



Environmental DNA Amelander Zandsuppletie

**Van**

Berry van der Hoorn
Arjan Gittenberger (GiMaRIS)
Edwin Verduin (Eurofins)

Datum

20 november
2018

Versie

Concept 2.0

Opdrachtgever

Cor Schipper (Rijkswaterstaat)

Pagina's

29

Bijlagen

0

Verantwoording rollen

Dit project is uitgevoerd onder verantwoordelijkheid van Naturalis Biodiversity Center, wat geldt voor de projectopzet, studentbegeleiding, monstername, labwerkzaamheden, bioinformatica, analyse, interpretatie en rapportage. GiMaRis is betrokken geweest bij de projectopzet en de ecologische analyses. Eurofins was projectleider van de T0-meting macrozoobenthos voor de Amelander Zandsuppletie en heeft bijgedragen aan de monstername met boxcores. Rijkswaterstaat was de overkoepelende projectleider van de T0-meting en kritisch lezer van deze rapportage.

Afbeelding 1: Een impressie van het eDNA proces met achtereenvolgens monstername met een boxcorer, verzamelen van een sedimentmonster met een puntloze spuit, verzamelen van een watermonster met een Van Dorn sampler en de verwerking op het lab van Naturalis.



Index

Verantwoording	2
Introductie	4
Materiaal en methoden	6
Beschikbaarheid DNA referentie barcodes	
Monstername	
DNA extractie, amplificatie en sequencing	
Bioinformatica	
Data analyse eDNA	
Kosten	
Resultaten	12
Compleetheid DNA referentie barcodes	
Vissen in watermonsters	
Vissen in sedimentmonsters	
Uitgelicht: zandspierungen	
Macrozoöbenthos	
Leefgemeenschappen	
Discussie	23
Aantonen vissen en macrozoöbenthos	
Leefgemeenschappen en herstel	
Kosten	
Aanbevelingen	25
Conclusie	27
Dankwoord	27
Literatuur	28

Introductie

Om de kustveiligheid in de toekomst te kunnen waarborgen ontwikkelde Rijkswaterstaat (RWS) een zandsuppletiestrategie. Suppleties worden uitgevoerd om de basiskustlijn te handhaven, ondermeer door het kustfundament te laten meestijgen met de zeespiegelstijging. Daarbij wordt rekening gehouden met gestelde doelen ten aanzien van natuurbehoud en natuurontwikkeling van de Nederlandse kust, maar ook met recreatie en andere functies.

Rijkswaterstaat heeft besloten om de kennis over de uitvoerbaarheid en de effectiviteit van een grootschalige suppletie op een buitendelta te vergroten. De buitendelta van het Amelander Zeegat is gekozen als locatie voor een pilotsuppletie die in 2018 wordt uitgevoerd. De pilotsuppletie op de Buitendelta Amelander Zeegat heeft tot doel kennis op te leveren over de manier waarop suppleties in de buitendelta's het beste kunnen plaatsvinden met oog op kustonderhoud, kustveiligheid en behoud van waardevolle natuur. Om het effect op de natuur te kunnen beoordelen wordt gekeken naar de ontwikkelingen van benthische soorten zoals macrozoobenthos (kreeftachtigen en schelpdieren) en vissen (met name zandspiering). Deze twee groepen worden als indicator gebruikt om de kennis over het (ecologisch) functioneren van het systeem van de buitendelta te beschrijven.

De laatste jaren zijn genetische technieken voor biomonitoring in opmars. Soorten worden gedetecteerd en geïdentificeerd aan de hand van hun DNA. Van gemengde monsters (water, sediment) kunnen vele taxa tegelijk worden geïdentificeerd door het toepassen van metabarcoding, waarbij van aanwezige soorten een klein stukje van hun DNA wordt geïsoleerd (een marker, ook wel een DNA barcode genoemd) en wordt vergeleken met een referentiedatabase met de DNA codes van vele verschillende soorten, om tot een naam te komen. Het aanwezige DNA in een willekeurige omgeving wordt environmental DNA of kortweg eDNA genoemd, en kan slaan op de soorten zelf met het DNA nog in hun lichaam, of op het DNA van losse huidcellen en uitwerpselen dat in de omgeving zweeft.

Biomonitoring gebaseerd op metabarcoding brengt de belofte met zich mee van een meer uniforme wijze van monitoring (identificatie), met een betere herkenbaarheid van cryptische soorten of lastige levensstadia zoals eieren en larven. Zeker wanneer DNA uit water wordt gefilterd is het minder invasief voor een leefgemeenschap dan het verzamelen van de dieren zelf. Honderden monsters kunnen tegelijk worden geanalyseerd op een enkele chip van een sequencing machine die de genetische code afleest. Naarmate de techniek voortschrijdt is de verwachting dat kosten van metabarcoding steeds lager worden en de resolutie van metingen in zowel ruimte (meer meetpunten) als tijd (vaker meten) zal toenemen.

Voor de geplande pilotsuppletie van het najaar van 2018 werd in het najaar van 2017 een uitgebreide T0-meting uitgevoerd door verschillende partijen. Naturalis, GiMaRIS, Eurofins en Rijkswaterstaat voerden in samenwerking een pilotstudie uit naar de toepasbaarheid van eDNA in biologische monitoring rond zandsuppleties, waarbij de focus lag op het DNA buiten de dieren zelf, aanwezig in het sediment en in het water nabij de bodem.

De onderzoeksvraag voor deze studie is als volgt gedefinieerd: *wat is de toegevoegde waarde van eDNA op de effectbepaling van de Amelander Zandsuppletie op macrozoöbenthos en vissen?*

Toegevoegde waarde is voor dit onderzoek vooral gedefinieerd als aanvullende geïdentificeerde soorten ten opzichte van conventionele morfologische identificaties op visuele kenmerken. De toegevoegde waarde kan ook gelegen zijn in andere aspecten zoals de kosten, de doorlooptijd en de betrouwbaarheid van de identificaties. Alleen de kosten worden meegenomen in dit onderzoek

Deze onderzoeksvraag is onderverdeeld in de volgende subvragen:

1. *In hoeverre kan met eDNA de aanwezigheid van vissen en macrozoöbenthos worden bepaald?*
2. *In hoeverre kan met eDNA een indruk worden gegeven van de aanwezige leefgemeenschappen?*
3. *In hoeverre kan met eDNA een indicatie worden gegeven voor het herstel van de biodiversiteit in een gebied na verstoring?*
4. *In hoeverre is toepassing van eDNA/genetische monitoring goedkoper of duurder dan conventionele biomonitoring?*

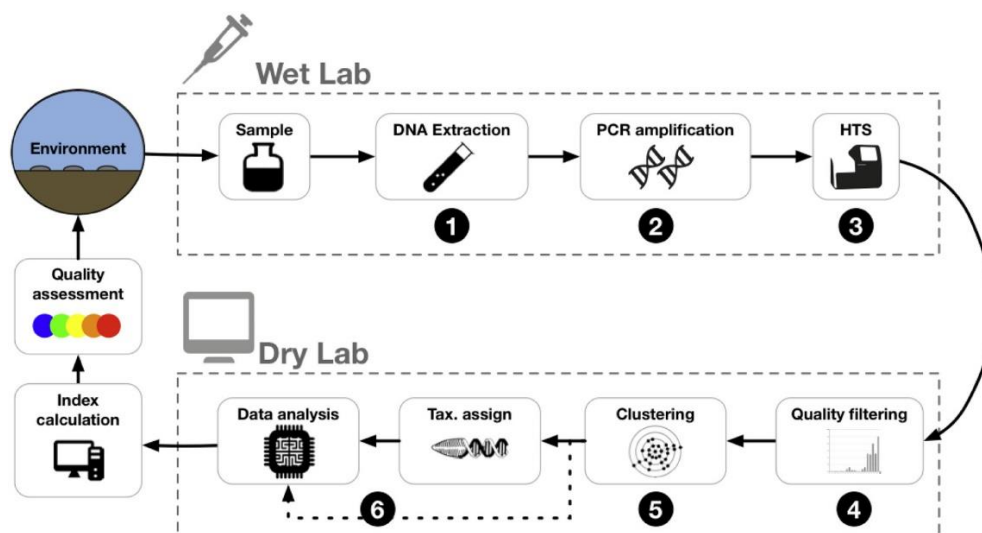
Materiaal en methoden

Om de vragen te beantwoorden is voor de volgende aanpak gekozen:

- Allereerst is globaal gekeken naar de beschikbaarheid van DNA barcodes (CO1) als referentie, als 'DNA bibliotheek'. Van soorten waarvan geen sequentie beschikbaar is kan de identificatie immers niet met eDNA worden vastgesteld.
- Voor de toegevoegde waarde van een eDNA methode voor macrozoobenthos is een vergelijking gemaakt tussen de resultaten van conventionele monitoring (Eurofins) met eDNA monitoring, zowel op basis van soortenlijsten als patronen/clusters van bemonsterde stations. Voor vissen was dit niet mogelijk omdat de stations niet conventioneel zijn bemonsterd voor de visfauna, daar hebben we uitsluitend gekeken naar de soortenlijst en de patronen/clusters op basis van eDNA.
- Voor de leefgemeenschappen hebben we gekeken naar alle DNA barcodes in de monsters, ook naar diegene die we niet konden identificeren, en of we op basis hiervan patronen in de bemonsterde stations konden afleiden.
- Op basis van bovenstaande hebben we ook conclusies getrokken voor de mogelijkheden van toepassingen voor herstel na een impact zoals een zandsuppletie.
- Voor de kosten tenslotte hebben we geen inzicht in de gemaakte kosten door Eurofins, waardoor we uitsluitend een eigen opgave doen van gemaakte kosten.

Voor de eDNA monsternamen zijn verzamelprotocollen gebruikt op basis van literatuur en ervaring bij Naturalis. Voor verwerking op het DNA lab (Wet Lab in figuur 1) zijn nieuwe protocollen opgesteld, op basis van methoden uit soortgelijke studies beschreven in de literatuur, gevolgd door een uitgebreide fase van testen en optimaliseren. De bioinformaticapijplijn plus de data analyse (Dry Lab in figuur 1) is volgens de standaard methode van Naturalis zoals die in al onze studies wordt gebruikt. Pas in de analysefase is de data gesplitst en beoordeeld voor beantwoording van de verschillende subvragen.

Figuur 1: Schematische weergave van de stappen van een monster tot soortenlijst bij genetische biomonitoring (afkomstig van Pawlowski et al. 2017).



De uiteindelijk gevolgde methoden, vastgelegd in protocollen en bioinformatica, staan hieronder in detail beschreven.

Beschikbaarheid DNA referentie barcodes

Voor de beschikbaarheid van referentie DNA sequenties is gekeken naar de Barcode Of Life Database BOLD (Ratnasingham & Hebert 2007). Als basis is de lijst met Nederlandse taxa van Bos et al. 2016 genomen. Alle taxa zijn vergeleken met de taxonomische database WORMS (Horton et al. 2018) om de meest recente geaccepteerde soortnamen voor de taxa te verkrijgen. Deze lijst met geaccepteerde namen is als checklist ingevoerd op BOLD. De functionaliteit voor het opstellen van een progress report op BOLD is vervolgens gebruikt voor de beoordeling van welke taxa barcodes beschikbaar zijn.

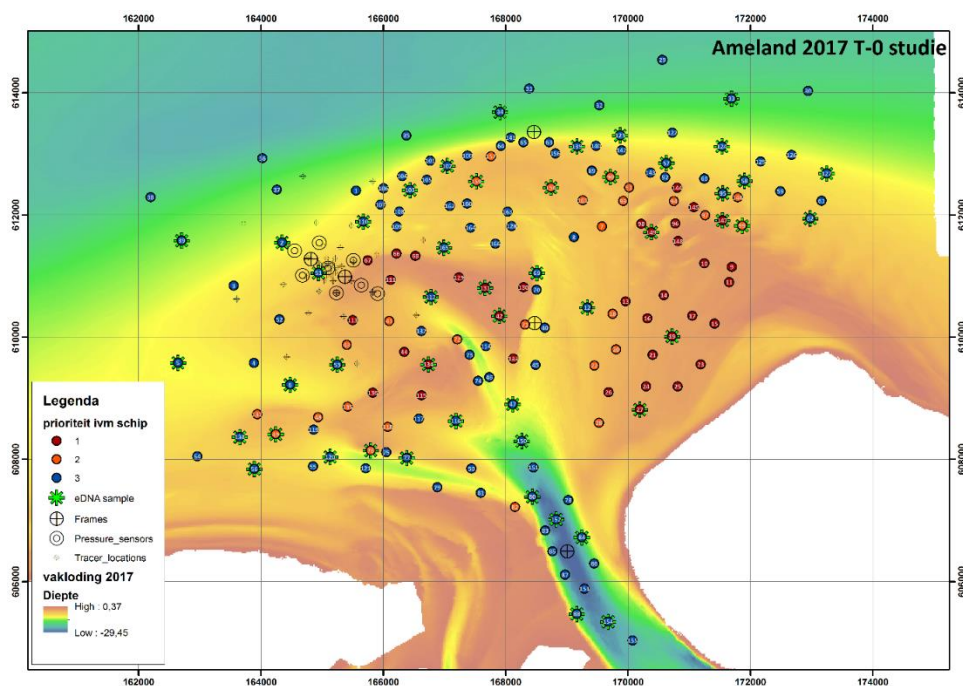
Monstername

eDNA monsters zijn verzameld tijdens de benthosbemonstering van het Amelandse Zeegat, in september 2017. De benthosbemonstering vormt onderdeel van een T0-meting en werd gecoördineerd en uitgevoerd door Eurofins in opdracht van Rijkswaterstaat. De bemonstering is gedaan met een Reineck boxcorer (0,078 m²) vanaf de schepen Gerdia WR82 en MS Terschelling (Rijksrederij). Van een aantal stations is door Naturalis met een puntloze 50ml spuit drie deelmonsters van 5ml genomen (1cm diepte) uit het onverstoorde oppervlak van de boxcore. De drie deelmonsters zijn samengevoegd in een falcontube en tot 50ml aangevuld met 96% ethanol voor conservering tot aan verwerking in het lab van Naturalis. Gebruikte materialen zijn tussen de monsternames gereinigd met 10% bleekmiddel en afgespoeld met demiwater, om contaminatie tussen monsters te voorkomen.

De bemonstering van water heeft plaatsgevonden met een Van Dorn Sampler van de firma Eijkelkamp, met een volume van 2,5 liter. De sampler is aan de zijkant van het schip omlaag gelaten tot op de bodem waar het watermonster is genomen. Van ieder monster is een halve liter zeewater gefilterd met oplosbare filters van polyethersulfone, poriëgrootte 0,2µm. Voor filteren is gebruik gemaakt van een filter/trechtersysteem van VWR met een elektrische pomp van Datura. De filters zijn opgeslagen in 2ml epjes in 700 µl CTAB voor conservering tot aan verwerking in het lab van Naturalis. Als negatieve controle is in het veld zowel 0,5L leidingwater als 0,5L demiwater gefilterd. Gebruikte materialen zijn tussen de monsternames gereinigd met 10% bleekmiddel en afgespoeld met demiwater.

De bemonsterde stations staan aangegeven op kaart 1.

Kaart 1: Amelander zeegat met bemonsterde stations. NB: de aangegeven stations voor eDNA wijken af van de daadwerkelijk bemonsterde stations.



DNA extractie, amplificatie en sequencing

Voor de verschillende monstersoorten zijn verschillende DNA extractie methoden nodig. De watermonsters zijn gefiltreerd over PES filters die in 2 ml reactievaatjes met CTAB buffer zijn bewaard. CTAB is een zeep dat de aanwezige cellen openbreekt. Het DNA dat daarbij vrijkomt is vervolgens geïsoleerd met chloroform:isoamyl alcohol en gezuiverd met een isopropanol/acetaat precipitatie.

Om een zo compleet en realistisch mogelijk beeld te krijgen van de aanwezige biodiversiteit in sediment, is er voor gekozen om een relatief grote hoeveelheid sediment (10g) van het mengmonster als uitgangsmateriaal te nemen voor DNA isolatie. In lijn met de methode beschreven door Aylagas et al. (2016) is voor deze sedimentmonsters de DNeasy powerMax soil DNA extractie kit gebruikt, die geoptimaliseerd is voor complexe substraten als grond en sediment en waarmee grotere monster volumes kunnen worden geëxtraheerd. Aansluitend is het DNA nog verder gezuiverd met de DNeasy power clean pro DNA clean up kit om remmende stoffen kwijt te raken die kunnen storen in de PCR.

De T0-meting richt zich met name op vissen en macrobenthos waardoor we hebben gekozen voor primers voor metazoa ontwikkeld door Leray et al. (2013), en voor visprimers van Miya et al. (2015). Deze primers zijn specifiek ontwikkeld voor de gekozen indicatorgroepen (maar leveren altijd bijvangst op van andere soorten).

Alle monsters zijn verwerkt op een Illumina MySeq bij het bedrijf BaseClear. We hebben een tweestaps PCR toegepast. In de eerste PCR het DNA is geamplificeerd met gebruik van Nextera-tailed primers. PCR producten zijn gecontroleerd en geschoond met een NucleoMag NGS Clean-up kit. In de tweede PCR stap zijn de amplicons gelabeld met unieke Nextera XT (Illumina) labeled primers. PCR producten zijn gecontroleerd, genormaliseerd en samengevoegd met een Qiagilty pipetting robot (QIAGEN). De verkregen pools zijn geschoond met een NucleoMag NGS Clean-up kit. Een controle kwaliteit en kwantiteit is uitgevoerd met een Bioanalyzer (Agilent), met gebruik van een High Sensitivity chip. De sequencing bij BaseClear is gedaan met een Illumina Miseq PE 300 bp.

Tabel 1: soortgroepen en primers

Biota	Reference	Primers
Metazoa	Leray et al. 2013	Forward: GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC Reverse: GGRGGRTASACSGTTCASCCSGTSCC
Vissen	Miya et al. 2015	Forward: TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG GTCGGTAAACTCGTGCCAGC Reverse: GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCA TAGTGGGGTATCTAATCCTAGTTTG

Bioinformatica

De ruwe sequenties afkomstig van de sequencer zijn verwerkt op een door Naturalis ontwikkelde bioinformatica pijplijn in Galaxy (zie figuur 1 voor de globale stappen). Paired-end sequences van de Illumina runs zijn samengevoegd met FLASH (Magoč & Salzberg, 2011) als de overlap minimaal 10 baseparen bedroeg en de foutmarge (mismatch) kleiner was dan 20%. Primers zijn getrimd met Cutadapt (Martin, 2011). Kwaliteitsfiltering is gedaan met FastQC (Andrews, 2010) met een minimale kwaliteitseis van 20, zodat dubbelzinnige baseparen niet zijn meegenomen. DNA fragmenten kleiner of groter dan 160 – 170 baseparen voor 12S, en 310 – 314 voor CO1, zijn verwijderd met PRINSEQ (Schmieder & Edwards, 2011). DNA fragmenten zijn ontdebeld (samenvoeging identieke fragmenten) met gebruik van VSEARCH (Rognes et al., 2016). Chimeras, DNA fragmenten die overduidelijk afwijken van de gekozen marker, zijn verwijderd tijdens het clusteren van de fragmenten in UNOISE (Edgar, 2016).

Voor het toewijzen van soortnamen zijn de geclusterde CO1 sequenties vergeleken (Camacho et al. 2009) met de publiek beschikbare sequenties in BOLD (Ratnasingham & Hebert 2007) en NCBI/GenBank (Benson et al. 2013), met een minimale overeenkomst van 98%. De 12S clusters zijn vergeleken met de MitoFish databank (Iwasaki et al. 2013) en NCBI met dezelfde criteria. De verkregen namen zijn gelijkgetrokken met de geaccepteerde namen in WORMS (Horton et al. 2018) en alle niet mariene soorten (zoals het alomtegenwoordige DNA van mens, varken en rund) zijn verwijderd.

Data analyse eDNA

De basale soortenlijsten verkregen met de eDNA methode zijn door expert Arjan Gittenberger gecontroleerd op (ecologische) onwaarschijnlijkheden, die invloed hebben op de interpretatie van de gegevens. Soortenlijsten verkregen met metabarcoding vragen om een kritische beoordeling omdat sommige soorten overduidelijke foutieve identificaties betreffen, bijvoorbeeld doordat sommige nauw verwante soorten nauwelijks of niet zijn te onderscheiden met de gebruikte marker.

De data zijn vervolgens bewerkt in excel en geïmporteerd in het softwarepakket PRIMER-e (Clarke & Gorley 2015) voor verdere verwerking en statistische analyse. Voor de vergelijking tussen de conventionele methode (Eurofins) en de eDNA methode voor detectie van macrozoobenthos zijn de stations gebruikt waar beide methoden zijn toegepast. Vervolgens zijn de totale soortenlijsten met elkaar vergeleken (onderzoeksvraag 1). Voor vissen is louter met expert judgement naar de soortenlijst gekeken omdat er geen specifieke vissendata beschikbaar is van de bemonsterde stations. Voor vissen is in extra detail gekeken naar zandspieroortsoorten omdat deze speciale aandacht krijgen gedurende de monitoring van de zandsuppletie vanwege hun schakelfunctie in het ecosysteem. Voor de zandspieroort is gekeken of we onderscheid konden maken tussen *Ammodytes tobianus* en *Ammodytes marinus*, en hoe deze verdeeld zijn over de bemonsterde stations.

Vervolgens is de abundantie (aantal DNA fragmenten per soort) van zowel macrozoobenthos als vissen omgezet naar aanwezigheid/afwezigheid en naar Jaccard similariteitsmatrixen. In een similariteitsmatrix worden de overeenkomsten (of verschillen) in soortsaansameling tussen monsters kwantitatief weergegeven. Deze matrixen zijn gebruikt voor clusteranalyses en ordinatietechnieken, waarbij naar patronen is gezocht tussen de leefgemeenschappen van de verschillende bemonsterde stations. Voor macrozoobenthos is hierbij weer een vergelijking gemaakt tussen morfologie en eDNA, voor vissen was dit niet mogelijk (onderzoeksvraag 1).

Voor zowel macrozoobenthos als voor vissen is tevens gekeken of de patronen verschilden wanneer de analyse werd gedaan met aan/afwezigheid of met inbegrip van abundantie. Voor aan/afwezigheid zijn de bovengenoemde Jaccard matrixen gebruikt. Voor abundanties zijn de aantallen reads (DNA barcodes) log getransformeerd en omgezet naar Bray-Curtis matrixen. De patronen van de Jaccard en Bray-Curtis matrixen zijn met elkaar vergeleken.

Om een indicatie te verkrijgen over de toegevoegde waarde van het werken met complete leefgemeenschappen ten opzichte van indicatorgroepen (macrozoobenthos, vissen) zijn alle DNA barcodes gebruikt van het sequencen van de sedimentmonsters. De meeste daarvan zijn niet op naam te brengen omdat er geen goede referentiedatabases beschikbaar zijn. Maar ook met naamloze geclusterde DNA fragmenten (Operational Taxonomic Units, kortweg OTU's) kunnen we naar patronen zoeken. Als voorbeeld hebben we de 50 meest dominante OTU's geselecteerd en naar associaties tussen deze OTU's gezocht via een clusteranalyse. Vervolgens hebben we naar associaties gezocht tussen de stations, ook op basis van OTU's. Dit hebben we uitgezet in een shadeplot.

Kosten

Voor de kosten baseren we ons op onze urenregistratie voor dit project en op de commerciële kostprijzen zoals opgesteld voor het inmiddels opgerichte spin-off bedrijf BioMon, the Netherlands Center for Genetic Biodiversity Assessment, een samenwerking van Naturalis met het CML, KWR Watercycle Research en BaseClear. We maken onderscheid tussen de ontwikkelkosten en de kosten voor uitvoer van routinematig werk.

Resultaten

In totaal zijn 33 watermonsters en 55 sedimentmonsters verzameld van verschillende stations (zie kaart 1). Van het water zijn minder monsters verzameld dan vooraf gepland doordat de Van Dorn Sampler op een zeker moment in de golven verdween. De sampler voldeed uitstekend in de ondiepe waddenzee, maar was te licht voor de diepere delen met sterke stroming verder richting de Noordzee. Bij de sedimentmonsters is gedurende het transport naar Naturalis van een vijftal falcontubes het label afgeweekt door alcohol dampen. Deze zijn niet gebruikt in de analyses.

Compleetheid DNA Barcode referenties

De vergelijking met BOLD laat zien dat van de 1100 mariene soorten op de Nederlandse lijst (exclusief vogels), er door verschillende onderzoeksinstellingen in totaal van 885 soorten (80%) één of meerdere exemplaren (specimina) als vouchers zijn verzameld, en dat van 802 soorten (73%) een betrouwbare DNA barcode is verkregen. Tabel 1 geeft een overzicht van de resultaten per klasse. Hier zit nog wel een addertje onder het gras. Veel van deze data staat wel in BOLD maar is niet publiekelijk beschikbaar. Van de zandspiering staan bijvoorbeeld 19 DNA Barcodes op BOLD waarvan er slechts 6 publiek beschikbaar zijn en 13 afgeschermd. Alle 19 lopen ze mee in de identificatie van aangetroffen sequenties, maar 13 zijn er niet goed op betrouwbaarheid te controleren doordat er geen inzage is in de brondata: wie het exemplaar heeft geïdentificeerd en ingevoerd. Soorten waarvan geen DNA barcode beschikbaar is kunnen uiteraard niet worden aangetoond met metabarcoding van environmental DNA. De consequenties voor de Ameland studie zijn niet verder in detail uitgewerkt.

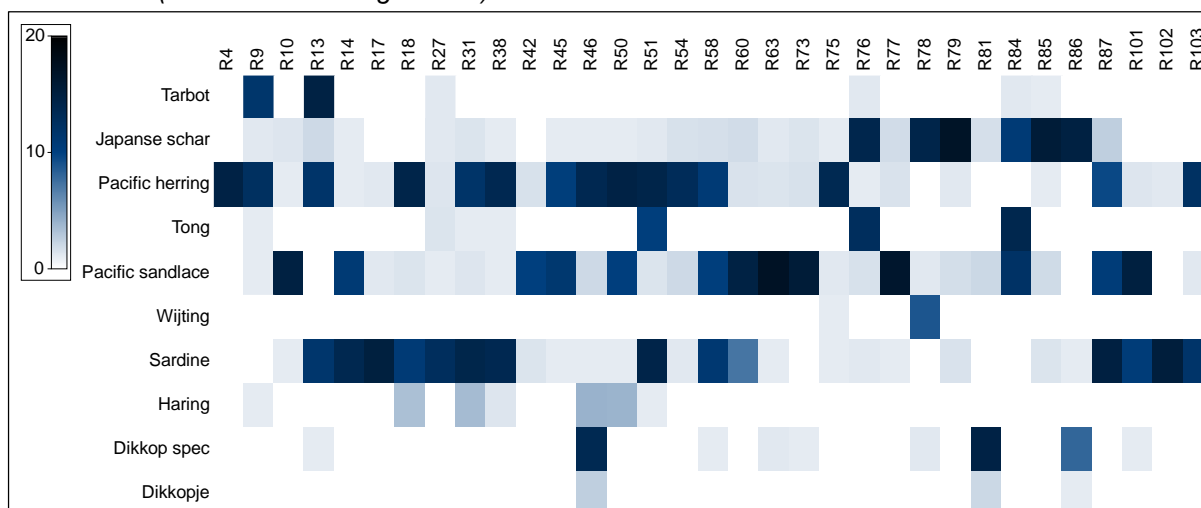
Tabel 1. Verzamelde exemplaren en DNA barcodes van Noordzee soorten (exclusief vogels).

Rijk	Klasse	Soorten	Soorten met specimina	Soorten met DNA Barcodes
Annelida	Polychaeta	202	158	139
Annelida	Clitellata	9	8	7
Arthropoda	Hexanauplia	9	7	7
Arthropoda	Malacostraca	274	210	186
Arthropoda	Arachnida	13	0	0
Arthropoda	Pycnogonida	5	5	5
Arthropoda	Insecta	1	0	0
Bryozoa	Gymnolaemata	44	30	21
Bryozoa	Stenolaemata	2	2	2
Cephalorhyncha	Priapulida	1	1	1
Chordata	Elasmobranchii	25	24	24
Chordata	Ascidiacea	15	11	11
Chordata	Petromyzonti	2	2	2
Chordata	Leptocardii	1	1	1
Chordata	Actinopterygii	119	114	114
Chordata	Mammalia	22	22	22
Chordata	Reptilia	4	4	4
Cnidaria	Hydrozoa	71	55	48
Cnidaria	Anthozoa	17	15	11
Cnidaria	Scyphozoa	5	4	4
Ctenophora	Tentaculata	1	1	1
Echinodermata	Ophiuroidea	8	8	8
Echinodermata	Echinoidea	7	7	7
Echinodermata	Asteroidea	5	3	3
Echinodermata	Holothuroidea	4	4	4
Hemichordata	Enteropneusta	1	0	0
Mollusca	Bivalvia	95	77	69
Mollusca	Gastropoda	94	81	73
Mollusca	Cephalopoda	9	9	9
Mollusca	Caudofoveata	1	1	1
Mollusca	Polyplacophora	3	2	2
Nematoda	Chromadorea	1	0	0
Nematoda	Enoplea	1	1	0
Nemertea	Anopla	3	3	3
Nemertea	Enopla	3	3	3
Nemertea	Palaeonemertea	1	1	1
Platyhelminthes	Rhabditophora	1	1	1
Porifera	Demospongiae	14	5	5
Porifera	Calcarea	2	2	1
Sipuncula	Sipunculidea	4	2	1
Sipuncula	Phascolosomatidea	1	1	1

Vissen in watermonsters (12S marker)

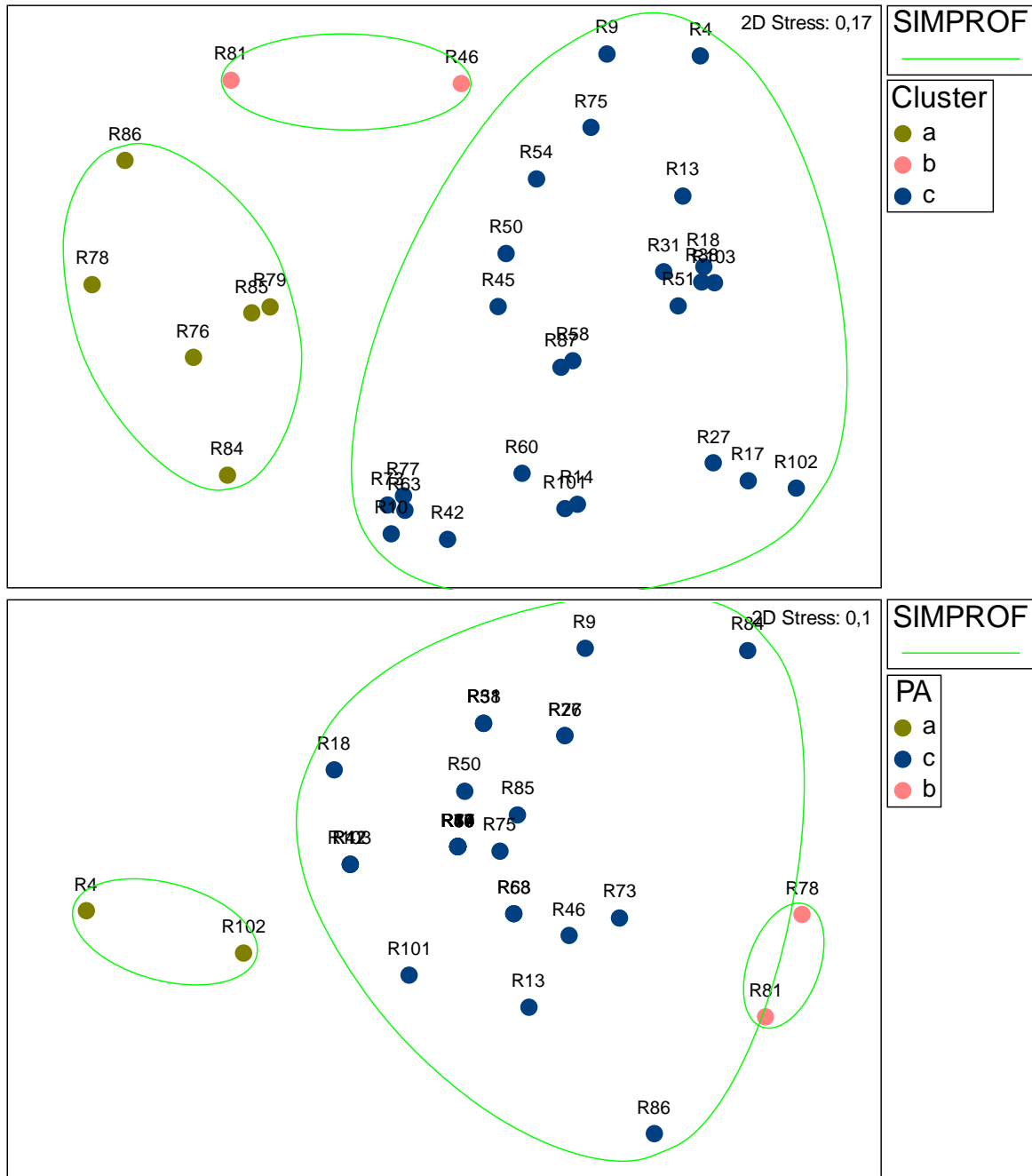
De 12S marker leverde in de watermonsters in totaal tien vissoorten op. Opvallend zijn de ‘exotische’ soorten als Japanse schar, Pacific herring en Pacific sandlace die niet in onze wateren voorkomen. Ongetwijfeld betreft dit het DNA van Europese soorten, respectievelijk Schar, Haring en één van de zandspieringen. De abundanties van de verschillende aangetroffen vissoorten per bemonsterd station zijn weergegeven in een shadeplot (figuur 1). Hoe donkerder de kleur blauw, hoe groter de aangetroffen abundantie.

Figuur 1. Shadeplot van aangetroffen vissoorten per station op basis van log getransformeerde abundanties (aantallen DNA fragmenten).



Op twee manieren is onderzocht of er patronen of clusters zijn in bemonsterde stations: i) op basis van overeenkomsten in aangetroffen vissoorten en hun dichtheden (bovenste afbeelding figuur 2), en ii) op basis van alleen de aangetroffen vissoorten (onderste afbeelding figuur 2). In beide gevallen zijn er statistisch valide clusters in stations, maar deze zijn wel verschillend.

Figuur 2. NMDS plots met de bemonsterde stations geclusterd naar overeenkomsten in viscommunities. Boven gebaseerd op log getransformeerde abundanties, onder op aan/afwezigheid van vissoorten.



Vissen in sedimentmonsters (CO1 marker)

De analyse van de universele CO1 marker in sedimentmonsters leverde vijf vissoorten op. De aangetroffen soorten zijn Zandspiering (*Ammodytes tobianus*), Noordse zandspiering (*Ammodytes marinus*), Bot (*Platichthys flesus*), Schar (*Limanda limanda*) en Schol (*Pleuronectes platessa*). Vanwege het belang van de zandspiering worden deze twee soorten hieronder verder uitgelicht.

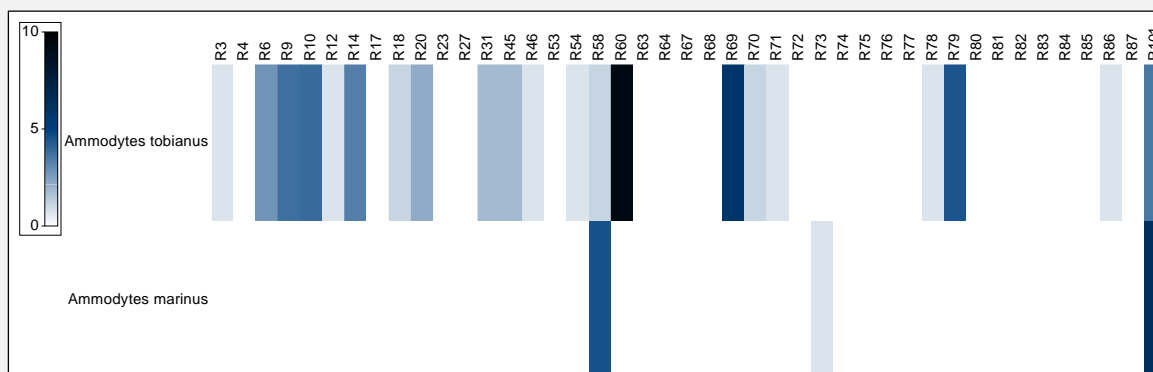
Uitgelicht: zandspierungen

Een sleutelsoort in het project van de Amelander zandsuppletie is de zandspierung. In de Noordzee en Waddenzee leven enkele sterk op elkaar lijkende soorten: Zandspierung (*Ammodytes tobianus*), Noorse zandspierung (*Ammodytes marinus*) en Smelt (*Hyperoplus lanceolatus*). Zandspierungen vormen het stapelvoedsel voor beschermde vogelsoorten zoals de Grote stern (*Thalasseus sandvicensis*). Wageningen Marine Research (WMR) heeft met een speciaal ontwikkelde schaaaf onderzoek gedaan naar het voorkomen van zandspierung soorten rond de voorgenomen suppletie locatie. Daarbij zijn specimen verzameld om aan de hand van otolieten (gehoorbotjes) de juiste soortnaam vast te stellen.

Zowel watersamples als sedimentsamples zijn genetisch geanalyseerd op vissen met speciale aandacht voor de zandspierungen. Bij de watermonsters in combinatie met de 12S marker en de referentiedatbase MitoFish kregen we geen resultaat voor de bij ons voorkomende zandspierungen, maar wel voor de Pacific sandlace (*Ammodytes personatus*). Dit betreft een foutieve identificatie, zie de discussie.

Bij de sedimentmonsters in combinatie met de CO1 marker vonden we zowel Zandspierung als Noorse Zandspierung in de monsters. Het patroon van beide soorten is verschillend. In onderstaande shadeplot wordt per bemonsterd station een indicatie weergegeven van de aantallen aangetroffen DNA barcodes (logaritmisch getransformeerd). Hoe donker de kleur blauw, hoe meer DNA barcodes zijn aangetroffen. DNA van de Zandspierung is in veel sedimentmonsters aanwezig, met pieken op locaties R60, R69 en R79, dwars door het hele gebied. DNA van de Noorse zandspierung is aangetroffen in slechts drie sedimentmonsters, met pieken in R101 en R58, beide op de rand van het onderzoeksgebied, aan de Noordzeezijde.

Figuur 3. Shadeplot van eDNA zandspierung in sediment voor de verschillende stations.



NB: onderzoek heeft uitgewezen dat de soorten Zandspierung en Smelt niet zijn te onderscheiden met de CO1 barcode. Uit vangsten blijkt echter dat de Smelt rond de locatie van de voorgenomen zandsuppletie niet of nauwelijks aanwezig was. Echter, we kunnen dus niet uitsluiten dat een deel van de Zandspierung betrekking heeft op Smelt.

Macrozoobenthos

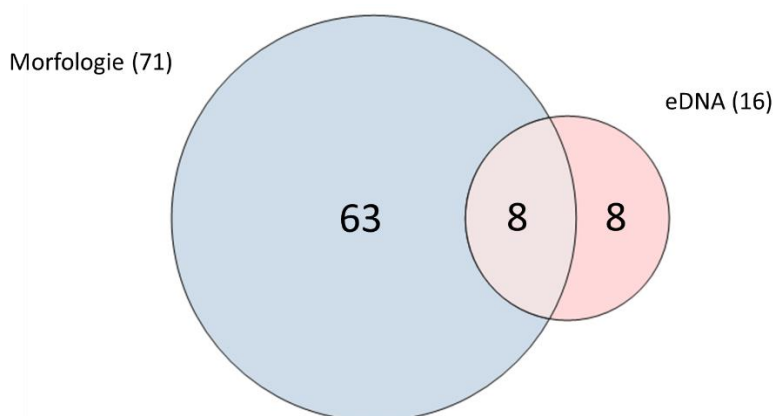
Genetische analyse van de sediment monsters leverde een totaal op van 16 geïdentificeerde soorten. Deze staan vermeld in tabel 2. Om dit resultaat te kunnen vergelijken met de uitkomst van de morfologische identificaties hebben we van Eurofins de resultaten van de uitgezochte boxcores ontvangen. Uit morfologische analyse van de stations bleken stations 81 en 84 sterk afwijkend vanwege het lage aantal aangetroffen soorten (resp. 1 en 0) waardoor ze de analyse verstoorden. Uit analyse van de sediment monsters bleken stations 37 en 41 mislukt (geen DNA fragmenten) waardoor we ook deze buiten de verdere analyses hebben gehouden.

Tabel 2. Macrozoobenthos soorten geïdentificeerd met genetische analyse van sediment monsters.

Soort	Tevens in morfologie
<i>Nephtys hombergii</i>	x
<i>Scoloplos armiger</i>	x
<i>Echinocardium cordatum</i>	x
<i>Mytilus trossulus</i>	
<i>Bathyporeia pelagica</i>	x
<i>Paraonis fulgens</i>	x
<i>Arenicola defodiens</i>	
<i>Donax vittatus</i>	x
<i>Spisula subtruncata</i>	x
<i>Evadne nordmanni</i>	
<i>Magelona johnstoni</i>	x
<i>Acartia bifilosa</i>	
<i>Protodrilus adhaerens</i>	
<i>Pisidia longicornis</i>	
<i>Cyclops kikuchii</i>	
<i>Alitta virens</i>	

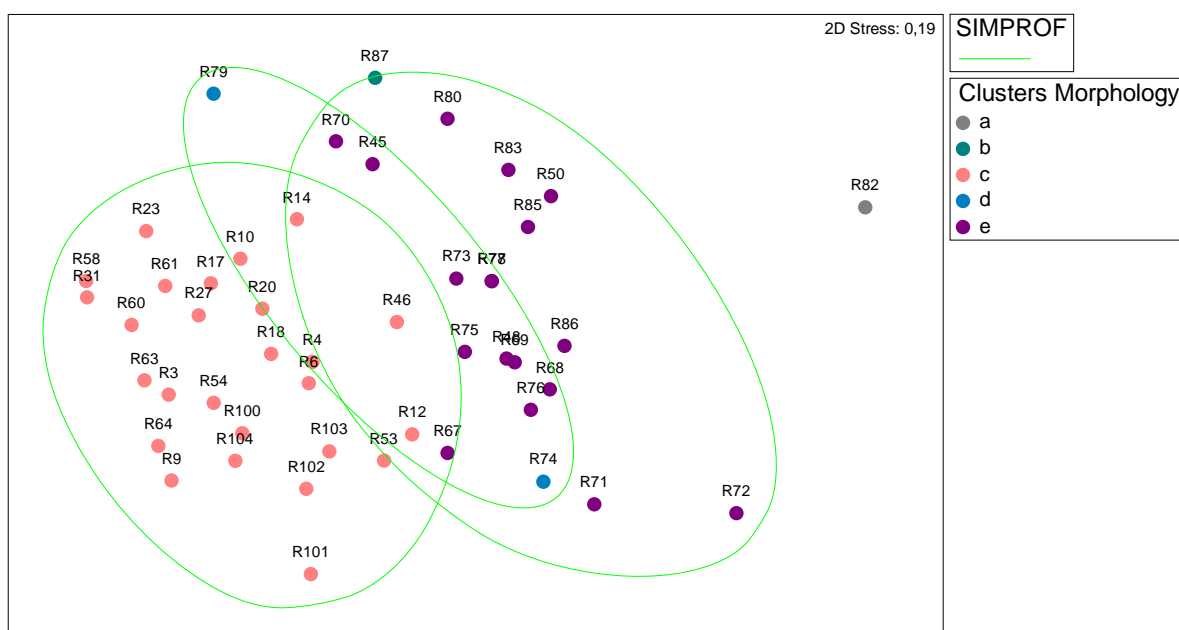
De morfologische analyses van de boxcores leverde een totaal op van 71 soorten, waarvan er 8 eveneens met genetische analyse zijn vastgesteld (tabel 2). Bij elkaar opgeteld bevatten de stations in totaal 79 unieke soorten macrozoobenthos geïdentificeerd, waarvan 63 uitsluitend gebaseerd op morfologische analyses en 8 uitsluitend gebaseerd op de eDNA analyses werden aangetoond (Fig. 4).

Figuur 4. Venn Diagram van macrozoobenthos soorten vastgesteld met morfologie versus environmental DNA.

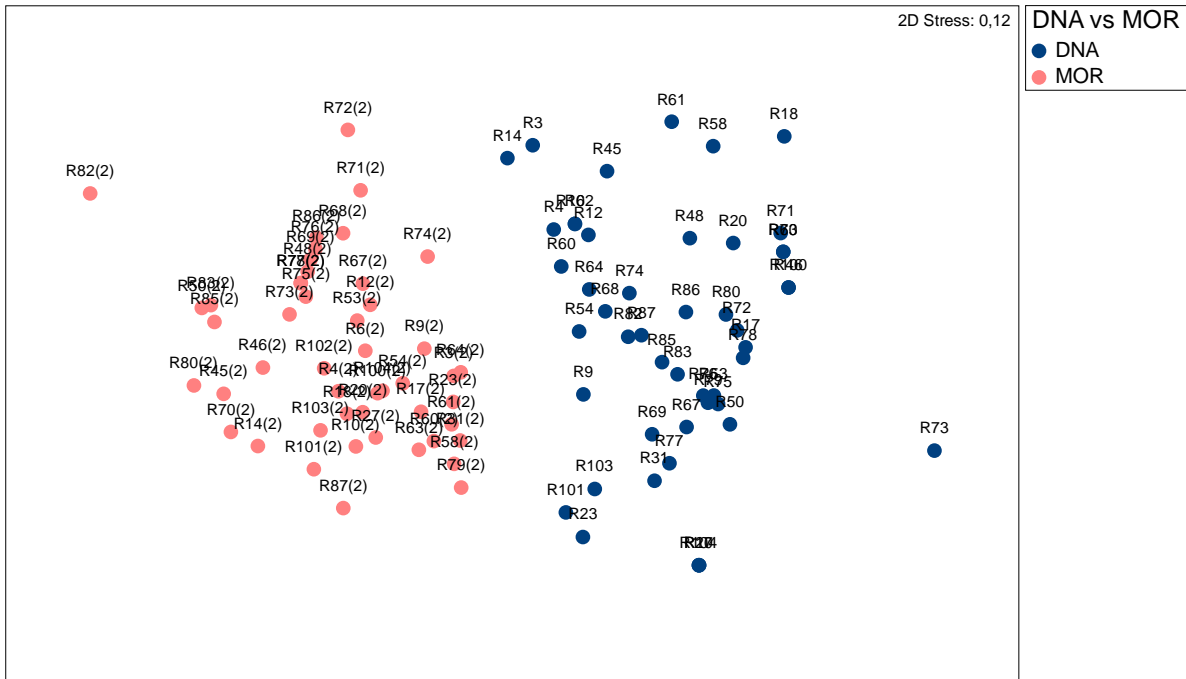


Zowel voor de morfologie als voor de genetische resultaten hebben we gekeken naar clusters in bemonsterde stations op basis van overeenkomsten in de aangetroffen leefgemeenschappen. Bij de morfologische resultaten zijn drie duidelijke clusters zichtbaar waarbinnen de soortsaanpak van de stations sterk overeenkomt. Deze zijn groen omcirkeld in figuur 5. Voorts zijn er twee daarvan afwijkende stations, R82 en R87, beide met een laag aantal vastgestelde soorten (resp. 1 en 5). Bij de genetische resultaten zijn dit soort (statistische) clusters niet aanwezig. Een RELATE analyse (PRIMER-e) toont aan dat de aangetroffen leefgemeenschappen op basis van morfologie sterk afwijken van de genetische resultaten. Dit is visueel weergegeven in een NMDS plot (figuur 6) waar beide groepen duidelijk gescheiden zijn.

Figuur 5. NMDS plot met clusters van stations naar overeenkomsten in aangetroffen leefgemeenschappen macrozoobenthos.

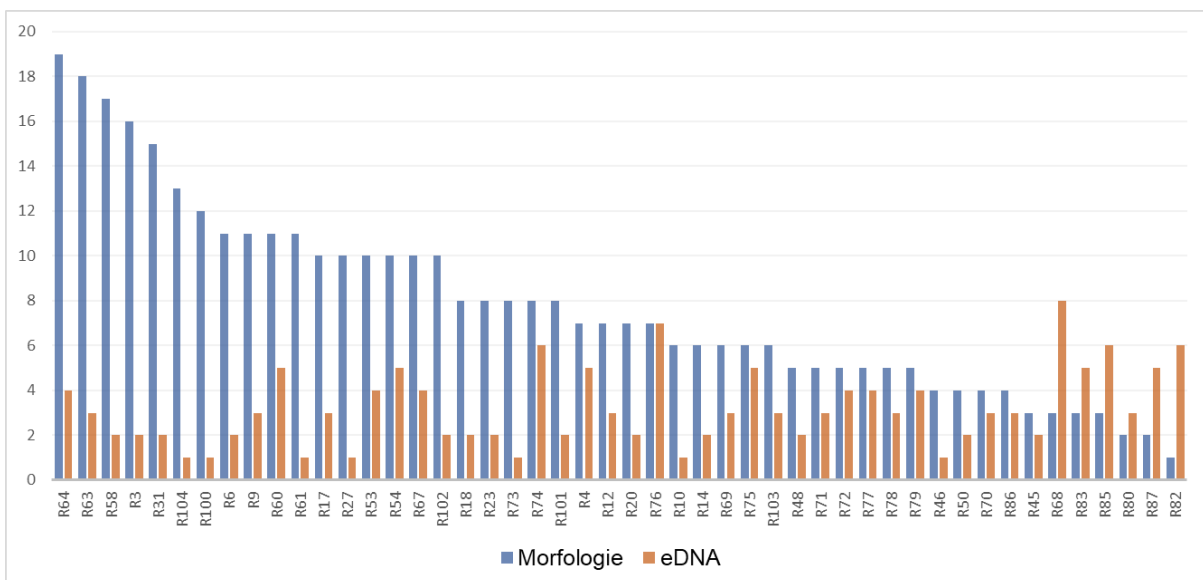


Figuur 6. NMDS plot van de bemonsterde stations op basis van aangetroffen soorten macrozoobenthos. In kleur staat het verschil aangegeven tussen stations met een soortenlijst gebaseerd op morfologische identificatie versus DNA identificatie. De afstand tussen de punten geeft het relatieve verschil tussen de stations aan.



Ten slotte, om het verschil nogmaals te illustreren, hebben we gekeken naar de soortendiversiteit per station voor zowel morfologie als eDNA. De gegevens zijn uitgezet in figuur 7 waar de stations zijn gerangschikt van het grootste morfologische soortenaantal naar het laagste. Uit de figuur blijkt duidelijk dat het soortenaantal bij morfologie hoger ligt, en dat de verdeling over de stations ook verschilt met eDNA.

Figuur 7. Aantal macrozoobenthos soorten per station voor morfologische en eDNA monsters.

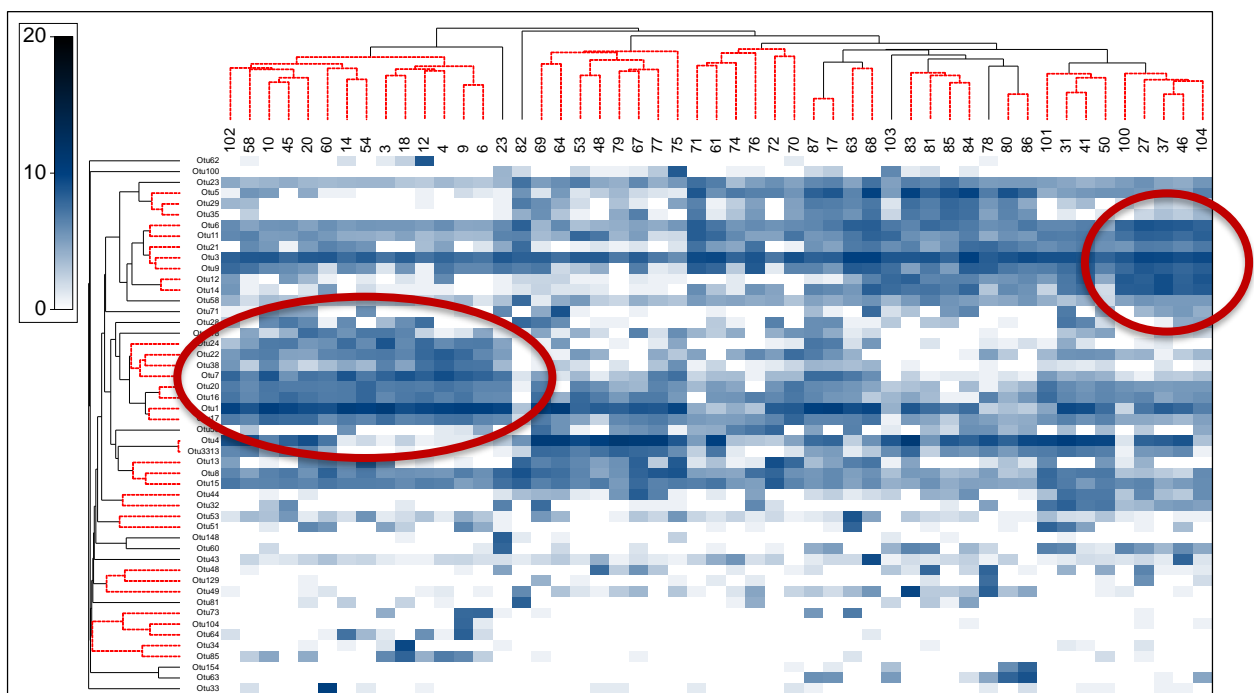


Totale leefgemeenschappen

De huidige studie is gericht op vissen en macrozoobenthos. Een voordeel van metabarcoding en environmental DNA is echter dat je complete leefgemeenschappen tegelijk kunt analyseren, dwars door alle soortgroepen heen. Wanneer we macrozoobenthos als voorbeeld nemen dan krijgen we bijna 4 miljoen DNA fragmenten uit de sedimentmonsters, waarvan we er slechts ruim 40 duizend, iets meer dan één procent, kunnen toewijzen aan macrozoobenthos. De overige 99% bestaat uit algen, bacteriën en overige organismen. De meeste daarvan kunnen we niet op naam brengen omdat er geen goede referentiedatabases beschikbaar zijn. Maar ook met naamloze DNA barcodes (Operational Taxonomic Units, kortweg OTU's) kunnen we naar patronen zoeken. Als voorbeeld hebben we de 50 meest dominante OTU's geselecteerd en naar associaties tussen deze OTU's gezocht via een clusteranalyse, dus welke OTU's komen vooral voor met welke andere OTU's. Vervolgens hebben we naar associaties gezocht tussen de stations, ook op basis van OTU's, dus welke stations komen qua OTU samenstelling overeen. Dit hebben we uitgezet in een shadeplot (figuur 9), waarbij de diepte van de blauwe kleur een maat is voor het aantal DNA barcodes van een desbetreffende OTU op een desbetreffend station.

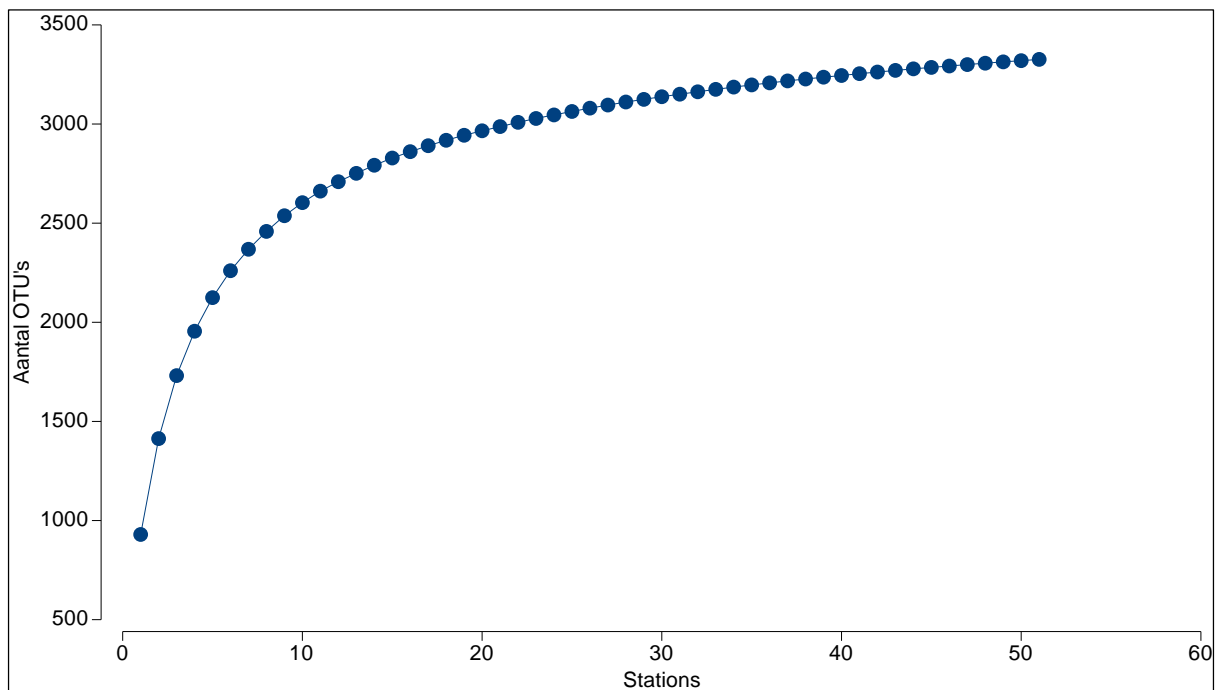
In de shadeplot is zichtbaar dat er clusters zijn van OTU's binnen clusters van stations. Van het OTU cluster 6 tot en met 14 wordt het grootste aantal DNA barcodes gevonden bij het station cluster 100 tot en met 104. Van het OTU cluster 24 tot en met 17 wordt het grootste aantal DNA barcodes gevonden bij het station cluster 102 tot 123. De verspreiding lijkt niet willekeurig. Aanvullend onderzoek is nodig voor een ecologische interpretatie.

Figuur 8. Shade plot met verticaal de OTU associaties, horizontaal de geclusterde bemonsterde stations.



Het aantal OTU's in een omgeving ligt (voorlopig) veel hoger dan morfologisch herkenbare soorten, waardoor er meer eenheden zijn om mee te kunnen analyseren. Voor de marker CO1 in de sedimentmonsters troffen we meer dan 3.000 OTU's aan, en een verzadigingscurve toont aan dat we met meer biologische monsters nog meer OTU's konden aantreffen (figuur 10). De curve is nog niet afgevlakt.

Figuur 10. OTU verzadigingscurve voor marker CO1 in sediment.



Kosten

Over de kosten van morfologie vs eDNA kunnen we beperkt uitspraken doen. Indien de protocollen reeds zijn geoptimaliseerd en vastgesteld kan de verwerking van vierhonderd eDNA monsters op het lab tot aan sequencing binnen een tot twee volledige werkweken plaatsvinden. Sequencing wordt door ons uitbesteed aan BaseClear. Bioinformatica en data schonen van de sequencing resultaten kosten een dag, met als resultaat de soortenlijsten per station met het aantal DNA fragmenten ('reads') per soort.

De kosten van sequencing gaan snel naar omlaag door voortschrijdende technologie en geven het beste beeld van kostenbesparingen. Een monster in drievoud laten sequencen (voor drie verschillende PCR reacties) kost commercieel momenteel rond de 300 euro. Een monster morfologisch laten uitzoeken en analyseren kost al snel meer dan 500 euro, afhankelijk van het substraat.

Discussie

Aantonen vissen en macrozoöbenthos

Deze studie toont de potentie van environmental DNA en DNA metabarcoding voor detectie en monitoring van mariene soorten. Zowel met de specifieke marker 12S als met de meer universele marker CO1 konden vissen worden aangetoond. De 12S marker correspondeert met de referentiedatabase MitoFish. Deze blijkt nog incompleet voor Europese soorten waardoor de beste overeenkomst wordt gevonden met het DNA van genetisch verwante soorten. De 12S marker is te verkiezen boven CO1 omdat de 'bijvangst' aan andere soorten kleiner is. Evengoed blijkt dat met CO1 ook onderscheid gemaakt kan worden tussen verwante soorten als kleine zandspiering en Noorse zandspiering en deze in het sediment detecteerbaar zijn. Doordat de referentiedatabases BOLD en NCBI beter gevuld zijn voor Europese vissoorten zijn de aangetroffen soorten op basis van de CO1 marker vooralsnog beter van toepassing dan die van MitoFish.

Voor macrozoöbenthos speelt een niet volledige referentie mogelijk eveneens een rol in het lage aantal identificaties. Echter, al is de referentie compleet, ook in andere studies is aangetoond dat met eDNA uit sediment rond de 20% van aanwezige soorten wordt gedetecteerd.

De keuze van de primer-marker combinatie is van grote invloed op de uiteindelijke resultaten. Perfecte primers die het DNA van alle soorten in een mengsel tegelijk amplificeren bestaan niet (Andújar et al. 2018). Ook al is de referentiedatabase compleet, dan nog zullen er soorten worden gemist. Zo is het bekend dat de groep zakpijpen niet aantoonbaar is met de marker CO1.

Sommige nauwverwante soorten zijn niet of nauwelijks te onderscheiden met een marker als CO1. Als voorbeeld vonden bij genetische analyses van het sediment (macrozoöbenthos) de soort *Mytilus trossilus*, een soort van de Pacifische kust van Noord Amerika. Dit betreft hoogstwaarschijnlijk een foutieve identificatie. We hebben de aangetroffen genetische code gecontroleerd op de Barcode of Life Database waaruit blijkt dat er eigenlijk een betere match is met de in Nederland algemeen voorkomende mossel *Mytilus edulis*, maar dat de genetische data van deze soort nog niet zijn vrijgegeven door de verzamelaar, waardoor *Mytilus trossilus* wordt gevonden als 'second best'. Dit onderschrijft het belang van een uitgebreide, complete referentiedatabase. De soorten *Mytilus edulis* (Noord Atlantisch), *Mytilus galloprovincialis* (Mediterraan) en *Mytilus trossulus* (Noord Pacifisch) vormen een soortcomplex met onderling beperkte genetische variatie waardoor kennis van de gebruikte genetische marker van belang is voor een juiste interpretatie.

Al worden minder of andere soorten aangetoond met eDNA, dan nog zou dit een representatieve steekproef kunnen zijn die bruikbaar is voor onderzoek naar ecologische interpretaties. Op basis van de vergelijking tussen morfologie en eDNA bij macrozoöbenthos kunnen we in elk geval concluderen dat de resultaten tussen deze twee methoden verschillen: de overeenkomsten in bemonsterde stations bij eDNA zijn anders dan bij morfologie.

Bij de interpretatie van eDNA in het mariene milieu moet rekening worden gehouden met een aantal onzekerheden. Allereerst is niet duidelijk of het DNA afkomstig is van aanwezige levende dieren, of van dieren die reeds lang verdwenen zijn maar waarvan slechts het DNA nog aanwezig is. In zeewater is DNA in minimaal 2 dagen detecteerbaar (Collins et al. 2018). In sediment kan DNA veel langer aanwezig zijn, gekoppeld aan substraat, hoewel de toplaag van het sediment in het dynamische systeem rond Ameland ongetwijfeld zeer regelmatig wordt doorgespoeld. Een tweede onzekerheid betreft de status van vestiging. Veel mariene organismen hebben een levensstadium als plankton en zijn door stroming en getijdewerking aanwezig in gebieden waar ze zich mogelijk niet kunnen vestigen.

Leefgemeenschappen en herstel

De potentie van genetische analyse is groot voor het analyseren van complete leefgemeenschappen, met name bij groepen waar de soorten niet of nauwelijks zijn te detecteren en identificeren. Onze resultaten met operationele taxonomische unit (OTU) analyses geven een vooruitblik, waarbij naar patronen tussen monsters wordt gekeken op basis van clusters van DNA fragmenten, in plaats van uitsluitend op naam gebrachte soorten. Het aantal eenheden dat met OTU's wordt meegenomen in patroonanalyses is doorgaans vele malen groter dan het aantal soorten. Bovendien zijn de clusters afkomstig van bacteriën tot gewervelden en omvatten dus de volledige taxonomische samenstelling van een leefomgeving. Statistische analyses zijn daardoor robuust.

Hierbij behoren enkele aantekeningen. OTU's zijn als eenheden bruikbaar voor biomonitoring en impact assessments, maar alleen als consequent dezelfde algoritmen en criteria voor clustering in de bioinformaticapijplijn wordt toegepast. Een OTU komt bovendien niet altijd overeen met een soort, veel soorten leiden tot meerdere OTU's door genetische variatie binnen de gekozen marker. Lopend onderzoek richt zich op het vinden van een algoritme dat OTU's op een manier clustert die het best taxonomische soorten representeert. Een tweede uitdaging is het koppelen van OTU's aan taxonomische groepen voor de toewijzing van namen. Indien identificatie tot soortniveau niet mogelijk is zou het voor (sommige) ecologische interpretaties alsnog nuttig zijn om (minimaal) te weten tot welk hog taxonomisch niveau ze behoren, zoals bacteriën, algen, mollusken, kreeftachtigen, stekelhuidigen enz.

Onze conclusie is dat juist voor de analyse van complete leefgemeenschappen, en daardoor ook voor impact assessments op de complete biodiversiteit in plaats van indicatorsoorten of -groepen, genetische analyse een belangrijke aanvulling kan vormen op bestaande methoden van morfologische analyses.

Kosten

Wanneer eDNA monsters voor vissen en macrozoöbenthos voldoende zijn voor beantwoording van een ecologische vraagstelling kunnen de besparingen aanzienlijk zijn. Allereerst zijn er besparingen mbt het verzamelen van de monsters. Het maakt nogal verschil als er niet met zware en tijdrovende apparatuur als boxcores en schaven hoeft te worden gewerkt. Behalve vaartijd is mogelijk een lichter schip vereist. Voorts is de verwerking van de monsters op het lab sneller, en liggen sequencing kosten lager dan morfologisch uitzoekwerk.

Voor deze studie moesten protocollen nog worden ontwikkeld en geoptimaliseerd voordat monsters als routinematig konden worden verwerkt. Dat vraagt een aanvullende investering van enkele maanden doorlooptijd. Bovendien, wanneer water of sediment monsters niet voldoende zijn, zoals het geval lijkt voor macrozoöbenthos, en bulksamples mogelijk een beter resultaat geven, dan vervallen de besparingen voor het verzamelen van monsters en kost de verwerking op het lab ook aanzienlijk meer werk vanwege het homogeniseren.

Aanbevelingen

Uit deze studie volgt een aantal aanbevelingen voor vervolgonderzoek. Een eerste is de aanbeveling om met gezamenlijke inspanningen de referentiedatabases met DNA barcodes voor soorten in de Noordzee zoveel mogelijk compleet te maken, voor belangrijke genetische markers als CO1 en 12S. Op dit moment ontbreken nog verschillende soorten, of zijn alleen exemplaren bekend van andere geografische regio's (West Atlantische of Pacifische oceaan), die genetisch kunnen verschillen van onze Noordzee populaties. Dit heeft tot gevolg dat niet alle soorten kunnen worden geïdentificeerd met genetische methoden voor biomonitoring. Van veel soorten zijn geen recente exemplaren beschikbaar op Naturalis, waardoor geen DNA beschikbaar is om DNA barcodes te bepalen. Het heeft een hoge prioriteit om de collectie soorten en DNA barcodes aan te vullen. Naturalis spreekt per direct haar netwerk aan om mariene soorten te verzamelen, en zal DNA barcodering van voucherspecimen bij toekomstige onderzoeksprojecten meebegroten. Doel is om binnen enkele jaren een groot deel van de Noordzeesoorten en hun DNA op Naturalis beschikbaar te hebben.

In aanvulling op vorige aanbeveling adviseren we aanvullend onderzoek naar de effectiviteit en gevoeligheid van de DNA barcodes. Met de huidige markers zijn mogelijk niet alle soorten goed van elkaar te onderscheiden, doordat ze voor de desbetreffende marker genetisch indentiek zijn. In de praktijk werken de generieke primers niet voor alle soortgroepen, waardoor sommige soorten niet gevonden worden. In sommige gevallen kunnen nieuwe marker-primer combinaties worden ontwikkeld om dit te ondervangen. Voor een juiste interpretatie van resultaten, met name of soorten terecht op de lijst staan of juist ontbreken, is kennis van de werking van de markers en primers essentieel. In alle gevallen is calibratie met morfologische monsters noodzakelijk.

Een derde aanbeveling betreft het type monsters dat wordt gebruikt voor analyses. Uit onze en andere studies blijkt dat extractie van DNA uit sedimentmonsters geen complete lijst levert van de aanwezige soorten macrozoöbenthos. Voor bemonstering van macrozoöbenthos adviseren we om met bulkmonsters te werken, traditionele monsters waarbij de organismen worden verzameld. Deze monsters kunnen worden verwerkt (vermalen) waarna DNA wordt geëxtraheerd om vervolgens genetisch de identificaties vast te stellen. We verwachten dat we hiermee de traditionele soortenlijst veel dichter kunnen benaderen, en waarschijnlijk zelfs kunnen aanvullen met taxa die niet eenvoudig tot op soort zijn te determineren. Ook voor deze aanpak moeten protocollen worden geoptimaliseerd, waarbij gekeken kan worden naar de invloed van het aantal boxcores per monsterpunt, het aantal DNA replicates en het aantal PCR replicates.

Een vierde aanbeveling betreft uitbreiding van het onderzoek naar bodemvissen. Uit onze studie blijkt dat zandspiering is aan te tonen met eDNA uit sedimentmonsters. Zandspiering vormt een belangrijk schakel in het ecosysteem van Noordzee en Waddenzee, als stapelvoedsel voor vissen, zeevogels en zeezoogdieren. Zandspiering voedt zich met planktonsoorten. We zouden meer van het de verspreiding en het voedselweb van de zandspiering willen weten omdat dit mogelijk bruikbaar is voor monitoring. Een overweging voor specifieke soorten zoals zandspiering is de ontwikkeling van soortspecifieke primers. Met dergelijke primers kan zeer nauwkeurig naar doelsoorten worden gezocht. Met een speciale PCR methode, de digital droplet PCR (ddPCR), kan vervolgens zeer nauwkeurig de hoeveelheid aangetroffen DNA moleculen worden bepaald. Op deze manier kan de de verspreiding en de relatieve abundantie van doelsoorten accuraat worden bepaald. Met genetische dieetaanalyse kunnen zandspiering worden onderzocht op de inhoud van hun magen en darmen. Op deze wijze kunnen zandspierungen zelf een monsterstation vormen voor hun prooidieren, en kan naar veranderingen in tijd en ruimte, of voor en na een impact, worden gekeken.

Een vijfde aanbeveling is monitoring van complete leefgemeenschappen door middel van OTU's. Met name voor beoordeling van impact assessments lijkt deze methode veel informatie genereren voor robuuste statistische analyses. Momenteel werkt Naturalis aan een algoritme om de 'lowest common ancestor' van OTU's te bepalen. Als er geen identificatie is tot op soortniveau, dan wordt gekeken of de OTU met een bepaalde zekerheid kan worden toegewezen aan een eerstvolgend hoger taxonomische niveau zoals genus, familie, orde enz. Een dergelijke classificatie kan de analyse en ecologische interpretatie van OTU's aanzienlijk verbeteren. Toepassing van een OTU methodiek vereist een aanpassing van bestaande ecologische indexen.

Een zesde en laatste aanbeveling betreft een advies voor systematisch onderzoek om tot geoptimaliseerde en gestandaardiseerde protocollen te komen. Vergelijkend onderzoek kan uitwijzen wat de beste bemonsteringsstrategie is, en wat de beste verwerking is op het lab. Voor de huidige macrozoobenthos monitoring voor de MWTL zouden enkele variabelen kunnen zijn: het aantal boxcores op een en hetzelfde station, het aantal DNA extracties van een enkele boxcore, het aantal PCR replicates van een enkele DNA extractie en het PCR protocol. Standaardisatie en strikte kwaliteitscontroles zijn voorwaarden voor accurate, vergelijkbare resultaten.

Conclusie

In deze studie hebben we onderzocht wat de toegevoegde waarde is van eDNA analyses voor de monitoring van vissen en macrozoobenthos. Het aantal soorten macrozoobenthos dat wordt aangetoond met eDNA ligt lager dan dat van traditionele morfologische analyses. Wel worden deels andere soorten gevonden waardoor eDNA een aanvulling kan vormen op bestaande monitoring. eDNA analyses van water en sedimentmonsters voor detectie van vissen geven interessante resultaten voor meer toepassingen en onderzoeken. Een voorwaarde voor accurate genetische identificaties van zowel macrozoobenthos als vissen is een complete en betrouwbare referentiebibliotheek met DNA barcodes. Een interessante ontwikkeling is de genetische detectie van complete leefgemeenschappen, in plaats van specifieke indicatorsoorten of -groepen, voor biomonitoring en maatregel-effect analyses, zoals herstel na verstoring. De kosten voor het genetische analyseren van een monster liggen nu al lager dan een morfologische analyse. Echter, een investering in optimalisatie en standaardisatie is vereist voordat routinematige werkzaamheden kunnen worden uitgevoerd. In dit verslag worden aanbevelingen gedaan voor aanvullen van referentiedatabases, meer onderzoek naar de gevoeligheid en effectiviteit van primer-marker combinaties, bulksampling van macrozoöbenthos, eDNA en dieetanalyse van zandspieringen en vergelijkend onderzoek voor standaardisatie en kwaliteitsborging.

Dankwoord

Deze studie is uitgevoerd in samenwerking met Rijkswaterstaat en Eurofins. Cor Schipper (Rijkswaterstaat) was verantwoordelijk voor het totale monitoringsprogramma en de organisatie van schepen en het verblijf op Ameland. Edwin Verduin (Eurofins), Harriette Holzauer (TU Delft) en the Fieldwork Company hanteerden de boxcores waaruit de sedimentmonsters zijn genomen. Student Mejdy Kacem droeg zorg voor de bemonstering en de verwerking van de monsters op het lab van Naturalis, onder begeleiding van analisten Frank Stokvis en Rob Pastoor (Naturalis).

Literatuur

- Andrews S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Andújar, C., Arribas, P., Yu, D. W., Vogler, A. P., & Emerson, B. C. (2018). Why the COI barcode should be the community DNA metabarcode for the Metazoa. *Molecular Ecology*. <https://doi.org/10.1111/mec.14844>
- Aylagas, E., Mendibil, I., Borja, Á., & Rodríguez-Ezpeleta, N. (2016). Marine Sediment Sample Pre-processing for Macroinvertebrates Metabarcoding: Mechanical Enrichment and Homogenization. *Frontiers in Marine Science*, 3. <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00203>
- Bos, O. G., Gittenberger, A., Boois, I. de, Asch, M. van, Wal, J.T. van der, Cremer, J., Hoorn, B. van der, Pieterse, S. & Bakker, P.A.J. (2016). Soortenlijst Nederlandse Noordzee. Wageningen Marine Research. rapport C125/16. DOI: <https://doi.org/10.18174/401117>
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), 36–42. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1195>
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Clarke, K.R., Gorley, R.N. (2015). PRIMER v7: User Manual/Tutorial PRIMER-E: Plymouth.
- Collins, R. A., Wangenstein, O. S., O’Gorman, E. J., Mariani, S., Sims, D. W., & Genner, M. J. (2018). Persistence of environmental DNA in marine systems. *Communications Biology*. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0192-6>
- Dell’Anno, A., & Corinaldesi, C. (2004). Degradation and Turnover of Extracellular DNA in Marine Sediments : Ecological and Methodological Considerations Degradation and Turnover of Extracellular DNA in Marine Sediments : Ecological and Methodological Considerations. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 4384–4386. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.4384>
- Gittenberger, A., Rensing, M., Stegenga, H. & B.W. Hoeksema, 2010. Native and non-native species of hard substrata in the Dutch Wadden Sea. *Nederlandse Faunistische Mededelingen* 33: 21-75.
- Gittenberger, A., Rensing, M., & Wesdorp, K. H. (2017b). Uitheemse mariene soorten in Nederland. GiMaRIS rapport 2017_19.
- Horton, T., ... Zhao, Z. (2018). World Register of Marine Species. Available from <http://www.marinespecies.org> at VLIZ. Accessed 2018-04-04. doi:10.14284/170
- Iwasaki, W., Fukunaga, T., Isagozawa, R., Yamada, K., Maeda, Y., Satoh, T. P., ... Nishida, M. (2013). Mitofish and mitoannotator: A mitochondrial genome database of fish with an accurate and automatic annotation pipeline. *Molecular Biology and Evolution*, 30(11), 2531–2540. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst141>
- Leray, M., Yang, J. Y., Meyer, C. P., Mills, S. C., Agudelo, N., Ranwez, V., ... Machida, R. J. (2013). A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. *Frontiers in Zoology*. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-10-34>
- Lindsay, D. J., Grossmann, M. M., Nishikawa, J., Bentlage, B., & Collins, A. G. (2015). DNA barcoding of pelagic cnidarians: current status and future prospects. *Bull. Plankton Soc. Japan*, 62(1), 39–43.
- Magoč, T., & Salzberg, S. L. (2011). FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 27(21), 2957–2963. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr507>
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, 17(1), 10. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., ... Iwasaki, W. (2015). MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of

- more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science*, 2(7), 150088. <https://doi.org/10.1098/rsos.150088>
- Pawlowski, J., Kelly-Quinn, M., Altermatt, F., Apothéoz-Perret-Gentil, L., Beja, P., Boggero, A., ... Kahlert, M. (2018). The future of biotic indices in the ecogenomic era: Integrating (e)DNA metabarcoding in biological assessment of aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment*, 637–638, 1295–1310. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.002>
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. N. (2007). BARCODING, BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes*, 7(April 2016), 355–364. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01678.x>
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4, e2584. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>
- Schmieder, R., & Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*, 27(6), 863–864. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr026>