



Zeewier en plankton; een eerste verkenning met zeesla in mesocosms

Auteur(s): M.C. Keur, E.M. Foekema

Wageningen University &
Research rapport C115/20

Zeewier en plankton; een eerste verkenning met zeesla in mesocosms

Auteur(s): M.C. Keur, E.M. Foekema

Wageningen Marine Research

Wageningen Marine Research
Den Helder, December 2020

VERTROUWELIJK Nee

Wageningen Marine Research rapport C115/20

Keywords: *Ulva lactuca*, fytoplankton, zooplankton, primaire productie, e-DNA,

Opdrachtgever: Ministerie LNV
BAPS project nummer: KB34-2C-3, 2019-2022
Project titel: Marine lower trophic food systems

Dit rapport is gratis te downloaden van <https://doi.org/10.18174/537123>
Wageningen Marine Research verstrekt *geen* gedrukte exemplaren van rapporten.

Wageningen Marine Research is ISO 9001:2015 gecertificeerd.

© Wageningen Marine Research

Wageningen Marine Research, instituut
binnen de rechtspersoon Stichting
Wageningen Research, hierbij
vertegenwoordigd door
Dr.ir. J.T. Dijkman, Managing director

KvK nr. 09098104,
WMR BTW nr. NL 8113.83.696.B16.
Code BIC/SWIFT address: RABONL2U
IBAN code: NL 73 RABO 0373599285

Wageningen Marine Research aanvaardt geen aansprakelijkheid voor
gevolg schade, noch voor schade welke voortvloeit uit toepassingen van de
resultaten van werkzaamheden of andere gegevens verkregen van Wageningen
Marine Research. Opdrachtgever vrijwaart Wageningen Marine Research van
aanspraken van derden in verband met deze toepassing.
Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag weergegeven en/of
gepubliceerd worden, gefotokopieerd of op enige andere manier gebruikt worden
zonder schriftelijke toestemming van de uitgever of auteur.

A_4_3_1 V30 (2020)

Inhoud

Samenvatting	4
1 Inleiding	5
2 Materiaal en methode	6
2.1 Voorbereiding	6
2.2 Experimentele behandelingen	6
2.3 Bepaling startdichtheid zeesla	6
2.4 Monitoring mesocosms	7
2.4.1 Waterparameters	7
2.4.2 Fyto- en zoöplankton (DNA) bemonstering	8
2.4.3 Zeesla behandeling	8
2.4.4 Statistische analyses	8
3 Resultaten	9
3.1 Water parameters	9
3.2 Nutriënten	10
3.3 Plankton	10
3.3.1 Fytoplankton	10
3.3.2 Zoöplankton	11
3.3.3 Fyto-zoöplankton correlatie	11
3.4 Biomassa zeesla	12
4 Conclusies en aanbevelingen	13
5 Kwaliteitsborging	14
Literatuur	15
Verantwoording	16
Bijlage 1 Protocol bemonstering DNA fytoplankton uit mesocosms	17
Bijlage 2 Protocol bemonstering DNA zoöplankton uit mesocosms	19

Samenvatting

Zeewier wordt gezien als een belangrijke eiwitbron voor de toekomst, maar grootschalige productie van zeewier op zee kan verschillende invloeden hebben op het ecosysteem. Een van de vragen betreft de invloed van het zeewier op het plankton. Het fytoplankton maakt immers gebruik van dezelfde nutriënten, waardoor een verminderde beschikbaarheid, of veranderde verhoudingen tussen verschillende nutriënten gevolgen kan hebben op de productiviteit en de samenstelling van de fytoplanktongemeenschap. Dit heeft dan ook consequenties voor het zoöplankton dat van het fytoplankton afhankelijk is. Mogelijk heeft dit invloed op de wijze waarop in het ecosysteem koolstof wordt vastgelegd.

In dit onderzoek is in een miniatuur experimenteel ecosysteem (mesocosm) het effect van de aanwezigheid van zeesla (*Ulva lactuca*) op de ontwikkeling van de planktongemeenschap. De ontwikkeling van de zeesla biomassa in de mesocosms volgde in grote lijnen de groeioprognose totdat de nutriënten limiterend werden. Dit laat zien dat de ontwikkelingsmogelijkheden voor het zeesla (licht, temperatuur, gasuitwisseling) in de mesocosms voldoende waren. Omdat de beschikbare hoeveelheid nutriënten beperkt was tot hetgeen bij aanvang aanwezig was in de waterkolom, bleef de geproduceerde biomassa beperkt. Na dag 42 leek fosfor de limiterende factor te zijn. De zoöplankton-chlorofyl correlatie op dag 56 suggereert echter dat nutriënten beschikbaarheid aan het eind van de proef voor het fytoplankton nog niet in alle mesocosms kritisch was. De invloed van de zeesla daarop is echter op dit moment nog onduidelijk. Hiervoor is een analyse van de individuele mesocosms nodig die kan worden uitgevoerd als er inzicht is in de samenstelling van de planktongemeenschap. De resultaten van de DNA-analyses die met dat doel worden uitgevoerd komen in 2021 beschikbaar.

1 Inleiding

Zeewier wordt gezien als een belangrijke eiwitbron voor de toekomst, maar grootschalige productie van zeewier op zee kan verschillende invloeden hebben op het ecosysteem. Een van de vragen betreft de invloed van het zeewier op het plankton. Het fytoplankton maakt immers gebruik van dezelfde nutriënten, waardoor een verminderde beschikbaarheid van nutriënten of veranderde verhoudingen tussen verschillende nutriënten gevolgen kan hebben op de productiviteit en de samenstelling van de fytoplanktongemeenschap. Dit heeft dan ook consequenties voor het zoöplankton dat van het fytoplankton afhankelijk is. Mogelijk heeft dit invloed op de wijze waarop in het ecosysteem koolstof wordt vastgelegd.

In dit onderzoek is getest of een mesocosm, een experimenteel ecosysteem, een geschikt instrument is om het effect van de aanwezigheid van zeesla (*Ulva lactuca*) op een planktonasamenstelling te onderzoeken. De voorspelling was dat bij aanwezigheid van zeesla het gros van alle nutriënten naar de zeesla zou gaan waardoor de hoeveelheid plankton laag zou zijn in vergelijking met mesocosms zonder zeesla.

2 Materiaal en methode

2.1 Voorbereiding

Eind juli 2020 zijn 9 schone mesocosms gevuld met 5m³ zeewater, dat kort daarvoor was ingenomen bij Den Oever tijdens hoogwater. Na het vullen werd het water van de 9 mesocosms via een 7 m³-tank gecirculeerd, om zoveel mogelijk gelijke condities in elke mesocosms te creëren. De circulatie is na 2 weken gestopt, waarna elk van de 9 mesocosms 'stand-alone' werd, en de experimentele behandeling begon.

Tijdens het gehele experiment, is de waterkolom van elke mesocosm continu belucht, om gasuitwisseling en menging te garanderen.

2.2 Experimentele behandelingen

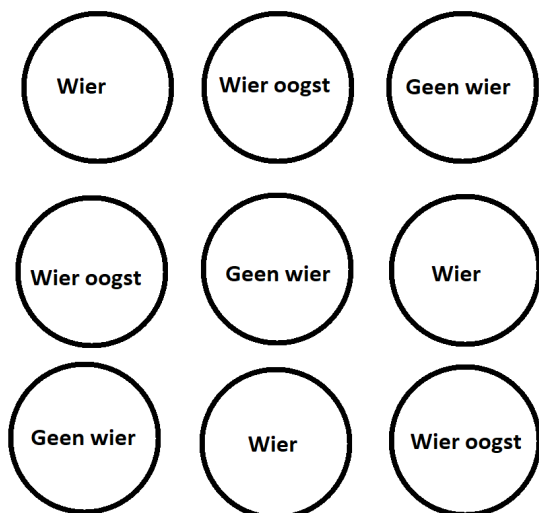
Na het stoppen van de circulatie werd aan 6 mesocosms 50 gram zeesla toegevoegd. De overige drie mesocosms bleven zonder zeesla.

Het experiment duurde 8 weken. Na 4 weken werd in 3 mesocosms het wier 'geogst'. Hierbij werd de zeesla biomassa weer naar de starthoeveelheid van 50 gram per mesocosm teruggebracht.

In totaal waren er dus drie behandelingen, elk in triplo uitgevoerd:

- Controle; zeewater zonder zeesla (code: geen wier)
- Zeewater met zeesla (code: wier)
- Zeewater met zeesla, geogst naar startgewicht na 4 weken (code: wier oogst)

Deze behandelingen zijn volgens een random block design verdeeld over de 9 mesocosms zoals weergegeven in Figuur 1.



Figuur 1. Verdeling van de behandelingen over de 9 mesocosms.

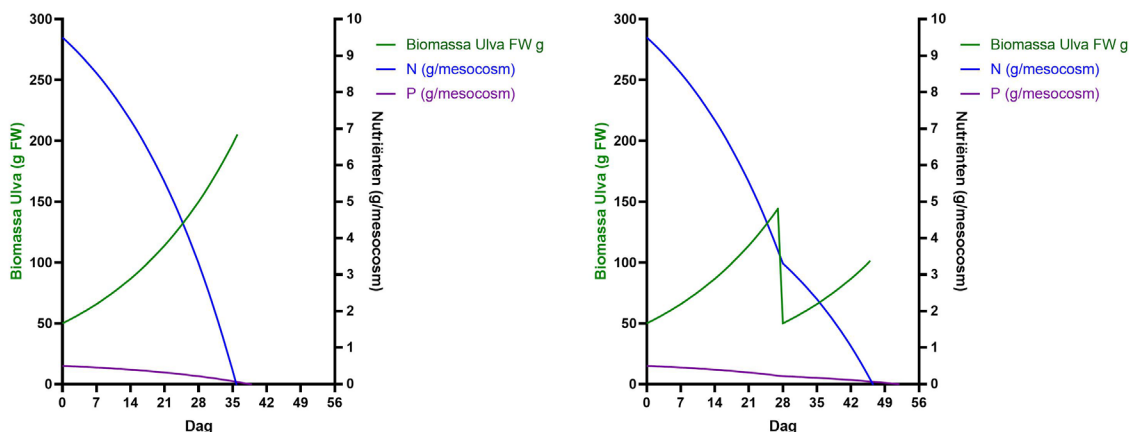
2.3 Bepaling startdichtheid zeesla

De starthoeveelheid zeesla, 50 gram per mesocosm, is bepaald op basis van de hoeveelheid beschikbare nutriënten aan het begin van de proef en het nutriënten verbruik van zeesla. Op 10 augustus 2020 is in het zeewater van de mesocosms de concentratie inorganisch N (NO₂+NO₃+NH₄)

en P (ortho-PO₄) gemeten. Omgerekend naar het watervolume van 5 m³ komt dit neer op een totaal van 9.555 gram N en 0.165 gram P per mesocosm. Lubsch & Timmermans (2018) stellen dat *Ulva lactuca* per 1000 gram versgewicht bij een groeisnelheid van 4% per dag, 2.5 gram N (Stikstof) en 0.1 gram P (fosfor) per dag verbruikt.

Aan de hand van deze gegevens is een startconcentratie zeesla per mesocosm bepaald waarbij de N en P in theorie, na ongeveer 5 weken uitgeput raken. Er is specifiek voor 5 weken gekozen zodat de nutriënten nog niet uitgeput zijn wanneer na 4 weken geoogst wordt. Hierdoor is er na de oogst nog enige ruimte voor zeesla-productie.

De uitkomst van deze berekening was dat 50 gram zeesla per mesocosm werd ingezet als starthoeveelheid. Bij de gekozen starthoeveelheid verlopen de hoeveelheden stikstof, fosfor en zeesla in de mesocosms in theorie zoals weergegeven in Figuur 2. In dit model is niet opgenomen dat de groeisnelheid van het zeesla afneemt als een van de nutriënten uitgeput raakt.



Figuur 2. Theoretisch verloop in concentraties N en P en biomassa van zeesla (*U. lactuca*) bij behandeling zonder oogst (links) en met oogst (rechts)

2.4 Monitoring mesocosms

Gedurende de 8 weken zijn alle mesocosms iedere 2 weken bemonsterd. Hierbij zijn de volgende parameters gemeten/bemonsterd;

- Waterparameters
 - Temperatuur (°C)
 - pH
 - Saliniteit (‰)
 - Zuurstof (%)
 - Turbiditeit (NTU, Nephelometric Turbidity Unit)
 - Chlorofyl (µg/l)
- Nutriënten (N & P) concentraties
- Fytoplankton en zoöplankton soorten compositie via DNA monsters

Daarnaast werd de Zeesla biomassa vanaf week 4 bepaald en werden zoöplankton tellingen uitgevoerd in week 4 en week 8.

2.4.1 Waterparameters

De temperatuur, saliniteit, en zuurstof zijn gemeten met de Hach multimeter (SOP E_4_025 en E_4_026). De pH is gemeten met de Mettler Toledo pH meter (SOP E_4_024). Al deze metingen zijn gedaan circa 20cm onder het wateroppervlak.

Er is een chlorofyl en turbiditeit monster genomen op een diepte van 20-30 cm onder het wateroppervlak. Turbiditeit is gemeten met de Eutech TN-100 (SOP E_4_041). Voor een indicatie in de hoeveelheid fytoplankton is het chlorofylgehalte gemeten met de BBE Moldaenke AlgaeLabAnalyser (SOP E_4_046). Hierbij wordt het totaal chlorofyl in µg/l gemeten en wordt een indicatie gegeven van het aandeel van de volgende groepen; Green algae, Bluegreen algae, Diatoms, Cryptofyta en yellow substances (afbraakproducten van algen).

Stikstof en fosfor zijn bepaald als N-NO₃, N-NH₄ en PO₄ in watermonsters met behulp van Hach colorimeter methode (SOP E_4_181).

2.4.2 Fyto- en zoöplankton (DNA) bemonstering

Om de soortensamenstelling van de planktongemeenschap in de mesocosms gedurende het experiment in kaart te brengen zijn er fytoplankton en zoöplankton monsters genomen. Deze zijn genomen volgens een eDNA protocol van Wageningen Environmental Research (WEnR). De protocollen zijn opgenomen als Bijlage 1 voor het fytoplankton, en Bijlage 2 voor het zoöplankton. De monsters zijn voor analyse verzonden naar WEnR. Resultaten komen naar verwachting in het 1^e kwartaal van 2021 beschikbaar.

Daarnaast zijn er in week 4 en 8 van het experiment van alle mesocosms op traditionele wijze zoöplankton monsters verzameld. De monsters zijn genomen door met een steekbuis in ieder kwadrant van de mesocosm een monster van 2.5 liter te nemen. Het aldus verzamelde 10 liter monster is over een 50 µm planktonnet gefilterd en opgeslagen in monsterpotten en geconserveerd met 37% formaldehyde.

De monsters zijn op een later tijdstip verwerkt. Hierbij zijn de monsters eerst weer over een 50 µm planktonnet gespoeld om de formaldehyde te verwijderen. Daarna zijn de monsters aangevuld met een bekende hoeveelheid gefilterd (0,2 µm) zeewater en zijn een aantal druppels methyleenblauw (0.1 gram/l) toegevoegd om het zoöplankton te laten kleuren zodat de monsters makkelijker verwerkt kunnen worden. Vervolgens zijn twee 1 ml sub-monsters genomen in Sedgewick Rafter telramen. Vervolgens zijn de aantallen zoöplankton onder de microscoop geteld en gedetermineerd op groepsniveau.

2.4.3 Zeesla behandeling

De 50 gram zeesla per mesocosm is afkomstig van drie zeesla planten. Deze zijn eerst los op het wateroppervlak gelegd. Omdat de zeesla echter snel naar de bodem van de mesocosm zonk is het twee dagen later in drie ruime netten ('vogelnetten') vlak onder het wateroppervlak opgehangen. Elk net bevatte 1 'plant'. De netten waren verdeeld over de mesocosm zodat de planten ruim uit elkaar hingen.

Vanaf week 4 is iedere bemonstering het natgewicht van de zeesla bepaald. Hiervoor is de zeesla uit de drie netten gehaald gezamenlijk gewogen, nadat de zeesla een paar minuten heeft kunnen uitlekken om het vocht er enigszins uit te krijgen. Daarna zijn de zeesla planten terug in de netten gestopt en teruggehangen in de mesocosms.

In de oogst mesocosms werd na 4 weken van elk plant een deel afgescheurd zodat de totale hoeveelheid zeesla in deze mesocosms weer werd teruggebracht naar de oorspronkelijke 50 gram.

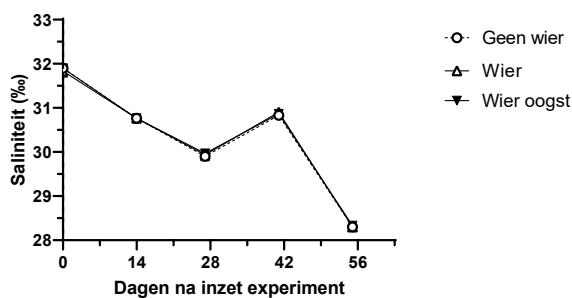
2.4.4 Statistische analyses

De data van de 3 behandelingen zijn statistisch met elkaar vergeleken doormiddel van een two-way ANOVA in het programma PRISM (versie 8.2.1).

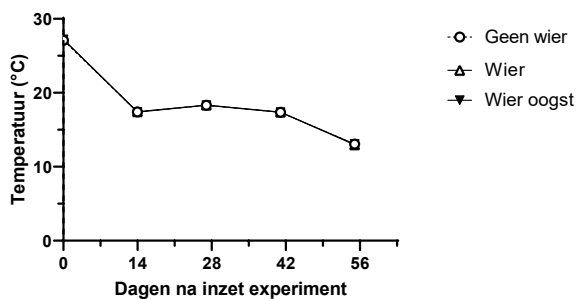
3 Resultaten

3.1 Water parameters

Gedurende het experiment was de pH gemiddeld 8.40 (± 0.12). Er was geen sprake van significante verschillen tussen behandelingen. Het zuurstofgehalte varieerde was gemiddelde 106% (± 2.02). Ook hier waren verschillen tussen de 3 behandelingen niet statistisch significant verschillend. De saliniteit tussen de 3 behandelingen verschilt ook minimaal van elkaar en is statistisch ook niet significant verschillend van elkaar (Figuur 3). Gedurende het experiment neemt de saliniteit af van 31.9 naar 28.3. Deze afname is het gevolg van regenval, omdat gedurende deze proef geen deksels op de mesocosms gemonteerd waren. De watertemperatuur is vanaf de start van het experiment, half augustus, wel flink gezakt tot het einde van het experiment begin oktober (Figuur 4). De watertemperatuur was bij de start 27.2 °C en aan het eind 13.0 °C.

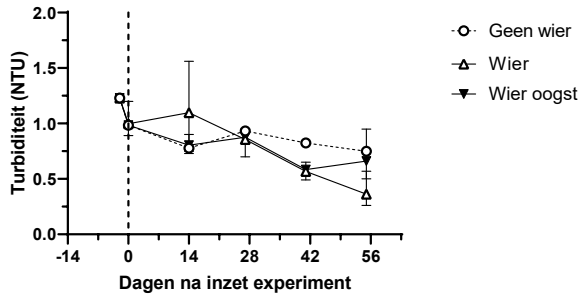


Figuur 3. De saliniteit van de mesocosms gedurende het hele experiment, waarbij de gemiddelde saliniteit van de drie replica's als verschillende punten zijn weergegeven en minimale en maximale waarde doormiddel van foutbalken.



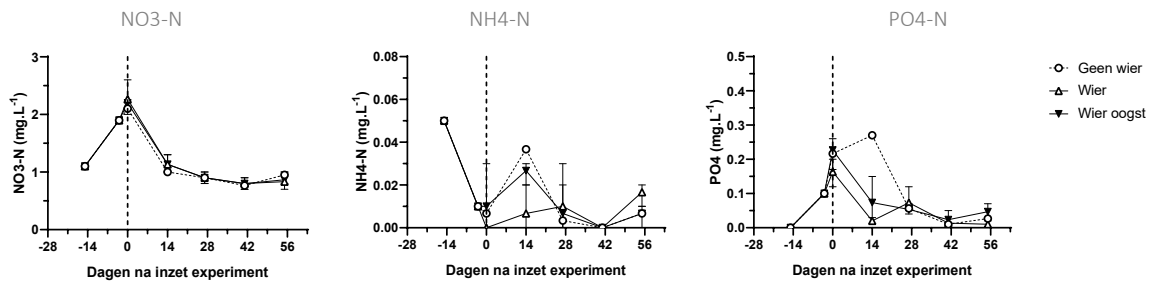
Figuur 4. De temperatuur van de mesocosms gedurende het hele experiment, waarbij de gemiddelde temperatuur van de drie replica's als verschillende punten zijn weergegeven en minimale en maximale waarden doormiddel van foutbalken.

Het water in alle mesocosms was helder met een turbiditeit van minder dan 1.5 (Figuur 5). Gedurende de proef daalt de turbiditeit in alle mesocosms. Deze daling lijkt iets sneller te gaan in de 'Wier' mesocosms, en het minst snel in de mesocosms zonder wier. Verschillen tussen behandelingen zijn echter niet statistisch significant



Figuur 5. De turbiditeit van de mesocosms gedurende het hele experiment, waarbij de gemiddelde turbiditeit van de drie replica's als verschillende punten zijn weergegeven en minimale en maximale waarden doormiddel van foutbalken.

3.2 Nutriënten



Figuur 6. Nutriëntenconcentraties van inorganisch N, (als NO₃-N en NH₄-N) en fosfaat. Gemiddelde van de 3 replica's per behandeling is in verschillende punten weergegeven en de foutbalken zijn de minimale en maximale gemeten concentraties.

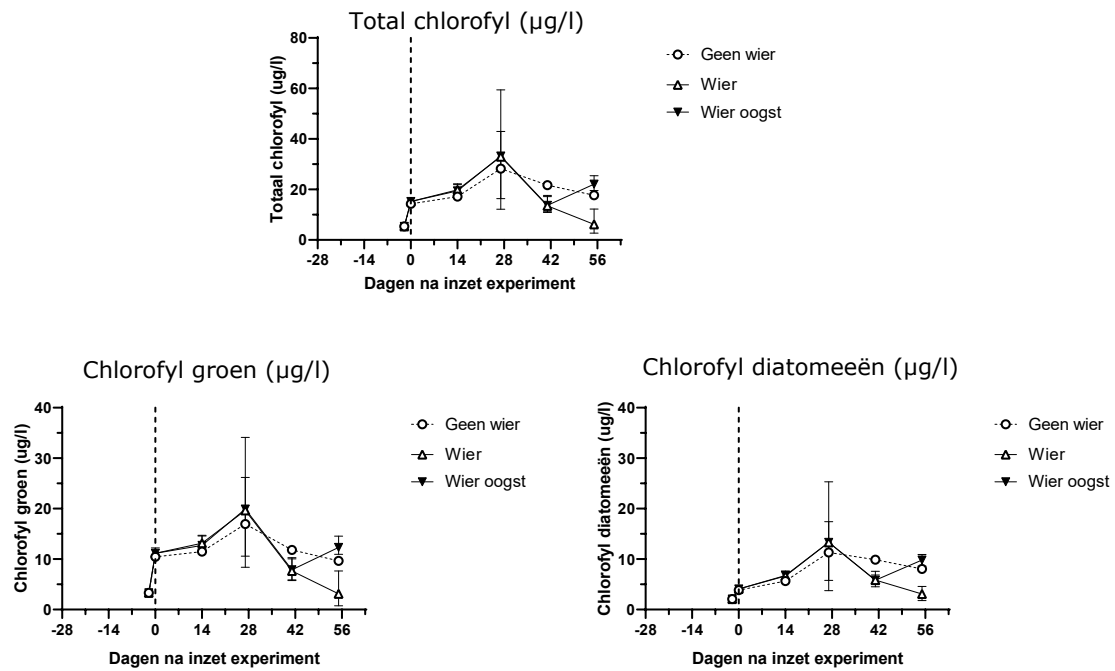
In figuur 6 is de verloop van de nutriëntenconcentraties in de mesocosms weergegeven. De concentratie Nitraat (NO₃-N) neemt vanaf de start van het experiment in de eerste 14 dagen meteen af tot een niveau van rond de 1.0 mg/l NO₃-N, wat de rest van het experiment stabiel blijft. Er zijn ook geen significante verschillen tussen de 3 behandelingen aanwezig. Ammoniacconcentraties (NH₄-N) zijn het gehele experiment laag (<0.05 mg/l). Gedurende de mesocosmproef schommelt de concentratie ammonium wel wat, maar door de lage concentraties zijn de kleine verschillen niet noemenswaardig. Fosfaatconcentraties (PO₄-P) nemen vanaf de start van het experiment in de eerste 14 dagen voor de behandelingen met wier meteen af tot een niveau van rond de 0 mg/l. In de behandeling zonder zeesla treedt die afname in fosfaat na 14 dagen op.

3.3 Plankton

3.3.1 Fytoplankton

Het totaal chlorofylgehalte in de waterkolom van de mesocosms neemt in alle 3 de behandelingen geleidelijk toe tijdens de eerste 4 weken van het experiment (Figuur 7). Daarna neemt het gaandeweg af. Deze afname gaat sneller in de mesocosms met zeesla en zet door tot het eind van de proef in de mesocosms waar niet geoogst is. In de mesocosms waar wel geoogst werd, steeg na dag 42 het chlorofyl gehalte weer, waardoor aan het eind van de proef de chlorofyl concentraties gelijk zijn aan de mesocosms zonder zeesla.

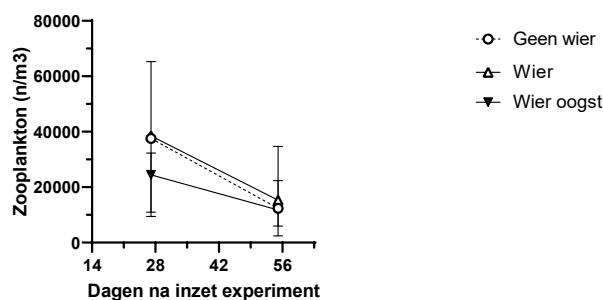
Binnen het chlorofyl zijn tweegroepen dominant, groenalgen en diatomeeën. Deze twee groepen volgen het gehele experiment hetzelfde patroon als het totaal chlorofyl. De verhouding tussen de twee groepen schommelt lichtelijk gedurende het experiment, waarbij groenalgen in hogere hoeveelheden voorkomen dan diatomeeën. Blauwgroen algen en cryptofyta waren niet aanwezig in meetbare hoeveelheden.



Figuur 7. Het totaal chlorofyl in µg/l (boven) en de twee groepen waarin het chlorofyl is onderverdeeld namelijk in groenalgen (links) en diatomeeën (rechts).

3.3.2 Zoöplankton

Zoöplankton aantallen per m³ namen vanaf 28 dagen af tot het einde van het experiment in alle drie behandelingen (Figuur 8). Er zijn grote spreidingen tussen de 3 replica's van de behandelingen te zien, en geen structurele verschillen tussen behandelingen.

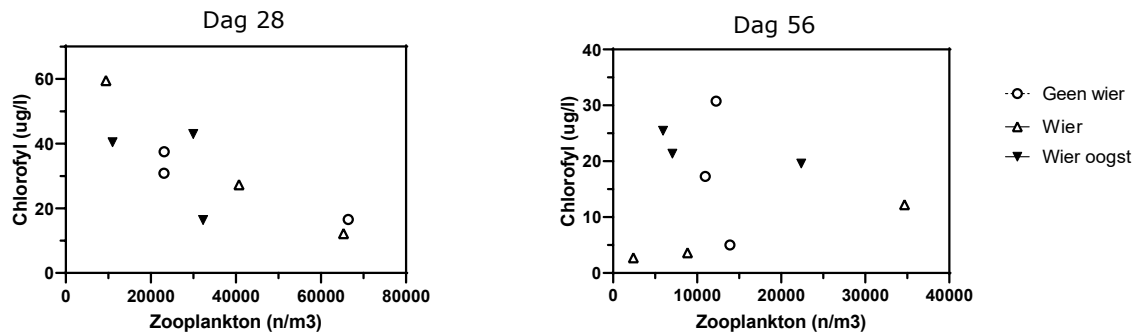


Figuur 8. Zoöplankton aantallen per m³ in de mesocosms. Foutbalken zijn minimale en maximale aantallen per behandeling

3.3.3 Fyto-zoöplankton correlatie

Op dag 28 is een duidelijke correlatie aanwezig tussen de hoeveelheid zoöplankton en het chlorofyl gehalte van het water; bij hogere zoöplankton dichtheden worden lagere chlorofylgehalten gemeten. Dit lijkt te duiden op top down controle van het fytoplankton door het zoöplankton. Er is geen structureel verschil tussen de mesocosms met en zonder zeewier. De 6 mesocosms met zeewier vormen tot het moment van de oogst (dag 28) nog replica's.

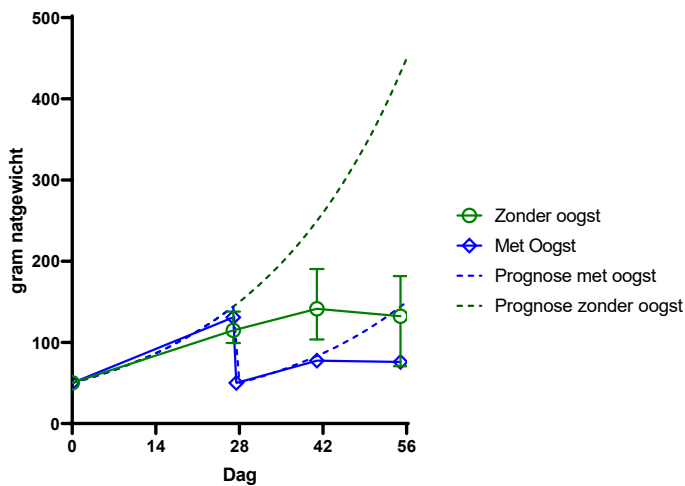
Op dag 56 is de correlatie niet meer op dezelfde wijze aanwezig voor alle mesocosms; twee mesocosm met wier en een mesocosm zonder wier hebben een laag chlorofyl gehalte, terwijl de zoöplankton dichtheid ook relatief laag is. Dit suggereert dat het lage chlorofylgehalte in deze mesocosms niet door het zoöplankton wordt veroorzaakt, maar waarschijnlijk het gevolg is van nutriënten gebrek. Ook op dag 56 is de respons van de behandelingen niet consistent.



Figuur 9. Zoöplankton aantallen per m³ uitgezet tegen het totaal chlorofyl concentratie voor dag 28 (links) en dag 56 (rechts) van het experiment. De data is per mesocosm van iedere behandeling weergegeven.

3.4 Biomassa zeesla

In Figuur 10 is de grafiek te zien waar de prognose, bepaalt in paragraaf 2.2, van het biomassa verloop van zeesla voor beide behandelingen te zien is. Daarnaast is de daadwerkelijke vastgestelde biomassa van het zeesla geplot. In de mesocosm waar niet werd geoogst volgde de ontwikkeling van de zeesla biomassa gedurende de eerste 28 dagen min of meer de prognose. Daarna remde de groei duidelijk af en stagneerde volledig na dag 42. In de mesocosms waar na 28 dagen werd geoogst, volgde de biomassa ontwikkeling de prognose vrijwel exact, totdat ook daar vanaf dag 42 de groei stagneerde.



Figuur 10. Prognose van de zeesla biomassa in gram natgewicht (stippellijn) voor beide behandelingen met zeesla en de daadwerkelijke gewichten tijdens het experiment (doorgetrokken lijn).

4 Conclusies en aanbevelingen

Het eerste doel van de studie was te verkennen of mesocosms een geschikte tool zijn om de invloed van zeewier op een planktongemeenschap te onderzoeken. Hoewel de resultaten van de DNA-analyses, die inzicht geven in de respons van de plankton gemeenschap nog niet beschikbaar zijn, kunnen in dit stadium wel al enkele algemene observaties worden beschreven.

Totdat nutriënten limiterend werden volgde de ontwikkeling van de zeesla biomassa in grote lijnen de groeiprognoze. Dit laat zien dat de ontwikkelingsmogelijkheden voor het zeesla (licht, temperatuur, gasuitwisseling) in de mesocosms voldoende waren. De maximale hoeveelheid zeesla die werd bereikt, bleef onder de 200 gram per mesocosm. Omdat er geen sediment in de mesocosms was aangebracht en geen nutriënten werden gedoseerd, was het nutriënten aanbod beperkt tot de hoeveelheid die bij aanvang van de proef aanwezig was in de waterkolom. Hoewel aan het eind van de proef ook licht mogelijk beperkend werd voor de groei van de zeesal, was meer productie waarschijnlijk ook niet mogelijk wegens nutriëntengebrek. Na dag 42 lijkt fosfor de limiterende factor te zijn.

De zooplankton-chlorofyl correlatie aan het eind van de proef (dag 56) suggereert echter dat nutriënten beschikbaarheid voor het fytoplankton nog niet in alle mesocosms kritisch was. Van de drie mesocosms waar dit mogelijk wel het geval was waren er 2 voorzien van zeesla, de derde bevatte geen zeesla. De invloed van de zeesla is dus op dit moment onduidelijk. Verschillen in het chlorofylgehalte lijken tussen behandelingen pas te ontstaan vanaf dag 42, en zich daarna verder te ontwikkelen. Wellicht had een iets langere duur van de proef duidelijker verschillen laten zien. Vanwege het seizoen zouden dan echter ook de lichtbeschikbaarheid en watertemperatuur invloed hebben gehad op de primaire productie. Een langere proef eerder in het seizoen kan dus nieuwe inzichten opleveren, eventueel kan worden overwogen extra nutriënten te doseren of om de mesocosms te voorzien van een laag natuurlijk sediment die als nutriëntenbron kan dienen.

Om een vollediger beeld van de primaire productie in het systeem te krijgen, zouden dan ook metingen van de ontwikkeling van aangroeiende algen (perifyton) meegenomen kunnen worden. Wellicht dat dit enig inzicht kan opleveren in het functioneren van individuele mesocosms. Analyse van de gegevens op basis van de individuele mesocosms kan worden uitgevoerd wanneer ook de resultaten van het DNA onderzoek beschikbaar zijn.

5 Kwaliteitsborging

Wageningen Marine Research beschikt over een ISO 9001:2015 gecertificeerd kwaliteitsmanagementsysteem. Dit certificaat is geldig tot 15 december 2021. De organisatie is gecertificeerd sinds 27 februari 2001. De certificering is uitgevoerd door DNV GL.

Literatuur

Lubsch, A. and Timmermans, K.R. 2018. Uptake kinetics and storage capacity of dissolved inorganic phosphorus and corresponding N:P dynamics in *Ulva lactuca* (chlorophyta). J. Phycol. 54, 215-233 (2018). DOI: 10.1111/jpy.12612

Verantwoording

Rapport C115/20
Projectnummer: 431.83001.56

Dit rapport is met grote zorgvuldigheid tot stand gekomen. De wetenschappelijke kwaliteit is intern getoetst door een collega-onderzoeker en het verantwoordelijk lid van het managementteam van Wageningen Marine Research

Akkoord: Drs. Afra Asjes
Onderzoeker

Handtekening:



Datum: 14 december 2020

Akkoord: Drs. J. Asjes
Manager Integratie

Handtekening:



Datum: 14 december 2020

Bijlage 1 Protocol bemonstering DNA fytoplankton uit mesocosms

Versie 1 (augustus 2020). Vragen: WENR t.a.v. Arjen de Groot (mobiel: 0317-485926)

Belangrijke opmerkingen:

- Dit protocol gaat ervan uit dat reeds met een steekbuis een verzamelmonster van 10L water uit de mesocosm is genomen, conform de reguliere methode maar met aandacht voor het voorkomen van kruiscontaminatie (zie onder, gebruik een met chloor schoongespoelde bak of emmer!).
- Essentieel bij eDNA-onderzoek is het voorkomen van kruiscontaminatie tussen monsters van verschillende locaties. Open de monsterkit daarom pas direct voorafgaand aan bemonstering en gebruik de materialen slechts voor één monster.

Benodigdheden per monster:

- monsterformulier
- koelbox met koude koelblokken
- 2 paar handschoenen
- Schone monsterfles 2L
- 1 filtermonsterkit met de volgende inhoud
 - o 1 Sterivex filtercapsule (verpakt)
 - o 1 spuit van 50 ml
 - o 1 spuit van 3 ml
 - o 1 buisje met conserveringsbuffer (ethanol)
 - o 1 afsluitdopje voor de ingang van de filter
 - o 1 afsluitdopje voor de uitgang van de filter
 - o 1 griplock-zakje met monstercode

Wijze van monstername:

- 1) Noteer op het monsterformulier de monstercode die op het griplock-zakje in de monsterkit staat. Noteer tevens de code van de mesocosm en datum van bemonstering.
- 2) Trek handschoenen aan
- 3) Pak de filtercapsule, open de verpakking aan 1 zijde en leg deze klaar voor gebruik.
- 4) Pak de 50ml spuit en trek 50ml water op uit het 10L verzamelmonster
- 5) Neem de filtercapsule uit de verpakking en koppel het smalle uiteinde met een draaiende beweging aan de spuit-opening.
- 6) Duw het water uit de spuit voorzichtig in de filtercapsule. Het gefiltreerde water stroomt af uit de uitgang van de filter. Houd daarom bij voorkeur de uitgang van de filter naar beneden gericht op ongeveer een halve meter van de grond, zodat het water niet teveel opspat (wat het risico op contaminatie vergroot).
- 7) Koppel de filtercapsule los en steek deze weer even terug in de verpakking.
- 8) Herhaal stap 3 t/m 6, zodat in totaal 100ml water is gefiltreerd. Let op: mocht de tegendruk tijdens het filtreren sterk toenemen, stop dan het duwen. De filter is dan verstopt geraakt en kan knappen bij te hoge druk.
- 9) Noteer op het monsterformulier (achter de juiste monstercode) het daadwerkelijke totale gefiltreerde watervolume.
- 10) Koppel de spuit weer af en spuit deze waar nodig leeg (wederom dicht bij de grond om spetteren te voorkomen).
- 11) Koppel de spuit weer aan en duw lucht door het filtercapsule om het resterende water in de capsule eruit te blazen. Koppel dan de spuit weer af.
- 12) Trek schone handschoenen aan
- 13) Sluit de uitgang van de filtercapsule af met het passende dopje uit de monsterkit.
- 14) Pak de 3ml spuit en het buisje ethanol-buffer, en zuig circa **2** ml ethanol op in de spuit.

-
- 15) Koppel de spuit aan de ingang van de filter en duw de ethanol-buffer in de filter. Koppel dan de spuit weer af.
 - 16) Sluit nu ook de ingang van de filtercapsule af met het passende dopje uit de monsterkit.
 - 17) Draai de filtercapsule enkele malen om, zodat de buffer in de capsule goed in contact komt met de volledige filter.
 - 18) Pak nu het griplock-zakje met monstercode uit de monsterkit, stop de capsule erin, en maak het zakje dicht.
 - 19) Sla het zakje met filtercapsule op in de koelbox voor transport naar het lab.
 - 20) Alle overige materialen mogen bij het afval. Tip: stop alles terug in de monsterkit en sluit deze af voor makkelijk en schoon vervoer van het afvalmateriaal.
 - 21) Bij terugkomst op het lab: bewaar de zakjes met filtercapsules in de vriezer bij -20 °C.

Bijlage 2 Protocol bemonstering DNA zoöplankton uit mesocosms

Arjen de Groot, versie 1, augustus 2020

Vooraf (lab)

Spullen:

- Putsemmer (schoongespoeld met leidingwater)
- Gemarkeerde Spuitfles met leidingwater (gespoeld met leidingwater)
- Jerrycan of tapkraan met leidingwater voor bijvullen spuitfles
- Spuitfles ethanol (96% TG)
- Zooplanktonnet
- Touw met dieptemarkering voor planktonnet
- Centrifugebuizen voor DNA monsters
- Monsterlijst, etiketten, pen, stift, potlood, schrijfpapier
- Koelbox met koelelementen

Eerste monstername

- Gemarkeerde centrifugebuis klaarleggen en monstercode opschrijven op veldformulier, samen met metadata van te verzamelen monster.
- Monster verzamelen met planktonnet volgens reguliere procedure. Denk afhankelijk van onderzoeksdoel na over diepte van de te bemonsteren waterkolom.
- Net met leidingwater uit spuitfles schoonspuiten en plankton naar beneden spuiten (opvangpot)
- Schone handschoenen aan en water uit opvangpot tippen (met vingers)
- Opvangpot omkeren en schuin tegen opening van centrifugebuis zetten, met opening in de potrand naar boven gericht.
- Plankton voorzichtig uit de opvangpot in de centrifugebuis spoelen met ethanol (uit spuitfles).
- Dop goed op centrifugebuis draaien (check op lekken door buis ondersteboven te houden)
- Buis z.s.m. in koelbox of koelkast opbergen

Volgende monsternames

- Planktonnet eerst goed schoonspuiten met leidingwater
- Neem regelmatig (bijvoorbeeld elke 3^e mesocosm) een negatieve controle-monster
 - Schone handschoenen aan
 - Met ethanol de inhoud van (lege) opvangpot van het planktonnet in centrifugebuis spuiten
 - Monstercode centrifugebuis noteren en bij metadata aangeven dat het negatieve controle betrof, en wanneer (voorafgaand aan welke monstername) deze is genomen
- Vervolgens het echte DNA monster nemen zoals boven beschreven

Bij terugkomst op het lab

Bewaar de monsterbuizen in de vriezer bij -20 °C tot aan verzending naar WENR. Zorg voor transport naar Wageningen bij een temperatuur beneden vriespunt (bijvoorbeeld op droogijs).

Indien transport binnen enkele dagen na monstername plaatsvindt, bewaar dan de monsterbuizen in de koelkast en zorg voor gekoeld transport in piepschuim doos met koelelementen.

Wageningen Marine Research
T: +31 (0)317 48 09 00
E: marine-research@wur.nl
www.wur.nl/marine-research

Bezoekers adres:

- Ankerpark 27 1781 AG Den Helder
- Korringaweg 7, 4401 NT Yerseke
- Haringkade 1, 1976 CP IJmuiden

Wageningen Marine Research levert met kennis, onafhankelijk wetenschappelijk onderzoek en advies een wezenlijke bijdrage aan een duurzamer, zorgvuldiger beheer, gebruik en bescherming van de natuurlijke rijkdommen in zee-, kust- en zoetwatergebieden.



Wageningen Marine Research is onderdeel van Wageningen University & Research. Wageningen University & Research is het samenwerkingsverband tussen Wageningen University en Stichting Wageningen Research en heeft als **missie**: 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'