Bijlage 5 Methodiek correlatieve veldstudie

Chemische analyse
De volgende parameters zijn in het lab bepaald aan de meegenomen monsters:
- oppervlaktewater: pH, alkaliniteit, EGV, turbiditeit, PO_4, NO_3, NH_4, N-totaal, Na, K, Cl, CO_2, HCO_3 en totaalconcentraties Al, Ca, Fe, Mg, Mn, P, S, Si, Zn;
- poriewater: pH, alkaliniteit, EGV, PO_4, NO_3, NH_4, N-totaal, Na, K, Cl, CO_2, HCO_3 en totaalconcentraties Al, Ca, Fe, Mg, Mn, P, S, Si, Zn;
- bodemmonsters: organische-stofgehalte, plantbeschikbaar P (P-Olsen), zoutextraheerbaar NH_4, NO_3, pH, Al, Ca, Fe, K, Mg, Mn, P, S, Si, Zn, totaalconcentraties Al, Ca, Fe, K, Mg, Mn, P, S, Si, Zn;
- vegetatiemonsters: biomassa, totaalconcentraties Al, C, Ca, Fe, K, N, Mg, Mn, P, S, Si, Zn.

De pH van het oppervlaktewater werd gemeten met een standaard $Ag/AgCl_2$ elektrode verbonden met een radiometer (Copenhagen, type TIM840). De hoeveelheid opgelost anorganisch koolstof (TIC, som van CO_2 en HCO_3^-) werd bepaald met behulp van infrarood gas analyse (ABB Advance Optima IRGA). De concentraties CO_2 en HCO_3^- werden met behulp van het pH-evenwicht berekend uit de concentraties totaal anorganisch koolstof). De alkaliniteit van het bodemvocht en het oppervlaktewater werd bepaald door een deel van het monster te titreren met verdund zoutzuur tot pH 4,2. De EGV werd bepaald met een HACH EGV-probe verbonden met een HQD-meter. De turbiditeit van de oppervlaktewatermonsters werd bepaald met een Dentan Turbidimeter (model FN-5).De monsters voor de autoanalyser werden bewaard bij een temperatuur van –20 ºC tot aan de analyse. De monsters voor de ICP werden aangezuurd voor analyse en gekoeld bewaard.

De concentraties calcium (Ca), magnesium (Mg), aluminium (Al), ijzer (Fe), mangaan (Mn), fosfor (P), zwavel (S; als maat voor sulfaat), silicium (Si) en zink (Zn) in oppervlaktewater, bodemvocht en bodemextracten werden bepaald met behulp van een Inductively Coupled Plasma Spectrofotometer (ICP; Thermo Electron Corporation, IRIS Intrepid II XDL). De concentraties nitraat (NO_3^-) en ammonium (NH_4^+) werden colorimetrisch bepaald met een Bran+Luebbe auto-analyzer III met behulp van resp. salicylaatreagens en hydrazinesulfaat. Chloride (Cl^-) en fosfaat (PO_4^{3-}) werden colorimetrisch bepaald met een Technicon auto-analyzer III systeem met behulp van resp. mercuritiocyanide, en ammoniummolybdaat en ascorbinezuur. Natrium (Na^+) en kalium (K^+) werden vlamfotometrisch bepaald met een Technicon Flame Photometer IV Control.

<u>Bodem en biomassabewerking</u>
Vochtpercentage, organische organische-stofconcentratie en bodemdichtheid
Het vochtpercentage van het verse bodemmateriaal werd via het vochtverlies bepaald. Dit gebeurde door in duplo bodemmateriaal te drogen gedurende 48 uur bij 60ºC. Uit het vaste volume van deze bakjes werd de bodemdichtheid berekend. De fractie organische stof in de bodem werd berekend door het gloeiverlies te bepalen. Hiertoe werd het bodemmateriaal, na drogen, gedurende 4 uur verast in een oven bij 550ºC. Het gloeiverlies komt goed overeen met de fractie organisch materiaal in de bodem.
Het vegetatiemateriaal werd minimaal 48 uur gedroogd bij 60ºC, waarna het werd gewogen.

Olsen-extractie
Plantbeschikbaar fosfaat werd met behulp van een Olsen-extractie (Olsen et al., 1954) bepaald. De fosfaatconcentratie bepaald met een Olsen-extractie is sterk gecorreleerd met de opname van P door de vegetatie en geeft een goede voorspelling van de soortenrijkdom van halfnatuurlijke graslanden (Gilbert et al., 2009). Het principe van deze extractiemethode is dat natriumbicarbonaat ($NaHCO_3$) zorgt voor een daling van de concentratie opgeloste calciumionen via de vorming van onoplosbaar calciumcarbonaat ($CaCO_3$). Hierdoor stijgt de concentratie opgelost fosfaat. Natriumbicarbonaat brengt ook de labiele, voor planten snel beschikbare, proportie van de organische fractie in oplossing. Voor de Olsen-extractie werd aan 3 gram droog bodemmateriaal 100 60 ml 0,5 mol l^{-1} natriumbicarbonaat ($NaHCO_3$) toegevoegd. Gedurende 30 minuten werden de monsters uitgeschud op een schudmachine (100 r.p.m.) waarna het supernatant onder vacuüm werd verzameld met behulp van teflon poriewaterbemonsteraars. Het extract werd bij 4oC bewaard tot verdere analyse.

Zoutextractie (NaCl-extractie)
Bij een natriumchloride(zout)-extractie worden aan het bodemadsorptiecomplex gebonden kationen verdrongen door natrium. Met deze extractie kan onder andere de pH, ammonium- en nitraatbeschikbaarheid van de bodem bepaald worden en de concentratie kationen aan het kationadsorptiecomplex van de bodem. Voor een zoutextractie werd aan 17,5 gram verse bodem 50 ml 0,2 mol l^{-1} natriumchloride (NaCl) toegevoegd. Gedurende 60 minuten werden de monsters uitgeschud op een schudmachine (100 r.p.m.) waarna de pH werd gemeten. Het supernatant werd onder vacuüm verzameld met behulp van teflon rhizons en bewaard bij 4°C tot verdere analyse.

Bodemdestructie
Door de bodem te destrueren (ontsluiten) is het mogelijk de totale concentratie van bepaalde elementen in het bodemmateriaal te bepalen. Hiervoor werd 200 mg fijngemalen gedroogde bodem afgewogen in teflon destructievaatjes. Aan het bodemmateriaal werd 4 ml geconcentreerd salpeterzuur (HNO_3, 65%) en 1 ml waterstofperoxide (H_2O_2, 30%) toegevoegd en geplaatst in een destructiemagnetron (Milestone microwave type mls 1200 mega). De monsters werden vervolgens gedestrueerd in gesloten teflon vaatjes en na afkoelen werden het destruaat nauwkeurig overgebracht en aangevuld tot 100 ml met milliQ. De monsters werden in polyethyleenpotjes bij 4°C bewaard voor verdere analyse.

C- en N-bepaling
Voor het bepalen van de totaalconcentraties C en N in de bodem werd de bodem zeer fijn gemalen en werd tussen 6 en 22 mg ingewogen voor analyse, afhankelijk van het percentage organisch materiaal. Van plantmateriaal werd 3 mg ingewogen. Concentraties totaal-C en totaal-N werden bepaald met een CNS analyser (Carbo Erla Instruments, Instruments NA 1500).

Vegetatie-opnames
De verlandingsvegetatie is op het oog beoordeeld op homogeniteit van de vegetatie. Als er verschillende zones te onderscheiden waren, zijn deze apart bemonsterd (figuur 3.12). Van elke locatie met verlanding werd een Tansley-opname gemaakt van de gehele verlandingsvegetatie. Ook bij het ontbreken van verlanding werd er een opname gemaakt vanaf de waterlijn enkele meters het water in. Als er sprake was van verschillende vegetatiezones binnen de verlandingsvegetatie werd er van elke zone een Braun-Blanquet-opname gemaakt van ongeveer 2x2 meter. Daarnaast is genoteerd welke van

de volgende *ecosystem engineers* voorkwamen op de aanliggende oever, buiten de opname: Kleine watereppe, Slangenwortel, Draadzegge, Pluimzegge, Snavelzegge, Waterscheerling, Galigaan, Wateraardbei, Holpijp, Paddenrus, Waterdrieblad, Grote boterbloem, Riet, Moerasvaren, Kleine lisdodde, Grote lisdodde, Krabbenscheer.

Beoordeling aandeel waterbronnen
Het belang van verschillende waterbronnen (grondwater, regenwater en zee/rivierwater) in de samenstelling van het water in de petgaten is beoordeeld aan de hand van IR-EGV-diagrammen (Van Wirdum, 1991) en de gelijkenis met de deze typen wateren (rLi, rAt, rTh, rMo) (Van Wirdum, 1991). Deze similariteit is berekend met het programma MAIONdP (Van Wirdum, 1991 (aangepaste versie 2006)). De concentratie van de referentiemonsters staan gegeven in tabel B5.1.

Tabel B5.1. Samenstelling referenties in MAION (Van Wirdum et al., 1992). Concentraties in mg/l, EGV in mS/m. Table B5.1. Composition of reference samples in MAION (Van Wirdum et al., 1992). Concentrations in mg/l, EC in mS/cm.

	Lithotroof	**Atmotroof**	**Thalassotroof**	**Molunotroof**
pH	7,5	4,2	8,3	7,8
Ca	115	0,4	420	82
Mg	8	0,2	1400	10
Na	12	1,6	10480	96
K	2	0,2	390	7
Cl	11	3	19100	178
HCO_3	400	0	122	158,6
SO_4	13	5,8	2640	80
EGV	65,2	5	5200	99,6

Statistische verwerking
Er is voor gekozen om vooral naar verbanden tussen parameters en verlandingsvegetaties te zoeken. Dit is gedaan met multivariate technieken in Canoco 5. De gemeten parameters van de verschillende onderdelen van het petgat (oppervlaktewater, bodem oever, onderwaterbodem, etc.) zijn apart geanalyseerd in een PCA (Principal Componant Analyses), waarvan vervolgens een figuur van de eerste twee of drie assen gemaakt is. Voorafgaand aan de analyse zijn de chemische parameters ln (x+1)-getransformeerd (behalve pH), om ze beter te laten voldoen aan de aanname van normale verdeling. Om grootte van de eigenwaarden niet te beïnvloeden zijn parameters die onderling een correlatie vertoonden van r=0,85 of groter verwijderd. In de figuur is dan slechts één van de parameters meegenomen en is aangegeven voor welke parameters de pijl nog meer geldt. Ontbrekende waarden zijn vervangen door het gemiddelde meetwaarde van de betreffende parameter. Om de verschillen in bodem- en (porie)waterkwaliteit tussen verschillende typen verlanding, en plekken zonder verlanding, in beeld te brengen, zijn boxplots van de abiotische variabelen gemaakt in R. Verschillen tussen type verlandingen zijn vervolgens Hier is voor gekozen, omdat de verwachting is dat op verschillende plekken zonder verlanding er niet één, maar meerdere factoren het ontstaan van jonge verlandingsvegetaties belemmeren. We verwachtten daarom dat er bij mogelijke belemmerende factoren voor verlanding enkele outliers aanwezig zullen zijn voor de locaties waarvoor deze factor een rol speelt in het uitblijven van de verlanding. Voor locaties waarvoor deze factor geen rol speelt, zal deze naar verwachting niet verschillen van de locaties met verlanding, waardoor het gemiddelde of de mediaan van deze factor niet hoeft te verschillen van locaties waar wel

verlanding voorkomt. Bij het EGV van het oppervlaktewater, bijvoorbeeld, zijn er in de locaties zonder verlanding die in vergelijking met locaties met verlanding een hoge of juist lage EGV hebben, terwijl het gemiddelde EGV niet verschilt tussen locaties met en zonder verlanding.
Statistische verschillen tussen typen verlandingsvegetaties en tussen vegetaties met hoge potentie voor ontwikkeling naar trilveen, Krabbenscheerverlanding en overige verlandingstypen zijn getoetst in SPSS 21 met de ln(x+1)-getransformeerde (behalve pH en hellingshoek oever) gegevens met een eenweg-ANOVA met Tukey-posthoctest. Resultaten van deze ANOVA's zijn weergegeven in boxplots (gemaakt in R) in Bijlage 7.