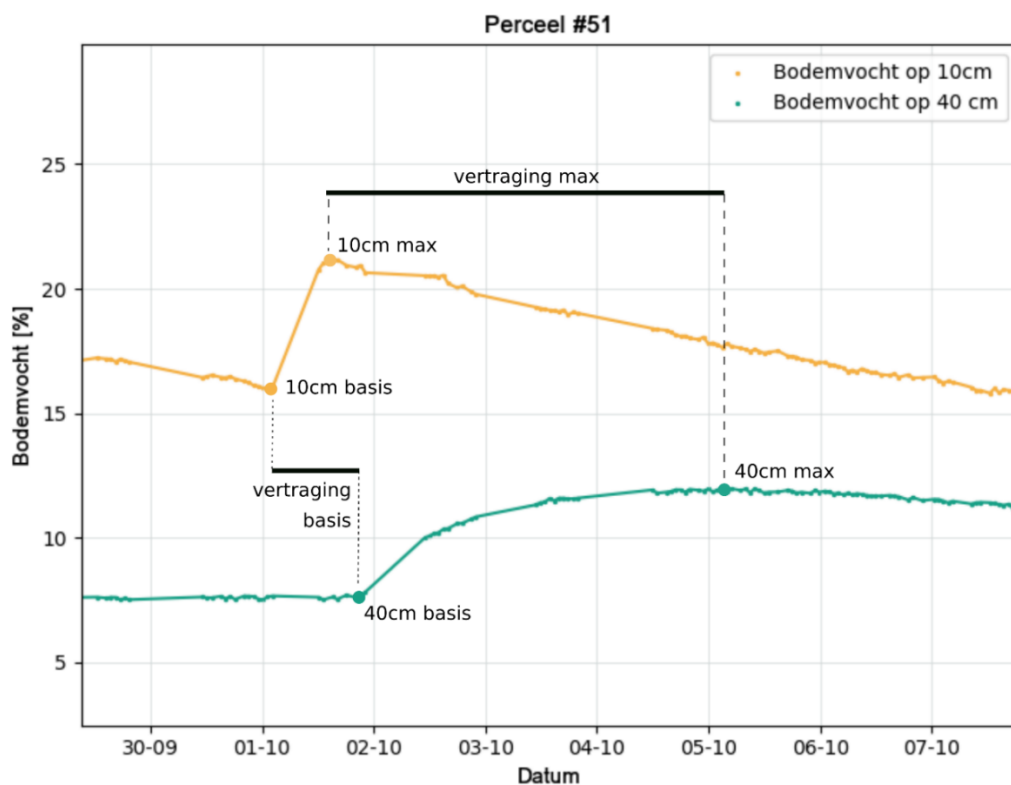
bodemvochtgehalte. Dit verklaart mogelijk ook de hogere variatie in de data wanneer de basis van de piek wordt gebruikt.

Voor het berekenen van deze indicator op basis van radarbeelden is het daarom aan te raden te kijken naar de vertraging tussen de maxima van de regenbui en het bodemvochtgehalte. Voor het berekenen van de vertraging van de basis van de pieken, zal lokale regenmeting waarschijnlijk noodzakelijk zijn.

De tijd tussen het maximum van de regenbui en het maximum in bodemvocht, suggereert een relatief vergelijkbare infiltratie in de bovengrond tussen zand, klei en veen percelen, waarbij op perceel 51 en 15 de infiltratie relatief langzamer gaat, op perceel 109 en 11 gemiddeld en op percelen 51 en 85 het water relatief snel infiltreert.

#### 4.9.2.3 Potentiële indicator 2: Tijd tussen bodemvocht piek in de toplaag en de diepere laag

De bodemvochtsensoren laten zien dat het bodemvochtgehalte na een regenbui piekt op 10cm en na een vertraging ook het bodemvochtgehalte op 40cm piekt. Deze vertraging geeft informatie over de drainage vanaf de toplaag naar de diepere laag. De vertraging kan gekwantificeerd worden op de basis van de piek: de eerste zichtbare stijging van bodemvocht of het moment dat de piek zijn maximum bereikt.



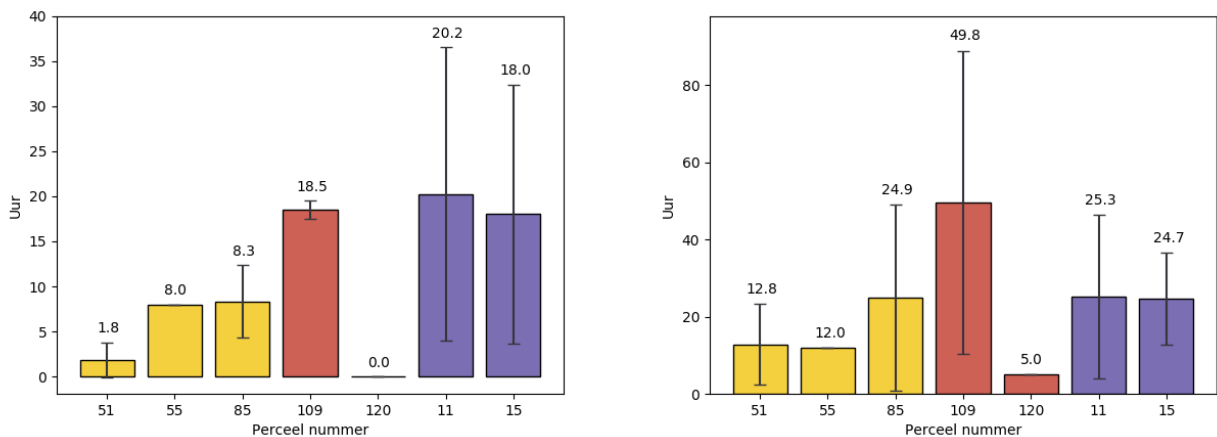
*Figuur 70. Voorbeeld van de vertraging tussen de bases en maxima van bodemvochtpeiken op 10cm en 40cm diepte op een zandperceel.*

Uit de analyse van de sensorpercelen weergegeven in Figuur 71, is op te maken dat de veenpercelen en kleiperceel 109 sterk afwijken van de andere percelen. Op de veenpercelen is voor beide

rekenmethoden veel verschil tussen de meetlocaties. Wat eveneens opvalt is dat het tweede kleiperceel een kleine vertraging laat zien, ook vergeleken met de zandpercelen.

Op de zandpercelen is de vertraging het grootst op perceel 85, maar het verschil is niet significant met de andere zandpercelen. Percelen 51 en 55 liggen dicht bij elkaar.

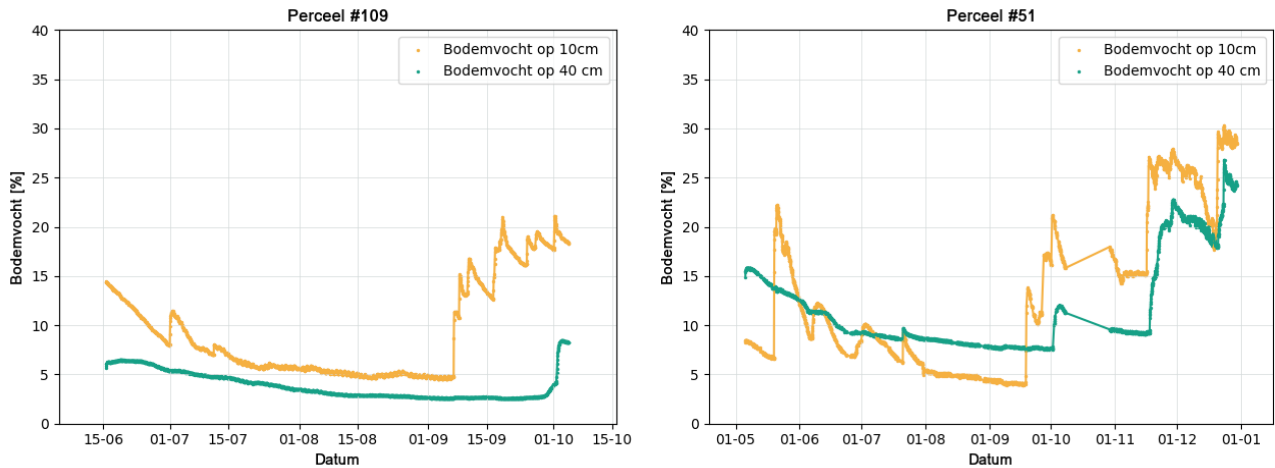
Gelijk aan de indicator voor infiltratie richt deze indicator zich op water dat getransporteerd wordt via grote poriën, of door gangen gemaakt door regenwormen of reeds afgestorven (pen)wortels. In een (grove) zandbodem kan drainage via grote poriën de dominante vorm van drainage zijn, maar in bodems met meer klei, zilt of organische stof is dit onwaarschijnlijk. De interpretatie van deze indicator verschilt daarmee dus per bodemtype. In zandbodems kan het mogelijk een weergave zijn van de gemiddelde drainage snelheid, terwijl het in klei en veenbodems een hele specifieke maat is voor drainage via grote poriën of gangen. Voor alle percelen is de vertraging van het maximum van die piek groter dan de vertraging tussen de bases van de piek. Voor vergelijkbaarheid met de indicator voor infiltratie is bij de interpretatie in volgende paragrafen gebruik gemaakt van de vertraging tussen de maxima van de pieken.



*Figuur 71. De gemiddelde tijd (mediaan) tussen de bases van de pieken (links) en de maxima van de pieken (rechts). De foutbalken geven de variatie (standaarddeviatie) aan tussen de verschillende meetlocaties op het perceel. De kleuren geven de bodemsoort aan, waarbij geel=zand, rood=klei en paars = veen.*

#### 4.9.2.4 Potentiële indicator 3: Gemiddelde vertraging tussen toplaag (10cm) en diepere laag (40cm)

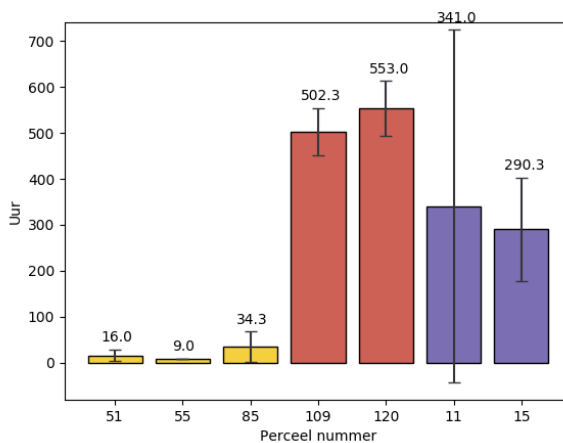
Om een beeld te krijgen van de gemiddelde drainagesnelheid kan er ook gekeken worden naar de verschuiving in het jaarverloop van het bodemvocht in de toplaag en de diepere laag. Onderstaande grafiek illustreert deze vertraging op een kleiperceel en een zandperceel.



*Figuur 73. Voorbeeld van de gemiddelde vertraging in het jaarverloop van bodemvocht op 10cm en 40cm diepte in een kleibodem (links) en zandbodem (rechts).*

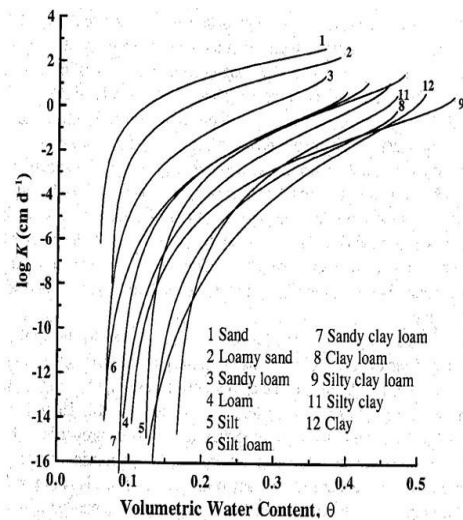
Door uit het bodemvochtssignaal op beide diepten het daggemiddelde te berekenen en vervolgens een normalisatie toe te passen, kan de gemiddelde verschuiving tussen de trends berekend worden. De waarden zijn weergegeven in Figuur 72. Hier is duidelijk het verschil zichtbaar tussen zand, klei en veen.

*Figuur 72. De gemiddelde verschuiving in het bodemvocht-signaal in de toplaag (10) en diepere laag (40cm) voor alle bodemtypes (links) en alleen zand- en veenbodems (rechts). De foutbalken geven de variatie (standaarddeviatie) tussen de verschillende meetlocaties op het perceel. De kleuren geven de bodemsoort aan, waarbij geel=zand, rood=klei en paars = veen.*



Bij de vergelijking tussen pieken wordt specifiek gekeken naar drainage via grote poriën of gangen. De verschuiving van het jaargemiddelde daarentegen geeft een beeld van de gemiddelde drainagesnelheid. Deze is in kleibodems vele mate langzamer dan in zandbodems en veenbodems. Dit komt overeen met bevindingen in de wetenschappelijke literatuur, waar de hydrologische conductiviteit wordt gebruikt als maat voor de snelheid waarmee water door de bodem getransporteerd wordt. Deze is in kleibodems een factor 100-10000 kleiner dan in zandbodems bij gelijk vochtgehalte in de bodem.

Echter is de hydrologische conductiviteit sterk afhankelijk van het bodemvochtgehalte (Figuur 74). Het (gemiddelde) bodemvochtgehalte op het perceel zal deze indicator dus beïnvloeden. Hier kan voor gecorrigeerd worden, maar een mogelijk beter alternatief is het nemen van een modelmatig aanpak, waarbij het bodemvochtgehalte op de verschillende dieptes wordt beschreven aan de hand van een bodemvocht model. Door een dergelijk model te 'fitten' op de gemeten waarden zou de hydraulische conductiviteit indirect bepaald kunnen worden. De berekening van bodemvocht modellen, zoals de veel gebruikte 'Richard's equation' is echter zeer complex en vereist nader onderzoek. De pedotransferfuncties die binnen de OBI gebruikt worden om watervasthoudend vermogen te berekenen uit chemische data geven reeds een inschatting van de hydrologische conductiviteit bij verzadiging ( $K_{sat}$ ). Met de bovengenoemde modelmatige aanpak zou deze berekende waarde getoetst kunnen worden op de sensordata.



Figuur 74. Hydrologische conductiviteit in verschillende bodemtypes. Comegna et al. 2012

De indicator is breed inzetbaar in alle bodemtypen. Wel is in nattere bodems het jaar-patroon in de diepere laag moeilijker te detecteren en kunnen er sneller rekenfouten optreden. Dit is mogelijk ook een gevolg van de keuze voor de geteste sensoren, die een te klein bereik bleken te hebben, met name in veenbodems. Dit verklaart mogelijk ook de grote variatie op perceel 11.

Zoals aangeven in de voorgaande paragraaf kan in grove zandbodems de vertraging tussen pieken reeds een beeld geven van de gemiddelde drainagesnelheid. Wanneer beide indicatoren vergeleken worden, lijkt dit in ieder geval voor percelen 51 en 85 het geval. Voor perceel 55 wordt een vertraging van 0 uur berekend, dit is mogelijk een rekenfout.

## 4.9.2.5 Relatie tussen indicatoren voor infiltratie, drainage en relevante bodem-metingen

Infiltratie en de drainage tussen de toplaag (10cm) en diepere laag (40cm) is niet direct gemeten in dit project en is geen onderdeel van gangbare meetmethodes. De indicator is daarom vergeleken met factoren die bekend zijn van invloed te zijn op drainage:

- Aanwezigheid van regenwormen, totaal en specifiek grondeters en pendelaars
- Verdichting tot 40cm
- Verdichting van 40-80cm
- De bepaalde diepte van de verdichting bij de visuele inspectie
- Structuurscore bij de visuele inspectie

De vertraging tussen een regenbui en de detectie van een bodemvochtssignaal (SL1) is relatief hoog in perceel 55, dit is ook het enige zandperceel waarbij een hoge verdichting is gemeten in de laag tot 40cm. Deze verdichting ligt daarnaast ook relatief ondiep (25 cm). Op kleiperceel 109 is de infiltratie ook relatief traag, wat eveneens te maken kan hebben met de verdichting in de laag tot 40cm. Daarnaast is de infiltratie op de veenpercelen trager dan gemiddeld op klei en zand. Hier lijkt geen relatie zichtbaar met verdichting, de langzamere infiltratie op veenpercelen kan in dit geval het gevolg zijn van een gunstige eigenschap, namelijk een zeer hoog watervasthoudend vermogen.

*Tabel 29. Indicatoren voor infiltratie en drainage vergeleken met metingen die mogelijk van invloed zijn. De kleuren geven de relatieve score aan van het perceel vergeleken met het gemiddelde en de variatie van andere percelen met hetzelfde bodemtype (dekzand, rivierklei en veen). De grijs tinten geven de hoogte van de SL-indicatoren aan in vergelijking met het gemiddelde en de variatie van de sensorpercelen van lichtgrijs (sneller) tot donkergrijs (langzamer).*

Perceel	Dataset	Zand	51	55	85	Klei	109	120	Veen	11	15
Regenwormen – Totaal	27 ± 24	25 ± 22	16	105	3	32 ± 26		11	41 ± 19	73	19
Regenwormen – Grondeters & pendelaars	22 ± 23	20 ± 20	11	52	0	28 ± 27		2	28 ± 19	32	7
Verdichting tot 40cm	324 ± 181	400 ± 163	300	1000	333	266 ± 165	1000	400	161 ± 55	304	125
Verdichting 40 – 80cm	760 ± 321	919 ± 177	584	1000	313	694 ± 273	972	1000	583 ± 312	724	204
Structuur	1,4 ± 0,9	1,5 ± 0,8	2	1	0	1,2 ± 0,9	0	0	2 ± 0	2	2
Diepte verdichte laag	57 ± 11	53 ± 13	-	25	30	68 ± 5	43	40	63 ± 5	-	-
SL1 (infiltratie, vertraging grote poriën en gangen)	13 ± 5		10	16	8		11	8		14	21
SL2 (drainage, vertraging grote poriën en gangen)	22 ± 15		13	12	25		50	5		25	25
SL3 (drainage gemiddelde vertraging)	249 ± 233		16	9	34		502	553		341	290

Voor de zandpercelen komt de snelheid van de drainage door grote poriën en gangen (SL2) qua orde grootte overeen met de gemiddelde snelheid van drainage (SL3). Percelen 51 en 85 hebben beiden een lage verdichting, maar de drainage lijkt iets sneller te verlopen op perceel 51, mogelijk door de betere structuur, het hogere aantal regenwormen of het lagere watervasthoudend vermogen.

Ondanks de sterkere verdichting verloopt de drainage door grote poriën en gangen op zandperceel 55 met een vergelijkbare snelheid. Dit is in tegenstelling tot de langzamere infiltratie. Tijdens visuele inspectie is de verdichte laag geschat op 25 cm diepte. Het is onduidelijk waarom de verdichting minder effect lijkt te hebben op de drainage dan de infiltratie. Mogelijk speelt het bodemleven hier een rol: op het perceel werden buitengewoon veel regenwormen gemeten en specifiek pendelaars. Echter zou men verwachten dat pendelaars ook de infiltratie zouden bevorderen. Tot slot is op dit perceel maar 1 sensor geplaatst en zou de verdichting op de meetlocatie zich ondieper kunnen bevinden dan tijdens de visuele inspectie is vastgesteld. Metingen van droge bulkdichtheid bevestigen dit beeld echter niet.

Voor de kleipercelen geldt dat er een zeer groot verschil is tussen de drainagesnelheid via grote poriën en gangen en de gemiddelde drainagesnelheid. De gemiddelde drainagesnelheid is gelijk voor beide percelen en lijkt weinig beïnvloed te worden door verdichting. De drainage via grote poriën en gangen daarentegen verloopt veel langzamer op perceel 109, dat extreem verdicht is in de laag van 0 tot 40cm diepte. Dit komt overeen met resultaten uit wetenschappelijk onderzoek waaruit blijkt dat in kleigronden verdichting specifiek het preferent watertransport (via grote gangen en poriën) belemmert.

Op de veenpercelen is de variatie tussen de sensorlocaties op hetzelfde perceel veel groter dan de verschillen tussen de percelen. De verschillen tussen de percelen zijn daarom lastig te koppelen aan onderliggende factoren. De gebruikte indicatoren voor infiltratie en drainage worden ook beïnvloed door watervasthoudend vermogen, de aantrekking van water door de bodem boven de sensor kan ervoor zorgen dat het water pas later de bodemvochtsensor bereikt. De tragere infiltratie en drainage op veen, kunnen daarmee ook een gunstige eigenschap weergeven. In een vervolgonderzoek kan verder worden ingezoomd op het corrigeren van deze indicatoren voor watervasthoudend vermogen, door deze te vergelijken met referentiemetingen van infiltratie. Op basis van deze referentiemetingen kan per indicator worden afgewogen of deze correctie te maken is middels correctiefactoren, of een modelmatige aanpak van toegevoegde waarde is.

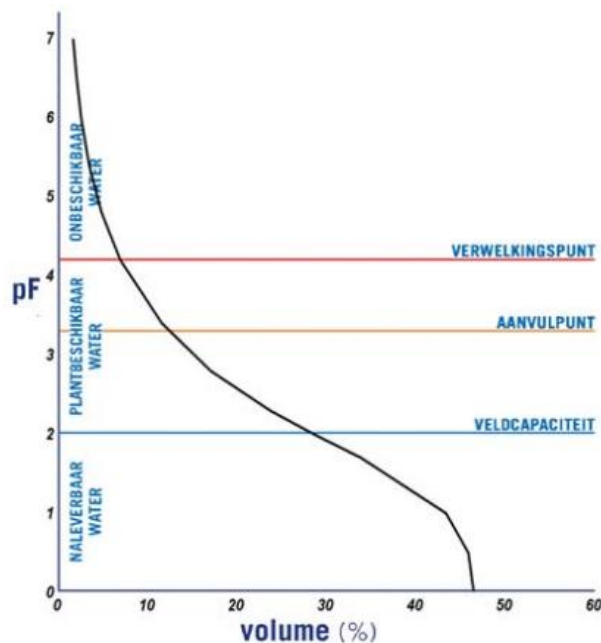


## 4.9.3 Watervasthoudend vermogen

### 4.9.3.1 Huidige aanpak

Op dit moment wordt de waterretentie van de bodem in standaard bodemanalyses geschat op basis van indirecte meting (NIR) van klei, zand, zilt en organische stofgehalte en rekenmethodes (pedotransferfuncties) van Wosten et al. (2001). Met deze metingen en rekenmethodes wordt een pF curve berekend voor de bodem. Uit de pF curve is vervolgens het verwelkingspunt, de veldcapaciteit en het watervasthoudend-vermogen te halen. Plant beschikbaar water is het verschil tussen de veldcapaciteit en het verwelkingspunt, en geeft de gebruiker direct informatie hoe droogtebestendig en perceel is en/of efficiënt te beregenen.

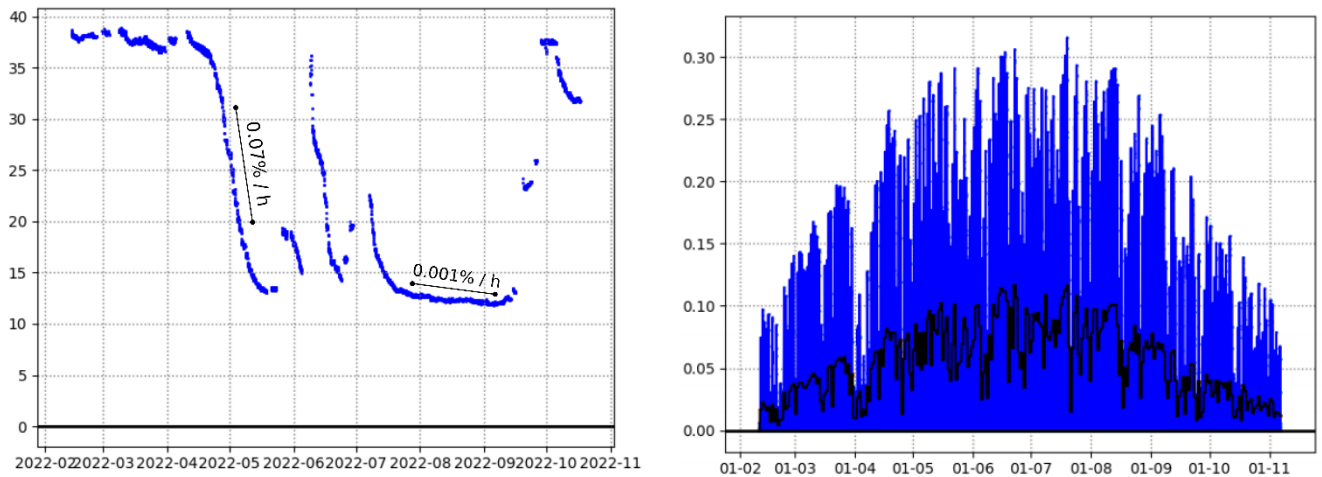
Een daadwerkelijke meting van de pF-curve wordt in het landbouwkundig bodemonderzoek door agrarische laboratoria nauwelijks meer gedaan. Wel kan het verzadigingspunt los bepaald worden met een vloeigrensbepaling. Dit is in het project ook als losse meting uitgevoerd.



Figuur 75. pF Curve berekend door Eurofins op basis van standaard chemisch-fysische metingen.

### 4.9.3.2 Potentiële indicator 4: Het stagnatiepunt

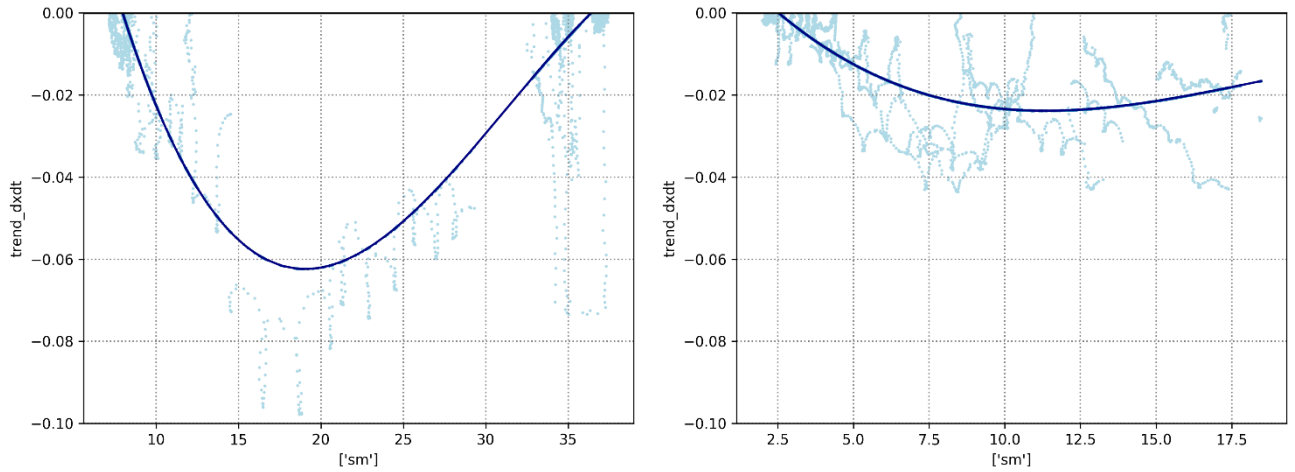
Om in kaart te brengen wat de relatie is tussen de afname van bodemvocht in de toplaag en de verdamping is de bodemvochtmeting opgesplitst in periodes van droogte en periodes van neerslag. Daarnaast is de potentiële verdamping van gras berekend, op basis van de 'Makkink' methode. In Figuur 76 (links) is een voorbeeld weergegeven van het bodemvochtgehalte in periodes van droogte en de potentiële verdamping op een veenperceel. Gedurende een droge periode is de aanvoer van water beperkt, terwijl het gewas wel water wil verdampen. In het bodemvochtssignaal is dan ook zichtbaar dat na een periode van neerslag het bodemvocht snel daalt. Echter hoe lager het absolute bodemvochtgehalte, des te meer een stagnatie te zien is in deze daling, tot het bodemvocht nagenoeg niet meer verandert. Op dit punt is de eventuele aanvoer van water door capillaire werking in balans met de hoeveelheid vocht dat het gewas uit deze laag onttrekt voor verdamping.



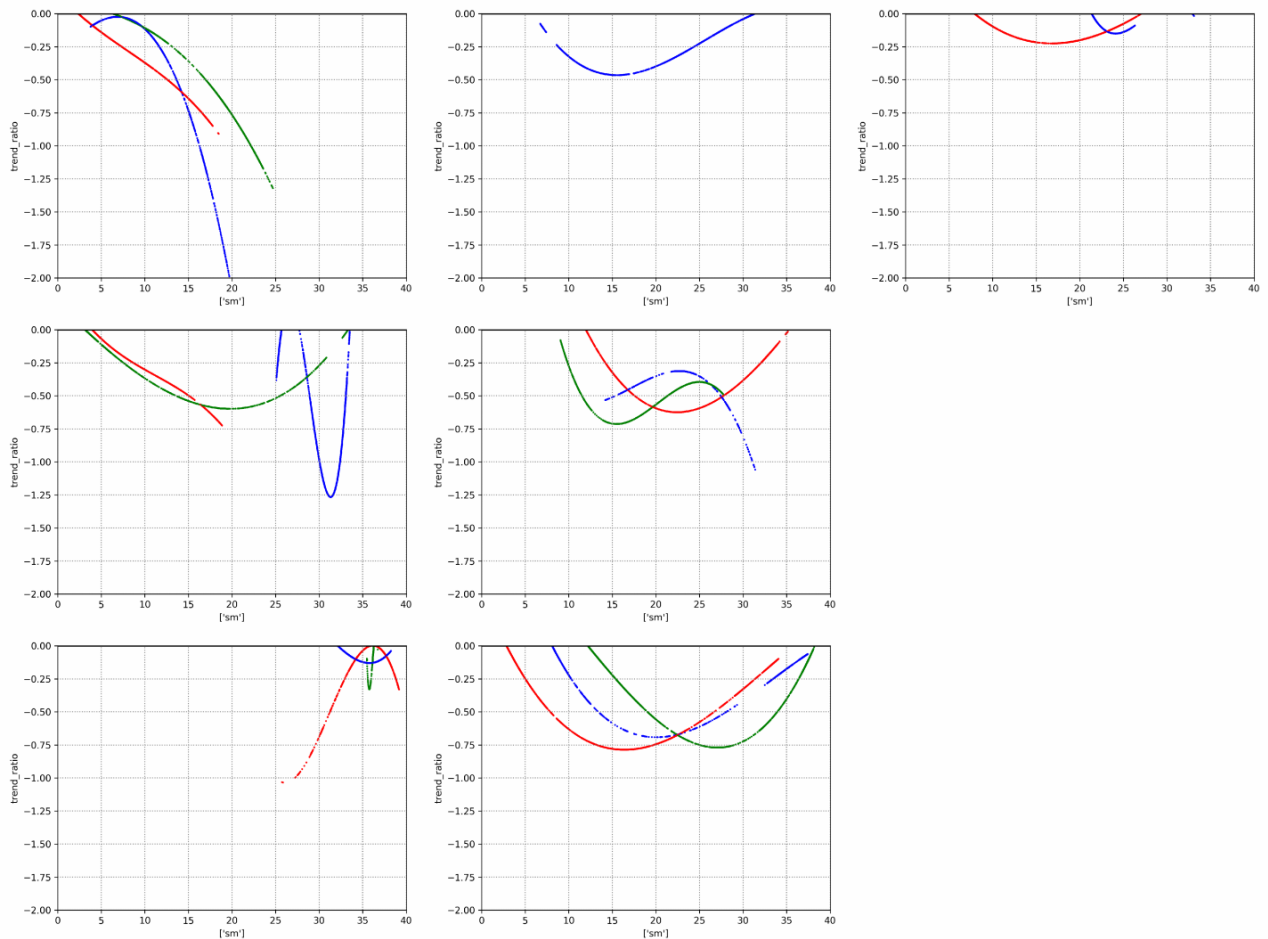
*Figuur 76. Het bodemvochtgehalte op perceel 15 gedurende droge perioden (links) en de potentiële verdamping van gras bij optimale vochthuishouding (rechts). De verdamping is berekend op uurbasis (blauwe lijnen) en als daggemiddelde (zwarte lijn), eenheid: mm/h.*

In bodems waar de snelheid van capillair watertransport veel kleiner is dan de potentiële verdamping, zal het gewas niet meer voldoende water kunnen onttrekken uit de toplaag. Het punt waarop de daling van bodemvocht stagneert: het stagnatiepunt, zou in dat geval overeen kunnen komen met het verwelkingspunt. Daarnaast kan de bodemvochtdaling vlak na een natte periode mogelijk ook informatie geven over de veldcapaciteit. Om dit te onderzoeken is op basis van bovenstaande data een empirische verliescurve gemaakt, waarin de bodemvochtdaling is afgezet tegen het bodemvochtgehalte. In Figuur 77 zijn deze verliescurves weergegeven voor twee sensoren. De verliescurves hebben de vorm van een omgekeerde parabool. Het verlies neemt toe naarmate de bodem meer vocht bevat, maar bereikt een minimum en wordt vervolgens weer kleiner.

Een belangrijke factor in de vorm van de verliescurves is de verdamping van het gewas dat in de relatief natte herfst en wintermaanden veel lager ligt. In Figuur 78 zijn de curves weergegeven waarin de ratio tussen de bodemvochtdaling en de verdamping is weergegeven. Percelen 85 (zand) en 11 (veen) wijken duidelijk af. Deze percelen bevatten het gehele jaar veel vocht en de daling van bodemvocht in de toplaag is gering: de maximale daling in bodemvocht is 25% van de potentiële verdamping. In de andere percelen wordt een maximum daling tussen de 50-75% van de potentiële verdamping gemeten. In het veenperceel 15 is de daling het grootst. Voor enkele sensoren wijkt de trend van de verliescurve af.



Figuur 77. De verliescurves voor twee sensoren op perceel 15 (links) en perceel 11 (rechts). Het verlies in bodemvocht is weergegeven op de y-as als % per uur. De meetpunten zijn aangegeven in lichtblauw en in donkerblauw de trend (3e graads polynoom).



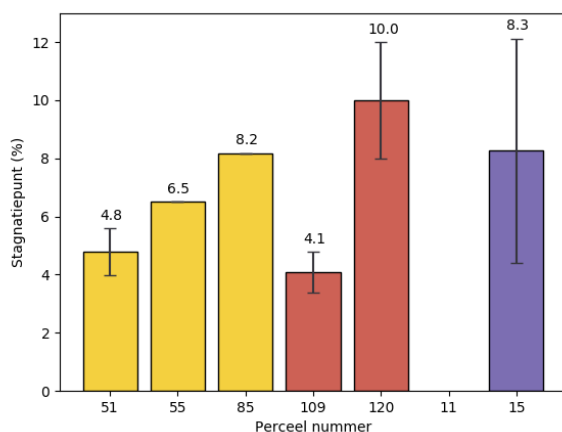
Figuur 78. Trends van de verliescurves gecorrigeerd voor potentiële verdamping voor alle percelen. Het verlies in bodemvocht is op de y-as weergegeven als fractie van de potentiële verdamping: -0.5 staat gelijk aan een daling van 50% van de potentiële verdamping. Elke sensor heeft een andere kleur.

Ook na correctie van de verdamping hebben de empirische verliescurves een minimum waarna het verlies lijkt af te nemen. Theoretisch is echter te verwachten dat bij hoge vochtgehalten de snelheid waarmee water door de bodem kan bewegen toeneemt (Figuur 74). Enkel het bodemvocht in perceel 51 lijkt zich te gedragen zoals theoretisch verwacht. Dat de gecorrigeerde verliescurve afwijkt van wat theoretisch verwacht wordt is te verklaren door verschillende factoren.

- Niet alle neerslag wordt gedetecteerd, deels al op het niveau van radarbeelden en deels op het niveau van piekdetectie. De afname van bodemvocht in de nattere periodes wordt daardoor onderschat, omdat er in werkelijkheid nog toevoer is van vocht door miezer, mist of kleine regenbuien.
- Er kan door trage transportprocessen vlak na een periode van neerslag sprake zijn van een schaduwpiek. Dit is met name het geval in kleibodems en het effect is wederom sterker in de herfst en wintermaanden wanneer de periodes van droogte korter worden.
- Het bereik van de vochtsensoren is beperkt bij hoge vochtgehalten. Dit heeft direct invloed op de gemeten bodemvochtdaling.

Gezien bovenstaande beperkingen, bieden deze verliescurves waarschijnlijk alleen relevante informatie voor periodes waarin het bodemvochtgehalte laag is. In het vervolg van de analyse is daarom gekeken of met behulp van deze curves een stagnatiepunt te bepalen is als indicator voor het verwelkingspunt. Om eveneens de veldcapaciteit en daarmee het watervasthoudend vermogen te bepalen, zullen bovenstaande beperkingen moeten worden weggenomen.

Voor de bepaling van het stagnatiepunt uit bovenstaande curves is per meetpunt gekeken bij welk bodemvochtgehalte het verlies uit de toplaag lager is dan 5% van de potentiële verdamping. De keuze voor deze grenswaarde is arbitrair en zal in vervolgonderzoek getest moeten worden.



*Figuur 79. Het stagnatiepunt, bepaald uit de verliescurves. De foutbalken geven de variatie (standaarddeviatie) aan tussen de verschillende meetlocaties op het perceel. De kleuren geven de bodemsoort aan, waarbij geel=zand, rood=klei en paars=veen.*

Voor perceel 11 kon voor geen van de meetpunten het stagnatiepunt bepaald worden uit bovenstaande curves. Er was gedurende het seizoen voldoende bodemvocht aanwezig waardoor er geen sprake was van stagnatie in de bodemvochtdaling. Op perceel 85 was dit voor twee van de drie meetpunten eveneens het geval.

### 4.9.3.3 Relatie tussen indicator voor watervasthoudend vermogen en huidige aanpak

Er is in het project geen directe meting verricht van het verwelkingspunt en de veldcapaciteit. Wel is de vloeigrens voor alle bodems bepaald en is de pF curve, als onderdeel van de OBI, geschat. In onderstaande tabel is de indicator vergeleken met de vloeigrensmeting en zijn de indicatoren berekend in de OBI.

Het watervasthoudend vermogen ligt aanzienlijk hoger op de klei- en veenpercelen dan op de zandpercelen. De gemeten vloeigrens komt op veenpercelen lager uit dan de indicator voor het watervasthoudend vermogen in de OBI. Daarnaast is de gemeten vloeigrens op perceel 85 aanzienlijk hoger dan de OBI-indicator voor watervasthoudend vermogen.

Het stagnatiepunt (SL4) ligt voor zandpercelen 51 en 55 nabij de OBI-indicator voor het verwelkingspunt, maar is aanzienlijk hoger voor perceel 85. Gezien ook de vloeigrens voor dit perceel aanzienlijk hoger ligt, is het mogelijk dat de OBI-indicator het verwelkingspunt onderschat.

Voor klei- en veenpercelen ligt het stagnatiepunt veel lager dan de OBI-indicator voor het verwelkingspunt. Op veen is een klein deel van dit verschil mogelijk te verklaren door overschatting door de OBI-indicator, echter zal het grootste deel waarschijnlijk liggen aan de bepaling van de SL indicator. Mogelijke oorzaken zijn:

- De kalibratie van de sensoren, die uitdagender is op klei- en veenpercelen
- Lokale effecten, zo staat op kleiperceel 120 een sensor op een dijk met een zandlaag
- Gezien de extreme droogte is het mogelijk dat de bodem verder uitdroogt voorbij het verwelkingspunt: Het stagnatiepunt ligt lager dan het verwelkingspunt.

*Tabel 30. Indicatoren voor watervasthoudend vermogen vergeleken met relevante metingen. De kleuren geven de relatieve score van het perceel weer vergeleken met het gemiddelde en de variatie van de dataset. Voor de SL indicatoren zijn dit de gemiddelden van de sensorpercelen.*

Perceel	Dataset	Zand	51	55	85	Klei	109	120	Veen	11	15
Organische stof	6 ± 3	5 ± 0	6	5	10	7 ± 1		9	12 ± 2	12	22
Vloeigrens	44 ± 13	38 ± 6	36	37	43	50 ± 11	-	45	48 ± 6	41	41
OBI Indicator – Vloeigrens	48 ± 4	46 ± 1	46	45	45	51 ± 3	49	51	53 ± 2	56	54
OBI Indicator – Veldcapaciteit	31 ± 7	26 ± 3	26	26	24	38 ± 6	37	38	39 ± 4	45	42
OBI indicator – Verwelkingspunt	10 ± 7	5 ± 1	5	5	5	17 ± 7	15	17	17 ± 6	26	21
SL4 – Stagnatiepunt	7 ± 2		4,8	6,5	8,2		4,1	10		-	8,3

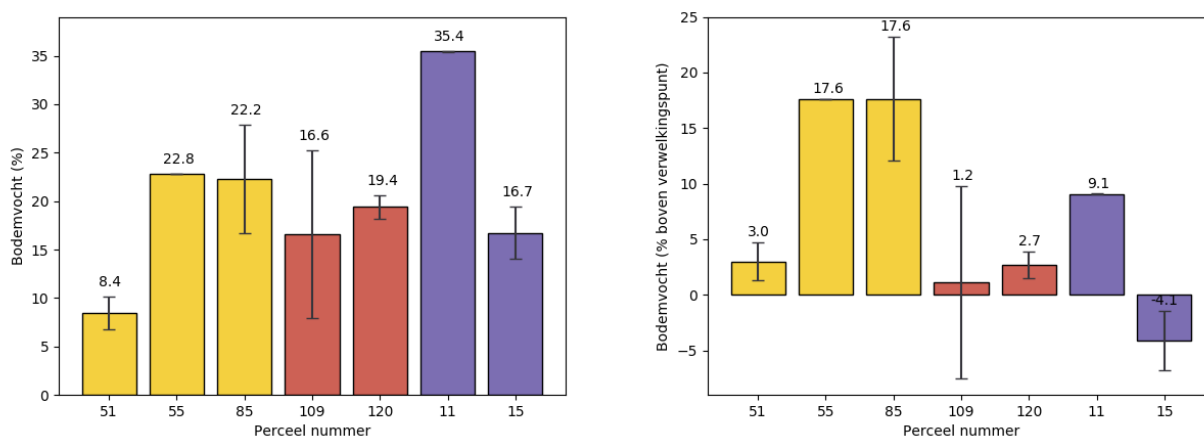
## 4.9.4 Vochtvoorziening en droogtestress

### 4.9.4.1 Huidige aanpak

Droogtestress wordt standaard berekend in de Open Bodem Index. Deze waarde wordt berekend op basis van gegevens van de grondwaterstand, het bodemtype en het gewastype. Watervasthoudend vermogen wordt niet meegenomen in deze berekening.

### 4.9.4.2 Potentiële indicator 5: Gemiddeld percentage bodemvocht gedurende het groeiseizoen in relatie tot het verwelkingspunt

Een eenvoudige indicator voor de droogtestress die het gewas op een perceel ervaart is het gemiddelde bodemvocht gehalte gedurende het groeiseizoen in relatie tot het verwelkingspunt. In onderstaande figuur is links het gemiddelde percentage bodemvocht gedurende het groeiseizoen weergegeven en rechts het verschil met het verwelkingspunt. Hoe lager dit verschil, des te meer het gewas waarschijnlijk droogtestress heeft ervaren. Het verwelkingspunt is in dit geval geschat met de rekenmethoden in de OBI, op basis van klei, zand, zilt en organische stofgehalten.

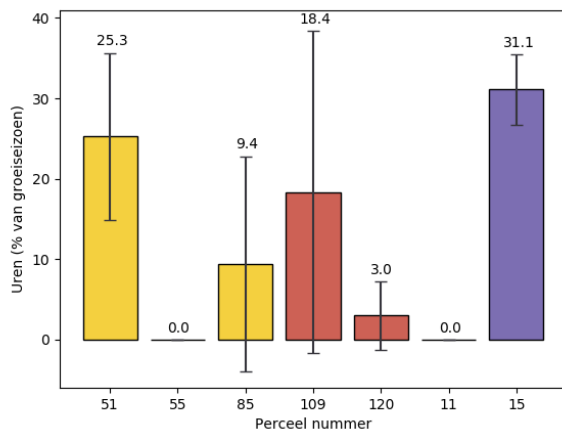


*Figuur 80. Gemiddeld percentage bodemvocht gedurende het groeiseizoen (links) en het verschil met het verwelkingspunt (rechts). De foutbalken geven de variatie (standaarddeviatie) aan tussen de verschillende meetlocaties op het perceel. De kleuren geven de bodemsoort aan, waarbij geel=zand, rood=klei en paars=veen.*

Uit de data blijkt een duidelijk verschil tussen de percelen. Bij de zandpercelen ligt het gemiddelde bodemvochtpercentage op perceel 51 het hele seizoen zeer dicht bij het berekende verwelkingspunt. Op beide kleipercelen is volgens deze indicator sprake van droogtestress. Op perceel 109 is dit in extreme mate het geval op twee van de drie sensorlocaties, waardoor de variatie voor het hele perceel groot is. Op veenpercelen geeft de indicator aan dat er op perceel 11 geen sprake is van droogtestress, maar wel in grote mate op perceel 15.

#### 4.9.4.3 Potentiële indicator 6: Tijd dat bodemvocht < stagnatiepunt

Bovenstaande indicator is afhankelijk van de beschikbaarheid van het verwelkingspunt door schattingen op basis van (historische) chemische metingen. Uit de verliescurves berekend voor indicator SL4 kan ook direct een schatting gemaakt worden van droogtestress. Hierbij is gekeken hoeveel uur het bodemvochtgehalte onder het stagnatiepunt ligt. Omdat niet alle sensoren evenveel meetpunten hebben is dit in Figuur 81 uitgedrukt in % van het groeiseizoen.

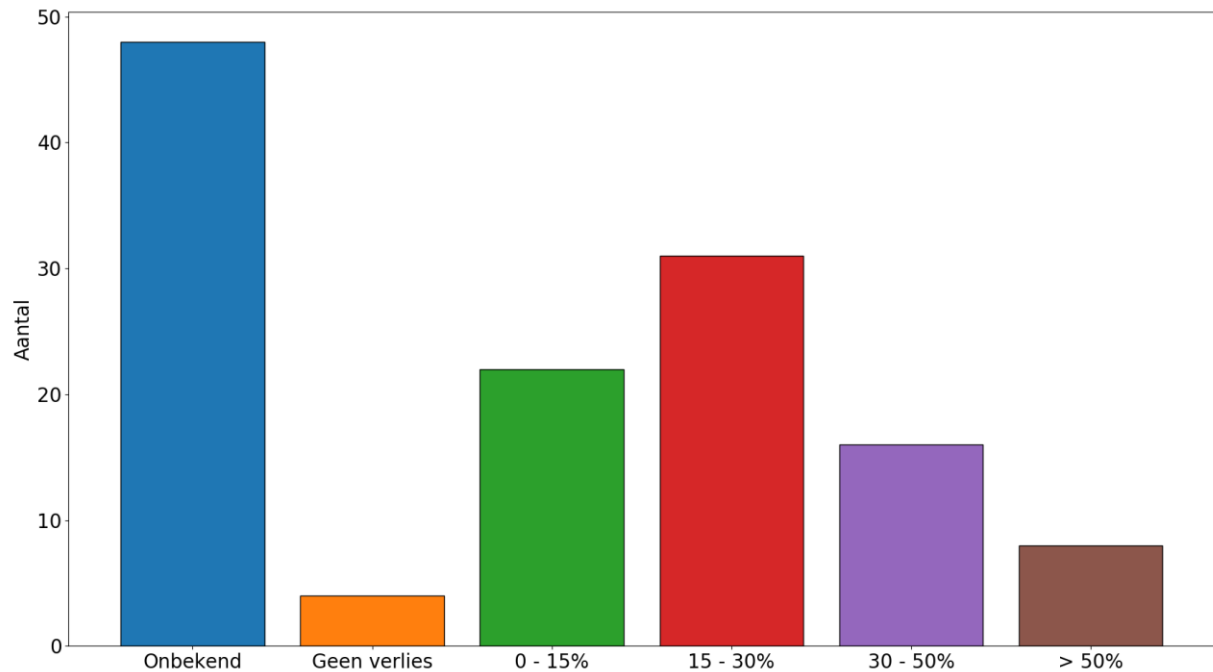


*Figuur 81. De tijd dat het bodemvocht gehalte in de toplaag lager is dan het stagnatiepunt (bodemvochtdaling 5% van de potentiële verdamping). De foutbalken geven de variatie (standaarddeviatie) aan tussen de verschillende meetlocaties op het perceel. De kleuren geven de bodemsoort aan, waarbij geel=zand, rood=klei en paars=veen.*

Het nadeel van deze indicator is dat wanneer het bodemvocht gedurende de meetperiode niet onder de grenswaarde komt er een waarde van 0 wordt toegekend, waardoor er geen onderscheid gemaakt kan worden tussen percelen die in mindere mate droogtestress ervaren. Tevens gelden dezelfde aannames als voor het berekenen van de verliescurve. Zo zal de indicator slechter presteren in bodems waar veel capillair vochttransport plaatsvindt.

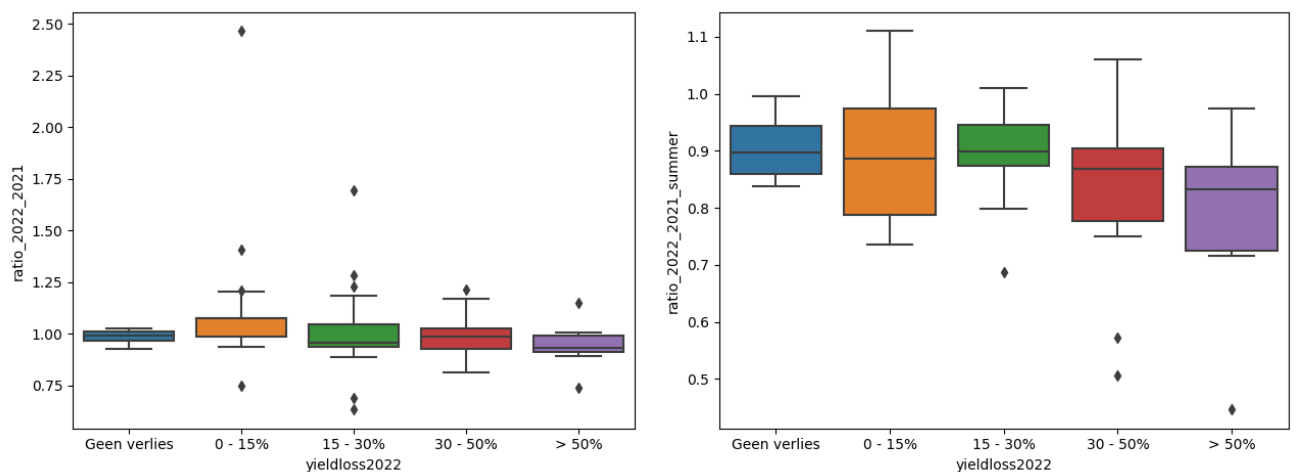
#### 4.9.4.4 Relatie tussen indicatoren voor vochtvoorziening en productiviteitsverlies

Droogtestress is in dit project bepaald door de gebruiker van het perceel te vragen naar het verlies van productiviteit tijdens de droogte in 2022. In onderstaande figuur zijn de resultaten van de vragenlijst weergegeven voor graslanden. Gemiddeld gaven de gebruikers aan dat de productiviteit tussen de 15-30% lager lag in 2022 door toedoen van de droogte.



*Figuur 82. Aantal percelen voor elke categorie van productieverlies. Onbekend zijn de percelen waarvoor de vragenlijst niet is ingevuld.*

Omdat niet alle gebruikers de vragenlijst hebben ingevuld, is deze data incompleet. Daarom is er tevens gekeken naar de bruikbaarheid van NDVI data uit 2021 en 2022 als maat voor productiviteit.



*Figuur 83. De gemiddelde waarden voor de ratio van de NDVI tussen 2022 en 2021 voor het hele jaar (links) en de zomer (week 18 t/m 34) (rechts). De waarden zijn weergegeven voor elk van de vier categorieën waarmee gebruikers het ingeschatte productieverlies konden aangeven.*



Des te hoger het ingeschatte productieverlies, des te lager de NDVI in 2022 ten opzichte van 2021 (Figuur 83). Verschillen zijn echter niet significant en er zijn veel uitschieters. Dit kan komen door een beheer verandering in 2022 of 2021, zoals opnieuw inzaaien van het grasland, door verkeerde inschatting van het productieverlies door de gebruiker of gebrek aan resolutie in de berekening van de NDVI. Wanneer er in detail wordt gekeken naar de NDVI over het hele jaar is te zien dat het verlies in productiviteit zich concentreert in de (late) zomer. Daarom is ook de ratio tussen de NDVI van alleen de zomers van 2021 en 2022 berekend. Hier zijn aanzienlijk minder uitschieters en is de trend duidelijker zichtbaar. De verhouding in NDVI van de zomers van 2022 en 2021 zijn daarom gebruikt in onderstaande analyse.

Op basis van de gerapporteerde droogtestress en de NDVI ratio's tussen 2021 en 2022 is er op de zandpercelen sprake van extreme droogtestress op perceel 51 en matige droogtestress op perceel 55. Op perceel 85 zijn de satellietgegevens en het gerapporteerde verlies tegenstrijdig. Op kleiperceel 109 is sprake van grote droogtestress en op perceel 120 matige droogtestress. Op veenpercelen 11 en 15 is op basis van de satellietdata geen droogtestress te constateren.

De huidige indicator in de OBI geeft weinig verschil aan tussen de proefpercelen, in vergelijking met de metingen van droogtestress. De OBI-indicator voorspelt een grotere kans op droogtestress op percelen 55 en 109, maar niet op perceel 51, waar de droogtestress het duidelijkst aanwezig was.

De droogtestress op perceel 51 blijkt wel duidelijk uit de sensormetingen en afgeleide SL indicatoren. Met geen van de SL indicatoren wordt echter de matige droogtestress op perceel 55 geconstateerd. Op perceel 85 wordt wel stagnatie van het bodemvochtverlies gemeten op 1 van de meetlocaties.

Ook de droogtestress op kleiperceel 109 is duidelijk te herleiden uit de sensormetingen. Voor perceel 120 is het beeld minder eenduidig, het gemiddelde verschil met het theoretische verwelkingspunt is laag, maar er wordt geen stagnatie van het bodemvochtgehalte gemeten. Op de veenpercelen is op basis van satellietgegevens geen droogtestress waarneembaar. Voor perceel 11 is dit in lijn met de sensormetingen, maar voor perceel 15 blijkt uit de SL indicatoren wel droogtestress.

Het verschil tussen de droogtestress op basis van data van satellietmetingen en sensormeting kan verschillende oorzaken hebben. Een uitdaging in het gebruik van satellietmetingen is het interval tussen de metingen. Als het bewolkt is op het moment dat het satellietbeeld gemaakt wordt, kunnen er belangrijke meetpunten verloren gaan. Sensoren meten daarentegen continu, maar kunnen op een plek staan die niet representatief is voor het hele perceel. Zo is op perceel 51 maar op 1 locatie gemeten, wat mogelijk verklaart dat de matige droogtestress niet is waargenomen.

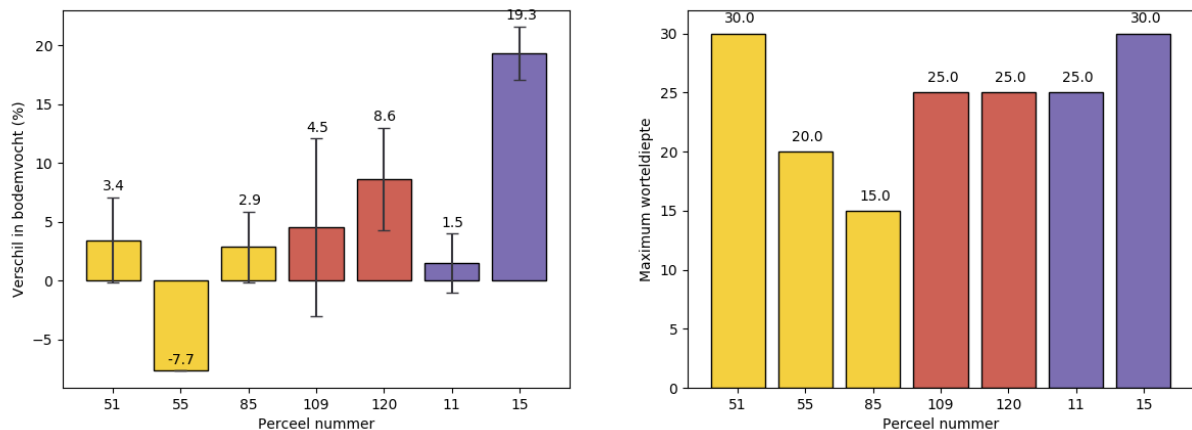
Daarnaast gaan beide indicatoren alleen uit van het bodemvochtgehalte op 10cm diepte. Een diepe beworteling of hoge mate van capillaire werking zou er bijvoorbeeld op veenperceel 15 voor kunnen zorgen dat het gewas in werkelijkheid geen droogtestress ervaart. Inderdaad is te zien in Figuur 84 dat het verschil in bodemvochtgehalte tussen 40cm en 10cm zeer hoog is op perceel 15 vergeleken met de andere percelen, en het gewas ook relatief diep wortelt.

De indicatoren kunnen daarom verbeterd worden door het (modelmatig) inschatten van het bodemvochtgehalte over de gehele bouwvoor en het meenemen van de bewortelingsdiepte ter plaatse, zoals bijvoorbeeld met de bodemconditiescore wordt bepaald.

Tabel 31. Metingen van droogtestress vergeleken met een bestaande indicator voor droogtestress uit de OBI en twee prototype indicatoren uit dit project. De kleuren geven de relatieve droogtestress aan op het perceel. Vergeleken met de gemiddelden en variatie van de gehele dataset. Voor de SL indicatoren zijn dit de gemiddelden van de sensorpercelen.

Perceel	Dataset	Zand	51	55	85	Klei	109	120	Veen	11	15
Neerslag	740 ± 59		638	764	708		798	827		746	754
NDVI ratio zomer 2022/2021	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,6	0,8	0,9	0,9 ± 0,1	0,7	1,0	0,9 ± 0,1	0,9	1,0
OBI Indicator	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,1	1,0	0,9	1,0	0,9 ± 0,2	0,9	1,0	1,0 ± 0,0	1,0	1,0
SL5 (% verschil met VP)	7 ± 8		3	18	18		1	3		9	-4
SL6 (% tijd onder stagnatiepunt)	12 ± 13		25	0	9		18	3		0	31

Wanneer de OBI indicator, op basis van grondwatertrap en bodemtype, vergeleken wordt met de SL indicatoren op basis van sensormetingen, zijn die laatste beter in staat om droogtestress in kaart te brengen. Daarbij komt de stagnatie van het bodemvochtgehalte het beste overeen met droogtestress op basis van de satellietbeelden. Deze indicator is onafhankelijk van de kalibratie en schatting van het verwelkingspunt. Wel is het bepalen van de drempelwaarde een uitdaging, evenals bovengenoemde verbeterpunten om de toepasbaarheid in bodems waar veel capillaire werking plaatsvindt te verbeteren.



Figuur 84. Verskil in bodemvochtgehalte tussen 40cm en 10cm diepte, gedurende het groeiseizoen (links) en de maximale worteldiepte bepaald tijdens de visuele inspectie (rechts). De foutbalken geven de variatie (standaarddeviatie) aan tussen de verschillende meetlocaties op het perceel. De kleuren geven de bodemsoort aan, waarbij geel=zand, rood=klei en paars=veen.

## 4.9.5 Relatie tussen indicatoren, gangbare metingen en beheer

### 4.9.5.1 Algemeen

Gezien het kleine aantal sensorpercelen is er geen kwantitatieve uitspraak te doen over de relatie tussen de indicatoren onderling, de gangbare metingen, referentiemetingen en het beheer. In onderstaande tabellen zijn per bodemtype de belangrijkste observaties beschreven.

### 4.9.5.2 Zandpercelen

Tussen de onderzochte zandpercelen was er een groot verschil zichtbaar in de waterregulatie. Het gewas op perceel 51 ervaarde een hoge mate van droogtestress, wat minder het geval was op perceel 85. Dit is zeer waarschijnlijk het directe gevolg van de winterdagbevoeiing die op perceel 85 plaatsvindt. Daarnaast is er op perceel 85 ook een hogere grondwaterstand en bovengemiddeld hoog organisch stofgehalte en watervasthoudend vermogen. Veel meetwaarden gerelateerd aan waterregulatie op perceel 85 lagen dicht bij het gemiddelde van veenbodems dan zandbodems. Voor vervolgonderzoek is het interessant om te kijken naar de relatieve bijdrage van het hogere watervasthoudend vermogen en grondwaterniveau in de betere waterhuishouding, naast de bevoeiing, en eventuele causale relaties tussen het effect van bevoeien en het watervasthoudend vermogen.

Tabel 32. Kwalitatieve vergelijking zandpercelen

Perceel			51	55	85
Beheer					Bevoeiing
Metingen	Gangbaar		Gemiddeld		Hogere grondwatertrap, bovengemiddeld organische stof/koolstof, stikstof voorraad en pH
	Referentie			Hoge verdichting en buitengewoon veel bodemleven	Hogere veldcapaciteit
Indicatoren	Satellietdata	Droogte stress	Hoog	Midden	Laag
	Sensoren	Droogte stress	Hoog	Geen	Laag
	Sensoren	Infiltratie via grote poriën en gangen		Langzamer	
	Sensoren	Drainage via grote poriën en gangen	Vergelijkbaar		Langzamer dan de andere zandpercelen
	Sensoren	Drainage, gemiddeld			
	Sensoren	Watervasthoudend vermogen			Hoger stagnatiepunt dan perceel 51
	OBI	Watervasthoudend vermogen	Vergelijkbaar		

Percelen 51 en 55 scoorden op veel metingen gemiddeld ten opzichte van andere zandbodems. Er is op basis van de metingen en indicatoren geen duidelijke verklaring te vinden waarom perceel 55

minder last heeft van droogtestress dan perceel 51. Interessant is de combinatie van zeer hoge verdichting en buitengewoon hoge aantallen regenwormen op perceel 55, terwijl de drainagesnelheid vergelijkbaar is met perceel 51. Dit roept de vraag op in hoeverre verdichting op zandbodems een verschillend effect heeft op infiltratie- en drainagesnelheid, en als er sprake is van een negatief effect, of een zeer actief bodemleven dit kan opheffen. Interessant is dat voor alle percelen geldt dat lagere droogteschade samenvalt met een groter aantal pendelaars in de bodem (Bijlage 7).

#### 4.9.5.3 Kleipercelen

Op de onderzochte kleipercelen was van tevoren bekend dat deze verschilden in beheer. Op perceel 120 werd voornamelijk vaste mest aangevoerd. De gangbare metingen lieten dan ook een verschil zien in organisch stofgehalte, dit lag op perceel 109 relatief laag.

De referentiemetingen lieten daarnaast zien dat er op perceel 109 sprake was van een extreme mate van verdichting in de laag 0 – 40 cm. Op beide percelen was de laag 40-80 cm sterk verdicht.

Tabel 33. Kwalitatieve vergelijking kleipercelen

Perceel			109	120
Beheer				Vaste mest
Metingen	Gangbaar			Hoger organische stofgehalte
	Referentie		Hoge verdichting in de laag 0-40cm	
Indicatoren	Sateliëtdata	Droogte stress	Hoog	Laag
	Sensoren	Droogte stress	Hoog	Midden
	Sensoren	Infiltratie via grote poriën en gangen	Langzamer	
	Sensoren	Drainage via grote poriën en gangen	Zeer langzaam	
	Sensoren	Drainage gemiddeld	Vergelijkbaar	
	Sensoren	Stagnatiepunt	Laag	
	OBI	Watervasthoudend vermogen	Vergelijkbaar	

Op kleipercelen was er sprake van een groot verschil tussen de indicator voor de gemiddelde drainagesnelheid en de indicator voor drainage door grote poriën en gangen. De gemiddelde snelheid was voor beide percelen vergelijkbaar, maar de drainagesnelheid door grote poriën en gangen was erg langzaam op perceel 109 en snel op perceel 120. Vanuit de wetenschappelijke literatuur is bekend dat verdichting in kleibodems zorgt dat het watertransport via grote poriën en gangen afneemt. De vraag voor een vervolgonderzoek is of dit verschil ook de grote mate van droogtestress op perceel 109 kan verklaren en of het beheer een rol speelt in dit verschil.

#### 4.9.5.4 Veenpercelen

Tussen de veenpercelen kon met de sensoren duidelijk een verschil in de waterregulatie worden waargenomen, waar de bodemvochtgehaltenes op perceel 11 veel hoger lagen gedurende het groeiseizoen dan op perceel 15. Echter vertaalt zich dit niet in waarneembare droogtestress via satellietdata, doordat de beworteling op perceel 15 relatief diep gaat.

Op perceel 15 verliep de infiltratie langzamer dan op perceel 11, terwijl de verdichting lager lag. Op perceel 15 waren wel veel minder regenwormen aanwezig, dus mogelijk is ook hier invloed van het bodemleven. Of de langzamere infiltratie van invloed is op de uitdroging van de toplaag is niet vast te stellen. De grootste verklarende factor voor het verschil in bodemvochtgehaltenes is waarschijnlijk de aanwezigheid van drainage op perceel 11, waarmee het bodemvocht in de diepere laag continu wordt aangevuld. Het bodemvochtgehalte op 40cm diepte vertoonde op perceel 11 gedurende het seizoen geen grote daling, terwijl dit op perceel 15 wel het geval was in de droge zomermaanden. Een piek in het bodemvochtgehalte op 40cm die afwezig was op 10cm verraadt wel een ingreep in de grondwaterstand op perceel 15, maar deze ingreep kwam te laat en was onvoldoende om het bodemvocht op 40cm diepte weer op peil te brengen.

Tabel 34. Kwalitatieve vergelijking veenpercelen

Perceel			11	15
Beheer			Drainage	
Metingen	Gangbaar		Hoog organische stof gehalte	Hoog koolstof gehalte en C:N verhouding
	Referentie		Veel regenwormen, hogere verdichting	
Indicatoren	Satellietdata	Droogte stress	Geen	Geen
	Sensoren	Droogte stress	Geen	Hoog
	Sensoren	Infiltratie via grote poriën en gangen		Langzamer
	Sensoren	Drainage via grote poriën en gangen	Vergelijkbaar	
	Sensoren	Drainage gemiddeld		
	Sensoren	Stagnatiepunt	-	
	OBI	Watervasthoudend vermogen	Vergelijkbaar	

Een interessante observatie, los van waterregulatie, is het grote verschil in potentiële CO<sub>2</sub> flux op perceel 15 ten opzichte van perceel 11. Perceel 15 bevatte ook relatief veel organische koolstof. Op basis van de gemeten uitdroging van de bodem op dit perceel in de zomer van 2022, is het waarschijnlijk dat er een grote mate van CO<sub>2</sub>-emissie heeft plaatsgevonden op dit perceel.

## 4.9.6 Gevoeligheid van de indicatoren

### 4.9.6.1 Resolutie in de tijd

De resolutie van de metingen gedurende het project was ingesteld op 1x per uur. Deze resolutie werd niet voor alle meetstations gehaald. Gemiddeld lag deze op 1.5x per uur. Voor indicatoren 1 en 2 is de resolutie van de metingen van belang voor een juiste berekening van de indicator. Op zandpercelen lagen de vertragingen tussen de 6 en 20 uur. Een resolutie van 1x per uur is daarmee een minimale vereiste om een verschil waar te nemen. Een hogere resolutie kan nuttig zijn, om deze bepaling nog accurater te maken. Indicatoren 3 en 5 kunnen ook met een veel lagere resolutie bepaald worden, zoals 1x per dag). Voor de berekening van indicatoren 4 en 5 moeten allereerst pieken in het signaal geanalyseerd worden. Deze analyse is ook afhankelijk van de resolutie in de tijd, zie de paragraaf 'analyse'.

Voor het gebruikte communicatienetwerk (TTN) geldt een fair-use policy van maximaal 30s zendtijd per dag per meetstation. De zendtijd van de meetstations was gemiddeld 7s per dag. Binnen de huidige opstelling is daarmee ruimte voor het verhogen van de meetresolutie in de tijd naar 2x per uur of maximaal 3x per uur. Wanneer een commercieel communicatienetwerk gebruikt wordt kan de resolutie mogelijk nog verder verhoogd worden.

### 4.9.6.2 Sensoren

Zoals is beschreven in het hoofdstuk validatie, zijn er verschillende uitdagingen in de kalibratie van 'cheapttech' sensoren, waardoor meetafwijkingen kunnen ontstaan. In de ontwikkeling van indicatoren op basis van deze sensoren is daarom zoveel mogelijk gezocht naar indicatoren die minder gevoelig zijn voor meetafwijkingen. Voor indicatoren 1,2 en 3 worden vertragingen berekend op basis van bases en maxima van pieken. Een afwijking in de absolute waarde van het bodemvocht heeft geen gevolgen voor deze berekening.

Voor indicator 5 wordt het gemeten bodemvochtgehalte (impliciet) vergeleken met het berekende verwelkingspunt. Hierbij kunnen meetafwijkingen direct zorgen voor een afwijking in de indicator.

Voor indicator 4 wordt het stagnatiepunt berekend. Deze berekening gebruikt de daling van het bodemvochtgehalte ten opzichte van de potentiële verdamping. De berekening van de indicator is daarmee gevoelig voor afwijkingen die ontstaan doordat de helling tussen de datapunten niet de helling van de kalibratiecurve volgt. Dit geldt eveneens voor indicator 6. Wanneer de hoogte van de metingen afwijkt maar de helling niet heeft dat geen gevolgen voor een juiste berekening van deze indicatoren. Echter om het stagnatiepunt te gebruiken als indicator voor watervasthoudend vermogen, zoals het verwelkingspunt en de veldcapaciteit, is het wenselijk dat de absolute waarde van de meting overeenkomt met het daadwerkelijke vochtgehalte in de bodem.

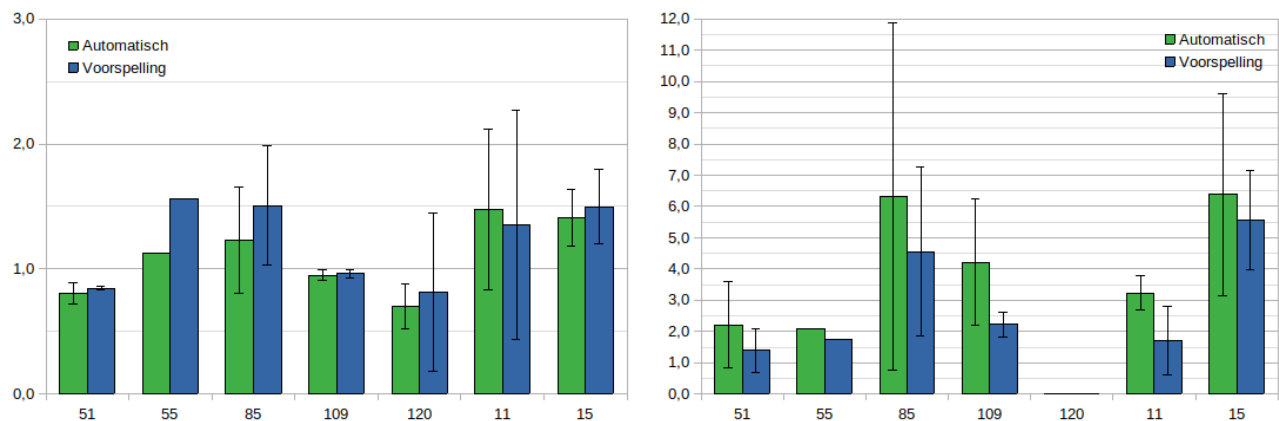
### 4.9.6.3 Analyse

Voor de berekening van indicatoren 1,2,4 en 5 is het noodzakelijk om pieken in het bodemvochtssignaal en in de neerslag te kunnen detecteren. De betrouwbaarheid van deze indicatoren is zeer afhankelijk van de kwaliteit van de piek detectie.

In het project zijn twee methoden van piek-detectie vergeleken: automatische piek detectie en voorspelling van pieken op basis van de metingen van een bovenliggend meetniveau.

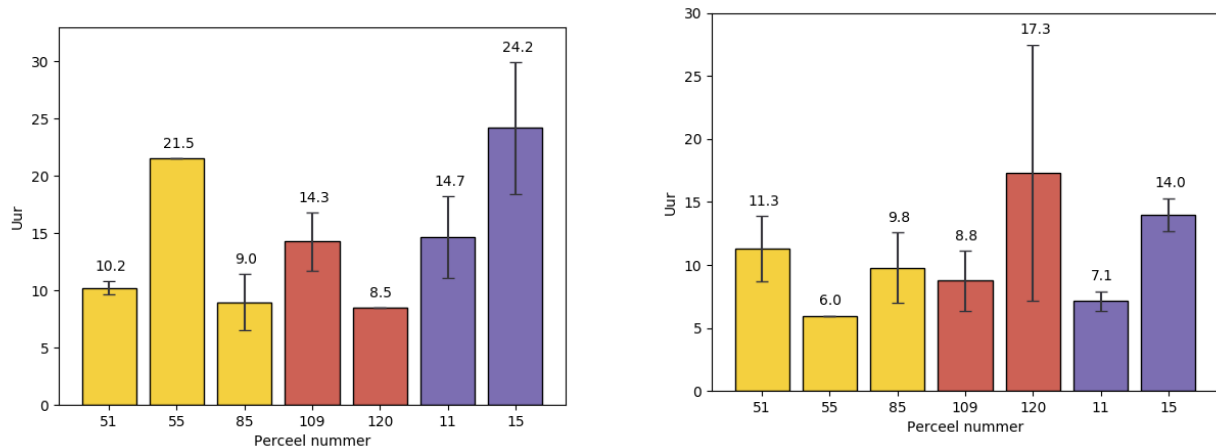
- Bij automatische piek detectie wordt het signaal van bodemvocht op een bepaalde diepte onderzocht op sterke afwijkingen tussen opeenvolgende metingen. Wijkt een datapunt sterker af dan een vooraf ingestelde grenswaarde, dan wordt deze als piek beschouwd.
- Voorspelling van pieken op basis van het bovenliggende meetniveau wordt gedaan door allereerst pieken in de neerslag te bepalen en vervolgens in het bodemvochtssignaal te onderzoeken of binnen een bepaalde tijd een piek volgt.

Om de betrouwbaarheid van beide methodes te testen zijn de pieken in het bodemvochtssignaal ook handmatig bepaald. De analyse laat zien dat met name in de diepere laag en in nattere bodems er meer pieken worden gedetecteerd met bovenstaande methodes, dan er handmatig bepaald zijn. Mogelijk wordt dit veroorzaakt door een meetfout bij hoge bodemvochtgehaltenes.



*Figuur 85. Verschil in pieken gedetecteerd met automatische piek detectie en voorspelling op basis van neerslag voor bodemvocht op 10cm (links) en 40cm diepte (rechts). De foutbalken geven de variatie (standaarddeviatie) aan tussen de verschillende meetpunten op het perceel.*

Van de onderzochte indicatoren zijn met name de indicatoren voor vertraging (SL1 en SL2) en bepaling van het stagnatiepunt (SL4 en SL6) gevoelig voor de manier waarop pieken gedetecteerd worden. In onderstaande grafiek is een voorbeeld gegeven van de berekende gemiddelde vertraging tussen neerslagpiek en bodemvochtpiek. De voorspelling van pieken geeft voor veel percelen significant andere waarden dan wanneer de pieken handmatig bepaald zijn en ook de onderlinge verhoudingen tussen percelen verschuiven. Het automatisch kunnen detecteren van pieken in het bodemvochtssignaal is een cruciale voorwaarde voor het breed kunnen inzetten van de ontwikkelde indicatoren. Het verder verbeteren van deze algoritmes is dus een belangrijk actiepoint voor vervolgonderzoek.



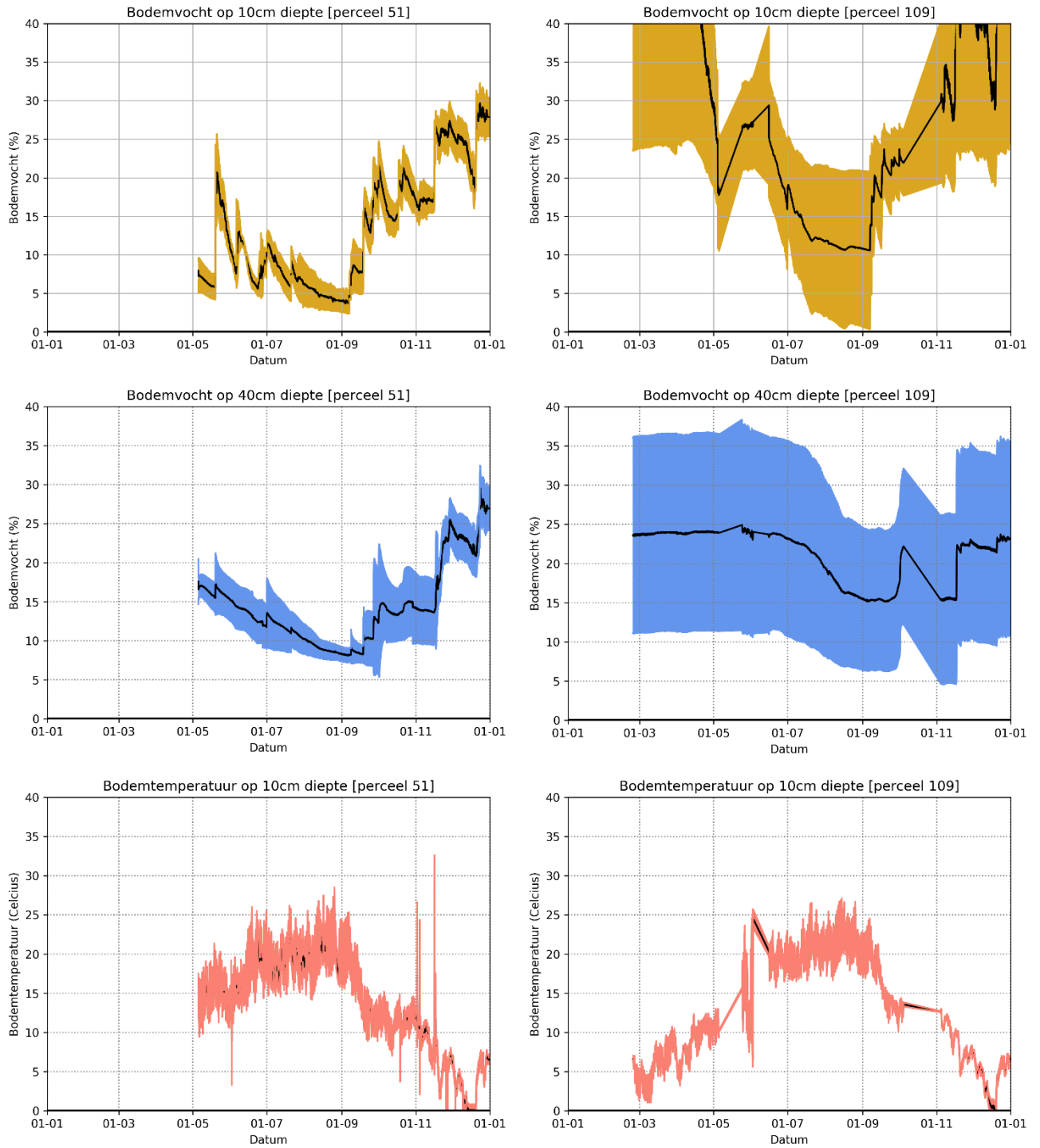
*Figuur 86. Indicator SL1 berekend op basis van handmatige bepaling van pieken (links) en voorspelling van pieken op basis van neerslag (rechts). Verschil in pieken gedetecteerd met automatische piek-detectie en voorspelling op basis van neerslag voor bodemvocht op 10cm (links) en 40cm diepte (rechts). De foutbalken geven de variatie (standaarddeviatie) aan tussen de verschillende meetlocaties op het perceel. De kleuren geven de bodemsoort aan, waarbij geel=zand, rood=klei en paars=veen.*

Indicatoren SL4 en SL5 zijn daarnaast ook afhankelijk van de berekening van verdamping. Voor de berekening van verdamping zijn meerdere methodes beschikbaar. De methode van Makkink gebruikt enkel zonne-instraling en temperatuur om de verdamping te berekenen, waarbij de methode van Pienman-Moneth ook rekening houdt met de luchtvochtigheid, het bodemvocht-gehalte, de bodemtemperatuur en de windsnelheid. Beide methoden zijn in dit project getest en de methode van Pienman-Moneth bleek gevoelig voor kleine afwijkingen in de data, die vaker voorkomen doordat meerdere variabelen meegenomen worden in de berekening. De methode van Makkink was een betere indicator van potentiële verdamping, omdat deze geen rekening houdt met het actuele bodemvochtgehalte. Voor deze indicator is het namelijk van belang om de bodemvochtdaling te vergelijken met wat er potentieel aan verdamping mogelijk zou zijn als het bodemvochtgehalte geen beperking zou zijn. Daarom is in de berekening van de indicatoren gekozen voor de Makkink methode. Voor vervolgonderzoek kan er gekeken worden naar een tussenvorm van beide methodes, waarbij rekening gehouden wordt met lokale luchtvochtigheid en windsnelheden, maar wel uitgegaan wordt van een ideaal bodemvochtgehalte.

#### 4.9.6.4 Ruimtelijke variatie

Om op basis van een vaste meetopstelling een uitspraak te kunnen doen op perceelsniveau is het van belang dat de meetopstelling op een representatieve plek op het perceel geplaatst wordt, ofwel er meerdere meetopstellingen geplaatst worden om ook de ruimtelijke variatie van de metingen te berekenen. Om een beeld te krijgen van de ruimtelijke variatie van de verschillende metingen zijn er gedurende het project op 6 sensorpercelen 3 meetopstellingen op uiteenlopende punten op het perceel geplaatst. Bovenstaande figuren geven een beeld van de variatie tussen de bodemvochtmetingen op 10cm, 40cm en temperatuurmeting op 10cm.

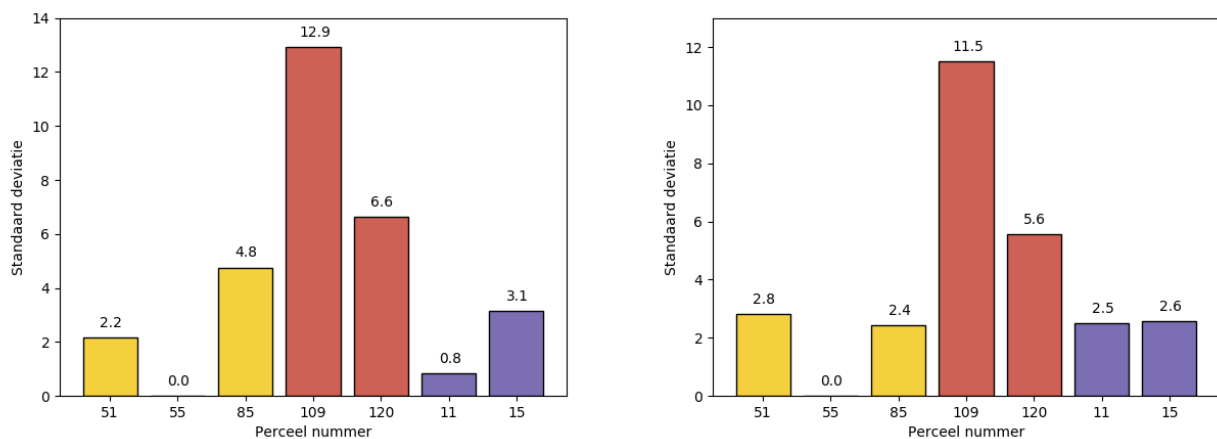




Figuur 87. Metingen van bodemvocht op 10cm diepte, 40cm diepte en bodemtemperatuur op 10cm diepte, voor een perceel met weinig variatie (51, links) en een perceel met veel variatie (109, rechts) tussen de meetpunten. Het gekleurde oppervlak geeft de standaarddeviatie tussen de meetpunten weer.

De variatie tussen meetpunten verschilt sterk tussen het type meting en de percelen. De meeste ruimtelijke variatie is te zien in de bodemvochtmetingen. De gemiddelde variatie tussen de meetpunten was 0.33 voor bodemvochtmetingen op 10cm diepte en 0.20 op 40cm diepte. Voor bodemtemperatuurmetingen lag deze variatie aanzienlijk lager: 0.09 op 10 cm diepte en 0.07 op 40cm diepte.

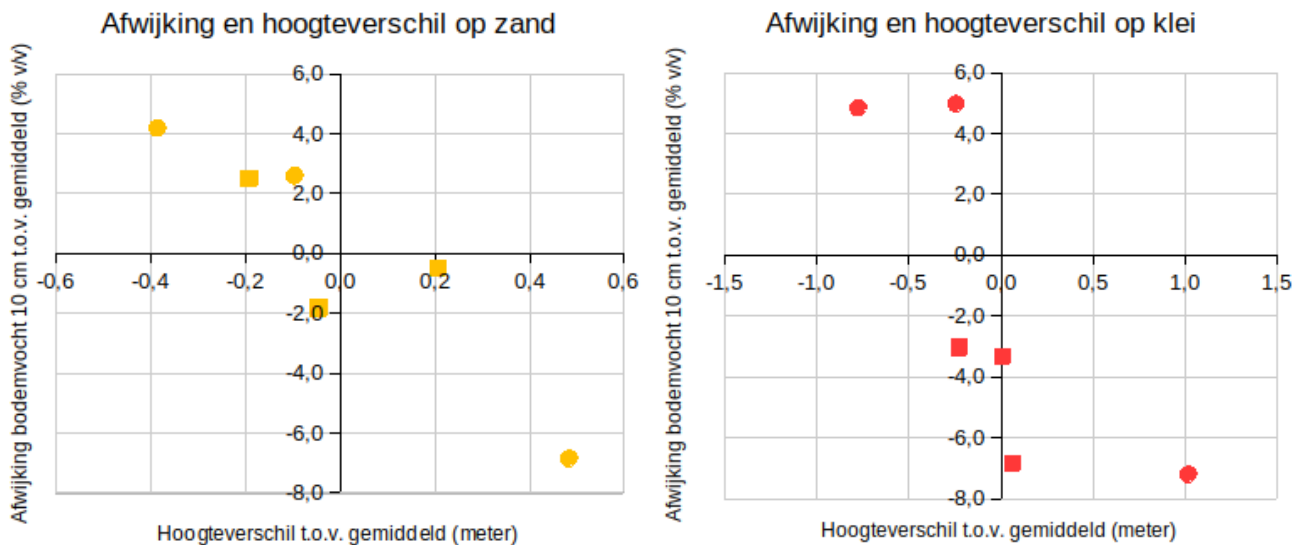
Op het kleiperceel 109 is de meeste ruimtelijke variatie tussen de bodemvochtmetingen gemeten, gevolgd door kleiperceel 120. Beide percelen lagen aan een dijk en hadden daardoor een groot hoogteverschil. Op beide percelen stond 1 sensor op de dijk. Ook waren er op beide kleipercelen lokale verschillen in bodemopbouw. Zo was op perceel 109 de dijk rijker in zand en was op perceel 120 nabij de rivier meer zand aanwezig in de bodem.



Figuur 88. Standaarddeviatie (% v/v) tussen meetpunten voor bodemvocht op 10cm diepte (links) en 40cm diepte (rechts). De kleuren geven de bodemsoort aan, waarbij geel=zand, rood=klei en paars=veen.

Op de zand- en veenpercelen lag de variatie tussen de meetpunten aanzienlijk lager: 0.8 - 4.8% (v/v). De variatie op percelen 85 en 15 trad voornamelijk op in de zomer. Op beide percelen droogde de bodem op 1 meetpunt verder uit dan op de andere twee meetpunten.

Voor zowel klei- als zandpercelen was er een relatie zichtbaar tussen de hoogte van het maaiveld en de afwijking van de bodemvochtmeting op 10cm diepte ten opzichte van het gemiddelde. Op de zandpercelen waren de lageregelegen meetpunten natter en op de kleipercelen was er een duidelijk verschil tussen de meetpunten in het lageregelegen deel van het perceel en de meetpunten op de dijk. Hoger gelegen punten kunnen minder bodemvocht bevatten in de toplaag door afspoeling naar lageregelegen delen en doordat optrekkend vocht een grotere afstand moet afleggen. In de kleipercelen speelt tevens de bodemopbouw mee, doordat de dijk op perceel 109 duidelijk meer zand bevatte. Op de veenpercelen was geen relatie zichtbaar tussen het hoogteverschil en de afwijking in bodemvochtgehalte. Op deze percelen was het hoogteverschil ook zeer beperkt.



Figuur 89. Afwijking van meetpunten voor bodemvocht op 10cm diepte in relatie tot het hoogteverschil voor zand (links) en klei percelen (rechts).

Voor het bodemvocht op 40cm is er geen duidelijke relatie zichtbaar tussen het hoogteverschil en de afwijking in het bodemvochtgehalte, met uitzondering van zandperceel 85. Opvallend is dat er eveneens geen duidelijk relatie is gevonden tussen de variatie in temperatuur en vochtgehalte. Nattere gedeelten van een perceel waren niet noodzakelijk de koudere gedeelten van een perceel. Mogelijk is het warmtetransport in de bodem voldoende snel om het verschil in verdamping en warmtecapaciteit te compenseren, of spelen andere factoren zoals beschutting een dominantere rol.

De ruimtelijke variatie in de metingen werkt op verschillende manieren door op de ruimtelijke variatie in de berekende indicatoren. In Tabel 35 is de relatieve standaarddeviatie van de indicatoren vergeleken met de bodemvochtmetingen. Over het algemeen is de ruimtelijke variatie tussen indicatoren groter dan tussen de metingen. Dit is met name het geval voor indicatoren voor vochtleverend vermogen (indicator 5 en 6). Dit betekent dat een klein verschil in bodemvochtgehalte een groot verschil maakt in of het gewas op dat meetpunt droogte ervaart of niet.

Voor de indicator voor infiltratie is gemiddeld de variatie gelijk aan de variatie in de metingen. Het valt op dat op relatief droge percelen minder ruimtelijke variatie is waargenomen dan op nattere percelen. Zoals genoemd is er een invloed van watervasthoudend vermogen op deze indicator. Daarnaast zal in een vervolgstadium ook onderzocht moeten worden hoe de indicator beïnvloed wordt door de intensiteit van regenbuien.

De indicatoren voor drainage geven een gemengd beeld. Deze indicatoren varieerden met name op de veenpercelen sterk tussen meetpunten ten opzichte van de bodemvochtmetingen. Op klei varieerden indicatoren voor drainage/infiltratie juist minder sterk dan de metingen. Op zand varieerde de gemiddelde vertraging sterker dan de metingen (SL3). Een deel van deze variatie is toe te schrijven aan de manier waarop deze indicatoren berekend worden. Zo is de gemiddelde vertraging op zand laag, waardoor met een gelijke afwijking de relatieve standaarddeviatie hoog uitvalt. Voor indicator 2 was de ruimtelijke variatie kleiner wanneer de vertraging wordt berekend met de basis van de piek.

Tot slot is bij de indicator voor watervasthoudend vermogen (het stagnatiepunt) minder ruimtelijke variatie te zien dan bij de oorspronkelijke metingen. Hier speelt echter mee dat het stagnatiepunt

alleen berekend kan worden als er sprake is van stagnatie in het bodemvocht signaal. Meetpunten waarbij dit niet het geval was, zijn daarmee automatisch buiten beschouwing gelaten in de berekening van deze variatie en deze is daarmee logischerwijs kleiner.

*Tabel 35. Relatieve standaarddeviatie van indicatoren ten opzichte van de metingen van bodemvocht. Op perceel 55 was maar 1 meetpunt aanwezig en hier kon de ruimtelijke variatie niet berekend worden. Op perceel 120 was de data van twee meetpunten onvolledig, waardoor voor indicatoren 1 t/m 3 geen waarde berekend kon worden. Indicator 4 en 6 zijn alleen berekend als het stagnatiepunt bereikt is gedurende de proefperiode.*

Perceel	Dataset	51	55	85	109	120	11	15
Bodemvocht 10 cm	0,34 ± 0,31	0,21	-	0,21	0,50	0,88	0,02	0,21
Bodemvocht 40 cm	0,20 ± 0,18	0,20	-	0,10	0,55	0,21	0,07	0,07
SL1 (infiltratie, vertraging grote poriën en gangen)	0,20 ± 0,09	0,06	-	0,28	0,18	-	0,24	0,24
SL2 (drainage, vertraging grote poriën en gangen)	0,61 ± 0,21	0,32	-	0,75	0,79	-	0,72	0,45
SL3 (drainage gemiddelde vertraging)	0,59 ± 0,43	0,77	-	0,98	0,14	0,10	1,12	0,40
SL4 Stagnatiepunt	0,25 ± 0,15	0,17	-	-	0,17	0,20	-	0,47
SL5 (% verschil met VP)	1,56 ± 2,87	0,57	-	0,32	7,40	0,44	0,00	0,65
SL6 (% tijd onder stagnatiepunt)	0,89 ± 0,58	0,41	-	1,40	1,08	1,41	-	0,14

Tijdens de plaatsing van de meetstations is, waar mogelijk, 1 van de meetstations op een 'representatieve' plek geplaatst en zijn de andere twee meetstations op twee uiteenlopende plekken op het perceel geplaatst. In bijna alle gevallen gaf het meetstation op de representatieve plek inderdaad het gemiddelde van het perceel weer.

In de praktijk is gezien dat het voor de gebruiker lastig is om meerdere vaste meetpunten op het perceel te hebben, waar tijdens bemesting en maaien rekening mee moet worden gehouden. Daarnaast brengen meerdere meetpunten ook extra kosten met zich mee. Gezien deze praktische belemmeringen en bovenstaande bevindingen zou meer tijd investeren in het selecteren van een representatieve plek op het perceel, mogelijk meer opleveren dan extra meetpunten.

Zoals beschreven is de ruimtelijke variatie in de bodemvochtmetingen voor een deel te verklaren door hoogteverschil. Daarnaast speelden op sommige locaties ook lokale verschillen in bodemopbouw een rol, maar dan met name op uithoeken van het perceel, zoals op een dijk. Uit de analyse komt daarnaast naar voren dat of het gewas droogte ervaart op een meetpunt, sterker varieert dan het gemeten bodemvochtgehalte. In het selecteren van een representatieve plek is het daarom van belang ook de ruimtelijk variatie in droogtestress mee te nemen. Dit kan gedaan worden door te kijken naar verkleuring op satellietbeelden van het perceel in droge jaren.

Aanbevolen criteria voor het bepalen van een representatieve plek zijn daarmee:

- De hoogte van het maaiveld
- Lokale verschillen in bodemopbouw
- De historische droogtestress (op basis van satellietdata)

Met deze criteria is de representativiteit van een meetpunt waarschijnlijk goed in te schatten voor de bodemvochtmeting, de droogtestress en het watervasthoudend vermogen. Lokale verschillen in bodemopbouw zijn veelal bekend bij de gebruiker van het perceel, evenals extreme plekken op het perceel wanneer het gaat om drainage en infiltratie (plasmvorming). Als toevoeging of alternatief kan er ook voor gekozen worden om alvorens de plaatsing van de sensoren op verschillende plekken op het perceel een visuele inspectie uit te voeren op bodemopbouw en verdichting, zoals in de bodemconditiescore systematiek, en daar een gemiddelde locatie uit te kiezen.

## 5. Conclusie en discussie

De vitaliteit van de bodem is een onderwerp dat steeds meer onder de aandacht komt van grondgebruikers, land(goed)eigenaren en beleidsmakers. Eenvoudig te interpreteren kwaliteitsindicatoren helpen om het effect van beheermaatregelen op de vitaliteit van de bodem te monitoren. Huidige bodemindicatoren richten zich echter voornamelijk op de vruchtbaarheid van de bodem en het ontbreekt nog aan eenvoudige indicatoren voor andere ecosysteemdiensten, waaronder biodiversiteit, waterregulatie en het beperken van broeikasgasemissies. Tegelijkertijd zijn uitgerekend deze ecosysteemdiensten steeds harder nodig om agrarische productie te ondersteunen en de negatieve effecten van klimaatverandering tegen te gaan.

In het project Sensorisch Landschap onderzoeken we of we deze onderbelichte ecosysteemdiensten kunnen monitoren door de inzet van nieuwe technieken: eDNA en cheaptech IoT sensoren. Hiermee willen we landbouwers een instrumentarium geven om het effect van extra beheermaatregelen op bodemvitaliteit en ecosysteemdiensten inzichtelijk te maken. Dit inzicht is nodig om grondeigenaren en beleidsmakers een objectieve basis te bieden om landbouwers te kunnen belonen voor hun extra inzet.

Omdat de toepassing van deze technieken in de praktijk nog veel werk vereist is het project opgedeeld in verschillende fases. Dit rapport beschrijft de resultaten van de eerste fase van het project, waarin is gefocust op de validatie van de technieken en een verkennende data-analyse is uitgevoerd om te identificeren welke metingen van toegevoegde waarde zijn voor de bepaling van nieuwe bodemindicatoren. Daarbij zijn reeds eerste rekenmethodes ontwikkeld om te komen tot een aantal prototype bodemindicatoren. In de vervolgfase zullen deze prototype indicatoren met meerjarenmetingen gevalideerd en verfijnd worden, met als doel deze te integreren in de Open Bodem Index (OBI).

### 5.1 Validatie Sensoren

Voor de ontwikkeling van eDNA analyse als gangbaar meetinstrument zit de grootste uitdaging in het kunnen interpreteren van de grote hoeveelheid data. Daarvoor is er in deze fase een groot aantal percelen (146) bemonsterd en geanalyseerd. Voor de 'cheaptech' sensormetingen is de betrouwbaarheid van de metingen de grootste uitdaging en is er daarom gekozen om juist intensief te meten op een klein aantal percelen (7).

De sensormetingen maakten gebruik van het open Source LoRa netwerk. Het netwerk is zeer geschikt voor de beoogde metingen, maar heeft op het platteland geen volledige (64%) dekking. Wanneer dit netwerk in een (vervolg) project wordt toegepast, moet rekening gehouden worden met investering in extra gateways om de dekking lokaal te versterken. De meetkasten, die ontworpen zijn voor metingen in een stedelijke situatie, bleken onvoldoende robuust voor toepassing in het veld. Om de onderhoudsgevoeligheid te verlagen, is een vernieuwd prototype ontwikkeld die in vervolgprojecten ingezet kan worden. De geteste bodemvochtsensoren bleken breed toepasbaar op zandgronden. Voor klei en veenbodems kunnen ze ingezet worden voor droogtemonitoring, maar ze zijn minder geschikt om in natte perioden verschillen aan te tonen. De kalibratie van de bodemvochtsensoren is bij alle bodemtypes een aandachtspunt. Dit betekent dat sensoren direct toepasbaar zijn voor de berekening van indicatoren gebaseerd op 'relatieve verschillen', maar een betere kalibratie nodig is voor indicatoren gebaseerd op absolute waarden.

Geteste CO<sub>2</sub> sensoren kunnen op korte termijn gebruikt worden in eenvoudige (draagbare) CO<sub>2</sub> kamers om van gestoken monsters de CO<sub>2</sub> uitstoot te meten. Op de lange termijn zouden soortgelijke kamers ook real-time kunnen meten in het veld, mits de verstoring van de meting bij een hoge relatieve luchtvochtigheid (>85%) vermeden of exact gekwantificeerd kan worden. In veldmetingen van de CO<sub>2</sub> concentratie van de lucht boven het maaiveld zijn pieken te observeren na bemesting en trends van veenoxidatie zichtbaar. Er zijn op dit moment echter veel te weinig meetpunten van CO<sub>2</sub> in Nederland om een inschatting te maken of deze observaties ook kwantitatief te relateren zijn aan lokale fluxen.

## 5.2 Real-time data

Data van sensoren kan ook real-time worden toegepast voor het maken van keuzes in het beheer. In dit project zijn twee gebruiksscenario's onderzocht: beregeningsadvies en bemestingstiming in het voorjaar. De kwaliteit van een bergingsadvies blijkt zeer gevoelig voor afwijkingen in de sensormetingen en is daarnaast ook afhankelijk van de schatting van het verwelkingspunt, waar ook fouten kunnen optreden. Bovendien blijkt dat zelfs tijdens een extreme droogte, zoals in 2022, relatief weinig gebruikers ervoor (kunnen) kiezen om te beregenen.

De bodemtemperatuurmetingen zijn voldoende betrouwbaar om input te geven voor de bemestingstiming. Voor bemesting met kunstmest kunnen bodemtemperatuurmetingen direct dienen als alternatief voor de Tsom.

## 5.3 Prototype indicatoren voor bodemvitaliteit

### 5.3.1 Indicatoren op basis van sensordata

Tabel 36 geeft een lijst van prototype indicatoren weer die in deze fase zijn geïdentificeerd en/of ontwikkeld op basis van de data-analyse van de sensor-metingen in relatie met gangbare metingen, referentiemetingen, eDNA metingen en bestaande OBI-indicatoren. Relaties tussen prototype indicatoren op basis van sensormetingen berusten op eerste observaties op 7 percelen.

*Tabel 36. Overzicht van ontwikkelde prototype indicatoren op basis van sensordata die ontwikkeld zijn in deze studie.*

Prototype indicator	Proces of functie waarvoor de indicator indicatief is	Status
Vertraging tussen neerslag- en bodemvochtpieken in de toplaag (10cm)	Infiltratie, ecosysteemdienst waterregulatie	Toepasbaar op alle ondergronden, indicatief voor infiltratie en drainage via grote poriën en gangen. De invloed van watervasthoudend vermogen op de interpretatie moet nader onderzocht worden.
Vertraging tussen bodemvochtpieken in de toplaag (10cm) en diepere laag (40cm)	Drainage, ecosysteemdienst waterregulatie	
Gemiddelde vertraging tussen toplaag (10cm) en diepere laag (40cm)	Drainage, ecosysteemdienst waterregulatie	Toepasbaar op alle ondergronden. Correctie nodig voor watervasthoudend vermogen middels een modelmatige aanpak.
Het stagnatiepunt	Watervasthoudend vermogen, ecosysteemdienst waterregulatie	Toepasbaar op zand. Op klei en veen nog onvoldoende interpreteerbaar. Bestaande schattingen van watervasthoudend vermogen op basis van bodemchemie hebben nog de voorkeur.

Gedeelte van het groeiseizoen dat het bodemvocht nabij het stagnatiepunt ligt	Vochtleverend vermogen, ecosysteemdienst waterregulatie	Toepasbaar op zand, klei en veen, mits er gedurende de meetperiode sprake is van stagnatie. Te verbeteren door bodemvocht en beworteling in diepere laag mee te nemen
Verskil met het verwelkingspunt	Vochtleverend vermogen, ecosysteemdienst waterregulatie	Met geteste sensoren te onbetrouwbaar. Accurateresensoren of betere kalibratie is nodig.

### 5.3.2 Indicatoren op basis van eDNA data

Om een uitspraak te kunnen doen over de bodemgezondheid van een specifiek perceel is het van belang inzicht te krijgen in de plaatselijke vruchtbaarheid en vitaliteit, i.e. weerbaarheid, van de bodem. Aangezien verschillende factoren en variabelen als biodiversiteit, nutriëntencycli en bodemstructuur hierbij een belangrijke rol spelen en elkaar onderling beïnvloeden is het essentieel dat er voor een multidisciplinaire aanpak wordt gekozen. Naast chemische en fysische analyses is het van belang ook de biologische eigenschappen in kaart te brengen. Technologische ontwikkelingen in (e)DNA-onderzoek, *next-generation sequencing* en (functionele) databases hebben het mogelijk gemaakt om de bodembioïologie makkelijker en sneller in kaart te brengen. In deze studie zijn prototype indicatoren ontwikkeld die toegepast kunnen worden om bodembioïologie mee te nemen in de evaluatie van de effectiviteit van beheermaatregelen. Bovendien kunnen bepaalde indicatoren gebruikt worden als basis voor een beloningssysteem voor het stimuleren van ondergrondse biodiversiteit. Tabel 37 geeft een overzicht van potentiële biologische indicatoren op basis van een eDNA analyse die in deze studie onderzocht zijn. In de tabel is opgenomen voor welk proces of eigenschap van de bodem de betreffende indicator indicatieve waarde heeft. Bovendien is aangegeven in hoeverre de indicator al toepasbaar is, of dat er nader onderzoek nodig is.

*Tabel 37. Overzicht van prototype indicatoren op basis van eDNA data die ontwikkeld zijn in deze studie. De tweede kolom geeft weer voor welke proces de betreffende indicator een indicatieve waarde heeft. In de laatste kolom is de weergegeven of er voldoende basis is om de indicator in de praktijk toe te gaan passen, of dat nader onderzoek nodig is.*

Prototype indicator	Proces of functie waarvoor de indicator indicatief is	Status
Totale hoeveelheid eDNA van prokaryoten en eukaryoten.	Hoeveelheid bodemleven. Veel eDNA indiceert een stabiele bodem.	Toepasbaar, wenselijk om streefwaarde te ontwikkelen
Aantal unieke DNA-fragmenten van prokaryoten en eukaryoten	Ondergrondse biodiversiteit. Veel unieke eDNA fragmenten indiceert een stabiele bodem.	Toepasbaar, wenselijk om streefwaarde te ontwikkelen
Aandeel en absolute hoeveelheid stikstof fixerende bacteriën	Stikstof vastlegging	Toepasbaar, wenselijk om streefwaarde te ontwikkelen
Ammonium oxiderende organismen	Maat voor nitrificatie (agronomische doelstelling) en stikstofdruk (natuurdoelstelling)	Nader onderzoek wenselijk
Hoeveelheid eDNA van denitrificerende bacteriën/ lachgas afbrekende bacteriën	Mogelijk een indicator die gebruikt kan worden om lachgasemissie te beperken	Nader onderzoek noodzakelijk
Hoeveelheid eDNA van methaan producerende organismen	Methaanproductie in de bodem	Nader onderzoek noodzakelijk
Hoeveelheid eDNA van methaan oxiderende organismen	Methaanafbraak in de bodem	Nader onderzoek noodzakelijk
Hoeveelheid en aandeel sulfaat reducerende bacteriën	Anaerobe omstandigheden	Toepasbaar, wenselijk om streefwaarde te ontwikkelen



Schimmel/bacterie ratio	Afbraaksnelheid van organische stof	Toepasbaar, wenselijk om streefwaarde te ontwikkelen
Arbusculaire mycorrhiza	Indicatief voor een gezond graslandsysteem met hoge kruidenrijkheid.	Toepasbaar, wenselijk om streefwaarde te ontwikkelen
Hoeveelheid eDNA van regenwormen	Mogelijk indicatief voor activiteit van regenwormen. Matige indicator voor aantal regenwormen.	Nader onderzoek noodzakelijk
Hoeveelheid eDNA van protozoa	Onduidelijk	Nader onderzoek noodzakelijk

## 5.4 Open Source

Één van de doelstelling van Sensorisch Landschap is om open source te werken. Dit houdt in dat de verzamelde data en ontwikkelde methoden, zoveel mogelijk publiek beschikbaar worden gesteld voor personen en organisaties om te gebruiken in hun eigen onderzoek. In deze fase van het project zijn er twee resultaten die reeds publiek beschikbaar gesteld kunnen worden.

- De firmware waarmee de meetkasten en sensoren worden aangestuurd
- Dataset van de verrichte metingen en verzamelde perceel data

De firmware die is ontwikkeld voor het sensorplatform is publiek beschikbaar via de github repository: <https://github.com/debaai/SensorischLandschap/>

De perceel data omvat chemische metingen, bodemconditiescore, eDNA resultaten, sensormetingen, data van weerstations, radargegevens, resultaten van de Open Bodem Index, satellietbaan (NDVI), potentiële broeikasgasemissies, vegetatie-opnames, regenwormen tellingen, nematoden tellingen, PLFAs en gerapporteerd management.

Voor het publiek delen van perceel data is een keuze neergelegd bij de eindgebruiker van het perceel. In de meeste gevallen zijn dit agrariërs die het perceel beheren. Via het invullen van een vragenlijst konden gebruikers kiezen voor drie opties voor het delen van data:

1. Alleen gebruiken voor dit onderzoek. De data van het perceel wordt niet publiek gedeeld.
2. Als open data, maar zonder GPS gegevens. In dit geval wordt de exacte locatie van het perceel niet publiek gedeeld. Enkel de provincie waar het perceel zich bevindt is beschikbaar in de data.
3. Als open data, met gps-gegevens. De data wordt gedeeld inclusief de exacte locatie van het perceel.

Voor de meerderheid van de percelen (64) hebben de gebruikers aangegeven de data beschikbaar te stellen als open data. Daarnaast zijn er 38 percelen waarvoor geen keuze is doorgegeven door de gebruiker. In dit geval zijn de percelen standaard opgenomen in de dataset als 'open data zonder locatie gegevens'.

Tabel 38 Aantal percelen per categorie

Categorie	Aantal percelen
Totaal	140
Data alleen te gebruiken voor dit onderzoek	38
Open data, zonder GPS gegevens	30
Open data, met GPS gegevens	34
Geen keuze doorgegeven door de gebruiker	38
<b>Totaal in publieke dataset</b>	<b>102</b>

De publieke dataset is te downloaden via: [data.sensorischlandschap.nl](https://data.sensorischlandschap.nl) in verschillende bestandsformaten. De repository is voorzien van een beschrijving en legenda.

## 5.5 Bodemleven & ondergrondse biodiversiteit

Met de toegepaste DNA-techniek kunnen 238 tot 3521 soort(groepen) per monster worden waargenomen. Met eDNA analyses zijn oude graslanden, natuurpercelen, landbouwpercelen en akkers duidelijk van elkaar te onderscheiden door hun type bodemleven. Ook is er duidelijk verschil in bodemleven zichtbaar tussen rivierklei en dekzand. Wij zien geen direct onderscheid tussen gangbaar en biologisch beheerde graslanden. Het onderscheid zit daar vooral in welke specifieke beheermaatregelen op het perceel worden genomen. Sommige parameters (beheermaatregelen of bodemeigenschappen) correleren met de absolute hoeveelheid bodemleven, terwijl andere parameters alleen de samenstelling en verhoudingen tussen soorten beïnvloeden. Zo is de totale hoeveelheid eDNA en de eDNA diversiteit lager op percelen die sterker verdicht waren, wat aangeeft dat het bodemleven zowel kwantitatief als kwalitatief afneemt naarmate percelen verder verdicht zijn.

## 5.6 Bovengrondse biodiversiteit

De totale hoeveelheid eDNA van alle (micro)-organismen bij elkaar is het hoogste op percelen met grote kruidenrijkdom. Interessant genoeg is er geen relatie gevonden tussen de eDNA diversiteit (aantal unieke DNA-fragmenten) en de kruidenrijkdom. De diversiteit onder de grond is dus niet af te lezen uit de vegetatie en vice versa. Wel zijn er verschillende functionele groepen van micro-organismen die een (sterk) positieve of negatieve relatie laten zien met kruidenrijkdom, waaronder de hoeveelheid stikstofbindende bacteriën en het aandeel ammonium oxiderende archaea. Dit reflecteert mogelijk een onderliggende relatie met stikstof. Stikstofbindende bacteriën zijn in het voordeel bij een beperkt aanbod van stikstof vanuit depositie en bemesting. Nitrificerende archaea profiteren daarentegen van een hoge aanvoer van ammonium.

Stikstofbindende bacteriën kunnen worden voorspeld met gangbare metingen en zijn daarmee mogelijk al sneller inpasbaar in de OBI, als indicator voor biodiversiteit. Het aandeel nitrificerende organismen kan niet goed voorspeld worden op basis van gangbare analyses en is een directe toegevoegde waarde van aanvullende eDNA analyse.

## 5.7 Stikstof

Vanuit de literatuur is bekend dat het aandeel ammonium-oxiderende organismen mogelijk dient als indicator voor influx van ammonium-stikstof op een perceel. De aanwezigheid van deze organismen op basis van eDNA analyse is inderdaad sterk gerelateerd aan de wijze waarop stikstof wordt aangevoerd, maar niet aan de totale stikstofvoorraad. Percelen die bemest worden met drijfmest

(hoog in  $\text{NH}_4$ ) bevatten meer van deze organismen, dan percelen waar vaste mest of kunstmest wordt gebruikt. In landbouwpercelen is de aanwezigheid van deze organismen wenselijk zodat  $\text{NH}_4$  snel kan worden omgezet naar nitraat voor de plant en niet verloren gaat als  $\text{NH}_3$  aan de lucht. Ook in natuurpercelen en onbemeste percelen kan het aandeel van deze organismen hoog zijn, wat mogelijk een gevolg is van ammonium-depositie.

## 5.8 Vermindering van broeikasgasemissies

Of een perceel netto  $\text{CO}_2$  vastlegt hangt af van de opname door het gewas en de respiratie (uitstoot) van de bodem. De potentiële  $\text{CO}_2$  uitstoot van onderzochte bodems werd sterk bepaald door het gehalte organische koolstof (gangbare meting) en in nog sterkere mate door microbiële koolstof op basis van PLFA (referentiemetingen) en vertoonden een relatie met het totale DNA. Veenbodems hadden daarmee de hoogste potentiële  $\text{CO}_2$  uitstoot, tot een maximum van  $1.6\text{kg CO}_2/\text{hectare / uur}$ . Een uitzondering op deze regel was o.a. één bodem waarbij op basis van eDNA vastgesteld werd dat er sprake was van een sterk anaeroob bodemleven (met een grondwaterstand van 5cm onder het maaiveld).

Er is een relatie gevonden tussen de hoeveelheid denitrificerende bacteriën (bacteriën die lachgas produceren) en de lachgasuitstoot zoals gemeten in het laboratorium. Ook zijn er lachgas afbrekende bacteriën gemeten. Toekomstig onderzoek kan vaststellen of het optimaliseren van de ratio lachgas producerende en lachgas afbrekende bacteriën de lachgas uitstoot van een perceel kan verkleinen. Methaan werd op de meeste percelen netto opgenomen en dit gebeurde met name op zandgronden. Er is geen relatie gevonden tussen methaan uitstoot en de hoeveelheid eDNA van methaan producerende of reducerende bacteriën. Methaanuitstoot van de bodem is echter alleen relevant voor natte veenpercelen. Er waren echter slechts zeven veenpercelen in de dataset waardoor het aantonen van significante correlaties tussen bodemleven en methaanuitstoot niet mogelijk was.

## 5.9 Waterregulatie

Een goede waterregulatie op het perceel is van belang voor productiviteit, maar ook voor biodiversiteit en broeikasgasemissies. Met de verzamelde sensordata zijn 6 prototype indicatoren onderzocht voor infiltratie (1), drainage (2), watervasthoudend vermogen (1) en vochtlevering (2). De indicatoren voor drainage en infiltratie zijn toepasbaar op alle bodemtypes en ook inzetbaar met andere typen sensoren, zolang de resolutie voldoende hoog is (1 meting per uur of vaker). Ze voegen relatief veel waarde toe, omdat infiltratie, en met name drainage, niet routinematig gemeten (kunnen) worden en de aanvoer en afvoer van regenwater essentieel is voor bodemvitaliteit en verschillende ecosysteemdiensten. De onderzochte indicator voor watervasthoudend vermogen (het stagnatiepunt) is inzetbaar op zandbodems. De interpretatie van het stagnatiepunt ten opzichte van het verwelkingspunt is echter nog onduidelijk en met name op klei en veen is daarom verder onderzoek nodig. Hier zijn bestaande schattingen op basis van chemische data op dit moment nog betrouwbaarder. De onderzochte indicatoren voor vochtlevering vanuit de toplaag presteerden beter dan schattingen op basis van grondwaterstand en bodemsoort en kunnen verder verbeterd worden door ook worteldiepte en vochtlevering vanuit de diepere bodemlagen mee te nemen.

## 5.10 Vervolgonderzoek

### 5.10.1 Combineren van eDNA en sensoren

In deze fase van het project zijn eDNA analyses en sensoren maar op een klein aantal percelen naast elkaar ingezet, waardoor het nog niet mogelijk is statistische verbanden aan te tonen. Wel zijn er interessante observaties te maken over het samenspel van beheer, bodemleven, bodemfysische parameters en waterregulatie. Het is bekend dat verdichting van de bodem een negatief effect heeft op infiltratie en drainage, afhankelijk waar de verdichting optreedt. Dit was terug te zien in de vergelijking van twee klei-percelen, maar zowel op zand als op veen waren er uitzonderingen wanneer het verdichte perceel (uitzonderlijk) veel regenwormen bevatte. Voor alle percelen geldt dat lagere droogteschade samenvalt met een groter aantal pendelaars in de bodem. Tegelijkertijd wordt ook bodemleven negatief beïnvloed door verdichting. Door eDNA en sensoren in vervolgonderzoek op een groter aantal percelen parallel toe te passen kan meer inzicht verkregen worden in deze interacties en waar de grenzen liggen wanneer bodemfuncties in het gedrang komen.

### 5.10.2 Beheermaatregelen en ecosysteemdiensten

In deze fase van het onderzoek zijn er statistische analyses gedaan om verbanden te identificeren tussen beheermaatregelen, indicatoren voor bodemleven en ecosysteemdiensten op een groot aantal percelen. Dit is van belang om de werking van de meettechnieken op meerdere bodemsoorten en beheersituaties aan te tonen. Echter bleek ook juist de monitoring van gerichte meerjarige experimenten met beheermaatregelen waardevol om scherpere inzichten te krijgen, zoals de invloed van kunstmest op het bodemleven op de proefpercelen bij de Ossenkampen. In een vervolgfase zal de nadruk liggen op de monitoring van experimenten met beheermaatregelen. De resultaten van dit onderzoek geven reeds een aantal aanknopingspunten waar metingen met eDNA en sensoren van grote meerwaarde kunnen zijn.

Verdichting wordt in dit onderzoek benadrukt als een belangrijk negatief effect op het bodemleven en de waterregulatie op graslandpercelen. De vervolgvraag is wat een gebruiker kan doen om de verdichting op te heffen en de bodemstructuur te verbeteren. In sommige gevallen kan het stimuleren van het bodemleven reeds helpen de negatieve effecten van verdichting op infiltratie en drainage te compenseren en mogelijk ook verdichting zelf tegengaan. Echter, als de bodemstructuur zo slecht is dat het bodemleven niet tot ontwikkeling komt, dan kan een mechanische ingreep nodig zijn om de ontwikkeling van een structuurrijke bodem in te zetten. Het is ook bekend dat (diep) ploegen een groot nadelig effect heeft op het bodemleven. Dit roept de volgende onderzoeksvragen op: welke bodems kunnen hersteld worden door het bodemleven te herstellen; In welke bodems is een mechanische ingreep noodzakelijk; Welke mechanische ingrepen zijn effectief tegen verdichting, maar hebben minder negatief effect op het (herstel van) het bodemleven? Het in deze fase ontwikkelde instrumentarium (combinatie van sensoren en eDNA) kan helpen om deze vragen te beantwoorden.

De prototype indicatoren voor biodiversiteit die in deze fase zijn geïdentificeerd hebben een sterke relatie met stikstof en in het geval van de ammonium oxiderende organismen ook een omgekeerde relatie met productiviteit. De biodiversiteit bovengronds is over het algemeen hoger op percelen met een beperkte gewasopbrengst. Er zijn echter uitzonderingen van percelen met een kruidenrijkdom op het niveau van natuurgraslanden met een hoge productiviteit (10-15 ton, >15 ton). Op het perceel met de hoogste opbrengst en kruidenrijkdom werd een verscheidenheid aan beheermaatregelen genomen, waaronder de toevoeging van micro-organismen, bokashi, precisiebemesting, vaste

rijpaden, lichtgewicht machines en water vasthouden. Voor vervolgonderzoek is het interessant om juist dit soort percelen nader te onderzoeken. Zo kunnen de onderlinge relaties tussen productiviteit, stikstof en biodiversiteit verder ontrafeld worden en onderzocht worden welke indicatoren specifiek zijn voor biodiversiteit in een hoogproductief grasland. Hierna kan de relatie worden gelegd met beheer.

De indicator voor ammonium oxiderende organismen kan daarnaast mogelijk toegepast worden op natuurpercelen, waar het doel ligt bij het behoud van bestaande biodiversiteit. Hierbij kan nader onderzocht worden of indicatoren op basis van eDNA analyses de effecten van (voorspelde) stikstofdepositie in de bodem kunnen kwantificeren en vervolgens gebruikt kunnen worden om het effect te bepalen van maatregelen om (de negatieve effecten van) stikstofdepositie te verminderen.

De opbouw van organische (kool)stof in de bodem is een belangrijk thema, zowel voor het verbeteren van het watervasthoudend vermogen van zandbodems als de vastlegging van koolstof in agrarische bodems. Potentiële CO<sub>2</sub> uitstoot lijkt vooral te worden beïnvloed door de (microbiële) koolstof in de bodem, wat betekent dat maatregelen om deze potentiële uitstoot te voorkomen nodig zijn om koolstof op te bouwen. De bodemtemperatuur en het bodemvochtgehalte spelen hierin een cruciale rol. In een vervolg kan gekeken worden 1) of de data van bodemvochtsensoren als input kan dienen voor bestaande rekenmodellen voor koolstofvastlegging en 2) of maatregelen die het bodemvocht verhogen, zoals bevoeiing, een causale relatie hebben met koolstofvastlegging.

### 5.10.3 Nader te verfijnen prototype indicatoren

Een aantal indicatoren op basis van eDNA zijn op korte termijn toepasbaar. Wat echter nog niet onderzocht is, is vanaf welke waardes een bepaalde indicator goed, matig of slecht zou moeten scoren. In de praktijk blijkt er vaak een geleidelijke schaal te zijn. Zo is het niet zo dat een grasland alleen maar veel of weinig bodemleven kent, maar zijn er ook veel graslanden die zich daartussen in bevinden. Het aanbrengen van harde grenzen voor kwaliteit is daarmee enigszins arbitrair. Als onderdeel van vervolgonderzoek dient vastgelegd te worden tussen welke waarde een bepaalde indicator slecht, matig of goed scoort. Een concreet voorbeeld is de bodemvoorraad P, waarbij een negatief verband zichtbaar is met bodemleven, maar nog geen streefwaarde gesteld kan worden.

## 6. Referenties

- Bax, I. & W. Schippers (1998) Ontwikkeling van botanisch waardevol grasland: veldgids. Dienst Landelijk Gebied, Utrecht, Publicatie / IKC Natuurbeheer, C-18, 88 pags. <https://edepot.wur.nl/336189>.
- Bouchez, T., Blieux, A. L., Dequiedt, S., Domaizon, I., Dufresne, A., Ferreira, S., ... & Ranjard, L. (2016). Molecular microbiology methods for environmental diagnosis. *Environmental Chemistry Letters*, 14(4), 423-441.
- Braun-Blanquet, J. (1932). Plant sociology. The study of plant communities. Plant sociology. The study of plant communities. First ed.
- Bünemann, E. K., Bongiorno, G., Bai, Z., Creamer, R. E., De Deyn, G., de Goede, R., ... & Brussaard, L. (2018). Soil quality—A critical review. *Soil Biology and Biochemistry*, 120, 105-125.
- CBS (2023). <https://www.cbs.nl/nl-nl/cijfers/detail/7140gras>
- Costa, O. Y., Raaijmakers, J. M., & Kuramae, E. E. (2018). Microbial extracellular polymeric substances: ecological function and impact on soil aggregation. *Frontiers in microbiology*, 9, 1636.
- Custódio, V., Gonin, M., Stabl, G., Bakhoun, N., Margarida Oliveira, M., Gutjahr, C., & Castrillo, G. (2022). Sculpting the soil microbiota. *The Plant Journal*, 109, 508–522.
- Doran, J.W. and Safley, M. (1997). Defining and Assessing Soil Health and Sustainable Productivity. In: Pankhurst, C., *et al.*, Eds., Biological Indicators of Soil Health, *CAB International*, Wallingford, 1-28.
- Faber, J.H. & van der Hout, A. (2009). Introductie van regenwormen ter verbetering van de bodem; literatuurstudie en veldinventarisatie Wageningen, Alterra, Alterra-rapport 1905.
- Huang, L., Chakrabarti, S., Cooper, J., Perez, A., John, S. M., Daroub, S. H. & Martens-Habbena, W. (2021). Ammonia-oxidizing archaea are integral to nitrogen cycling in a highly fertile agricultural soil. *ISME Communications*, 1:19, 1-12.
- Issa, A. A., Abd-Alla, M. H., & Ohyama, T. (2014). Nitrogen fixing cyanobacteria: future prospect. *Advances in biology and ecology of nitrogen fixation*, 2, 24-48.
- Jost, L., (2006) Entropy and diversity. *OIKOS*, 113(2), 363-375.
- Kumar, M., Yadav, A. N., Saxena, R., Rai, P. K., Paul, D., & Tomar, R. S. (2021). Novel methanotrophic and methanogenic bacterial communities from diverse ecosystems and their impact on environment. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 33, 102005.
- Kuypers, M. M. M., Marchant, H. K. & Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology*, 16, 263-276.
- Maul, Jude E., et al. (2019) Cropping system history and crop rotation phase drive the abundance of soil denitrification genes nirK, nirS and nosZ in conventional and organic grain agroecosystems." *Agriculture, Ecosystems & Environment* 273: 95-106.
- Morriën, E., Hannula, S. E., Snoek, L. B., Helmsing, N. R., Zweers, H., De Hollander, M., ... & Van Der Putten, W. H. (2017). Soil networks become more connected and take up more carbon as nature restoration progresses. *Nature communications*, 8(1), 1-10.

Ros GH, Verweij SE, Janssen SJC, De Haan J, & Fujita Y (2022). *An Open Soil Health Assessment Framework Facilitating Sustainable Soil Management*. Environmental Science & Technology, November.

Saleem, M., Hu, J., & Jousset, A. (2019). More Than the Sum of Its Parts: Microbiome Biodiversity as a Driver of Plant Growth and Soil Health. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 50(1), 145-168.

Schlatter, D., Kinkel, L., Thomashow, L., Weller, D., & Paulitz, T. (2017). Disease suppressive soils: new insights from the soil microbiome. *Phytopathology*, 107(11), 1284-1297.

Schloter, M., Nannipieri, P., Sørensen, S. J., & van Elsas, J. D. (2018). Microbial indicators for soil quality. *Biology and Fertility of Soils*, 54(1), 1-10.

Sims, A., Horton, J., Gajaraj, S., McIntosh, S., Miles, R. J., Mueller, R., ... & Hu, Z. (2012). Temporal and spatial distributions of ammonia-oxidizing archaea and bacteria and their ratio as an indicator of oligotrophic conditions in natural wetlands. *Water research*, 46(13), 4121-4129.

Toor, G. S., Yang, Y. Y., Das, S., Dorsey, S., & Felton, G. (2021). Soil health in agricultural ecosystems: current status and future perspectives. *Advances in Agronomy*, 168, 157-201.

van 't Veer, R. (2022) Monitoring van kruidenrijke graslanden in de Krimpenerwaard (Nederland, Provincie Zuid-Holland) - Monitoring of herb- and species rich grasslands in the Netherlands: Krimpenerwaard (provincie Zuid-Holland).

van 't Veer, R. (2020) Kruidenrijke graslanden in de Enge Wormer. Biodiversiteit, graslandherkenning en beheer. Van 't Veer & De Boer Ecologisch Advies & Onderzoeksbureau, Jisp.

Verweij S, Ros G, Fujita Y, & Riechelmann B (2023). *OBIC: Calculate the Open Bodem Index (OBI) Score*. <https://github.com/AgroCares/Open-Bodem-Index-Calculator2.0.4>.

Yadav, A. N., Kour, D., Kaur, T., Devi, R., Yadav, A., Dikilitas, M., ... & Saxena, A. K. (2021). Biodiversity, and biotechnological contribution of beneficial soil microbiomes for nutrient cycling, plant growth improvement and nutrient uptake. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 33, 102009.

Zhang, J., Van Der Heijden, M. G., Zhang, F., & Bender, S. F. (2020). Soil biodiversity and crop diversification are vital components of healthy soils and agricultural sustainability. *Frontiers of Agricultural Science and Engineering*, 7(3), 236.

Kögel-Knabner, I., Amelung, W., Cao, Z., Fiedler, S., Frenzel, P., Jahn, R., ... & Zech, W. (2010). Biogeochemistry of paddy soils. *Geoderma*, 157(1-2), 1-14.

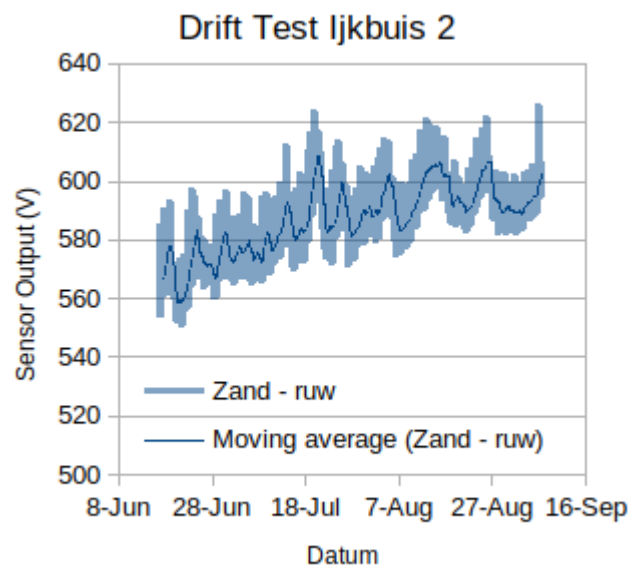
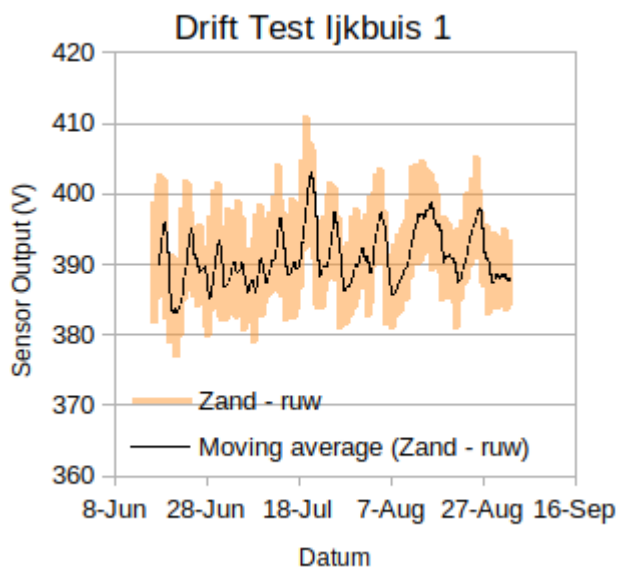
Tisdall, J. M., & Oades, J. M. (1982). Organic matter and water-stable aggregates in soils. *Journal of Soil Science*, 33(2), 141-163.

# Bijlage 1. Experimenten voor het bepalen van drift in bodemvochtsensoren

Om een indicatie te krijgen van drift in deze sensoren zijn metingen verricht in twee ijkbuizen. In de ijkbuizen is een bodem toegevoegd met een bekend vochtgehalte. In de bodem is een vocht-sensor en een temperatuur-sensor geplaatst en het geheel is waterdicht afgesloten.

## Drift Experiment 1

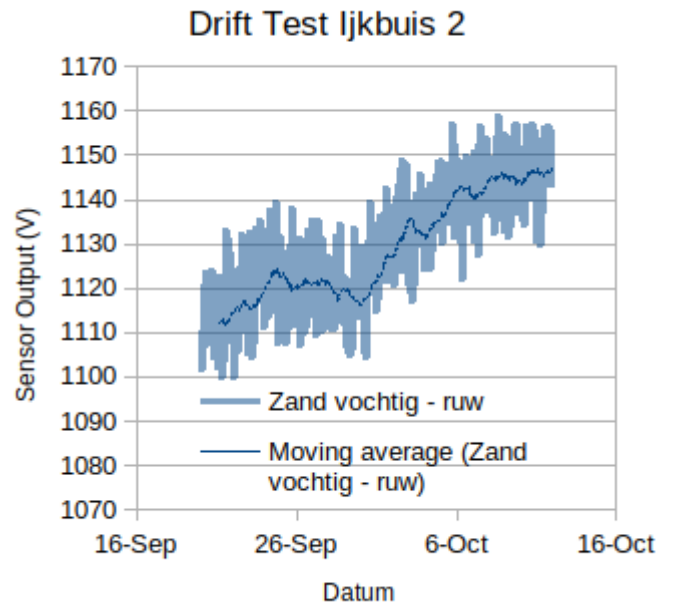
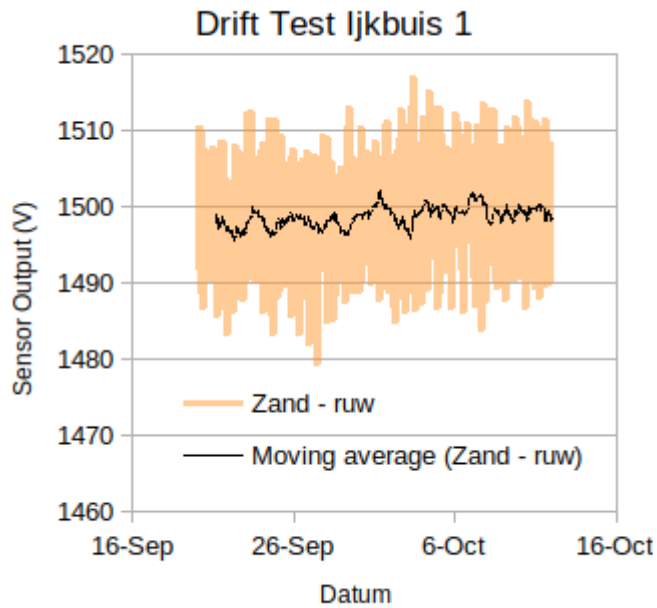
In dit experiment is getest met droog zand in ijkbuis 1 en licht vochtig zand (4% vocht) in ijkbuis 2. Uit de experimenten blijkt dat metingen gevoelig zijn voor temperatuur-effecten, zie meer informatie hierover in de volgende paragraaf. In ijkbuis 1 is de sensormeting over 3 maanden constant na correctie voor temperatuur-effecten. In ijkbuis 2 is sprake van een opwaartse trend (+6%). Gewicht bepalingen laten zien, dat het gewicht van ijkbuis 2 is toegenomen door het aantrekken van vocht. De toename in sensor-output is daarbij exact gelijk aan deze toename in vochtgehalte (+6%). De waargenomen trend is daarmee te verklaren door het aantrekken van vocht en niet door drift.





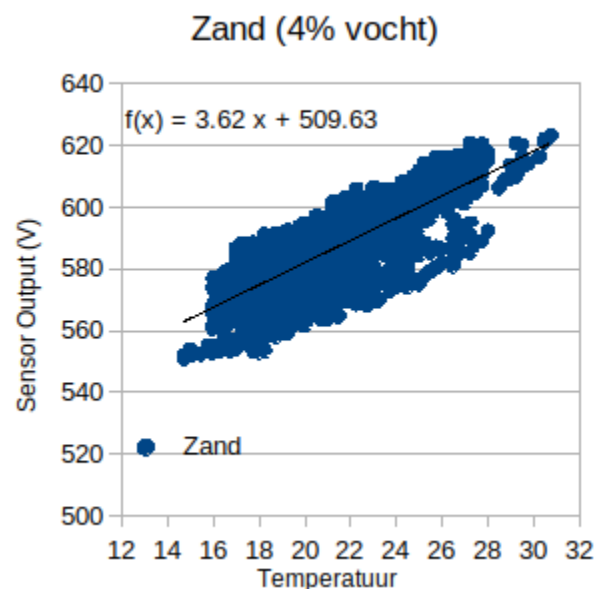
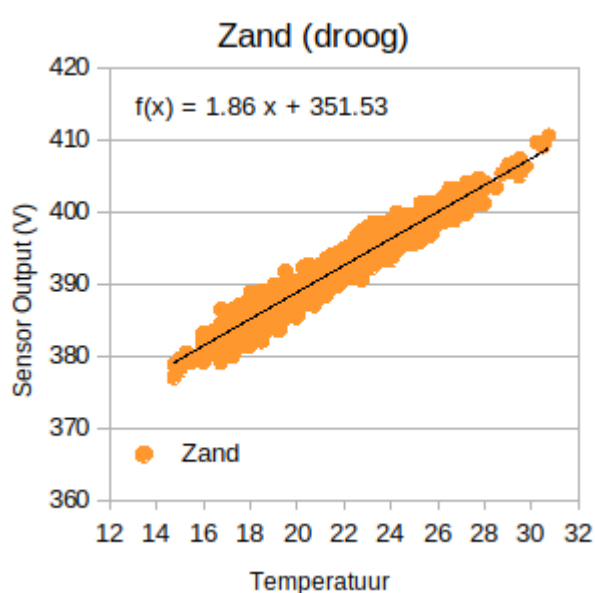
## Drift experiment 2

In een tweede experiment is gekeken naar drift in vochtige zandbodems. In ijkbuis 1 was over een periode van 1 maand geen sprake van een significante trend. In ijkbuis 2 was wel sprake van een duidelijke opgaande trend (+3%).

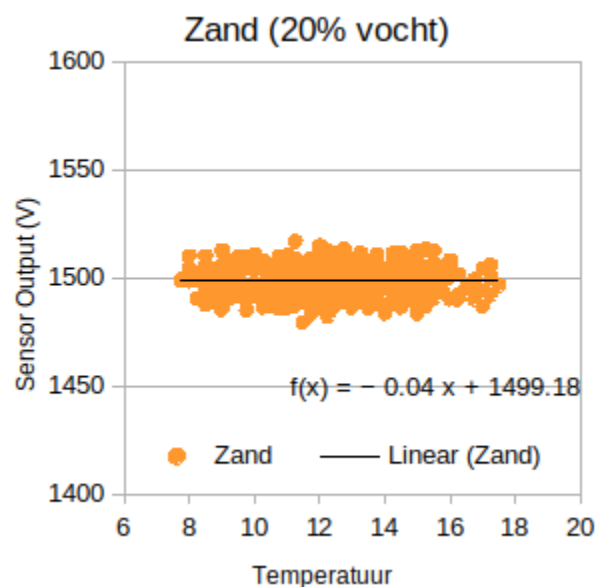
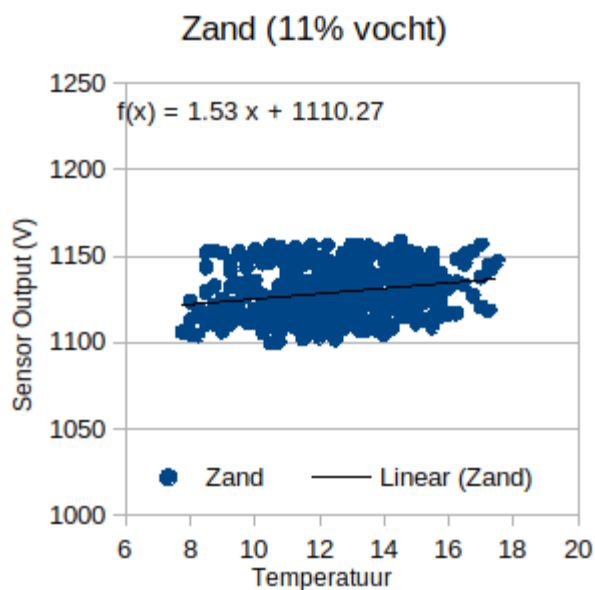


## Bijlage 2. Metingen van temperatuur effecten in bodemvocht-sensoren

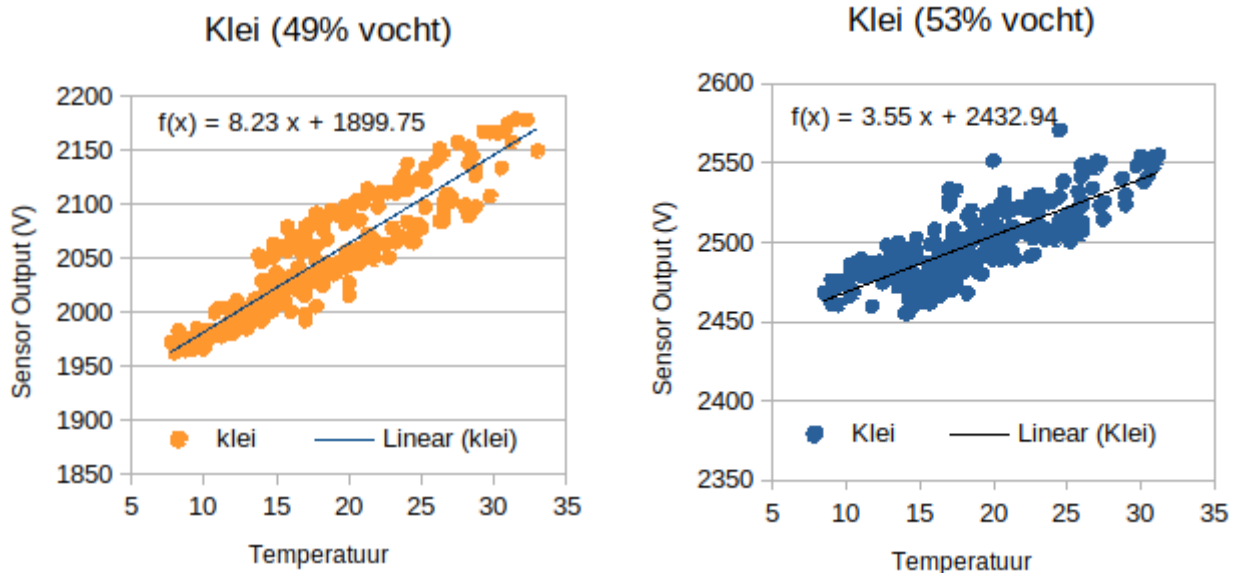
### Temperatuur effect op basis van experimenten



Met een proefopstelling is geanalyseerd of bij gelijkblijvend vochtgehalte de output van de sensor varieert met temperatuur. Aan de gegevens is te zien dat dit inderdaad het geval is en de variatie aanzienlijk beter correleert met de bodetemperatuur dan de luchttemperatuur. Zoals verwacht is het dus noodzakelijk om temperatuur-sensoren naast vocht-sensoren te plaatsen om goed te kunnen corrigeren voor temperatuur. In onderstaande figuren zijn de correlaties tussen de meting van het vochtgehalte en de temperatuur weergegeven.

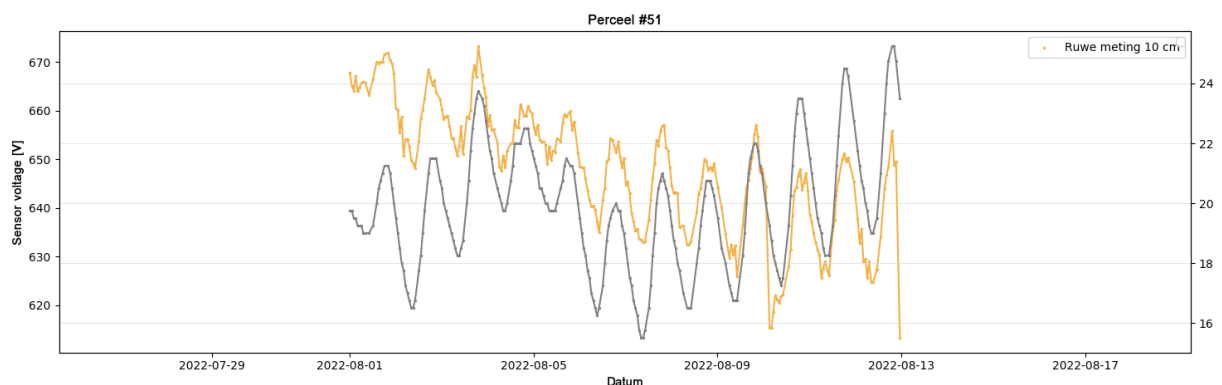


Resultaten van metingen met zand laten zien dat het temperatuur-effect niet gelijk is bij verschillende vochtgehalten. Het temperatuur-effect neemt toe van droog zand naar 4% vocht, maar neemt vervolgens af tot niet meer waarneembaar bij 20% vocht. In tegenstelling tot metingen in zand, laten metingen in klei nog een duidelijk temperatuur-effect zien bij 49% en 53% vocht. Uit deze resultaten is op te maken dat de samenstelling van de bodem van invloed is op de afhankelijkheid van bodemvochtmetingen op temperatuur.



## Temperatuur effect op basis van real-time data

Om een temperatuur-correctie te kunnen doen op basis van experimentele data zal informatie van de bodem nodig zijn, welke niet altijd voorhanden is. Als alternatief is daarom gekeken naar het afleiden van het temperatuur-effect uit dag-nacht schommelingen in de real-time data van bodemvocht-sensoren. Om het temperatuur-effect te kunnen bepalen op basis van real-time data zijn de datapunten van iedere sensor opgedeeld in droge perioden en natte perioden. Vervolgens is in de droge perioden gekeken naar de variatie in de bodemvocht-meting over de dag. In het figuur hieronder is een voorbeeld gegeven van een droge periode waar dag-nacht variatie in de meting is



waar te nemen.

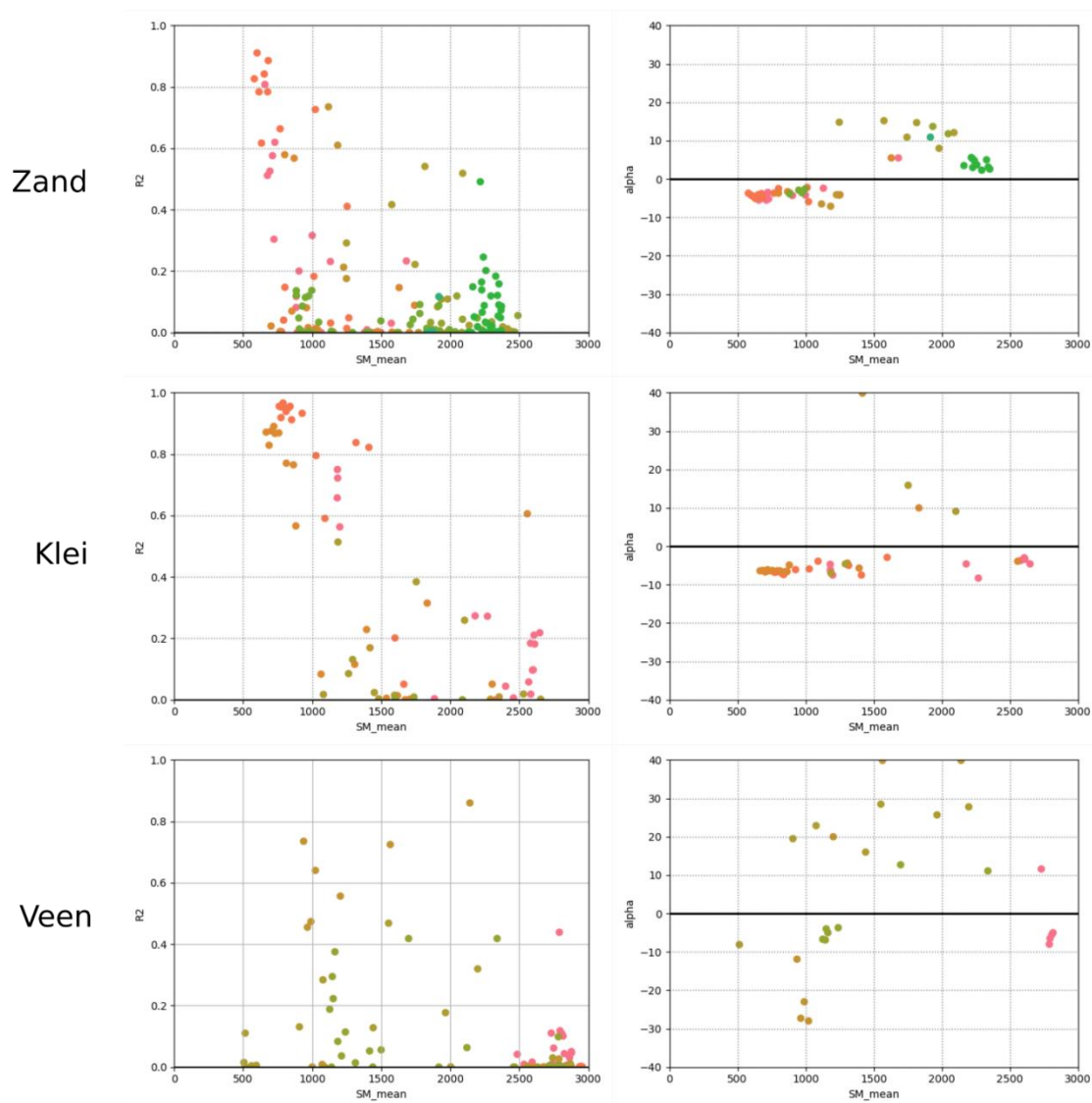
Modelmatig is vergeleken of de dag-nacht variatie in de bodemvocht-meting te verklaren is door temperatuur van de bodem. Hierbij is de variatie in onderstaand model statistisch vergeleken met de variatie in de ruwe waarden.

$$SM_{corr} = SM_{raw} + (T_{soil} - T_{ref}) * \alpha$$

In onderstaande figuren is per bodemsoort weergegeven in welke mate het model de dag-nacht variatie kan verklaren ( $r^2$  waarde, links) bij een optimale  $\alpha$  waarde (rechts).

In zandbodems is te zien dat de mate waarin het model de dag-nacht variatie verklaart hoger is wanneer er sprake is van een lage output van de sensor, i.e. een laag bodemvochtgehalte. Onder een sensor output van 1000 mV neemt de temperatuur-afhankelijkheid sterk toe. Deze temperatuur-afhankelijkheid is negatief: een hogere temperatuur zorgt voor een lagere sensor output.

In kleibodems gedraagt de sensor zich vergelijkbaar als in zandbodems, maar hier lijkt al bij een hoger vochtgehalte de temperatuur een rol te spelen. In veen is een minder eenduidig beeld zichtbaar, met name doordat de metingen een groot deel van het jaar richting de limiet van het meetbereik van de sensor aanzitten. Er is mogelijk sprake van een positief temperatuur-effect in de range 1500-2500.



De analyse van real-time data in zand en klei bodems komt overeen met de observatie van de experimenten. Temperatuurvariatie in de metingen is afhankelijk van het vochtgehalte en de bodemsoort. Het gevonden temperatuur-effect ( $\alpha$ ) op basis van real-time data komt overeen met het temperatuur-effect dat experimenteel is bepaald. De temperatuur-afhankelijkheid van de sensor is dus achteraf te corrigeren. De inzet van deze sensoren is daarmee niet beperkt tot bodems waar de bodemsamenstelling van in kaart is gebracht.

## Bijlage 3. Relatie tussen lokale meting van temperatuur en luchtvochtigheid met het dichtstbijzijnde KNMI station

Temperatuur

Sensor	Perceel	Afstand KNMI (km)	$r^2$	a	b
SL_007	11	19.2	0.89	0.94	1.11
SL_008	11	19.2	0.89	0.96	0.85
SL_009	11	19.2	0.81	0.89	0.96
SL_004	15	19.2	0.90	0.98	0.23
SL_005	15	19.2	0.90	0.98	0.35
SL_006	15	19.2	0.89	0.97	0.51
SL_016	51	11.3	0.89	0.92	0.81
SL_017 <sup>2</sup>	51	11.3	0.78	0.85	2.37
SL_018	51	11.3	0.81	0.82	1.81
SL_019 <sup>1</sup>	55	21.6	0.91	0.95	0.75
SL_010	85	11.1	0.85	0.88	2.01
SL_011	85	11.1	0.81	0.84	2.76
SL_012	85	11.1	0.88	0.89	1.95
SL_013	109	25.3	0.86	0.89	1.58
SL_014 <sup>2</sup>	109	25.3	0.70	0.76	4.02
SL_020	109	25.3	0.83	0.84	2.25
SL_001	120	18.7	0.86	0.94	0.82
SL_002	120	18.7	0.85	0.87	1.63
SL_003	120	18.7	0.80	0.87	1.24
Gemiddelde <sup>2</sup>			0.87	0.91	1.21
Standaard deviatie <sup>2</sup>			0.04	0.05	0.71

<sup>1</sup> weergegeven in hoofdtekst

<sup>2</sup> Outliers, niet meegenomen in de berekening van het gemiddelde

Sensor	Perceel	Type gedrag	r <sup>2</sup>	a	b
SL_007	11	A	0.78	1.01	-6.85
SL_008	11	B	0.73	0.83	-1.35
SL_009	11	B	0.72	0.91	-2.64
SL_004	15	A	0.69	0.99	-1.90
SL_005	15	C	0.03	-0.08	74.96
SL_006	15	B	0.73	0.83	0.36
SL_016	51	B	0.68	0.79	12.53
SL_017	51	C	0.01	0.09	67.09
SL_018	51	C	0.00	-0.03	73.15
SL_019	55	A	0.75	0.87	7.31
SL_010	85	B	0.65	0.77	12.76
SL_011	85	C	0.11	-0.25	84.88
SL_012	85	C	0.15	0.28	49.37
SL_013	109	B	0.64	0.74	15.99
SL_014	109	C	0.09	0.18	60.31
SL_020	109	C	0.08	-0.14	84.32
SL_001	120	A	0.62	0.86	6.17
SL_002	120	B	0.59	0.77	7.81
SL_003	120	C	0.10	-0.30	84.10
Gemiddelde A			0.71	0.93	1.18
Standaard deviatie A			0.07	0.08	6.74
Gemiddelde B			0.69	0.80	6.61
Standaard deviatie B			0.05	0.06	7.26

## Bijlage 4. Laboratoriumanalyse metabarcoding

Het analyseren van een eDNA-monster door middel van metabarcoding vindt plaats in een aantal stappen. In grote lijnen houden deze stappen in dat het eDNA in een monster (1) geëxtraheerd en gezuiverd wordt, (2) geamplificeerd (vermeerderd) wordt met behulp van PCR, (3) verkregen PCR-fragmenten gezuiverd en in een DNA *library* opgenomen worden en deze tot slot (4) gesequenced wordt.

Analyse-stappen in meer detail:

1. Het DNA wordt uit het bodemmonster (0,25 gram) geëxtraheerd. Storende stoffen zoals humuszuren kunnen detectie van het eDNA inhiberen wat kan leiden tot fout negatief resultaat. Gedurende de DNA-extractie zijn deze inhiberende stoffen zo veel mogelijk verwijderd.
2. Het DNA is geamplificeerd door middel van een PCR waarbij gebruik gemaakt is van een universele (18S & 16S) en primerset die zeer efficiënt aan het DNA van zowel pro- als eukaryoten bindt. De primers bevatten ieder een unieke *tag* (7 nucleotiden lang). Gedurende de bioinformatica analyse kunnen de *reads* (gegenereerde sequenties) aan de hand van deze *tags* toegewezen worden aan het juiste monster. De PCR is uitgevoerd in 4 replica's met behulp van de TaqMan® Environmental Mastermix 2.0 (Life Technologies®). De PCR-producten van deze 4 replica's zijn vervolgens samengevoegd.
3. Door middel van gel-elektroforese is vastgesteld of de PCR geresulteerd heeft in PCR-producten van de juiste lengte. Met behulp van een tweede PCR zijn Illumina Nextera XT adaptors aan de PCR-producten gezet. Vervolgens zijn de PCR-producten samengevoegd. De pool van PCR-producten van verschillende monsters is gezuiverd. Deze pool van PCR-producten vormen de zogenaamde DNA *library* die gebruikt wordt om het DNA te sequencen.
4. De PCR-producten zijn gesequenced met behulp van *Next Generation Sequencing* (Illumina Novaseq 6000 platform, 150 bp paired-end). Hierbij worden miljoenen sequenties (zogenaamde *reads*) van het DNA uitgelezen. In deze stap wordt het fysieke DNA in het buisje dus vertaald naar digitale *reads*, i.e. DNA code/sequentie bestaande uit de DNA-bouwstenen weergegeven met de letters A (adenine), C (cytosine), G (guanine) en T (thymine).



# Bijlage 5. Bio-informatica pipeline metabarcoding

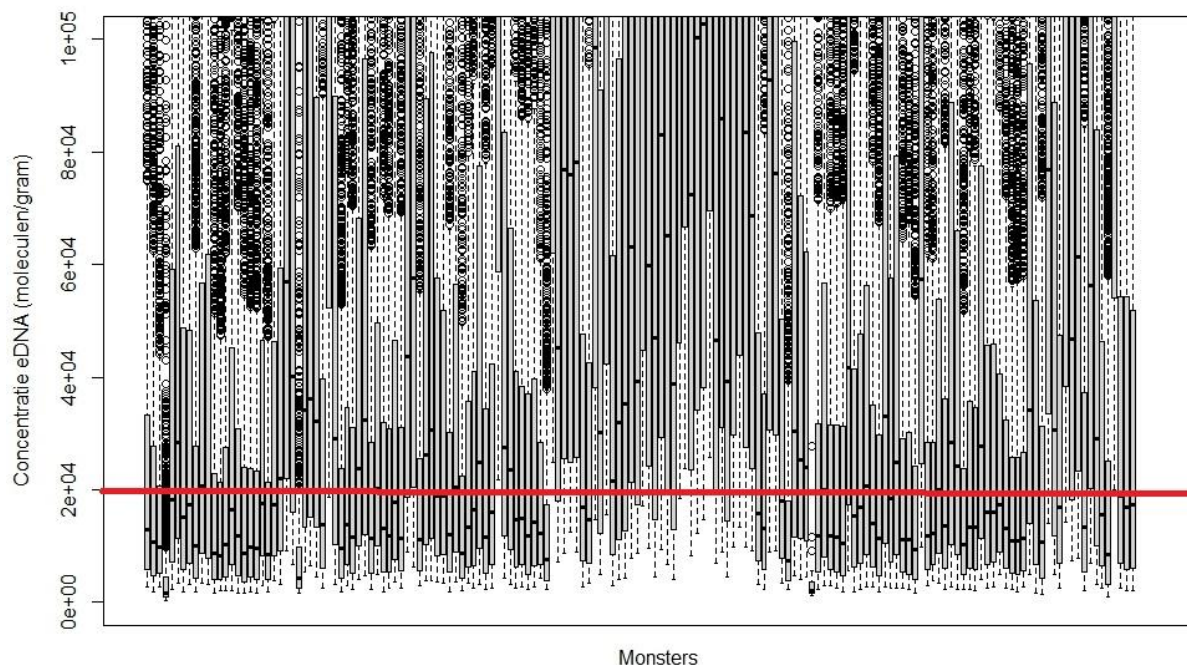
De gegenereerde sequenties (*reads*) vormen samen een ruwe dataset die, voordat verdere analyse mogelijk is, op kwaliteit gecontroleerd en opgeschoond moet worden. Hiervoor wordt eerst een standaard verwerking van Illumina *paired-end* data uitgevoerd. In meer detail omvat deze verwerking de volgende stappen:

1. FASTQ sequence files zijn gegenereerd met behulp van de Illumina RTA3.4.4 en Bcl2fastq v2.20 *pipeline*.
2. Eerste kwaliteitscheck is uitgevoerd door middel van Illumina Chastity filtering.
3. Vervolgens zijn *reads* welke PhiX controle bevatten verwijderd.
4. (Restanten van) de sequencing adapters zijn uit de *reads* geknipt.
5. De kwaliteit van de overgebleven *reads* is getest met de FastQC tool.

Vervolgens zijn de sequenties geanalyseerd met behulp van het softwarepakket Obitools. Deze *pipeline* resulteert uiteindelijk in een tabel waarin voor elk monster aangegeven is hoeveel *reads* er van elke OTU gedetecteerd zijn. Omdat er behoorlijke rekenkracht nodig is voor het verwerken van de sequentiedata wordt een werkstation gebruikt dat beschikt over 40-core processoren met *hyper-threading* en 512 Gb Ram-geheugen. De volgende stappen zijn achtereenvolgens doorlopen:

1. **Illuminapairedend:** Genereren van een consensus sequentie door groeperen van de *forward* en *reverse read (alignment)*.
2. **Obigrep:** Verwijderen van sequenties die niet gegroepeerd zijn na stap 1.
3. **NGSfilter:** Toewijzen van alle sequenties aan het corresponderende monster op basis van de gebruikte primers en tags, die toegevoegd zijn in de PCR stap van de metabarcoding analyse (zie analyse-stap 2 in paragraaf 2.3).
4. **Obiuniq:** Samenvoegen van alle identieke sequenties binnen een monster om de dataset, die nu nog bestaat uit miljoenen *reads*, hanteerbaarder te maken.
5. **Obigrep:** Verwijderen van sequenties die korter zijn dan 15 baseparen en met minder dan 10 *reads* in de dataset aanwezig zijn.
6. **Obiuniq:** Samenvoegen van alle sequenties (ook van de verschillende monsters).
7. **Obiclean:** Labelen van sequencing- en PCR-fouten. In de basis wordt elke waarneming het label 'singleton' (op zichzelf staand) meegegeven. Sequentie A wordt vervolgens als 'internal' (=fout) aangemerkt als sequentie A slechts beperkt afwijkt van sequentie B, en als sequentie A aanzienlijk minder voorkomt dan sequentie B. Sequentie B wordt vervolgens aangemerkt als 'head' (=correcte sequentie).
8. **Blast search:** De identificatie van de sequenties is uitgevoerd door middel van een Blast-search.
9. **Normalisatie:** Aan de hand van een interne standaard kan van elke gemeten DNA-sequentie een schatting van de concentratie verkregen worden. Om te zorgen dat in alle monsters even gevoelig gemeten wordt, is gekeken naar de laagste concentratie DNA die nog gedetecteerd kan

worden in monsters met relatief hoge concentraties DNA. De cut-off value is gesteld op 20.000 moleculen/ gram grond. Detecties met een concentratie lager dan 20.000 moleculen/gram grond zijn dus uit de dataset verwijderd omdat lagere concentratie eDNA niet in alle monsters gedetecteerd kan worden.

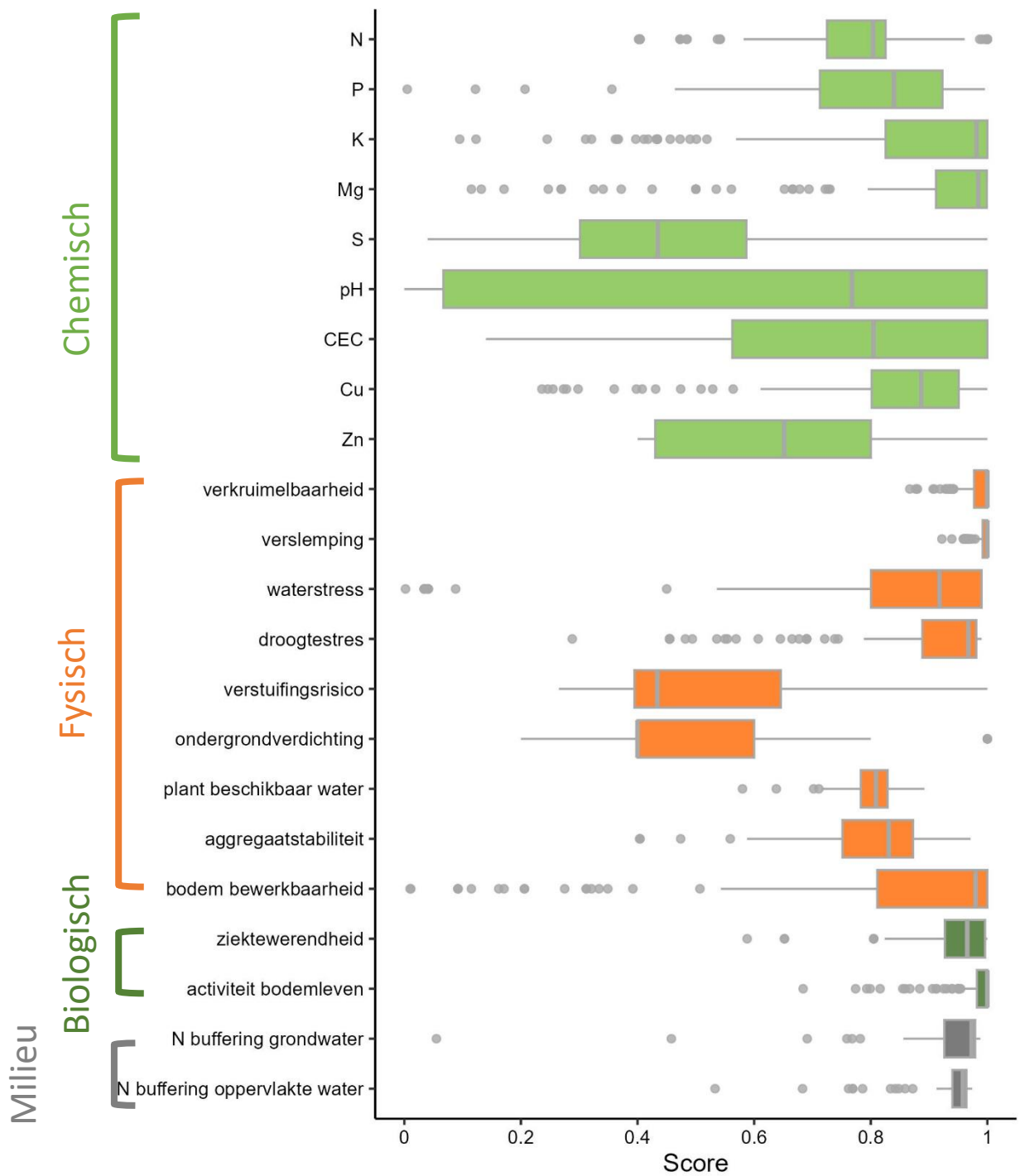


Concentraties van de gemeten unieke eDNA fragmenten per monster. De rode lijn geeft de threshold weer. Detecties onder de rode lijn zijn uit de dataset verwijderd om een even gevoelige detectie te realiseren in alle monsters. Ten behoeve van de leesbaarheid is de y-as gekort op  $10^5$  moleculen per gram.

## Bijlage 6. OBIC input en output

*Input parameters van Open Bodem Index. De gegevens zijn afkomstig van lab metingen van bodemmonsters ('Chemisch'), schatting van het nationale model op perceel niveau ('bodemschat'; <https://www.nmi-agro.nl/works/bodemschat>) of openbare gegevens ('open data').*

parameter code	bron	beschrijving
A_CEC_CO	Chemisch	Cation Exchange Capacity
A_CN_FR	Chemisch	Carbon / Nitrogen ratio
A_N_RT	Chemisch	Total nitrogen content
A_PH_CC	Chemisch	Acidity in CaCl <sub>2</sub>
A_S_RT	Chemisch	S-totaal bodemvoorraad
A_CA_CO_PO	bodemschat	Calcium occupation
A_CLAY_MI	bodemschat	Clay content
A_CU_CC	bodemschat	Copper plant available
A_K_CC	bodemschat	Potassium plant available
A_K_CO_PO	bodemschat	Potassium occupation
A_MG_CC	bodemschat	Magnesium plant available
A_MG_CO_PO	bodemschat	Magnesium occupation
A_MN_CC	bodemschat	Manganese plant available
A_N_PMN	bodemschat	Microbial Activity
A_P_AL	bodemschat	Total phosphate content
A_P_CC	bodemschat	Phosphor plant available
A_P_WA	bodemschat	Phosphate in water extraction
A_SAND_MI	bodemschat	Sand content
A_SILT_MI	bodemschat	Silt content
A_SOM_LOI	bodemschat	Organic matter content
A_ZN_CC	bodemschat	Zinc plant available
B_AER_CBS	open data	Agricultural economic region CBS2016
B_GWL_CLASS	open data	Groundwater class
B_GWL_GHG	open data	Averaged Highest Groundwater Level
B_GWL_GLG	open data	Averaged Lowest Groundwater Level
B_GWL_ZCRIT	open data	Distance between groundwater table and root zone (30 cm -mv) for delivering 2 mm/day
B_HELP_WENR	open data	HELP soiltype
B_LU_BRP	open data	Cultivation code according to BRP
B_SC_WENR	open data	Compaction risk
B_SOILTYPE_AGR	open data	Agricultural soiltype



Scores van bodemfuncties van OBI. OBI totaalscore was berekend op basis van scores van 9 chemische, 9 fysische, 2 biologische, en 2 milieu bodemfuncties. Verstuijingsrisico was niet beoordeeld voor graslandpercelen.

## Bijlage 7. Resultaten van statistische analyse

Resultaten van statistische analyse van 139 percelen. Coëfficiënt waarden van rangcorrelatie zijn weergegeven als deze significant ( $p < 0.05$ ) zijn. De effecten van de categorie parameters zijn getest door middel van een ANOVA. Bij de ANOVA test zijn de P-waarden van F-test weergegeven als \*\*\* ( $P < 0.001$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ), \* ( $P < 0.05$ ) of ns (niet significant). De voorspelbaarheid van de biologische indicatoren is getoetst door middel van een lineaire multivariaat regressie model met voorspellende variabelen die geschat kunnen worden op basis van standaard chemisch-fysische parameters ('LM (zonder BCS)'). Daarnaast is een tweede model getest waarin naast de chemisch-fysische parameters op de BodemConditieScore parameters en penetrometer gegevens als input gebruik zijn om de biologische parameters te voorspellen ('LM (met BCS)'). De relatie met ecosysteemdiensten (ESS) is getoetst door middel van een rangcorrelatie.

Indicatoren	1 op 1 relatie met gangbare parameters										Voorspelbaarheid		Relatie met ESS						
	Rangcorrelatie					ANOVA					LM (zonder BCS)	LM (met BCS)	Biodiversiteit		broeikasgasemissie <sup>*6</sup>			Productiviteit	
	Corg	pH	klei	GWL	Press 40 <sup>*1</sup>	Gewas type <sup>*2</sup>	Grond soort <sup>*3</sup>	Mgt <sup>*4</sup>	Kunst mest <sup>*5</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	aantal plant soorten	Q-waarde	CO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub> O	CH <sub>4</sub>	NDVI <sup>*7</sup>	Droogte schade <sup>*8</sup>	
<b>Wormen</b>																			
Aantal wormen	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,35	0,6	-0,29	-0,32	ns	ns	ns	ns	ns	
Fractie anec	ns	ns	0,27	0,24	ns	ns	*	ns	ns	0,14	0,2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-0,22	
Fractie epi	ns	ns	-0,3	ns	ns	ns	**	ns	ns	0,16	0,16	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
Fractie endo	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,12	0,14	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
<b>PLFA</b>																			
diversity	-0,53	0,26	-0,24	0,3	0,33	ns	ns	ns	ns	0,21	0,23	-0,38	-0,42	ns	ns	ns	ns	ns	
microbe totaal	0,63	ns	0,61	-0,4	-0,61	ns	***	**	ns	0,84	0,84	0,25	0,33	0,36	ns	ns	ns	ns	
Fungi:bacteria ratio	-0,26	0,25	-0,22	0,35	0,24	ns	***	ns	ns	0,44	0,48	ns	ns	ns	ns	ns	-0,19	ns	
bacteria GP:GN ratio	-0,43	ns	-0,21	0,39	0,21	ns	ns	ns	ns	0,3	0,3	-0,26	-0,25	ns	ns	-0,22	-0,27	-0,28	
frac_bacterialGP	-0,38	ns	ns	0,3	0,19	ns	*	*	*	0,35	0,49	-0,25	-0,25	ns	ns	-0,22	-0,19	-0,24	
frac_Actinomyceten	ns	0,3	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,3	0,3	-0,3	-0,25	ns	ns	ns	0,21	ns	
frac_bacterialGN	0,47	ns	0,23	-0,44	-0,2	*	***	*	*	0,56	0,51	0,24	0,27	ns	ns	0,19	0,31	0,27	
frac_Arbusculaire	-0,33	0,35	-0,3	0,31	0,34	ns	***	*	ns	0,59	0,68	-0,2	-0,28	ns	ns	ns	ns	ns	
frac_fungi_other	ns	ns	ns	0,24	ns	ns	ns	*	ns	0,29	0,32	ns	ns	ns	ns	ns	-0,39	ns	
frac_protozoa	-0,33	ns	-0,2	0,23	0,22	ns	*	ns	ns	0,11	0,17	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	

- \*1: Penetrometer gegevens van 40 cm diepte*
- \*2: Gewas type (akkerbouw / grasland / mais)*
- \*3: grondsoort categorie (klei / zand / veen)*
- \*4: Beheertype (Gangbaar / Biologisch / Natuur / Overig)*
- \*5: kunstmest is gebruikt (1) of niet (1)*
- \*6: emissie is gestandaardiseerd door totale koolstof gehalte*
- \*7: Proxy van productiviteit, afgeleid van satellietgegevens (mediaan NDVI van zomer (mei – oct), van jaar 2018 - 2022)*
- \*8: Proxy van droogte schade van 2022, ratio tussen NDVI zomer 2022 en NDVI zomer 2021*

## Bijlage 8. Organismen die geclassificeerd zijn als sulfaat reducerend

Desulfotomaculum	Desulfomicrobium	Paradesulfovibrio
Desulfaltia	Thermodesulfomicrobium	Paucidesulfovibrio
Desulfatibia	Desulfonatronum	Pseudodesulfovibrio
Desulfoarculus	Desulfonatronospira	Salidesulfovibrio
Desulfosporomusa	Desulfonatronovibrio	Solidesulfovibrio
Desulfosporosinus	Desulfonauticus	Desulfothermus
Desulfatibacillum	Desulfovulcanus	Desulfacinum
Desulfatirhabdium	Desulfoplanes	Desulfoglaeba
Desulfatiferula	Alkalidesulfovibrio	Desulforhabdus
Desulfobacter	Alteridesulfovibrio	Desulfosoma
Desulfobacterium	Aminidesulfovibrio	Desulfovirga
Desulfobacula	Avidesulfovibrio	Syntrophobacter
Desulfobotulus	Bilophila	Thermodesulforhabdus
Desulfocella	Cupidesulfovibrio	Desulfotomaculum
Desulfoconvexum	Desulfobaculum	Desulfosporomusa
Desulfofaba	Desulfocurvibacter	Desulfosporosinus
Desulfofrigus	Desulfocurvus	Thermodesulfovibrio
Desulfonatronobacter	Desulfohalovibrio	Archaeoglobus
Desulfosalsimonas	Desulfolutivibrio	Thermocladium
Desulfospira	Desulfovibrio	Caldivirga
Desulfotignum	Frigididesulfovibrio	Desulfofervidus
Desulfococcus	Fundidesulfovibrio	Deferrisoma
Desulfonema	Halodesulfovibrio	Adiutrix
Desulfoluna	Humidesulfovibrio	Desulfarculus
Desulforegula	Lawsonia	Desulfocarbo
Desulfatitalea	Mailhella	Dethiosulfatarculus
Desulfosarcina	Maridesulfovibrio	Desulfobacca
Magnetomorom	Megalodesulfovibrio	Magnetomorom
Desulfohalobium	Nitratidesulfovibrio	Desulfatibacillum
Desulfohalophilus	Oceanidesulfovibrio	Desulfatirhabdium
Desulfovermiculus	Oleidesulfovibrio	Desulfoarculus

Algorimarina	Desulfobulbus	Lawsonia
Magnetananas	Electrothrix	Mailhella
Magnetoglobus	Electronema	Maridesulfovibrio
Desulfatiferula	Desulfobia	Megalodesulfovibrio
Desulfamplus	Desulfatifera	Oceanidesulfovibrio
Desulfatiferula	Desulfocapsa	Oleidesulfovibrio
Desulfatiglans	Desulfofustis	Paradesulfovibrio
Desulfobacter	Desulfopila	Paucidesulfovibrio
Desulfobacula	Desulforhopalus	Pseudodesulfovibrio
Desulfobotulus	Desulfosediminicola	Psychrodesulfovibrio
Desulfocella	Desulfotalea	Salidesulfovibrio
Desulfocicer	Desulfomonile	Solidesulfovibrio
Desulfoconvexum	Desulfohalobium	Desulfuromonas
Desulfofrigus	Desulfohalophilus	Pelobacter
Desulforapulum	Desulfothermus	Geoalkalibacter
Desulfospira	Desulfovermiculus	Desulfuromusa
Desulfotignum	Desulfomicrobium	Geopsychrobacter
Desulfobacterium	Thermodesulfomicrobium	Malonomonas
Desulfococcus	Desulfonatronum	Geothermobacter
Desulfonema	Desulfonatronospira	Syntrophotalea
Desulfofaba	Desulfonatronovibrio	Deferrimonas
Desulfoluna	Desulfonauticus	Dissulfuribacter
Desulforegula	Desulfovolcanus	Smithella
Desulfonatronobacter	Desulfoplanes	Syntrophus
Desulfosalsimonas	Bilophila	Desulfonatronobulbus
Desulfatitalea	Cupidesulfovibrio	Desulfacinum
Desulfosarcina	Desulfobaculum	Desulfatimicrobium
Desulfosudis	Desulfocurvibacter	Desulfoferrobacter
Desulfaltia	Desulfocurvus	Desulfoglaeba
Desulfurivibrio	Desulfohalovibrio	Desulforhabdus
Desulfoprunum	Desulfolutivibrio	Desulfosoma
Desulfomarina	Desulfovibrio	Desulfovirga
Desulfolithobacter	Fundidesulfovibrio	Syntrophobacter
Desulfogranum	Halodesulfovibrio	Syntrophobacterium
Desulfocastanea	Humidesulfovibrio	Thermodesulforhabdus



Syntrophobacteria	Stygiolobus
Syntrophorhabdus	Sulfodiicoccus
Thermodesulfatator	Sulfolobus
Caldimicrobium	Sulfuracidifex
Geothermobacterium	Acidianus
Thermodesulfobacterium	Metallosphaera
Thermodesulfobacterium	Sulfolobus
Thermosulfurimonas	Sulfuracidifex
Thermosulfuriphilus	Dethiobacter
Desulfofervidia	Dissulfurirhabdus
Deferrisomatia	Desulfofundulus
Desulfarculia	Megalodesulfovibrio
Desulfobaccia	
Desulfobacteria	
Desulfobulbia	
Desulfomonilia	
Desulfovibrionia	
Desulfuromonadia	
Dissulfuribacteria	
Syntrophia	
Syntrophobacteria	
Syntrophobacteriabacterium	
Syntrophorhabdia	
Palaeococcus	
Pyrococcus	
Thermococcus	
Caldivirga	
Pyrobaculum	
Thermocladium	
Thermoproteus	
Vulcanisaeta	
Acidianus	
Aramenus	
Metallosphaera	
Saccharolobus	