



Interacties tussen zeewier en plankton in mesocosm studies; technische rapportage rond toepassing van nieuwe monitoringstechnieken

Auteurs: E.M. Foekema¹, M.C. Keur¹, R.G. Jak¹, M. Polling²

1: Wageningen Marine Research

2: Wageningen Environmental Research

4..

Wageningen University &
Research rapport C023/23

Interacties tussen zeewier en plankton in mesocosm studies; technische rapportage rond toepassing van nieuwe monitoringtechnieken

Auteur(s): E.M. Foekema¹, M.C. Keur¹, RG Jak¹, M. Polling²

¹: Wageningen Marine Research

²: Wageningen Environmental Research

Dit onderzoek is uitgevoerd door Wageningen Marine Research en Wageningen Environmental Research en gesubsidieerd door het Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit, in het kader van het WUR interne programma KB34 Towards a Circular and Climate Neutral Society (2019-2022), project KB34-2C-4; titel: Marine lower trophic food systems.

Wageningen Marine Research
Den Helder, mei 2023

VERTROUWELIJK Nee

Wageningen Marine Research rapport C023/23

Keywords: *Ulva lactuca*, fytoplankton, zoöplankton, primaire productie, (e)DNA metabarcoding

Opdrachtgever: Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit
T.a.v.: Directie SKI
P.O Box 2040
2500 EK, Den Haag
BAPS projectnummer: KB34-2C-3, 2019-2022
Projecttitel: Marine lower trophic food systems

Bas code: KB-34-007-004 1-2C-4

Dit rapport is gratis te downloaden van <https://doi.org/10.18174/630223>

Wageningen Marine Research verstrekt *geen* gedrukte exemplaren van rapporten.

Wageningen Marine Research is ISO 9001:2015 gecertificeerd.

Foto omslag: E. Foekema

© Wageningen Marine Research

Wageningen Marine Research, instituut
binnen de rechtspersoon Stichting
Wageningen Research, hierbij
vertegenwoordigd door
Drs.ir. M.T. van Manen, directeur
bedrijfsvoering

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
gevolgschade, 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 V32 (2021)

Inhoud

Samenvatting	5
1 Inleiding	6
2 Materiaal en methoden	7
2.1 Mesocosms	7
2.2 Monitoring mesocosms	9
2.2.1 Waterparameters	9
2.2.2 Perifyton meting	10
2.2.3 Fyto- en zoöplankton en perifyton (DNA) bemonstering	10
2.2.4 DNA analyse	10
2.2.5 Zooplankton detectie met toepassing van 'zooscan'	11
3 Mesocosmproef 2020	13
3.1 Resultaten	13
3.1.1 Water parameters	13
3.1.2 Nutriënten	14
3.1.3 Fytoplankton	15
3.1.4 Zoöplankton	17
3.1.5 Fyto-zoöplankton correlatie	18
3.1.6 Biomassa zeesla	19
3.2 Resumerend; zeewier-plankton interactie in 2020	20
4 Mesocosmproef 2021	21
4.1 Resultaten	21
4.1.1 Water parameters	21
4.1.2 Nutriënten	22
4.1.3 Biomassa zeesla	22
4.1.4 Perifyton ontwikkeling	23
4.1.5 Fytoplankton	25
4.1.6 Zoöplankton	27
4.1.7 Beta-diversiteit	29
4.2 Resumerend; zeewier-plankton interactie in 2021	31
5 Conclusies	32
5.1 Zeewier-plankton interacties	32
5.2 Inzetbaarheid van de gebruikte monitoring technieken	32
6 Kwaliteitsborging	34
Literatuur	35
Verantwoording	36

Samenvatting

Zeewier wordt gezien als een mogelijke voedingsbron 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.

In dit onderzoek is getracht in twee eenvoudige proeven in experimentele ecosystemen (mesocosms) het effect van de aanwezigheid van zeesla (*Ulva lactuca*) op de ontwikkeling van de planktongemeenschap te onderzoeken. Het betrof stagnante mesocosms met natuurlijk zeewater waaraan verder geen voedingsstoffen werden toegevoegd. Binnen twee tot vier weken na de introductie stagneerde de groei van de zeesla in de mesocosms, hoogstwaarschijnlijk als gevolg van limitatie van fosfaat. Na deze periode stierf een deel van het zeesla af waarna de biomassa per mesocosms stabiliseerde. Dit stabilisatie niveau werd waarschijnlijk bepaald door de snelheid waarmee nutriënten weer beschikbaar komen uit afgestorven zeesla, en plankton. In de mesocosms zonder zeesla werden de beschikbare nutriënten grotendeels door perifyton vastgelegd. Dus ongeacht of er wel of geen zeewier aanwezig was, trad in alle mesocosms nutriënten gebrek op, waardoor het plankton zich niet verder kon ontwikkelen. Het effect op het plankton van nutriënten uitputting door zeewier kon daardoor niet worden vergeleken met een referentie waarin nutriënten beschikbaar bleven.

Desondanks had het zeewier invloed op de zoöplankton gemeenschap. In mesocosms met zeewier werden harpacticoide copepoden de meest dominante zoöplankton groep, waarschijnlijk omdat deze profiteerden van een toename van foerageeropervlak door de aanwezigheid van zeewier. Er zijn geen aanwijzingen gevonden dat het zeesla een directe invloed had op het fytoplankton.

De toepasbaarheid van de innovatieve methoden (e)DNA metabarcoding en een geautomatiseerde beeldherkennig zoöplankton analyser, de Zooscan, werden in dezelfde proeven onderzocht. Voor het vaststellen van de soortenrijkdom, en/of de aanwezigheid van specifieke soorten zijn DNA technieken nu al zeer goed bruikbaar, maar deze is niet geschikt voor het aantonen van absolute aantallen. Hiervoor kan de Zooscan weer wel gebruikt worden, maar deze heeft als nadeel dat plankton zelden verder dan orde-niveau kan worden herkend. Met de drie sampling methoden (zoöplankton, fytoplankton en perifyton) werd in de mesocosms een significant andere soortensamenstelling bemonsterd. Dit geeft aan dat het nodig is om in mogelijke vervolgstudies verschillende sampling methoden toe te passen om een goed beeld van de biodiversiteit te verkrijgen.

De Zooscan bleek goed in staat om meso zoöplankton op groepsniveau te identificeren, en detecteerde de verschuiving tussen calanoïde en harpacticoide copepoden die in de mesocosm optrad. Deze werd ook aangetoond met (e)DNA metabarcoding, die kon helpen de exacte soortensamenstelling vast te stellen. Op deze manier werken de twee innovatieve methoden complementair en zijn de resultaten veelbelovend. Het wordt aanbevolen om vervolgprojecten te richten op een verdere integratie van beide innovatieve monitoring methoden (e)DNA en Zooscan, en hierbij tevens de 'klassieke' chlorofyl-fluorescentie methode te betrekken.

1 Inleiding

Zeewier wordt gezien als een mogelijke bron voor biomassa, koolhydratennutriënten en inhoudsstoffen voor de toekomst, en de teeltsector heeft de ambitie om richting 2030 op te schalen naar een productieareal van meer dan 500 km² voor de Nederlandse kust. Er is aandacht en er zijn zorgen over de grootschalige productie van zeewier op zee en de invloed hiervan op het ecosysteem. Een van de vragen betreft de invloed van het zeewier op het fyto- en zoöplankton. Het zeewier maakt gebruik van de van dezelfde (macro)nutriënten als het fytoplankton. Grootschalige zeewierkweek kan tot gevolg hebben dat nutriënten voor het fytoplankton minder beschikbaar worden, of dat de verhouding tussen verschillende nutriënten verandert. Dit kan gevolgen hebben voor de productiviteit en de samenstelling van de fytoplanktongemeenschap, met consequenties voor het zoöplankton dat van het fytoplankton afhankelijk is.

De plankton dynamiek is nauw verbonden met de koolstofcyclus. Door primaire producenten als zeewier en fytoplankton wordt CO₂ dat is opgelost in het zeewater in biomassa vastgelegd. Omdat CO₂ in zeewater en atmosfeer in evenwicht zijn zal het zeewater weer nieuw CO₂ uit de bovenstaande lucht absorberen, waardoor de hoeveelheid CO₂ in de atmosfeer door primaire productie wordt verminderd. Of dit als 'klimaatvoordeel' kan worden beschouwd hangt sterk af van wat er vervolgens met de nieuw geproduceerde biomassa gebeurt. Het meeste voordeel wordt behaald als de in de biomassa opgeslagen koolstof voor lange tijd wordt vastgelegd. Dat kan bijvoorbeeld gebeuren doordat plankton uitzakt naar de zeebodem en daar in zuurstofloze lagen begraven raakt. De kans dat dit gebeurt is groter bij 'zware' algensoorten als diatomeeën en foraminiferen die voorzien zijn van silica- en kalkskeletten, dan bij lichtere algen zonder deze verzwarende. Een verandering van de soortensamenstelling binnen het fytoplankton kan daardoor de potentie voor koolstofvastlegging beïnvloeden. De soortensamenstelling van het fytoplankton wordt, naast de hoeveelheid (zon)licht, in belangrijke mate bepaald door de verhoudingen waarin nutriënten, inclusief CO₂ aanwezig zijn. Het is onduidelijk in welke mate deze verhoudingen kunnen veranderen (grootschalige) zeewierkweek. Ook begrazing door zoöplankton -in zee vooral copepoden- heeft invloed op de potentie tot koolstofvastlegging van het systeem. Vooral de feces van het zoöplankton vormt hierin een belangrijke component, omdat deze pellets relatief makkelijk uitzakken naar, en een onderdeel gaan vormen van het sediment.

Naast de hierboven beschreven mogelijke invloed op CO₂ vastlegging, kan grootschalige zeewierkweek ook ecologische consequenties hebben. De concurrentie met het zeewier om in het zeewater beschikbare nutriënten kan leiden tot verminderde fytoplanktonproductie. Hierdoor kan minder voedsel beschikbaar zijn voor de primaire consumenten zoals zoöplankton en schelpdieren, en uiteindelijk ook voor de hogere trofische niveaus die hiervan afhankelijk zijn.

Binnen het kennisbasisproject *Marine lower trophic food systems* wordt de relatie tussen zeewier en plankton onderzocht en zijn methoden op hun toepasbaarheid getoetst om dit in een veldsituatie te monitoren. In 2020 en 2021 zijn daartoe experimenten uitgevoerd in mesocosms, waarbij de toepassingsmogelijkheden van eDNA technieken zijn getest om de planktongemeenschap te karakteriseren. In 2021 is hierbij ook een innovatieve methode getest om plankton via beeldherkenningssoftware te identificeren (Zooscan). Voorliggend rapport beschrijft de resultaten van deze studies. Een deel van de resultaten van de 2020 studie zijn eerder al gerapporteerd in Keur et al., 2020, maar zijn voor de volledigheid ook in deze rapportage opgenomen.

2 Materiaal en methoden

Deze paragraaf beschrijft de materialen en methoden die tijdens de proeven in 2020 en/of 2021 zijn toegepast. Informatie over de specifieke proefopzet, en frequentie van uitgevoerde metingen van beide proeven is in de volgende hoofdstukken gegeven.

2.1 Mesocosms

De proeven werden uitgevoerd in 9 polyester mesocosm-tanks (diameter 2 m, diepte 2 m) met een volume van ca. 5.6 m³ zeewater. Deze werden gevuld met natuurlijk 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 1 week gestopt, waarna elk van de 9 mesocosms 'stand-alone' werd, en de experimentele behandeling begon.

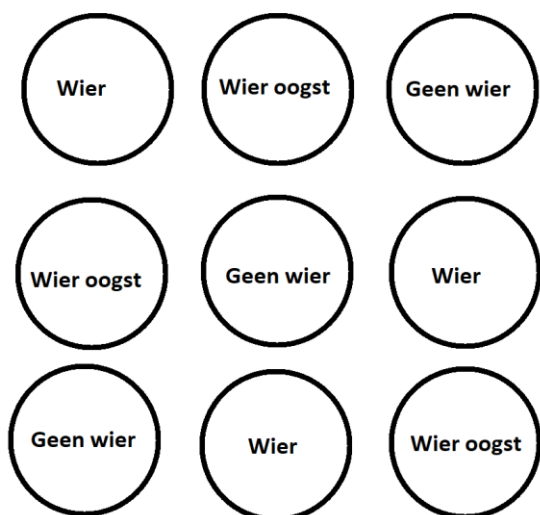
Na het stoppen van de watercirculatie werd aan 6 mesocosms 50-60 gram verse zeesla toegevoegd, die een dag eerder was verzameld in de Oosterschelde nabij Neeltje Jans. De zeesla werd per mesocosm verdeeld over 3 grofmazige netten (ca. 20 gram per netje) die vlak onder het wateroppervlak in de mesocosms werden gehangen. In drie mesocosms werd geen zeesla ingezet. Om gasuitwisseling en watermenging te garanderen werd de waterkolom van elke mesocosm continu belucht met perslucht via een bruissteen in het midden van de mesocosm op ca 20 cm boven de bodem.

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

- Controle; zeewater zonder zeesla (code: geen wier)
- Zeewater met zeesla (code: wier)
- Zeewater met zeesla, halverwege geoogst naar startgewicht (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.*

2.2 Monitoring mesocosms

De mesocosmproef in 2020 had een looptijd van 8 weken, de proef in 2021 van 10 weken. Op regelmatige tijdstippen werden monsters genomen/analyses uitgevoerd, volgens de hieronder beschreven methoden. Welke analyses met welke frequentie werden uitgevoerd in de respectievelijke proeven van 2020 en 2021 is weergegeven in Tabel 1.

Tabel 1 Overzicht van analyses en de frequentie waarmee zij zijn uitgevoerd in de mesocosmproeven van 2020 en 2021.

	2020	2021
Looptijd van de proef	8 weken	10 weken
Waterparameters	per 2 weken	wekelijks
Nutriënten	per 2 weken	per 5 weken
Zeesla biomassa	per 2 weken	wekelijks
Fytoplankton obv fluorescentie	per 2 weken	wekelijks
Fytoplankton obv DNA	per 2 weken	per 5 weken
Zoöplankton alleen tellingen	per 4 weken	nvt
Zoöplankton mbv ZooScan	nvt	per 5 weken
Zoöplankton obv DNA	per 2 weken	per 5 weken
Perifyton obv fluorescentie	nvt	per 5 weken
Perifyton obv DNA	nvt	per 5 weken

2.2.1 Waterparameters

De watertemperatuur, saliniteit, en zuurstofgehalte 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 20 cm onder het wateroppervlak.

Er is een chlorofyl en turbiditeitsmonster 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 het chlorofyl van de volgende groepen; groenalgen, blauwalgan (cyanobacterien), diatomeeën, 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). Daarnaast zijn er watermonsters naar het Waterlaboratorium gestuurd voor uitgebreidere nutriëntenanalyse op nitraat, fosfaat, ammonium en silicaat.

2.2.2 Perifyton meting

Om de aangroei in de mesocosms te monitoren zijn op dag 0 en dag 35, in elke mesocosm, 4 glasplaatjes (microscoop objectglazen) in een houder uitgehangen op circa 20 cm onder het oppervlak en zijn gericht op het zuiden, zodat de licht condities voor de ontwikkeling van perifyton optimaal is. Na 35 dagen werden de glasplaatjes verzameld en werd met de Biotek synergy HTX platereader de chlorofyl fluorescentie bepaald die een maat vormt voor de biomassa van de microalgen die zich op de plaatjes heeft ontwikkeld.

2.2.3 Fyto- en zoöplankton en perifyton (DNA) bemonstering

Om de soortensamenstelling van de planktongemeenschap in de mesocosms gedurende het experiment in kaart te brengen zijn fytoplankton en zoöplankton monsters genomen in 2021 op dag 0, 35 en 70, en in 2020 om de 2 weken. Deze zijn genomen volgens de (e)DNA protocollen van Wageningen Environmental Research (WENR). Deze protocollen zijn opgenomen als Bijlage 1 voor het fytoplankton, en Bijlage 2 voor het zoöplankton. Het perifyton werd van de plaatjes geschraapt en direct in ethanol (96% TG) verzameld.

2.2.4 DNA analyse

2.2.4.1 DNA extracties

Voor alle samples werd een ethanolprecipitatie stap gebruikt om het DNA te concentreren, voor het perifyton werd hierbij 20µl protease K toegevoegd. DNA extractie voor de fytoplankton samples die met behulp van sterivex waterfilters zijn genomen werd gedaan met behulp van de Blood & Tissue Kit (Qiagen) met toegevoegde ATE buffer van de Investigator Kit (Qiagen) en extra Proteinase K (zie WENR SOP E4103 versie 3). De zoöplankton samples die met het planktonnet zijn gevangen en direct in 96% ethanol zijn geconserveerd, zijn ook geëxtraheerd met de Blood & Tissue Kit van Qiagen, met extra ATL en prot K (zie WENR SOP E4026_v5). Het Perifyton werd geëxtraheerd met behulp van de Powerlyzer extractie kit (Qiagen; volgens de instructies in de handleiding).

2.2.4.2 PCR amplificatie

Aangezien het plankton dat bemonsterd werd in deze studie zeer fylogenetisch verschillend is (van wormen tot diatomeeën en van copepoden tot goudalgen) is gekozen voor de 18S regio die breed eukaryoten kan identificeren. Specifiek zijn twee subregio's van het ribosomale RNA van de 18S regio geamplificeerd, te weten 18SV4 (een relatief lang fragment van +/- 400-450bp met lage taxonomische resolutie maar met veel referentiedata) en 18SV9 (korter fragment van +/- 100-150bp met hoge taxonomische resolutie, maar weinig referentiedata). De primers die hiervoor gebruikt zijn, zijn 18SV4_TAREuk454FWD1 (Stoeck et al, 2010) en 18SV4_TAREukREV3_1 (Van der Heuvel et al, 2020) voor 18SV4 en EuK_1391f en EukB2 (Amaral-Zettler et al, 2009; zie WENR SOP 4106-02, versie 3, ook voor PCR ingrediënten en condities). CS1 en CS2 adapters werden met de primers tegelijk aan de amplicons gePCR'd. Sequencing werd uitbesteed aan Genome Quebec waar de tweede ronde PCRs werd uitgevoerd om de sample-specifieke tags aan de amplicons te hangen. MiSeq 2x250 sequencing werd gebruikt (nb: in vervolgonderzoek wordt mogelijk beter 2x300bp gebruikt in verband met de grote lengtevariatie van 18SV4).

2.2.4.3 Bioinformatica

Ruwe sequencing data werd gedemultiplexed per sample door Genome Quebec, welke vervolgens voor alle samples werden opgestuurd als R1 en R2 fastq bestanden. Deze werden geïmporteerd in het QIIME2 platform, versie 2021.11. De Cutadapt plugin is vervolgens gebruikt om de primers van de forward en reverse reads te halen, waarbij voor 18SV4 alle sequenties korter dan 200bp werden verwijderd, en voor 18SV9 alle sequenties korter dan 90bp. De sequenties werden vervolgens samengevoegd ('joined') en gede-noised met de DADA2 plugin waarbij voor 18SV4 een truncatie van de forward reads op 220 en reverse 200bp werd gebruikt. Voor 18SV9 werd 120 en 110bp gebruikt als truncatie. De VSEARCH plugin werd vervolgens gebruikt om de resulterende ASVs in 99% (OTUs) te clusteren. De taxonomie van de DNA sequenties (OTUs) werd verkregen via zowel de Silva (v138) als NCBI database. Alle identificaties van Embryophyta, Bacteria en Archaea werden vervolgens eruit gefilterd, zowel als alle OTUs met minder dan 10 reads in totaal.

Voor de leesbaarheid van dit rapport worden alleen de resultaten van 18SV4 (=18SM op de figuren) getoond vanaf nu.

2.2.4.4 Beta-Diversiteit

De QIIME2 emperor plugin is gebruikt om te bekijken of I) de verschillende sampling methoden (zoöplankton, fytoplankton en perifyton) significant verschillende data (=soortensamenstelling) opleverden, II) of de sample momenten (t0, t35 en t70) significant verschillende soorten opleverden en III) of er een significant verschil was tussen de behandelingen (Wier, Blanco en Wier Oogst). De input voor deze plugin was de unweighted unifracs distance matrix, d.w.z. de aan- of afwezigheid van soorten en niet de relatieve abundantie is gebruikt. Bij unifracs worden de phylogenetische verschillen tussen soorten gebruikt om verschillen tussen samples/gemeenschappen te visualiseren. Een PERMANOVA is gerund om te kijken of de verschillen ook daadwerkelijk significant waren.

2.2.5 Zooplankton detectie met toepassing van 'zooscan'

Op twee tijdstippen zijn in alle mesocosms ook op traditionele wijze zoöplankton monsters verzameld, door met een *water-core-sampler* in ieder kwadrant van de mesocosm een monster van 2.5 liter te nemen en het aldus verzamelde 10 liter monster over een 50 µm planktonnet te filtreren. De monsters zijn geconserveerd in een 4% formaldehyde oplossing en zijn op een later tijdstip geanalyseerd. In 2020 gebeurde dit op traditionele wijze door microscopietellingen. Vanwege de beschikbare tijd (budget) werd deze analyse beperkt tot het bepalen van de totale zoöplanktondichtheid, zonder onderscheid tussen soortgroepen.

De monsters van 2021 werden geanalyseerd door middel van een innovatieve methode. Dit betreft het op hoge resolutie scannen van de monsters waarbij door middel van *machine learning* de aantallen zoöplankton en de biodiversiteit op groepsniveau kan worden bepaald. Er is hierbij gebruik gemaakt van ZooScan, ImageJ en Ecotaxa, zie verder hieronder.

Voorafgaand aan de analyse is de formaline verwijderd door het monster over een 50 µm planktonzeef te gieten en goed te spoelen met zeewater.

Aan de hand van de hoeveelheid materiaal in het monster is gekozen om het monster direct in te scannen, eerst een split te maken, of een *size fractioning* te maken.

Voor size fractioning is het monster achtereenvolgens over een 500 µm, 300 µm en 50 µm zeef gegoten, waarna de inhoud van iedere zeef afzonderlijk is gescand.

Voor het splitten wordt het monster in twee gelijke delen verdeeld middels een Motoda box splitter (*Figuur 2*) en wordt één split monster gescand.



Figuur 2 *Motoda box splitter*

Voor het scannen wordt aangepaste software gebruikt gebaseerd op de officiële zooscan methode. Het monster wordt in een doorzichtige bak gegoten die op een Epson v850 scanner wordt gelegd.

Het monster wordt gescand op hoge resolutie en opgeslagen.

Daarna wordt door middel van de software ImageJ, de volledige scan als input gebruikt om van ieder losliggend object in de scan een individuele foto te maken.

De individuele object foto's worden als input gebruikt voor het classificatie programma EcoTaxa. De foto's worden geüpload en automatisch geclassificeerd, op groepsniveau, aan de hand van een learning set.

De learning set bestaat uit handmatig geclassificeerde foto's van zoöplankton groepen die voorkomen in de Waddenzee. De input foto's worden vergeleken met de learning set en geclassificeerd op groepsniveau. Dit resulteert in aantallen organismen per groep.

Het classificeren tot soortniveau is niet mogelijk aan de hand van deze foto's, omdat details hiervoor niet goed zichtbaar zijn met de gescande foto's.

2.2.5.1 Zeesla behandeling

De 50-60 gram zeesla die aan het begin van de proef per mesocosm werd ingezet, was verdeeld over 3 groepen van circa 20 gram, die in ruime netjes in de mesocosms werden uitgehangen. Doordat het gewicht van de natte netjes vooraf was bepaald kon wekelijks het gewicht van de zeesla bepaald worden zonder het uit de netjes te halen. Voorafgaand aan de weging werd het aanhangend water 'afgeschud'.

Halverwege de proef, in 2020 op dag 28 en in 2021 op dag 36, werd uit de 'wier oogst' mesocosms een hoeveelheid zeesla verwijderd (geoogst).

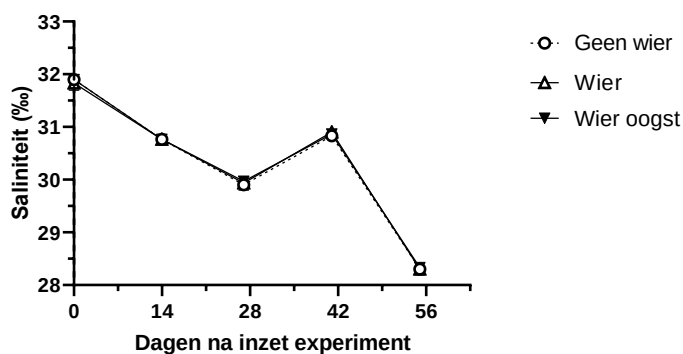
3 Mesocosmproof 2020

De mesocosmproof in 2020 werd uitgevoerd in de periode 10 augustus 2020 (dag 0, zeesla introductie) tot en met 5 oktober 2020 (dag 56, laatste bemonstering).

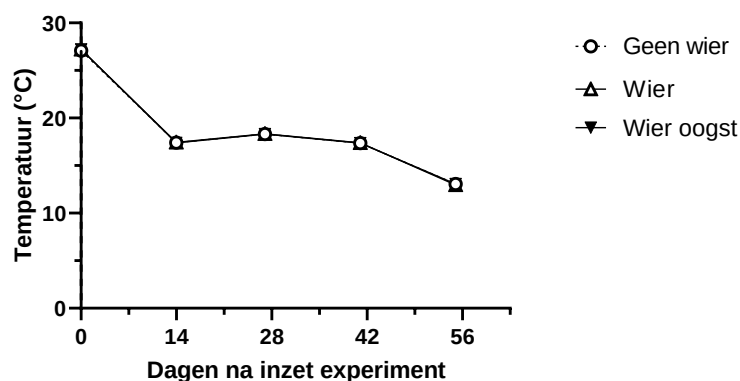
3.1 Resultaten

3.1.1 Water parameters

Gedurende het 2020 experiment was de pH in het mesocosmwater gemiddeld 8.40 (± 0.12) en het zuurstofverzadigingsniveau gemiddeld 106% (± 2.02). Er was geen sprake van significante verschillen tussen individuele mesocosms of behandelingen. Deze verschillen bestonden ook niet in saliniteit. Gedurende het experiment nam de saliniteit af van 31.9 naar 28.3 (Figuur 3). Deze afname is het gevolg van regenval. De watertemperatuur, bij aanvang in augustus nog 27 °C daalde tot 13.0 °C bij het einde van het experiment, begin oktober (Figuur 4).

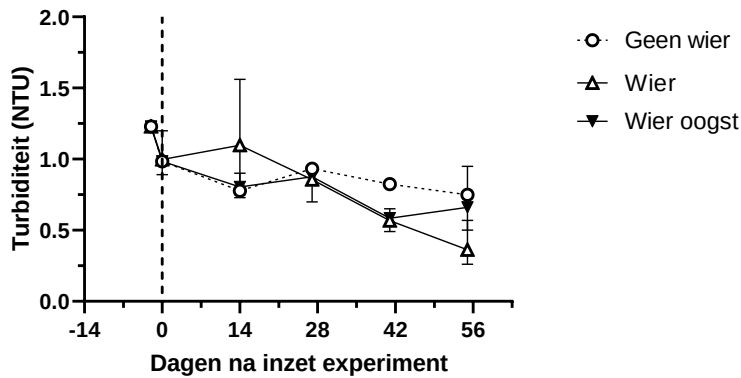


Figuur 3. De saliniteit van de mesocosms tijdens de proef in 2020. Gemiddelden van de drie replica's per behandeling.



Figuur 4. De temperatuur van de mesocosms tijdens de proef in 2020. Gemiddelden van de drie replica's per behandeling.

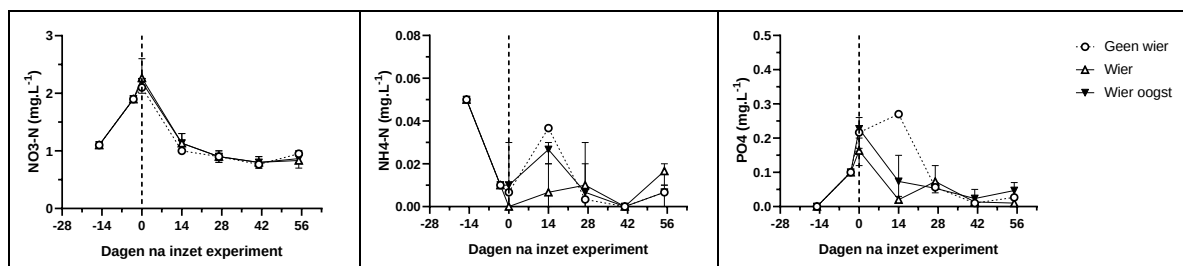
Het water in alle mesocosms was helder met een turbiditeit van minder dan 1.5 NTU (Figuur 5). Gedurende de proef daalt de turbiditeit in alle mesocosms. Deze daling lijkt iets sneller te gaan in de 'Wier' mesocosms, en het minst snel in de mesocosms zonder wier. Verschillen tussen behandelingen zijn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



Figuur 5. De turbiditeit van de mesocosms tijdens de proef in 2020. Gemiddelden van de drie replica's per behandeling.

3.1.2 Nutriënten

In **Figuur 6** is het verloop van de (opgeloste) nutriëntenconcentraties in het mesocosmwatert weergegeven. De concentratie nitraat (NO_3) neemt vanaf de start van het experiment in de eerste 14 dagen snel af tot een niveau van rond de 1.0 mg/l $\text{NO}_3\text{-N}$, en blijft de rest van het experiment stabiel rond deze waarde. Er zijn ook geen significante verschillen tussen de 3 behandelingen aanwezig. Ammoniumconcentraties (NH_4) zijn het gehele experiment laag (<0.05 mg/l). Gedurende de mesocosmstudie schommelt de concentratie ammonium wel wat, maar door de lage concentraties zijn de absolute verschillen beperkt. Fosfaatconcentraties ($\text{PO}_4\text{-P}$) nemen vanaf de start van het experiment in de eerste 14 dagen voor de behandelingen met wier af en benaderen concentraties rond 0 mg/l. In de behandeling zonder zeesla treedt wordt dit niveau 14 dagen later bereikt.



Figuur 6. Nutriëntenconcentraties van anorganisch N, (als $\text{NO}_3\text{-N}$ en $\text{NH}_4\text{-N}$) en fosfaat in het water van de mesocosms tijdens de proef in 2020. Gemiddelden van de drie replica's per behandeling.

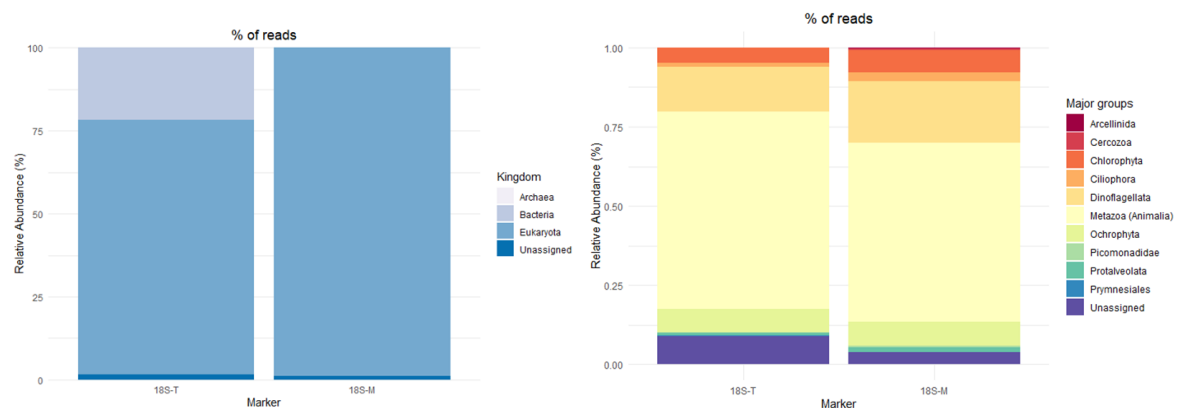
3.1.3 Fytoplankton

Het totaal chlorofylgehalte in de waterkolom van de mesocosms neemt in alle drie de behandelingen geleidelijk toe tijdens de eerste 4 weken van het experiment (Figuur 7). Daarna vindt een geleidelijke afname plaats. 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 chlorofylconcentraties gelijk zijn aan de mesocosms zonder zeesla.

Binnen het chlorofyl zijn twee groepen 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. Blauwalgen en cryptofyta waren niet aanwezig in meetbare hoeveelheden. Er zijn geen aanwijzingen dat de aanwezigheid van zeesla de samenstelling van de fytoplanktongemeenschap heeft beïnvloed.

DNA Resultaten

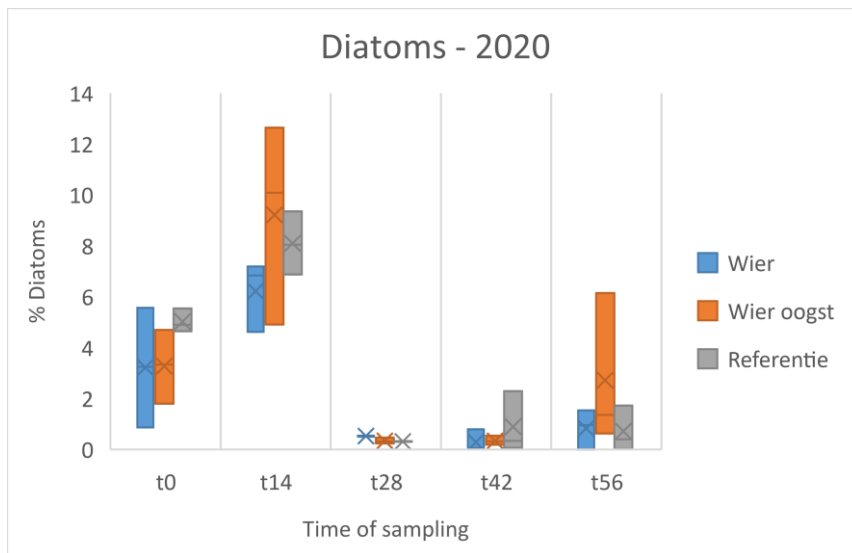
De gekozen markers amplificeren voornamelijk eukaryoten, alhoewel de kortere 18SV9 ook 25% ongewenst bacterieel DNA oppikt (**Figuur 7**). Binnen de Eukaryoten, komt het gevonden DNA voornamelijk van metazoa (dierlijk plankton), dinoflagellaten en Ochrophyta.



Figuur 7. Totaal percentage reads per taxonomische groep, kingdom (links) en phylum (rechts). '18S-T' refereert naar marker 18SV9, '18S-M' naar marker 18SV4.

Het percentage diatomeeën in de fytoplankton resultaten laat na 14 dagen een kleine, maar significante toename zien voor alle drie de behandelingen (Wier, Wier oogst, Referentie) van ongeveer 3% op t0 naar 6% voor Wier, 10% voor Wier oogst en 8% voor de referentie mesocosms (Figuur 8). Op t0 worden voornamelijk *Chaetoceros tenuissimus* en *Cerataulina bergonii* gevonden. Na 14 dagen is de soort *Chaetoceros calcitrans* het meest abundant. Na 28 dagen worden er geen diatomeeën meer gevonden met DNA, die vervolgens wel een lichte toename laten zien na 42 dagen (~1-2%; *Entomoneis* sp.). Na 56 dagen is er één wier oogst mesocosm die een waarde van 6% diatomeeën (*Entomoneis* sp.) geeft. De rest ligt tussen de 0 en 2% relatieve abundantie. Dit is een ander beeld dan de 2021 resultaten laten zien, waar op t0 nog ~30% relatieve abundantie diatomeeën wordt gevonden, die vervolgens na 35 dagen bijna geheel verdwenen was en niet meer terugkwam (zie paragraaf 4.1.5).

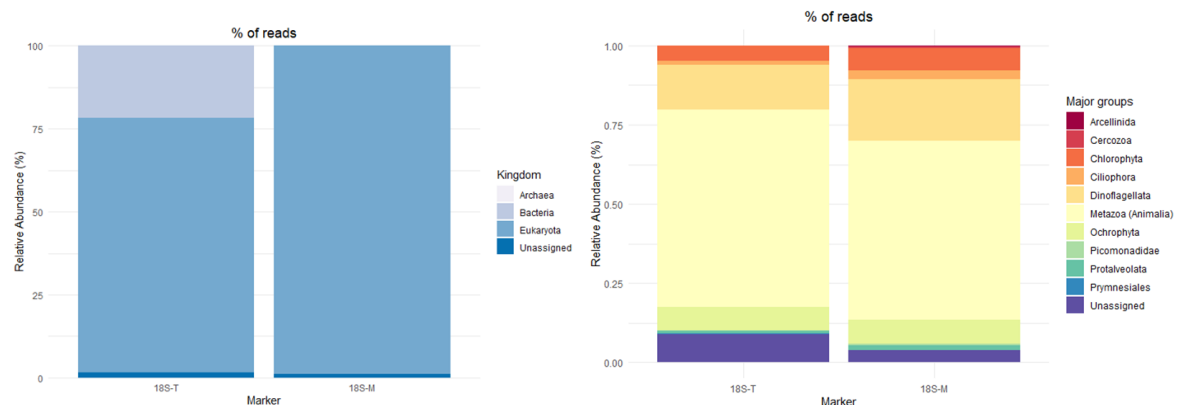
Deze verschuiving van het aandeel van de diatomeeën wordt niet waargenomen door de fluorescentie methode, die overigens een substantieel hoger aandeel van het fytoplankton aan de diatomeeën toewijst (**Fout!** Verwijzingsbron niet gevonden.). Toekomstige studies moeten deze twee methoden (chlorophyll en DNA) beter met elkaar integreren.



Figuur 8 Aandeel diatomeeën in de 18SV4 resultaten voor wier, wier oogst en referentie

3.1.3.1 DNA Resultaten

De gekozen markers amplificeren voornamelijk eukaryoten, alhoewel de kortere 18SV9 ook 25% ongewenst bacterieel DNA oppikt (**Figuur 7**). Binnen de Eukaryoten, komt het gevonden DNA voornamelijk van metazoa (dierlijk plankton), dinoflagellaten en Ochrophyta.

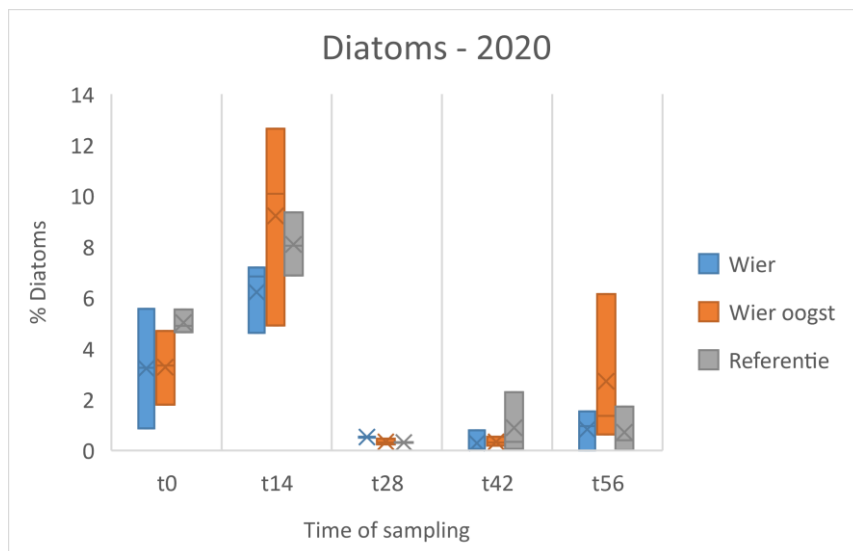


Figuur 7. Totaal percentage reads per taxonomische groep, kingdom (links) en phylum (rechts). '18S-T' refereert naar marker 18SV9, '18S-M' naar marker 18SV4.

Het percentage diatomeeën in de fytoplankton resultaten laat na 14 dagen een kleine, maar significante toename zien voor alle drie de behandelingen (Wier, Wier oogst, Referentie) van ongeveer 3% op t0 naar 6% voor Wier, 10% voor Wier oogst en 8% voor de referentie mesocosms (Figuur 8). Op t0 worden voornamelijk *Chaetoceros tenuissimus* en *Cerataulina bergonii* gevonden. Na 14 dagen is de soort *Chaetoceros calcitrans* het meest abundant. Na 28 dagen worden er geen diatomeeën meer gevonden met DNA, die vervolgens wel een lichte toename laten zien na 42 dagen (~1-2%; *Entomoneis* sp.). Na 56 dagen is er één wier oogst mesocosm die een waarde van 6% diatomeeën (*Entomoneis* sp.) geeft. De rest ligt tussen de 0 en 2% relatieve abundantie. Dit is een ander beeld dan de 2021 resultaten laten zien, waar op t0 nog ~30% relatieve abundantie diatomeeën wordt gevonden, die vervolgens na 35 dagen bijna geheel verdwenen was en niet meer terugkwam (zie paragraaf 4.1.5).

Deze verschuiving van het aandeel van de diatomeeën wordt niet waargenomen door de fluorescentie methode, die overigens een substantieel hoger aandeel van het fytoplankton aan de diatomeeën

toewijst (**Fout! Verwijzingsbron niet gevonden.**). Toekomstige studies moeten deze twee methoden (chlorophyll en DNA) beter met elkaar integreren.

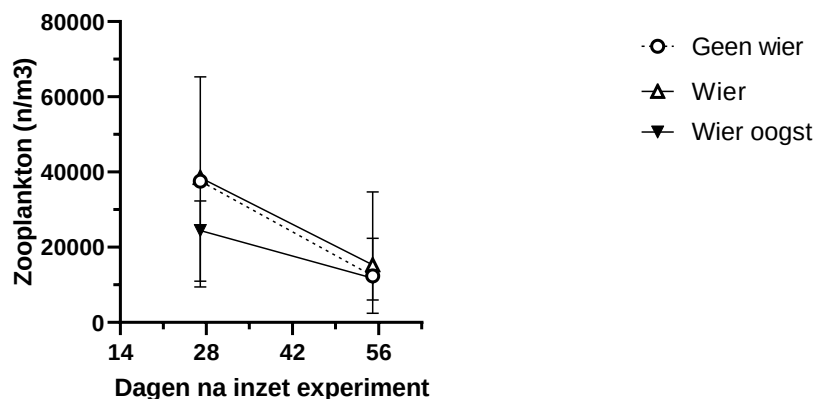


Figuur 8 Aandeel diatomeeën in de 18SV4 resultaten voor wier, wier oogst en referentie

3.1.4 Zoöplankton

Van het zoöplankton zijn in 2020 alleen totale dichtheden bepaald, zonder onderscheid tussen soorten te maken. De plankton scan methode was nog niet beschikbaar.

Zoöplankton aantallen per m³ namen tussen dag 28 en het eind van de proef af in alle drie behandelingen (Figuur 9). Er zijn grote spreidingen tussen de 3 replica's van de behandelingen te zien, en geen structurele verschillen tussen behandelingen.



Figuur 9. Zoöplankton aantallen per m³ in de mesocosms. Gemiddelden per behandeling met minima en maxima aantallen.

3.1.4.1 DNA Resultaten Zoöplankton

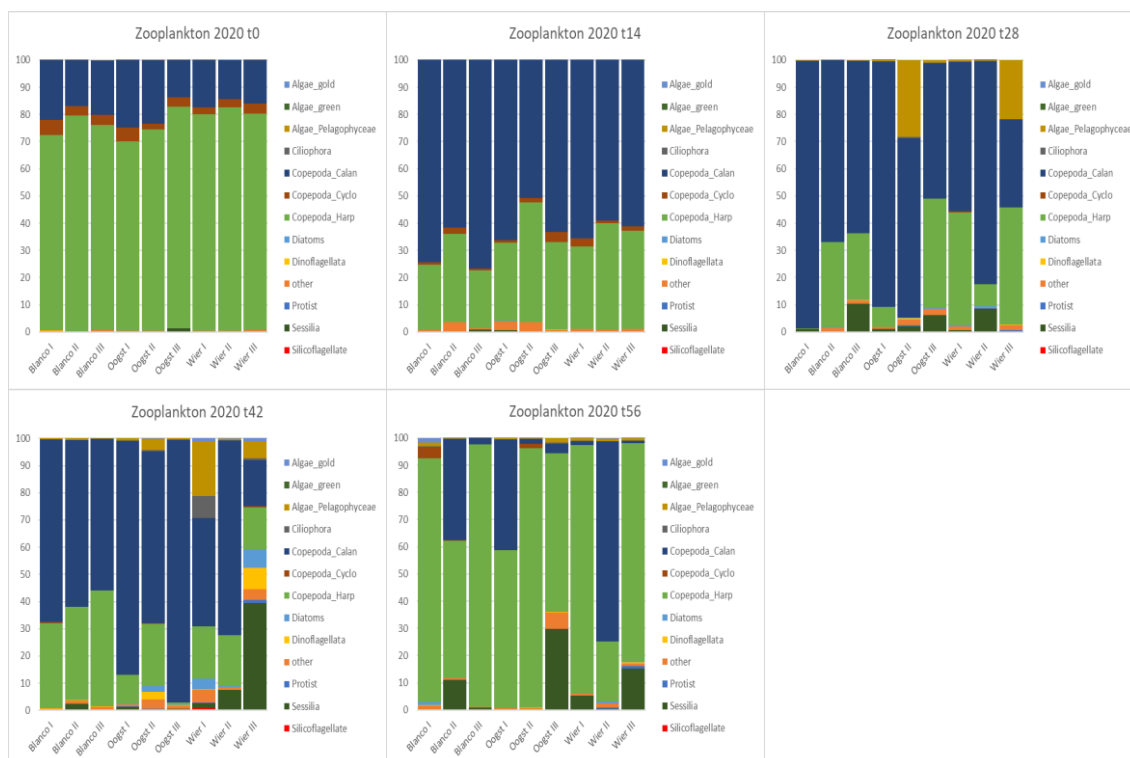
Op dag 0 is er in het zoöplankton DNA in alle mesocosms een dominantie te zien van copepoden, met name de harpacticoiden (onbekende soort(en) uit de familie Tachidiidae, mogelijk ook *Euterpina acutifrons* maar onzekere determinatie) zijn abundant met 75-85% relatieve abundantie (**Figuur 10**). Ook zien we calanoide copepoden met zo'n 15-25% relatieve abundantie, met name de soort *Acartia tonsa*, en in mindere mate *Pseudodiaptomus marinus*. Cyclopoide copepoden vormen de rest, met zo'n 5-10%, en zijn vertegenwoordigd door *Oithona spec.* en *Oithona davisae*. Het is ook duidelijk te zien

dat de samenstelling van het ingepompte zeewater zeer anders is in 2020 vergeleken met 2021 (bijvoorbeeld geen borstelwormen in 2020, versus grote hoeveelheden in 2021).

Na 14 dagen is een duidelijke verschuiving zichtbaar in alle mesocosms. De calanoïde copepoden zijn nu de dominante groep met zo'n 50-70% relatieve abundantie. *Acartia tonsa* blijft hier veruit de meest aangetroffen soort. De harpacticoiden (*Tachidiidae* indet) nemen af tot zo'n 20-30% en ook de Cyclopoiden nemen af (<5%). Een borstelworm (*Polydora cornuta*) wordt gevonden in lage hoeveelheden (<4%) in alle mesocosms.

Na 28 dagen lijkt het patroon van relatieve toename in calanoïde copepoden zich door te zetten met een nog hogere abundantie van *Acartia tonsa* in alle mesocosms (tot boven de 90% in sommige mesocosms, ongeacht behandeling), terwijl de harpacticoiden (*Tachidiidae* indet) zich in sommige mesocosms handhaven op hetzelfde niveau als op dag 14. In twee van de mesocosms (Oogst II en Wier III) neemt de goudalg (*Pelagophyceae*) *Pelagospilus aureus* toe (~25-30% relatieve abundantie) en ook zien we voor het eerst DNA van zeepokken (*Amphibalanus improvisus*, de brakwaterpok, in sommige mesocosms tot zo'n 10%). Dit beeld is op dag 42 nog ongeveer gelijk, maar na 56 dagen is een duidelijke omslag te zien waar de harpacticoiden copepoden weer dominant zijn (tot zo'n 90%). Wel worden er nu andere soorten gevonden: *Canthocamptidae* indet. en *Harpacticus* spec. De *Tachidiidae* zijn alleen nog te vinden in de referentie mesocosms. Calanoïde copepoden zijn in slechts drie van de mesocosms (Blanco II, Oogst I en Wier II) nog aanwezig, in dezelfde soortensamenstelling als hiervoor. Ook de zeepokken (brakwaterpok) handhaven zich in enkele mesocosms.

Er komt geen duidelijk beeld naar voren dat de aanwezigheid van het zeewier in de mesocosms de zoöplankton gemeenschap heeft veranderd.

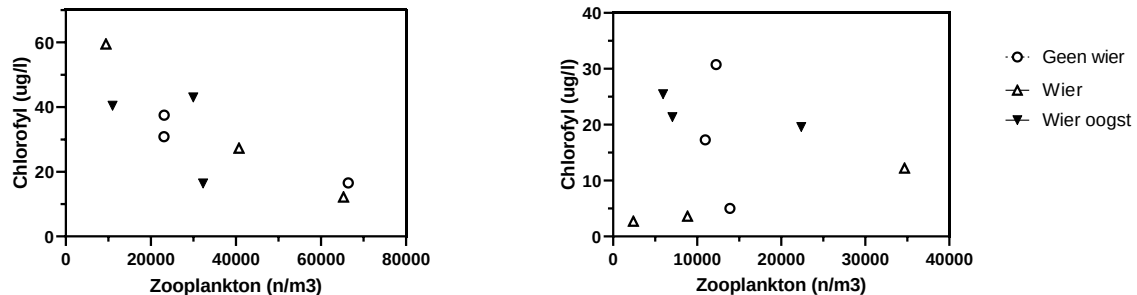


Figuur 10. Relatieve abundantie van DNA van verschillende taxonomische groepen in de zoöplankton monsters, inclusief aangetroffen fytoplankton taxa.

3.1.5 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

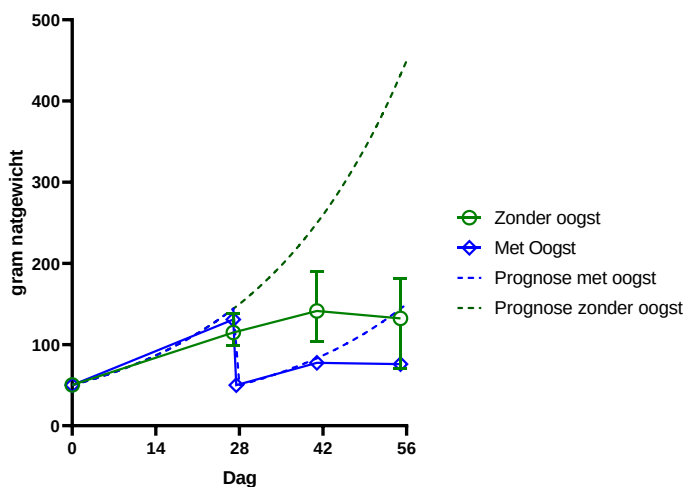
(**Figuur 11**). Dit lijkt te duiden op top down controle van het fytoplankton door het zoöplankton. Er is geen structureel verschil tussen de mesocosms met en zonder zeewier. De zes mesocosms met zeewier vormen tot het moment van de oogst (dag 28) nog replica's. Op dag 56 is de correlatie niet meer 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 nutriëntengebrek. Een effect van aan- of afwezigheid van zeewier is uit deze figuren niet op te maken.



Figuur 11. Zoöplankton aantallen per m^3 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.

3.1.6 Biomassa zeesla

In Figuur 12 is de geprognostiseerde ontwikkeling van de zeesla biomassa op basis van groeisnelheid en nutriënten beschikbaarheid weergegeven (zie Keur *et al.*, 2020). In dezelfde figuur is de daadwerkelijk vastgestelde aanwezige biomassa van het zeesla in de mesocosms tijdens de 2022 proef 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. Deze stagnatie kan het gevolg zijn van het afnemende licht aan het eind van de proef, en mede zijn beïnvloed door uitputting van de nutriënten voorraad. In de 'prognose' werd immers als uitgangspunt genomen dat alle aanwezige nutriënten voor het zeesla beschikbaar zouden zijn, terwijl in de praktijk een deel door andere organismen is gebruikt zoals bijvoorbeeld het perifyton dat zich op de wanden van de mesocosms ontwikkelde en het fytoplankton in de waterkolom.



Figuur 12. Prognose van de zeesla biomassa in gram natgewicht (stippellijn) voor beide behandelingen met zeesla en de daadwerkelijke gewichten tijdens het experiment in 2020 (markers en doorgetrokken lijn).

3.2 Resumerend; zeewier-plankton interactie in 2020

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. 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 zeesla, was meer productie waarschijnlijk ook niet mogelijk wegens nutriëntengebrek. De lichtintensiteit is tijdens de proef niet gemeten. Na dag 42 lijkt fosfaat de limiterende factor te zijn.

De zoöplankton-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 twee voorzien van zeesla, de derde bevatte geen zeesla. De invloed van 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.

Op basis van deze bevindingen is besloten in 2021 een langere proef eerder in het seizoen uit te voeren. Om een volledig beeld van de primaire productie in het systeem te krijgen, zijn dan ook metingen van de ontwikkeling van aangroeiende algen (perifyton) meegenomen.

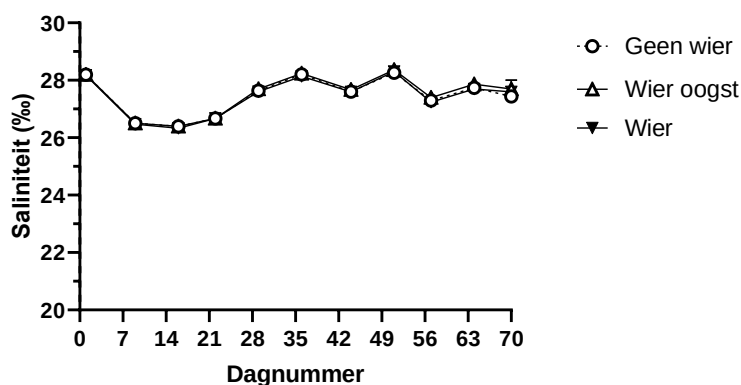
4 Mesocosmproef 2021

De mesocosmproef in 2021 werd uitgevoerd in de periode 15 juni 2021 (dag 0, zeesla introductie) tot en met 25 augustus 2021 (dag 71, laatste bemonstering).

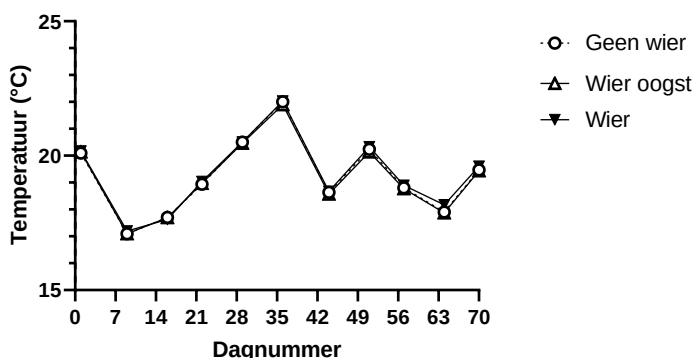
4.1 Resultaten

4.1.1 Water parameters

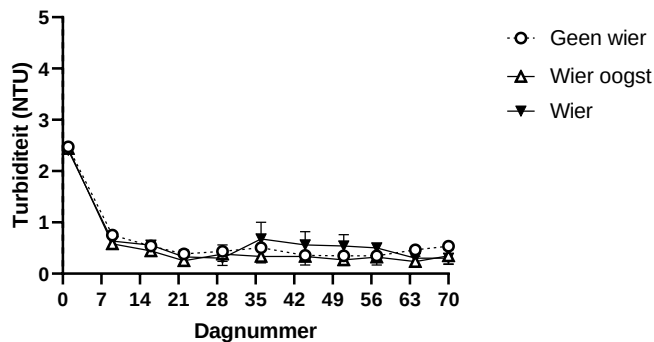
Gedurende het experiment was de pH gemiddeld 8.27 ± 0.06 , zonder significante verschillen tussen behandelingen. Ook het zuurstofgehalte ($104\% \pm 1.5$) en de saliniteit (27.5 ± 0.7 ; *Figuur 13*) was gedurende het experiment gelijk in alle mesocosms. De schommeling in saliniteit gedurende de proef was het gevolg van verdamping en regenval in de niet afgedekte mesocosms. De watertemperatuur varieerde met de buitentemperatuur rond het gemiddelde van $19.2\text{ °C} \pm 1.4$, met een range van 17 tot 22 °C (*Figuur 14*). Het water in alle mesocosms was vanaf dag 7 helder met een turbiditeit van rond de 0.5 NTU (*Figuur 15*). Verschillen tussen behandelingen waren niet statistisch significant.



Figuur 13 Saliniteit van de waterkolom van de mesocosms gedurende de proef (2021).



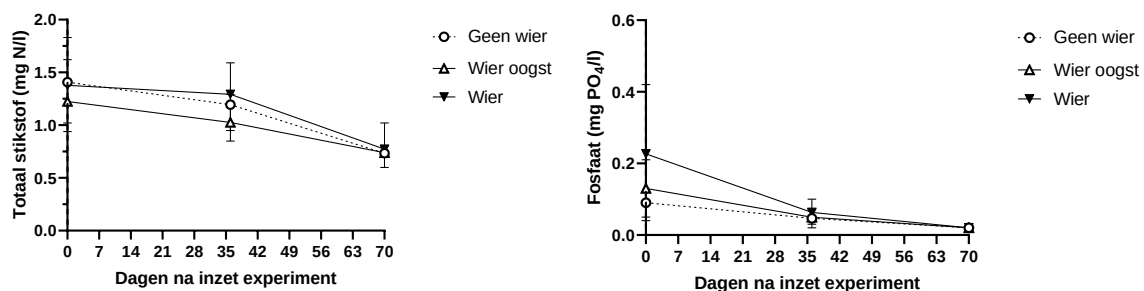
Figuur 14 Watertemperatuur in de mesocosms gedurende de proef (2021)



Figuur 15 Turbiditeit in de mesocosms in NTU (2021). Gemiddelde van 3 replica's per behandeling is in verschillende punten weergegeven en de foutbalken zijn de minimale en maximale gemeten concentraties.

4.1.2 Nutriënten

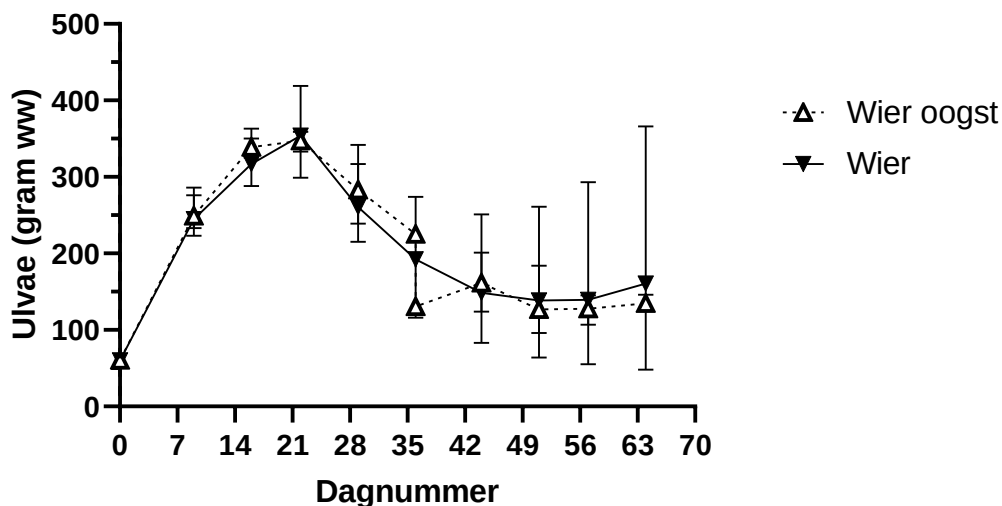
Er zijn geen significante verschillen gevonden in de nutriënten gehalten van de drie behandelingen. De concentratie anorganisch stikstof nam gedurende het experiment af van 1.3 naar 0.7 mg N/l (Figuur 16). Fosfaat was blijkbaar de limiterende nutriënt. Aan het eind van de proef lag de concentratie $\text{PO}_4\text{-P}$ in alle mesocosms onder de detectielimiet van 0.02 mg/l.



Figuur 16. Nutriëntenconcentraties van anorganisch stikstof, (als $\text{NO}_3\text{-N}$ en $\text{NH}_4\text{-N}$) en fosfor (als $\text{PO}_4\text{-P}$) in de waterkolom van de mesocosms (2021).

4.1.3 Biomassa zeesla

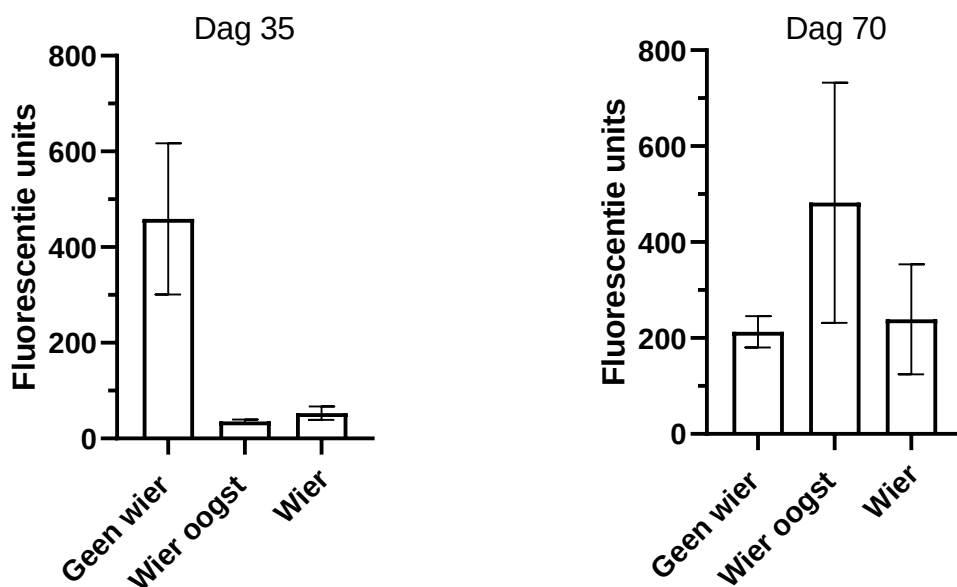
Tijdens de eerste twee weken na de introductie nam de biomassa van de zeesla in de mesocosms snel toe (Figuur 17). In de eerste week bedroeg de groeisnelheid ca. 35% per dag. Vanaf dag 21 nam de biomassa geleidelijk af, totdat deze vanaf dag 42 stabiliseerde rond een gemiddelde van ca. 130 gram per mesocosm. Deze ontwikkeling was vergelijkbaar in alle mesocosms met zeewier en werd niet beïnvloed door de oogst van 100 gram rond dag 35 uit de 'Wier-oogst' mesocosms. De variatie tussen de mesocosms was wel groter in de 'Wier' mesocosms dan in de 'Wier-oogst' mesocosms, met ranges in biomassa aan het eind van de proef van 128-146 gram in de Wier-oogst mesocosms en 48-366 gram in de Wier mesocosms.



Figuur 17. Ontwikkeling van de zeesla biomassa in gram natgewicht in de mesocosms (2021). op dag 35 is 200 gram zeesla geoogst uit de 'Wier Oogst' mesocosms.

4.1.4 Perifyton ontwikkeling

De perifyton biomassa dat zich op de glasplaatjes ontwikkelde was op dag 35 substantieel hoger in de mesocosms zonder zeewier dan in de mesocosms met zeewier (Figuur 18). De aangroei op de glasplaatjes vormde een goede afspiegeling van de mate van aangroei op de wanden van de mesocosms, die op dag 35 ook duidelijk groener waren bij afwezigheid van zeewier. Op de glasplaatjes die daarna zijn ingezet en die op dag 70 werden doorgemeten was het verschil tussen de behandelingen niet meer zichtbaar. Echter op de wanden van de bakken bleef het verschil wel aanwezig. Dit duidt erop dat verschillen in perifyton biomassa tussen mesocosms met en zonder zeewier voor dag 35 ontstonden, en in de periode daarna werden gehandhaafd, maar niet verder toenamen.



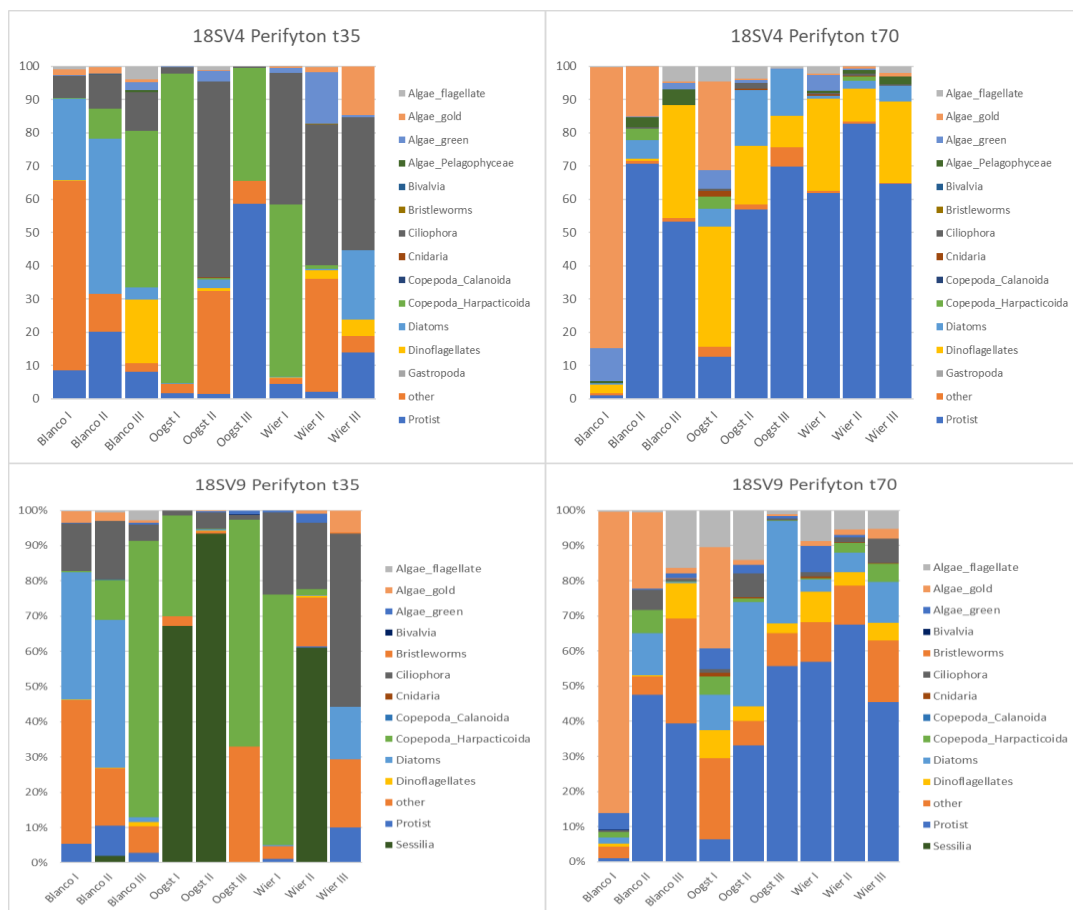
Figuur 18. Perifyton biomassa gemeten als fluorescentie units op in de mesocosms geëxposeerde glasplaatjes tussen dag 0 en 35 (links) en tussen dag 35 en 70 (rechts) (2021).

4.1.4.1 DNA resultaten perifyton

De DNA-resultaten laten zien dat na 35 dagen een diverse groep organismen te vinden was op de glasplaatjes, die per mesocosm ook zeer variabel was in relatieve abundantie en geen duidelijke trends liet zien tussen behandelingen (**Figuur 19**). In de mesocosms werden Diatomeeën (met name *Amphora/Halamphora spec*, *Cylindrotheca closterium* en *Amphiprora paludosa*), Ciliophora (*Pseudovorticella spec* en *Holosticha spec*), protisten (*Chlorarachnion reptans*), Harpacticoide copepoden (*Harpacticus spec*) en nematoden (Monhysterida) gevonden. Mogelijk is de hogere biomassa in de mesocosms zonder wier het resultaat van de hogere relatieve abundantie diatomeeën in deze mesocosms dan in oogst of wier mesocosms.

Op de glasplaatjes die van dag 35 en dag 70 in de mesocosms hingen werd een meer uniforme verdeling van perifyton zichtbaar in alle mesocosms, met uitzondering van Blanco I en Oogst I. Deze werd gevormd door protisten (bijna uitsluitend *Chlorarachnion reptans*, een mixotrophe amoeboïde protozoa), dinoflagellaten (met name *Amphidinium carterae*, een photosyntesizing gymnodinoid) en in sommige mesocosms Diatomeeën (*Amphiprora paludosa*) en flagellate algen (o.a. *Acanthoecca spectabilis*). Goudalgen (*Ochromonas spec*) zijn dominant gevonden in Blanco I en zijn ook relatief hoog in Blanco II en Oogst I. De wat hogere biomassa bij de wier oogst mesocosms kan ook hier mogelijk worden gewijd aan de hogere relatieve abundantie van diatomeeën (met name in Oogst II en III).

Aangezien de sessilia (zeepokken) alleen kunnen worden gedetermineerd met 18SV9 (DNA van 18SV4 van deze groep is te lang om te sequencen), is voor het perifyton in **Figuur 19** ook deze marker meegenomen. Deze laat duidelijk zien dat na 35 dagen de zeepokken op de glasplaatjes settlen wanneer het wier geoogst wordt (twee mesocosms) en bij één van de 'Wier' mesocosms. Blijkbaar zorgen zij niet voor veel biomassa in deze samples. Op de plaatjes die na dag 35 in de mesocosms werden gehangen en werden geanalyseerd op dag 70 werden geen zeepokken meer aangetroffen. Blijkbaar heeft er na dag 35 geen settlement van zeepokken meer plaatsgevonden.

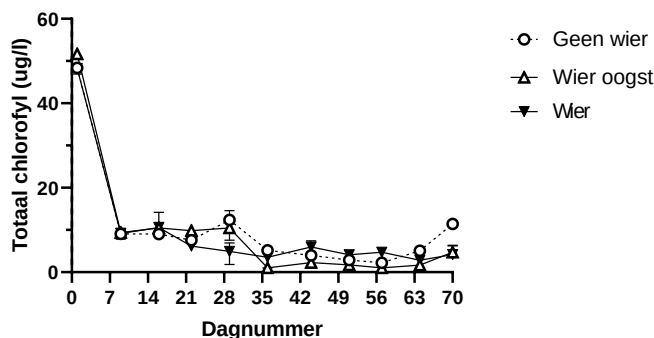


Figuur 19. Relatieve abundantie van DNA van soortgroepen in de perifyton monsters over de perioden Dag 0-35, en Dag 35-70 (2021). Naast de resultaten van regio 18SV4 (boven) zijn ook resultaten van 18SV9 (onder) weergegeven omdat hierin ook zeepokken (*Sessilia*) gedetecteerd worden.

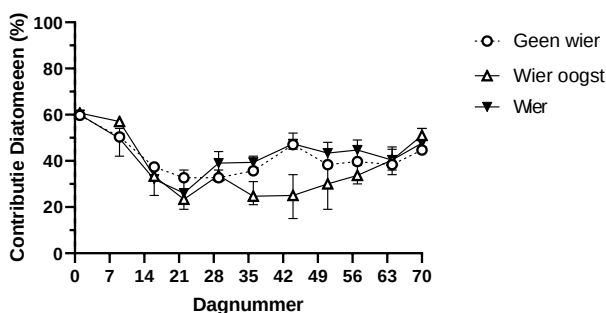
4.1.5 Fytoplankton

Het totaal chlorofylgehalte in de waterkolom van de mesocosms neemt in alle mesocosms sterk af in de eerste week van het experiment (**Figuur 20**). De drie weken daarna schommelt het chlorofylgehalte net onder 10 µg/l waarna het afneemt tot minder dan 5 µg/l. In de laatste twee weken van het experiment is in de mesocosms zonder zeewier een lichte toename in het chlorofylgehalte zichtbaar.

Binnen het chlorofyl waren twee groepen 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, maar lag meestal rond 50:50. Verschillen tussen behandelingen ontstonden alleen in de periode na de 'oogst', toen het aandeel van diatomeeën in de 'wier oogst' mesocosms daalde (**Figuur 21**). Deze daling leek echter al te zijn ingezet op dag 35, dus voordat de 'oogst' werd uitgevoerd. De relatie met het verwijderen van het zeewier uit de wier-oogst mesocosms is dan ook niet duidelijk. Aan het eind van de proef is het aandeel diatomeeën in alle mesocosms weer gelijk.



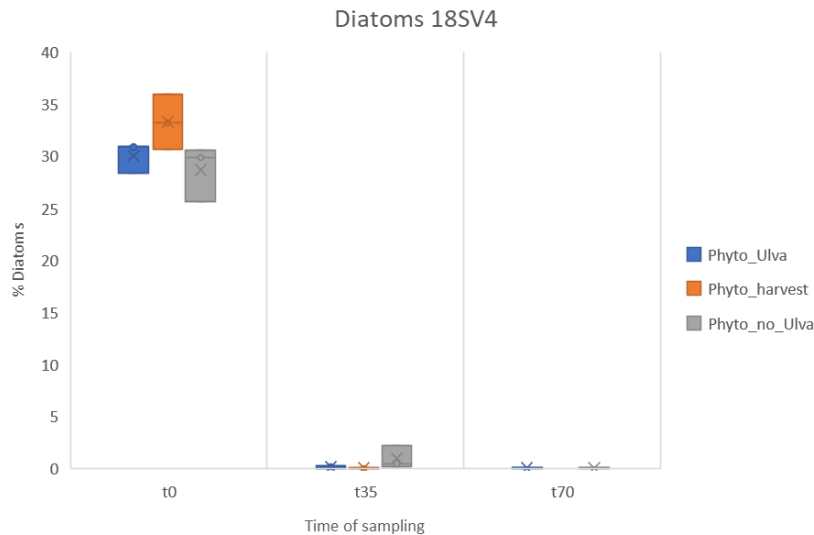
Figuur 20. Het totaal chlorofyl in de waterkolom van de mesocosms (2021).



Figuur 21 Percentuele aandeel van diatomeeën in de fytoplankton gemeenschap (2021)

4.1.5.1 DNA resultaten fytoplankton

Diatomeeën zijn ook gevonden met behulp van DNA metabarcoding (Figuur 22). De percentages zijn niet vergelijkbaar aangezien bij DNA metabarcoding zeer veel fylogenetische groepen aanwezig zijn naast alleen de groenalgen en diatomeeën die met de chlorofylmeting worden gemeten. Ook zijn er slechts op drie tijdstippen fytoplankton samples genomen voor DNA analyses: t0, t35 en t70. Deze laten zien dat op t0 bij alle drie de behandelingen ongeveer 30% van de relatieve abundantie in het fytoplankton uit diatomeeën bestaat. Deze bestaat uit een diverse groep soorten uit verschillende families, onder andere *Leptocylindrus danicus*, *Skeletonema marinoi-dohnii* complex, *Cerataulina pelagica*, *Chaetoceros socialis*, *Rhizosolenia setigera* en *Leptocylindrus minimus*. Na 35 dagen zijn deze bij alle drie de behandelingen nagenoeg verdwenen, met uitzondering van 1 mesocosm zonder zeewier die nog 3% diatomeeën toont (*Amphiprora paludosa*; nb. deze soort is ook zeer abundant in het perifyton). Na 70 dagen worden nauwelijks nog diatomeeën in het fytoplankton aangetroffen (in tegenstelling tot sommige samples in het perifyton, zie hierboven).



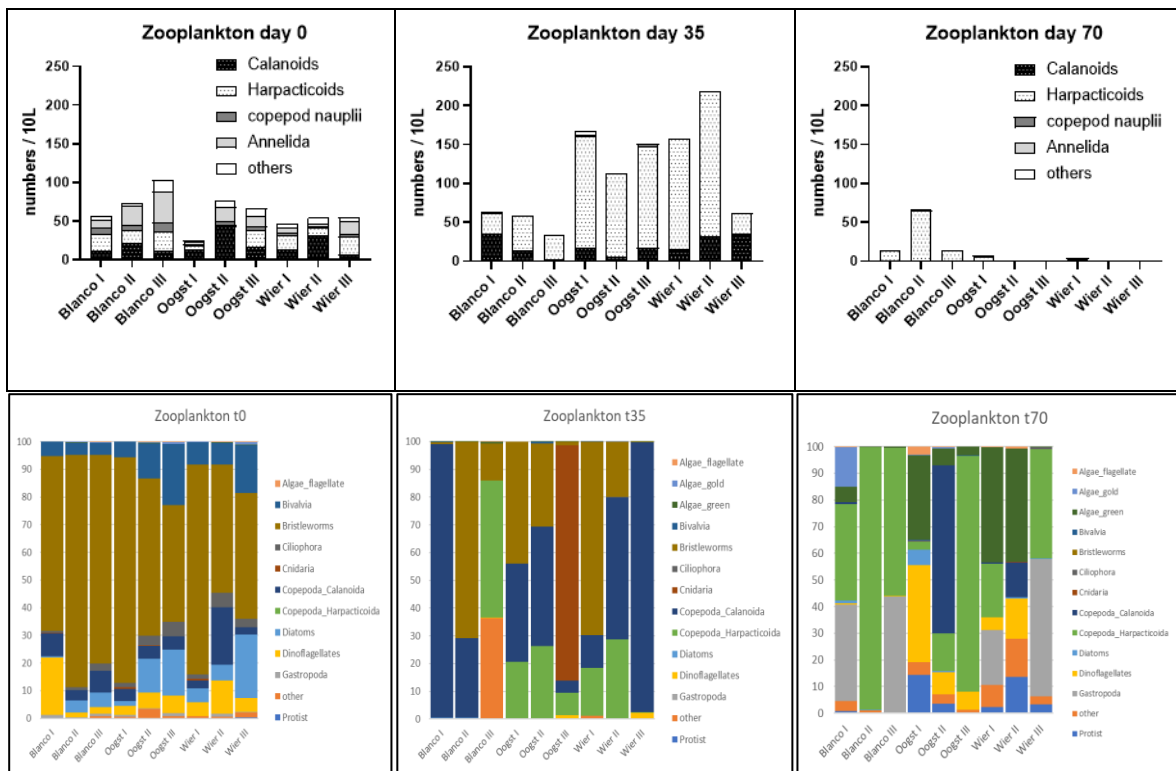
Figuur 22 Proporties diatomeeën in de 18SV4 resultaten voor wier, wier oogst en referentie (2021)

4.1.6 Zoöplankton

De zoöplankton gemeenschap in de mesocosms is morfologisch gezien slechts ten dele in kaart gebracht omdat de toegepaste Zooscan methode alleen de grotere individuen (vanaf ca. 100 µm) waarneemt. De resultaten zijn samengevat in *Figuur 23*.

In alle monsters zijn copepoden verreweg dominant. De Zooscan onderscheidde drie subgroepen van de klasse van Copepoda: de orde Calanoida, de orde Harpacticoida, en het larvale stadium van deze beide ordes, onder de noemer nauplii. Voor beide groepen vormen eencellige algen, micro-organismen en micro-zoöplankton (m.n. ciliaten) de belangrijkste voedselbronnen (Lee et al., 1985; Rieper, 1982; Roshchin and Chepurnov, 1985; Lonsdale et al., 1979; Paffenhofer et al., 1982; Williamson and Butler, 1986). Grofweg kan gesteld worden dat calanoide copepoden hun voedsel meer in de waterkolom zoeken, terwijl harpacticoiden meer in de buurt van de bodem of ander substraat foerageren. Deze scheiding is echter niet strikt (Suderman and Thistle, 1998).

Bij aanvang van de tests (dag 0) bestonden tussen de mesocosms weinig verschillen in de zoöplankton gemeenschap; beide copepoden ordes waren in min of meer gelijke dichtheden aanwezig en daarnaast werden vooral de pelagische larven van wormen (Annelida) aangetroffen (*Figuur 23*) die blijkbaar aanwezig waren in het zeewater tijdens het vullen van de mesocosms. Op dag 35 was dit beeld sterk veranderd. De wormenlarven waren uit de waterkolom verdwenen, waarschijnlijk door vestiging in de bodem, en de Zooscan detecteerde vrijwel uitsluitend copepoden. De aantallen calanoide copepoden waren in alle mesocosms min of meer vergelijkbaar en verschilden nauwelijks van de aantallen die op dag 0 aanwezig waren. In vrijwel alle mesocosms waar zeewier aan was toegevoegd (uitzondering was 'Wier III') waren de aantallen harpacticoiden substantieel hoger dan in de mesocosms zonder zeewier. Op dag 70 werd in de monsters uit de mesocosms waar wier aan was toegevoegd nauwelijks nog zoöplankton gedetecteerd. In de mesocosms zonder zeewier waren toen nog wel enkele harpacticoiden aanwezig.



Figuur 23 Zoöplanktondichtheden (2021). Bovenste drie figuren: Dichtheden van enkele zoöplankton groepen in de waterkolom van de mesocosms bepaald met behulp van de Zooscan-methode op dag 0, 35 en 70. Onderste drie figuren: hoofdgroepen plankton aan de hand van DNA-analyses (18SV4, relatieve abundanties) van netmonsters.

4.1.6.1 DNA resultaten zoöplankton

Op dag 0 (t0) zijn er in het zoöplankton in alle mesocosms een grote hoeveelheid borstelwormen aanwezig, met name de soorten *Polydora cornuta*, *Pygospio elegans* (zandpijp) en *Capitella capitata* (slangpier) en daarnaast *Lanice conchilega* (schelpkokerworm) in lagere hoeveelheden (Figuur 23). Calanoïde copepoden zijn ook in relatief lage hoeveelheden aanwezig (~5-15%) met de soorten *Centropages hamatus/typicus*, *Acartia bifilosa*, *A. clausii* en *Temora longicornis*. Ook (larven van) bivalven (*Ensis* sp) zowel als diatomeën (zie fytoplankton) zijn aanwezig, nooit met meer dan 10-20%. Harpacticoïde copepoden zijn niet gevonden op t0. Dit representeert de samenstelling van het ingepompte zeewater en toont goede overlap met de zooscan resultaten, op de Harpacticoïde copepoden na.

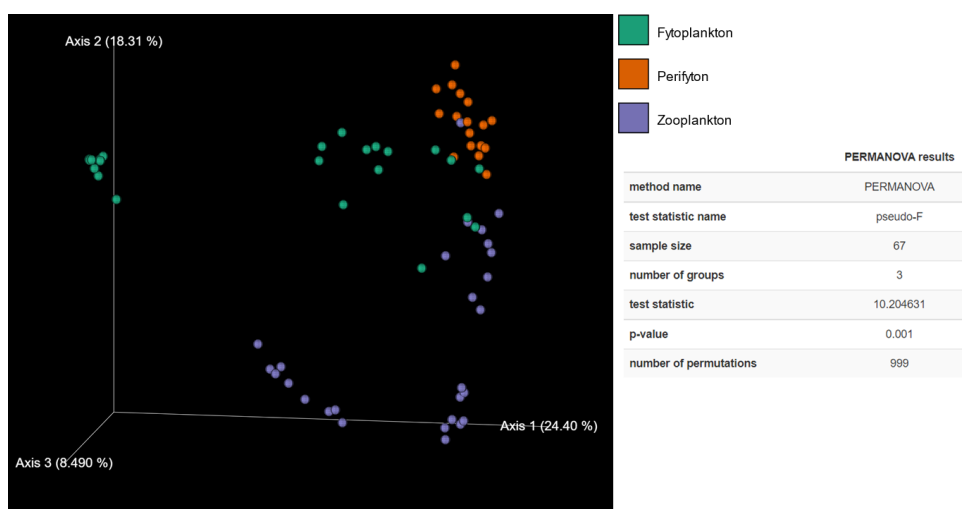
Na 35 dagen (t35) is bij alle behandelingen te zien dat de borstelwormen in sommige mesocosms verdwijnen (Blanco I, Oogst III), terwijl het in andere aanwezig blijft (met name zandpijp blijft aanwezig; bv. Blanco II en Wier I). Andere groepen zijn nu dominant, met name de Harpacticoïde en Calanoïde copepoden. De Calanoïde copepoden worden gedomineerd door *Centropages hamatus/typicus* en *Acartia tonsa* (langsprietroeipootkreeft). Een ongeïdentificeerde *Harpacticus* spec., en ongeïdentificeerde soorten uit de families Miraciidae en Canthocamptidae domineren de Harpacticoïde copepoden. Er zijn moeilijk duidelijke trends aantoonbaar tussen de verschillende behandelingen, aangezien de verschillen tussen de drie mesocosms per behandeling erg groot zijn (dit is ook deels zichtbaar in de Zooscan resultaten). De opvallende groep "Other" bij Blanco III betreft DNA van *Microstomum* spec., een nematode.

Na 70 dagen worden er geen borstelwormen meer teruggevonden in het zoöplankton. De meest dominante groep over alle mesocosms heen zijn de Harpacticoïden (*Harpacticus* en *Tisbe* spec.). Blanco II wordt bijna voor 100% gevormd door een ongeïdentificeerde soort uit de familie Canthocamptidae (Harpacticoïde). Alleen Oogst II en Wier II tonen nog een relatief hoge hoeveelheid Calanoïde copepoden (*Acartia tonsa*) die in alle andere mesocosms niet gezien wordt. In plaats daarvan zien we groepen die niet typisch worden bemonsterd met zoöplankton netten: Gastropoda

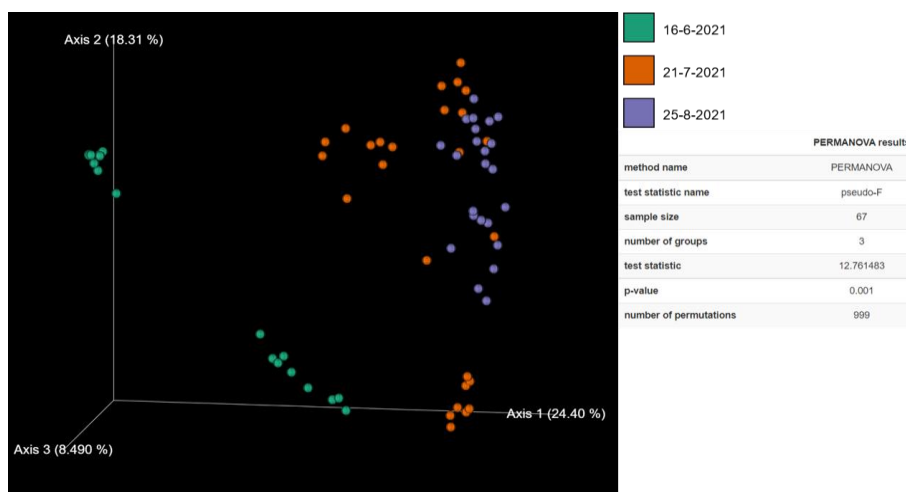
(*Peringia ulvae*, wadslakje), groenalgen (*Prasinococcus*) en dinoflagellaten (o.a. *Amphidiniella sedentaria* en *Heterocapsa rotundata*). Ook hier zijn grote verschillen zichtbaar tussen de verschillende mesocosms, waardoor vergelijkingen tussen behandelingen lastig zijn. Wel valt op dat er geen dinoflagellaten en protisten worden aangetroffen in de Blanco mesocosms, terwijl deze groepen wel aanwezig zijn bij de Wier en Wier Oogst mesocosms. De wadslakjes worden verder alleen in de Blanco en Wier mesocosms aangetroffen, niet in Oogst.

4.1.7 Beta-diversiteit

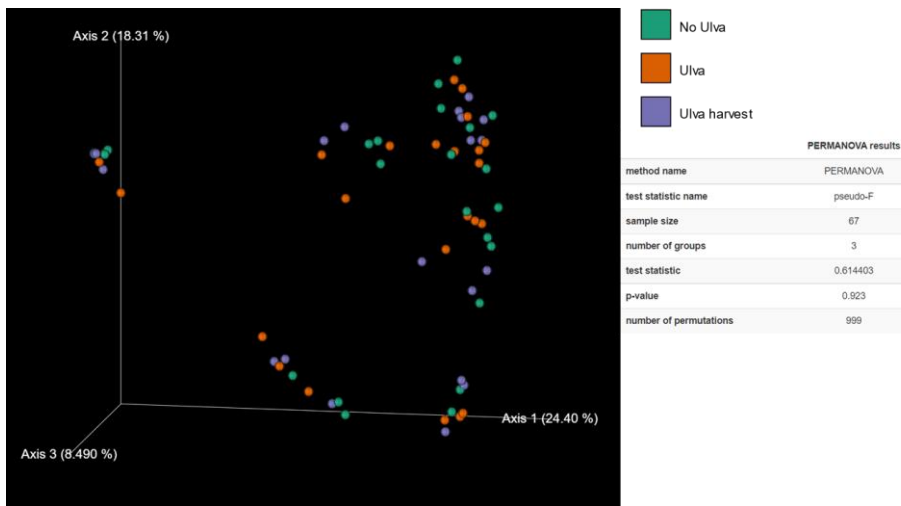
De Emperor plot per sample type laat duidelijk zien dat de drie sampling methoden (zoöplankton, fytoplankton en perifyton) een significant andere soortensamenstelling samplen ($p < 0.001$; *Figuur 24*). Dit betekent dat het zeker nuttig is om in mogelijke vervolgstudies alle drie de sampling methoden te gebruiken, gezien zij een significant ander deel van de gehele aanwezige biodiversiteit in het systeem samplen. Daarnaast zijn de verschillen ook significant per sample-moment ($p < 0.001$; ongeacht of er wordt gefilterd op sample type of niet; *Figuur 25*). Echter zijn er geen significante verschillen zichtbaar als de samples worden gegroepeerd op behandeling (Wier, Blanco of Wier Oogst, *Figuur 26*).



Figuur 24 Beta-diversiteit per sample type (significant)



Figuur 25 Beta-diversiteit per sampling moment (significant)



Figuur 26 Beta-diversiteit per behandeling (niet significant)

4.2 Resumerend; zeewier-plankton interactie in 2021

Drie weken na de introductie stagneerde de groei van de zeesla in de mesocosms, waarschijnlijk als gevolg van limitatie van fosfaat. Na deze periode stierf een deel van het zeesla af waarna de biomassa per mesocosms stabiliseert. De oogst werd gecompenseerd met een korte biomassa toename totdat het stabilisatie niveau weer was bereikt.

Het lijkt aannemelijk dat dit stabilisatie niveau bepaald werd door de snelheid waarmee nutriënten weer beschikbaar komen uit afgestorven zeesla en plankton. Het oogsten van het zeewier had geen invloed op de ontwikkelingen in de mesocosms.

De aanwezigheid van zeesla leidde in de eerste helft van de proef tot een toename van het aantal harpacticoide copepoden (op dag 35). Mogelijk gebruikten deze dieren het oppervlak van het zeewier om te foerageren op de daarop aanwezige micro-organismen. Met de aanwezigheid van het zeesla werd dus het leefgebied van de harpacticoide copepoden vergroot.

Op de dichtheden calanoide copepoden, die meer in de waterkolom foerageren, had de toevoeging van het zeesla geen effect. De afwezigheid van zeewier leidde ook niet tot een beter voedselaanbod voor deze copepoden, omdat de beschikbare nutriënten niet leidde tot meer microalgen in de waterkolom, maar tot meer perifyton op de wanden van de mesocosms.

Na dag 35, als de groei van het zeesla al sterk geremd is, wordt ook in de planktongemeenschap het effect van nutriëntenlimitatie zichtbaar. Dit was ook het geval in de mesocosms zonder zeesla, waar het perifyton op de rand van de mesocosms het belangrijkste deel van de beschikbare nutriënten vastlegde. Fytoplankton was na dag 35 nog nauwelijks aanwezig in alle mesocosms, en ook zoöplankton werd op dag 70 slechts in zeer lage dichtheden aangetroffen, en dan voornamelijk in de mesocosms zonder zeesla.

5 Conclusies

5.1 Zeewier-plankton interacties

De hypothese van deze studie was dat de aanwezigheid van zeewier in de mesocosms zou leiden tot nutriënten uitputting met consequenties voor de planktongemeenschap. In beide proeven echter raakten de nutriënten in de mesocosms ook uitgeput wanneer er geen zeewier aanwezig was. De beschikbare nutriënten werden in dat geval benut door perifyton dat zich voornamelijk op de wand van de mesocosms ontwikkelde. De ontwikkeling van de fytoplanktongemeenschap werd in alle mesocosms geremd door de uitputting van de nutriënten ongeacht of er zeewier aanwezig was. Het enige effect dat werd waargenomen betrof de toename van het aandeel harpacticoide copepoden van het zoöplankton in de mesocosms met zeewier. Dit is waarschijnlijk te verklaren doordat deze copepoden het oppervlak van het zeewier als substraat konden gebruiken om te foerageren op epifytische algen.

5.2 Inzetbaarheid van de gebruikte monitoring technieken

Hoewel in deze studie slechts op zeer beperkte schaal determinaties tot op soortniveau zijn uitgevoerd is evident dat door het gebruik van DNA een enorm aantal soorten gedetecteerd kan worden die met traditionele microscopische technieken niet gevonden zullen worden. De interpretatie van deze resultaten is echter nog niet eenvoudig, mede doordat ze geen inzicht bieden in absolute dichtheden van de geïdentificeerde taxa.

De DNA-resultaten worden sterk beïnvloed door de aan- en - nog meer - afwezigheid van referentie-sequenties in DNA databases. Voor de Nederlandse soorten copepoden bestaat er nog een flink hiaat in het aantal soorten met een bekende barcode (Tabel 2). Met name de harpacticoide copepoden zijn zeer matig gerepresenteerd, met maar 18,9% van de 111 in Nederland voorkomende soorten met een referentie barcode. Dit aantal is voor de calanoide copepoden een stuk hoger (bijna 80%), wat verklaart waarom deze groep ook in deze studie relatief goed op naam kon worden gebracht. Cyclopoide copepoden werden niet veel aangetroffen in deze studie. De ontwikkeling van DNA databases is de laatste jaren in een enorme stroomversnelling geraakt, zodat verwacht kan worden dat de accuratesse van de soortidentificatie die met DNA mogelijk is de komende tijd sterk zal verbeteren. Voor het vaststellen van soortenrijkdom worden DNA technieken daarom snel beter.

Tabel 2 Aantal Nederlandse copepoden soorten en het percentage waarvan de barcode bekend is (bron: ARISE target list, Naturalis Biodiversity Center, betreft hier analyse met COI , voor 18S is deze data niet beschikbaar, maar deze is typisch nog een stuk lager)

Phylum	Order	Totaal soorten	Soorten met barcodes	Totaal barcodes	% Coverage
Arthropoda	Harpacticoida	111	21	226	18.9
Arthropoda	Calanoida	48	38	1320	79.2
Arthropoda	Cyclopoida	68	45	845	66.2

Het bepalen van relatieve abundantie is met de huidige DNA methoden nog niet goed mogelijk. Wat in deze studie als relatieve abundantie is bepaald is feitelijk de relatieve abundantie van het DNA na opwerking van het monster. Een belangrijke stap in deze opwerking is de amplificatie van het DNA. Dit verloopt echter niet voor elke soort even efficiënt zodat de oorspronkelijke verhoudingen van DNA tussen soorten na de opwerking kunnen zijn verschoven in het 'voordeel' van goed te amplificeren DNA. De oorspronkelijk in het monster aanwezige onderlinge verhoudingen tussen het DNA van

verschillende soorten gaat dan dus deels verloren. Het is de verwachting dat de analyse technieken in de nabije toekomst zo verbeteren dat amplificatie niet meer nodig is.

Tot die tijd is het lastig om verschuivingen in dominantie van soorten op basis van DNA vast te stellen. In de huidige praktijk kunnen verschuivingen in gemeenschappen pas met zekerheid met DNA worden vastgesteld als het DNA van soorten vrijwel volledig uit het systeem (de mesocosm in dit geval) zijn verdwenen.

Voor het vaststellen van de soortenrijkdom, en/of de aanwezigheid van specifieke soorten zijn DNA technieken nu wel al zeer goed bruikbaar. Met de drie sampling methoden (zoöplankton, fytoplankton en perifyton) werd een significant andere soortensamenstelling bemonsterd. Dit geeft aan dat het nodig is om in mogelijke vervolgstudies verschillende sampling methoden toe te passen om een goed beeld van de biodiversiteitsrespons te verkrijgen.

De resultaten van de Zooscan zijn ook veelbelovend. Nadeel is dat op dit moment nog slechts het grotere zoöplankton gedetecteerd kan worden, maar het ligt in de lijn der verwachting dat dat in de toekomst zal verbeteren door verhoging van de resolutie van de scans. Wellicht zal deze geautomatiseerde methode nooit zo accuraat zoöplankton kunnen onderscheiden als een goed getrainde analist, zeker wanneer het monsters met veel zwevend materiaal betreft. Dergelijke taxonomisch opgeleide analisten worden echter schaars, en de snelheid waarmee in de toekomst een monster door de Zooscan geanalyseerd kan worden zal voor een analist nooit haalbaar zijn.

Waarschijnlijk zal in de toekomst vrijwel real time analyse mogelijk worden. Daarnaast kan door toepassing van rekenregels eenvoudig een schatting van biomassa en grootte-verdeling worden gemaakt van de zoöplanktongemeenschap. Voor efficiënte monitoring van meso-zoöplankton is de Zooscan daarom een veelbelovend instrument zolang de beperkingen in het oog worden gehouden. In elk geval was het systeem in 2021 goed in staat om belangrijkste copepoden groepen te onderscheiden en een effect van het zeewier daarop zichtbaar te maken. Copepoden vormen de belangrijkste zoöplankton groep in de Noordzee.

Het zal erg nuttig zijn om de resultaten van de Zooscan te integreren met DNA resultaten, om zodoende een complementair beeld te krijgen van de biomassa, grootte-verdeling en (soorten)diversiteit.

6 Kwaliteitsborging

Wageningen Marine Research beschikt over een ISO 9001:2015 gecertificeerd kwaliteitsmanagementsysteem. De organisatie is gecertificeerd sinds 27 februari 2001. De certificering is uitgevoerd door DNV.

Literatuur

- Keur M.C., Foekema E.M., 2020 Zeewier en plankton; een eerste verkenning met zeesla in mesocosms. Wageningen University & Research rapport C115/20
- Lee, W.Y., Zhang, X.K., Vanbaalen, C., Arnold, C.R., 1985. Feeding and reproductive-performance of the harpacticoid *tisbe-carolinensis* (copepoda, crustacea) in 4 algal cultures. *Marine Ecology Progress Series* 24, 273-279.
- Lonsdale, D.J., Heinle, D.R., Siegfried, C., 1979. Carnivorous feeding-behavior of the adult calanoid copepod *acartia-tonsa* dana. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 36, 235-248.
- 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
- Paffenhofer, G.A., Strickler, J.R., Alcaraz, M., 1982. Suspension-feeding by herbivorous calanoid copepods - a cinematographic study. *Marine Biology* 67, 193-199.
- Rieper, M., 1982. Feeding preferences of marine harpacticoid copepods for various species of bacteria. *Marine Ecology Progress Series* 7, 303-307.
- Roshchin, A.M., Chepurnov, V.A., 1985. Some features of feeding and development of 2 benthic harpacticoid species in benthic diatom cultures. *Zoologicheskij Zhurnal* 64, 1648-1654.
- Suderman, K., Thistle, D., 1998. Adult female harpacticoid copepods maintain their energy reserves by feeding while suspended during storms. *Marine Ecology Progress Series* 164, 245-252.
- Williamson, C.E., Butler, N.M., 1986. Predation on rotifers by the suspension-feeding calanoid copepod *diaptomus-pallidus*. *Limnology and Oceanography* 31, 393-402.
- Standaardtekst

Verantwoording

Rapport C023/23

Projectnummer: 431 5100 192

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: M. Poelman M.Sc.
Onderzoeker

Handtekening:



Datum: 10-05-2023

Akkoord: Dr. ir. T.P. Bult



Handtekening:

Datum: 10-05-2023

Bijlage 1 Protocol bemonstering DNA fytoplankton uit mesocosms

Versie 1 (augustus 2020). Opgesteld door Arjen de Groot, WENR

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 monsternamen:

- 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

versie 1, augustus 2020. Opgesteld door Arjen de Groot, WENR

Vooraf (lab)

Spullen:

- Putsemmer (schoongespoeld met leidingwater)
- Gemarkerde 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

- Gemarkerde 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 70 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'
