

# Afstudeerverslag: Potentie van DNA metabarcoding voor Biomonitoring van macrobenthos

Evaluatie van het gebruik van DNA metabarcoding voor het biomonitoren van de  
ecologische impact van het mechanisch oogsten van wadpielen



Bas Vooijs

2020

# Potentie van DNA metabarcoding voor Biomonitoring van macrobenthos

Evaluatie van het gebruik van DNA metabarcoding voor het biomonitoren van de  
ecologische impact van het mechanisch oogsten van wadpiëren

*Student: Bas Vooijs S1100180*

*Verslag V1*

*Datum van inlevering: 01-05-2020*



*Opleiding: Biologie en Medisch Laboratoriumonderzoek, Hogeschool Leiden*

*- Zernikedreef 11, 2333 CK Leiden*

*Specialisatie: Biomedisch Research*

*Afstudeerbegeleider/1<sup>e</sup> examiner: Maartje van Kregten*

*2<sup>e</sup> examiner: Ivo Horn*

*Periode stage: september 2019 – mei/juni 2020*

*Stageplek: Naturalis Biodiversity Center*

*- Darwinweg 2, 2333 CR Leiden*

*Stagebegeleider: Berry van der Hoorn*

*Dagelijkse (lab)begeleider: Elza Duijm*

## Inhoud

Afkortingen.....	3
Abstract .....	4
Inleiding.....	4
Proefopzet.....	6
Principes .....	7
Methode.....	8
DNABarcoding .....	8
Subsampling specimens .....	8
DNA-extractie Kingfisher .....	8
PCR.....	8
E-gel .....	9
Sequencing:.....	9
DNA Metabarcoding.....	9
homogenisering.....	9
DNA-extractie d.m.v. Powersoil Kingfisher kit. ....	9
PCR.....	10
Resultaten .....	11
DNA-barcoding .....	11
DNA Metabarcoding:.....	12
Discussie .....	14
Conclusie .....	17
Literatuurlijst. ....	17
Bijlage .....	21
Bijlage 1: Coördinaten van de stations per verzamelevents .....	21
Bijlage 2: Soorten lijst voor DNA Barcoding. ....	22
Bijlage 3: Resultaten.....	28
3.1: Dropsense 96 tabel monsters T0-T4 voor het opschonen van DNA extracten.....	28
3.2: Dropsense 96 tabel monsters T0-T4 na het opschonen van DNA extracten .....	29
Bijlage 3.3: QIAxcel gel image van Environmental mastermix PCR.....	30
Bijlage 4: Protocollen fabrikant. ....	31
Bijlage 4.1: MN Nucleomag Tissue kit voorschrift.....	31
Bijlage 4.2: Dropsense 96 (trinean) .....	32
Bijlage 4.3: E-gel 96 Agarose gel (2%) met SYBR sage.....	35
Bijlage 4.4: MagAttract PowerSoil DNA Kit .....	36
Bijlage 4.5: Zymo OneStep-96 PCR Inhibitor Remover.....	37

## Afkortingen

- BOLD: Barcode Of Life Data Systems
- CO1: Cytochrome C Oxidase 1 gen
- Cat. No.: Catalog Number
- DNA: DeoxyriboNucleic Acid
- dNTPs: (deoxyribose) Nucleoside TriPhosphate
- eDNA: Environmental DNA
- eRNA: Environmental RNA
- HTS: High-Throughput Sequencing
- ITS: Internal Transcribed Spacer gene
- KF: KingFisher
- NBC: Naturalis Biodiversity Center
- NGS: Next Generation Sequencing
- NIOZ: Royal Netherlands Institute for Sea Research (Koninklijk Nederlands Instituut voor Onderzoek der Zee)
- MatK: Maturase K gen
- MN: Manthey Nagel
- O/N: Over nacht
- PCR: Polymerase Chain Reaction
- PhyML: Maximum likelihood phylogeny tree
- ProtK: Proteinase K
- RBCL: Ribulose 1-5 bifosfaat carboxylase Large subunit- gene
- Rcf: Relative centrifugal force
- RNA: RiboNucleic Acid
- RNase: Ribonuclease
- Rpm: Revolutions per minute
- WWF: World Wild Fund for nature

## Abstract

Marine ecosystems are impacted through anthropogenic activities, which have a huge negative effect on biodiversity and population size. A quick and accurate method for biomonitoring is the key for actions to decrease the decline in biodiversity. eDNA metabarcoding is an upcoming and promising method which uses DNA extracted from environmental samples in combination with NGS to genetically identify all organisms present in the sample. In this study we evaluated the use of eDNA metabarcoding to biomonitor the impact of mechanical digging for the lugworm *Arenicola marina* on the biodiversity of the macrobenthic communities in the Dutch Wadden Sea area.

DNA barcodes (CO1 region) of several macrobenthos species were sequenced to complement the DNA-reference database of Naturalis Biodiversity Centre for species identification.

Sediment samples were collected near the island of Texel and freeze-dried before and up to 5 months after digging by the Royal-Netherlands-institute-for-sea-research (NIOZ). The samples were homogenized, DNA was extracted utilising the MagAttract Powersoil-kit, cleaned with Zymo<sup>tm</sup> Onestep-PCR-Inhibitor-Remover and the CO1 region was amplified using three different PCR-mixes. DNA-concentrations of the extracts were measured and the samples were checked for PCR-products.

From the sediment samples only 5 samples formed PCR product for all PCR-reactions, except for the environmental mastermix where the positive control was unsuccessful. Analysis of the DNA-extracts indicates the loss of DNA during Clean-up and presence of highly degraded DNA. No further test were done due to the Covid-19 pandemic and no concrete conclusion can be drawn regarding the cause of the degradation.

For future research, several recommendations regarding the process of the study are done using literature in combination with these results. Despite the existing problems with the current methods, eDNA metabarcoding nonetheless possesses the potential to be used for biomonitoring. However, more research should be done regarding the standardisation of the method.

## Inleiding

Veel marine ecosystemen zijn door menselijke activiteit, zoals visserij, aangetast. Voornamelijk de kustgebieden zijn gevoelig gebleken voor veranderingen<sup>1-3</sup>. Deze veranderingen hebben een grote impact op het aantal en de biodiversiteit van marine organismen. Tussen 1970 en 2000 is de marine biodiversiteit met 25% gedaald<sup>4</sup>, waarbij een rapport van het WWF uit 2018 stelde dat tussen 1970 en 2014 een gemiddelde afname in populatiegrootte van 60% is gevonden.<sup>5,6</sup> Er is een groot belang bij het ontwikkelen van een effectieve strategie om verlies van biodiversiteit tegen te gaan en deze te herstellen. Hiervoor is een snelle en accurate biomonitoring methode nodig om de afname en herstel van de diversiteit te meten. De conventionele methoden waarbij soorten op morfologische kenmerken (i.e anatomie) worden geïdentificeerd zijn vaak arbeidsintensief. De identificatie is afhankelijk van getrainde experts, kosten veel tijd en daardoor ook veel geld<sup>5,7-12</sup>.

Een veelbelovende ontwikkeling is het gebruik van environmental DNA (eDNA) en DNA metabarcoding om de diversiteit van bepaalde groepen organismen, zoals macrobenthos, in een ecosysteem te meten. eDNA is DNA dat verzameld wordt bij het nemen van een omgevingsmonster, zoals een water- of bodemonster, zonder dat er specifieke organismen geïsoleerd worden<sup>13-15</sup>. DNA Metabarcoding is de high-throughput genetische identificatie van meerdere soorten organismen tegelijk in een verzameld monster door de amplificatie van een marker gen met generieke primers<sup>16</sup>. Door gebruik van High-throughput sequencing (HTS) kan een veelvoud aan DNA-segmenten gelijktijdig gesequenced worden waarbij de reads van het geamplificeerde DNA vergeleken kunnen worden met een referentie

database met DNA profielen<sup>14,16-18</sup>. Macrobenthos zijn organismen die in de bentische zone leven, op en in de bodem van een waterlichaam, en zichtbaar zijn voor het oog (>1millimeter). Ze spelen een belangrijke rol in het ecosysteem, o.a. als voedselbron en reageren op stressoren in het ecosysteem door veranderingen in diversiteit en biomassa waardoor ze als bio-indicator gebruikt kunnen worden<sup>19,20</sup>. Een aantal factoren die impact hebben op de biodiversiteit van macrobenthos zijn temperatuur en pH<sup>1,9,19,21,22</sup>. Daarnaast hebben menselijke ingrepen, zoals bodemberoering, grote gevolgen voor macrobenthos.

eDNA metabarcoding is een snelle en efficiënte techniek<sup>14,23</sup>, waarbij Aylagas et al., (2018) hebben gevonden dat eDNA metabarcoding 55% minder geld en 72% minder tijd kost dan morfologisch identificeren. Deze techniek kan ook extra informatie geven die bij traditionele methoden niet verkregen wordt, onder andere doordat organismen in een vroege levensfase (eieren, larven) en beschadigde organismen wel geïdentificeerd kunnen worden, ook bij lage DNA concentraties<sup>11,13,15,24</sup>. Hierdoor kunnen invasieve- en bedreigde soorten in een ecosysteem eerder ontdekt worden. Bij verdere ontwikkeling van eDNA technieken zou ook de 'relative abundance' van aanwezige soorten bepaald kunnen worden. Hoewel het op dit moment nog niet zo accuraat is, hebben verschillende onderzoeken een correlatie gevonden tussen de hoeveelheid aanwezige organismen van een bepaald soort en de hoeveelheid teruggevonden DNA.<sup>13,15,23,25-27</sup>

De toepassing van eDNA metabarcoding brengt ook een aantal uitdagingen met zich mee. Nog lang niet alle organismen worden met deze techniek gedetecteerd. Uit een onderzoek van Aylagas et al., (2018) bleek dat slechts 112 van de 206 taxa geïdentificeerd met morfologische geïdentificeerde taxa na het verzamelen en filteren van bodemmonsters met DNA metabarcoding werd teruggevonden. De keuze van het gen en de lengte van de marker heeft ook invloed op de gedetecteerde soorten. Wangenstein et al., (2018), Aylagas et al., (2018) en Mauvisseau et al., (2019) hebben aangetoond dat het Cytochroom C Oxidase 1 gen (CO1) als marker een betere resolutie en identificatie tot op soortniveau geeft bij metabarcoding, maar dat resultaten van markers op het 18S gen meer overeenkomsten vertonen met resultaten uit de morfologische studies. Aylagas et al., (2016) heeft aangetoond dat een kortere marker betere detectie van soorten geeft dan een langere marker. Dit komt mogelijk doordat er tijdens PCR en sequencing bij langere sequenties meer fouten ontstaan.<sup>1,17,26</sup> De afwezigheid van standaard protocollen en standaard referentie database kan ook zorgen voor verschillen in het aantal en de kwaliteit van de resultaten in verschillende onderzoeken<sup>7,9,11,16,17,23,26,27</sup>. De aanwezigheid van eDNA is daarnaast ook niet altijd het resultaat van de aanwezigheid van het organisme in dat gebied. DNA kan bijvoorbeeld stroomafwaarts meegenomen zijn of kan getransporteerd worden via de uitwerpselen van een mobiel roofdier<sup>13</sup>. eDNA kan ondanks voorgenoemde uitdagingen gebruikt worden om de biodiversiteit van macrobenthos in aquatische ecosystemen te meten<sup>1,2,7,8,19,21</sup>.

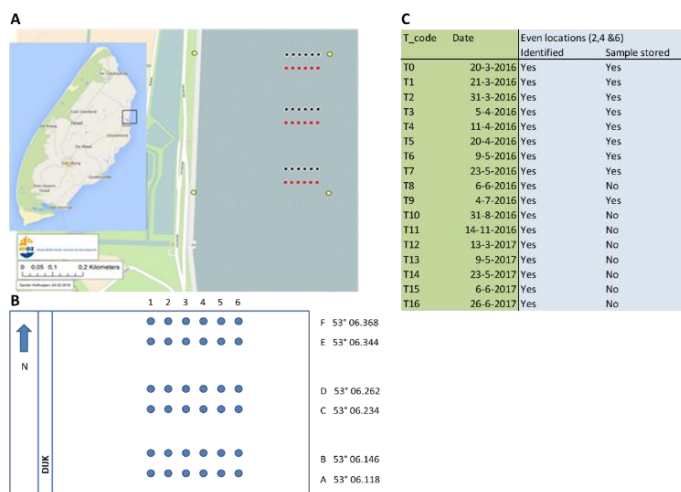
In dit onderzoek wordt gekeken naar de potentie van DNA metabarcoding voor het biomonitoren van de ecologische impact van het mechanisch oogsten van de zeeper *Arenicola marina* op de biodiversiteit van het Waddenzeegebied. Hiervoor wordt geprobeerd de impact op- en het eventuele herstel van macrobenthos te bepalen met behulp van eDNA metabarcoding. De bruikbaarheid van deze methode wordt geëvalueerd door de resultaten van deze studie te vergelijken met resultaten uit de literatuur. Hierbij wordt DNA uit gevriesdroogde bulksamples, verkregen van het Koninklijk Nederlands Instituut voor Onderzoek der Zee (NIOZ), geïsoleerd.

De hypothese is dat ondanks de huidige beperkingen van eDNA metabarcoding, de impact op en het herstel van macrobenthos gemonitord kan worden door middel van deze techniek, waarbij een vergelijkbaar patroon gevonden zal worden als bij het morfologisch onderzoek van Klunder et al, (2019). Dit resultaat wordt verwacht omdat in eerdere studies veranderingen in de aanwezigheid en

compositie van macrobenthos werden aangetoond door de toepassing van DNA metabarcoding, ondanks het feit dat nog niet alle soorten teruggevonden konden worden<sup>1,2,14,19,21,22</sup>. Ook is er sinds voorgaande geciteerde studies met DNA metabarcoding van macrobenthos veel progressie gemaakt in de methodologie<sup>8,9,22,28</sup>.

## Proefopzet

Om de ecologische impact van het mechanisch oogsten van de zeepier op de macrobenthos biodiversiteit te meten werden honderdtachtig monsters met organismen (sedimentmonsters) verzameld door het 'Koninklijk Nederlandse Instituut voor Onderzoek der Zee' (NIOZ). Deze zijn voor (T0) en tot 5 maanden na het oogsten (T1 t/m T10, m.u.v. T8) verzameld bij tien sampling events op achttien verschillende locaties, zie figuur 1.



Figuur 1: Overzicht van verzamelevents, De exacte coördinaten per station zijn toegevoegd in bijlage 1. (A) Locatie van de verschillende stations aan de kust van Texel. Bij de rode stations (transect A, C & D) is er mechanisch geoogst. De zwarte stations (Transect B, D & F) dienen als negatieve controle. (B): schematisch overzicht van alle 36 station. De latitude coördinaten van transect A t/m F zijn gegeven. Monsters verzameld bij de even rijen (Rij 2, 4 & 6) zijn geïdentificeerd en wordt dit onderzoek op uitgevoerd. (C) Overzicht van de data per verzamelingsevent. Geïdentificeerde monsters verzameld bij deze events zijn bewaard tot 2 maanden na het mechanisch oogsten.

Bij drie transects (A, C & E) is er mechanisch geoogst. De andere drie transects (B, D & F) dienen als negatieve controle. Per bodem monster is er 177 cm<sup>2</sup> genomen tot 25-30cm diepte. De monsters uit de even locaties (Rij 2, 4 & 6) werden gezeefd met een 1 mm zeef waarbij de aanwezige organismen zijn geïdentificeerd en geteld om morfologisch de impact vast te stellen. De organismen werden in de bijbehorende monsters samengevoegd, gevriesdroogd en uitgeleverd aan Naturalis Biodiversity Center (NBC). In dit onderzoek wordt geprobeerd dit patroon via genetische identificatie vast te stellen.

Omdat bepaalde organismen in de DNA referentie database van Naturalis ontbreken, kunnen deze niet geïdentificeerd worden. Om de DNA referentie databse uit te breiden zijn hiervoor specimen op alcohol verzameld door NBC en het NIOZ. De geïdentificeerde organismen worden gesubsampled, i.e. het afnemen van een deel van het organisme zoals een pootje, waarna het DNA hieruit geïsoleerd wordt. Het DNA wordt vervolgens geamplificeerd via Polymerase Chain Reaction (PCR). De verkregen PCR-producten worden geprepareerd en gesequenced met Sanger Sequencing via BaseClear B.V.. Als marker wordt een 658 bp regio in het Cytochroom c Oxidase 1 gen (COI) geamplificeerd. De sequenties worden bewerkt en gefilterd op kwaliteit waarna de DNA referentiedatabase wordt aangevuld.

Om zoveel mogelijk organismen in de sedimentmonsters te kunnen identificeren werden de monsters gehomogeniseerd met een vijzel en vloeibaar stikstof. Het DNA wordt geïsoleerd waarna de kwaliteit en kwantiteit van de DNA-extracten wordt gemeten. Het DNA wordt vervolgens op dezelfde manier als bij DNA barcoding geamplificeerd met 3 verschillende PCR reactie mixen om de beste PCR mix te achterhalen. Hierbij wordt gebruik gemaakt van een primer-set welke in een eerder onderzoek van Naturalis geoptimaliseerd is<sup>29,30</sup>

Door de Corona-19 pandemie zijn er helaas geen vervolggexperimenten gedaan met het sequencen en is er geen genetische data over de impact verkregen.

Om ontwikkeling van de uitgevoerde experimenten in de methode te evalueren op betrouwbaarheid, accuratesse en toepasbaarheid worden de verkregen resultaten van de experimenten vergeleken met literatuur.

## Principes

### **Vriesdrogen van monsters**<sup>31,32</sup>

Vriesdrogen is een methode van het conserveren van specimen door middel van het bevriezen van het organisme, waarna het ijs via sublimatie (i.e. van vaste- naar gasfase) in een vacuüm verwijderd wordt. Deze techniek heeft een aantal voordelen ten opzichte van conservatie op alcohol of formaline basis. Door het drogen van organisme kan het drooggewicht gemeten worden. Natgewicht varieert meer tussen organismen. Het proces van vriesdrogen heeft ook weinig invloed op het drooggewicht, waardoor het drooggewicht wel uniform is. Ook worden morfologische structuren van organisme niet beschadigd of vervormd, waardoor na het verzamelen identificatie nog steeds mogelijk is.

### **DNA Barcoding & Metabarcoding**<sup>7,14,16,33,34</sup>

DNA barcoding is de identificatie van een organisme door middel van amplificatie van een zogenoemde marker-gen, wat vervolgens gesequenced en vergeleken wordt met een DNA referentie database. Het marker gen/segment moet hiervoor aan bepaalde eisen voldoen. De sequentie moet hoog variabel zijn tussen soorten, nauwelijks variabel zijn binnen een soort en geflankeerd worden door conservatieve delen voor een universele primer-binding site. Het DNA segment wordt door middel van primers en Polymerase Chain Reaction (PCR) geamplificeerd, waarna de nucleotidevolgorde bepaald wordt met sequencing.

Een veel gebruikte techniek voor sequencing is Sanger Sequencing, waarbij gemarkeerde/gelabelde nucleotidebasen (A,T,C,G) gebruikt worden. Deze worden samen met niet-gemarkeerde nucleotiden ingebouwd. Wanneer een gemarkeerde base wordt gebruikt stopt de reactie voor dat DNA molecuul. Bij een PCR-reactie wordt willekeurig een gemarkeerde of niet-gemarkeerde base ingebouwd in het DNA molecuul wat resulteert in veel DNA-moleculen met verschillende lengtes en een gemarkeerde nucleotide op het eind. Deze DNA moleculen worden vervolgens gescheiden op grootte en langs een detector gehaald die de gemarkeerde nucleotide meet om de nucleotidevolgorde te achterhalen.

Bij DNA metabarcoding wordt hetzelfde proces voor DNA extractie en amplificatie plaats als bij DNA barcoding. Door het gebruik van NGS (Next Generation Sequencing) kan de sequentie van verschillende soorten in een monster bepaald worden. Deze sequenties kunnen vervolgens vergeleken worden met een DNA-referentie database om meerdere organismen in een monster tegelijk te identificeren.



## Methode

### DNABarcoding

#### Subsampling specimens

Van 477 geïdentificeerde organismen (voucher specimen) uit de verzameling van Naturalis en NIOZ zijn niet-kenmerkende delen (submonsters) voor DNA extractie afgenomen. Het submonster werd in de Collection microtubes Plate well met Caps (Qiagen; Cat. No. 19560 + Cat. No:19566) geplaatst in 200µl T-1 lysisbuffer uit de bijbehorende MN NucleoMag Tissue kit (Macherey Nagel; Cat. no. 744300.24). Kenmerkende delen van organismen werden vermeden om morfologische (her)identificatie in de toekomst mogelijk te maken.

#### DNA-extractie Kingfisher

Voor DNA-extractie werd 25µl ProtK uit de MN nucleomag Tissue kit toegevoegd volgens het door de fabrikant geleverde voorschrift. De plaat werd goed afgesloten waarna het kort werd gecentrifugeerd bij 2250 rcf. De plaat werd o/n geïncubeerd in een shake-incubator (56°C, 250 rpm). Een KingFisher DNA extractie werd uitgevoerd met behulp van de MN Tissue kit en de KingFisher Extraction robot. Voor de extractie werden 4 platen voorbereid: Een lysisplaat (Deepwell plate, Cat. No. 95040450) met 225µl gelyseerd monster, 360µl MB2 buffer & 24µl B-beads, 3 wasplaten (Deepwell plates, Cat. No. 95040450) met 600µl MB3-, MB4, en MB5 buffer respectievelijk, en een elutieplaat (200µl PCR plate, Cat. No. 97002540) met 150µl MB6 buffer. De buffer en beads zijn afkomstig van de MN Nucleomag Tissuekit. Voor Extractie werd het “Machery\_Nagel\_Tissue\_96 KingFisher Flex” programma uitgevoerd met “KingFisher 96 deepwell magnet tip comb”. Het geëluerde DNA werd opgedeeld en bewaard bij 4°C in een Eppendorf twin.tec PCR plate (Cat. No. 951020460) voor verder gebruik of bij –80°C in een Micronic lobarack 96 (Cat. No. MP75117BC) om het voor langere tijd te bewaren. De concentratie en zuiverheid van het DNA werd bepaald met de Dropsense 96 (Trinean), waarbij het protocol van de fabrikant gevolgd werd.

#### PCR

Het DNA werd, afhankelijk van de Dropsense resultaten, 10x of 100x verdund tot een concentratie tussen 2–30ng/µl. De PCR werd uitgevoerd met 10pM primers, 2,5mM dNTP's, 1x PCR-buffer CL (Qiagen) en 5 U/µl Taq-Polymerase (Qiagen). De gebruikte primers zijn M13F-jgLC01490 (5' TGTAACGACGGCCAGTTITCIACIAAYCAYAARGAYATTGG 3') en M13R-jgHCO2198 (5' CAGGAAACAGCTATGACTAIACYTCIGGRTGICCRAARAAYCA 3') (Zie tabel 1). De primers bevatten een M13 staart aan de 5' kant voor het sequencen na amplificatie. De Initiële denaturatie-stap werd drie minuten uitgevoerd bij 96°C. Daarna werd voor 40 cycli de denaturatie stap 15 seconden uitgevoerd bij 96°C, de annealing stap 30 seconden bij 50°C en de extension stap voor 40 seconden bij 72°C. Dit werd gevolgd door een laatste extension stap van 5 minuten bij 72°C. De verwachte productlengte was 658bp en de PCR-producten werden bewaard bij 4°C tot verder gebruik.

Tabel 1: informatie van primers en M13F tail voor DNA-barcoding

Name	Type	Primersequence (5'-->3')	Citation
jgLC01490	Forward	TITCIACIAAYCAYAARGAYATTGG	Geller et al., 2013
jgHCO2198	Reverse	TAIACYTCIGGRTGICCRAARAAYCA	Geller et al., 2013
M13F tail	Tail	TGTAACGACGGCCAGT	Baseclear®
M13R tail	Tail	CAGGAAACAGCTATGAC	Baseclear®

## E-gel

3µl PCR-product werd verdund tot 20µl met MilliQ. Het verdunde PCR-product werd vervolgens in een E-gel 96 Agarose Gel (2%) met SYBR Safe (ThermoFisher, Cat. No. G700802) gepipetteerd. De gel werd gerund in een E-Base™ device (ThermoFisher, Cat. No. EBM03EU) waarbij het protocol van de fabrikant gevolgd werd. Een UV-foto van de gel werd gemaakt met het Gel-dock UV photography systemen en geanalyseerd met behulp van het E-Editor™ V2.02 programma op de aanwezigheid van een PCR-product.

## Sequencing:

De succesvolle PCR-producten werden gepoold in nieuwe platen en verstuurd naar Baseclear B.V. voor Sanger-sequencing. De verkregen reads werden bewerkt in Geneious prime® (v. 2019.2.1), waarbij deze per sequencing plaat werden alligned tot contigs met De Novo Assemble met de hoogste sensitiviteit. De primersites werden hierbij geannoteerd. Niet samengevoegde reads werden handmatig beoordeeld en, bij een HQ% boven de 1%, werden eventuele regio's met lage confidence verwijderd om alligning mogelijk te maken. De primers werden van de sequenties getrimmed en de contigs werden beoordeeld op confidence (zekerheid per nucleotide), lengte van de sequentie (658bp exclusief primers) en gaten en/of dubieuze nucleotide in de sequenties. zijn gemarkeerd en uitgefilterd. Bij >3% dubieuze basen en/of >40% missende data werden de sequenties verwijderd. Sequenties die in lengte exact 3 base afweken van de verwachte lengte (658bp) werden gezien als correct, aangezien dit in de gekozen sequentie voorkomt en minder snel een frameshift in de genetische code zou veroorzaken.

Van de contigs werd een consensus sequence gemaakt met MAFT multiple align (Algorithm: Auto; Scoring matrix: 200PAM k=2; Gap open penalty: 1.53; offset value: 0). De sequenties werden nog een keer op kwaliteit gecontroleerd zoals hierboven beschreven waarbij onduidelijkheden en gaten vergeleken werden met de consensus sequentie. Van de contigs werd met behulp van de consensus sequentie een maximum likelihood phylogeny-boom (PhyML) berekend met de PHYML plug-in (Substitution model: GTR; No Bootstrapping likelihood; optimize: Topology/length/rate). Mogelijk gecontamineerde sequenties, aangeduid door een uitzonderlijke lange tak in de boom, werden geblast via NCBI GenBank BLAST

## DNA Metabarcoding

### homogenisering

De sedimentmonsters werden in gevriesdroogde vorm aangeleverd door het NIOZ. Monsters die water bevatten werden (nogmaals) gevriesdroogd met de "Christ® Alpha 2-4 LSCbasis" vriesdroger. De monsters werden behandeld met vloeibaar stikstof (ca. -195°C) en d.m.v. een porseleinen vijzel vermalen tot poedervorm. De gebruikte instrumenten en de werkplek werden tussen elk monsterbehandeling schoongemaakt met een bleekoplossing. De monsters werden bewaard bij -20°C tot verder gebruik.

### DNA-extractie d.m.v. Powersoil Kingfisher kit.

Voor DNA-extractie werd aan de PowerMag Bead/RNase A solution 0.4mg/ml ProtK (Macherey-Nagel™; Cat. No. 740506.75) toegevoegd. Van elk gehomogeniseerd monster werd c.a. 250mg in triplo in de PowerBead DNA Plate uit de bijbehorende MagAtract PowerSoil DNA Kit (Qiagen, Cat. No. 27000-4-KF) gebracht en werd er aan elke well 750µl PowerBead Solution/RNase A/ProtK Solution en 60µl SL-solution uit de kit toegevoegd volgens het bijgeleverde protocol van de fabrikant. De plaat werd 15 seconden gemixt op 30Hz op de TissueLyser II (Qiagen; Cat NO./ID: 85300) en o/n geïncubeerd in een shake-incubator (56°C, 400rpm) waarna het protocol van de fabrikant vervolgd werd. Bij monsters waar het supernatant in het sediment is getrokken is er nog een keer lysisbuffer op

gepipetteerd, gemixt en 1,5 uur geïncubeerd in een shake-incubator waarna het protocol weer gevolgd werd.

Bij de centrifugeer stappen werd 12 minuten met een snelheid van 2250xg gecentrifugeerd. Het DNA werd geëluëerd in 50µl elutie-buffer. Daarna werd het opgeschoond met de OneStep-96™ PCR Inhibitor Removal Kit (Zymo, Cat.No. D6035) waarbij het protocol van de fabrikant werd gevolgd. Het centrifugeren van het DNA werd respectievelijk 7 en 5 minuten met een snelheid van 2700 x g gedaan. De drie DNA-extract replica's van elk monster werden bij elkaar gepoold door van de replica een gelijke hoeveelheid in een nieuwe plaat over te brengen.

Het DNA werd nog een keer geïsoleerd zoals hierboven beschreven met 200 mg monster zonder de opschoonstap. De triplo's van elk monster werd hierbij bij elkaar gepoold door van elke plaat 50µl over te brengen in een nieuwe plaat. Hier is geen PCR mee gerund vanwege het sluiten van de praktijkwerkzaamheden i.v.m. de COVID-19 pandemie .

De DNA-extracten werden voor en na het opschonen gemeten met behulp van de dropsense 96 zoals hierboven beschreven en bewaard bij -80°C in een 96 wells stock plaat tot verder gebruik.

### PCR

Een PCR werd uitgevoerd met 1x KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Roche, Cat. No. KK2601) met 10pM primers. De gebruikte primers zijn mlCOLintFNXT (5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC 3') en jhHCO2198NXT

(5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTANACYTCNGGRTGNCCRAARAAYCA 3') (Zie tabel 2). Een initiële denaturatie stap werd 3 minuten uitgevoerd bij 95°C. Daarna werd voor 35 cycli de denaturatie stap 30 seconden uitgevoerd bij 95°C, de annealing stap 30 seconden bij 57°C en de extension stap voor 30 seconden bij 72°C. Dit werd gevolgd door een laatste extension stap van 1 minuut bij 72°C. De PCR producten werden zichtbaar gemaakt op een E-gel 96 Agarose Gels (2%) met SYBR Safe (ThermoFisher, Cat. No. G700802) zoals hiervoor beschreven. Voor de volgende PCR's werden 2 van de werkende monsters, samen met 3 niet werkende monsters, onverdund (0,2-40ng/µl), 10x verdund (0,02-4ng/µl) en 100x (0,002-0,4ng/µl) verdund meegenomen voor drie PCR mixen. Dit werd gedaan **om de correcte verdunning te achterhalen om de inhibitie te verminderen:**

De KAPA HiFi HotStart ReadyMix [1x KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Roche, Cat. No. KK2601), 10pM primers], de Taqman™ Environmental Master Mix 2.0 [1x Taqman™ Environmental Master Mix 2.0 (ThermoFisher, Cat. No. 4396838), 10pM primers], en de phire ii hotstart [1x Phire Hot Start II PCR buffer (ThermoFisher, Cat.No. F524L); 2,5mM dNTPs (Qiagen, Cat No./ID: 201900); 5 U/µl Taq-Polymerase(Qiagen, Cat No./ID: 201203)& 10pM primers]. De anealing temperatuur werd verlaagd naar 50°C.

De PCR producten werden geanalyseerd op de Qiaxcel Advanced system (Qiagen, Cat No./ID: 9001941) waarbij het protocol van de fabrikant gevolgd werd.

Tabel 2: Informatie over primers en Nextera tail voor metabarcoding

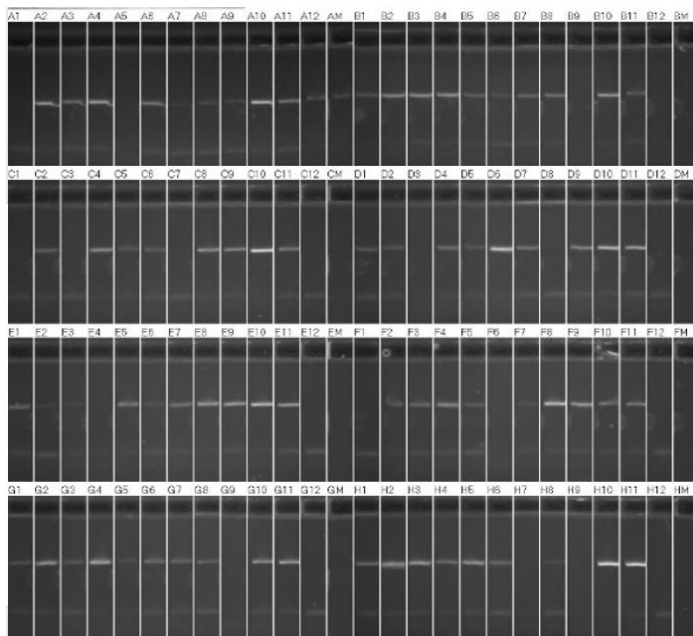
Name	Type	Primersequence 5'-->3'	reference
mlCOLintFNXT	Fw	GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC	Leray et al., 2013
jhHCO2198NXT	Rev	TANACYTCNGGRTGNCCRAARAAYCA	Geller et al., 2013
Nextera Tail	Fw tail	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG	Illumina
Nextera Tail	Rev tail	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG	Illumina

## Resultaten

In Verband met de COVID-19 pandemie is het onderzoek halverwege het onderzoek stilgelegd. Op het moment van stillegging waren er geen sequencing resultaten voor het metabarcoding. In overleg met de stagebegeleiders wordt in dit hoofdstuk algemeen de resultaten van de individuele experimenten besproken.

### DNA-barcoding

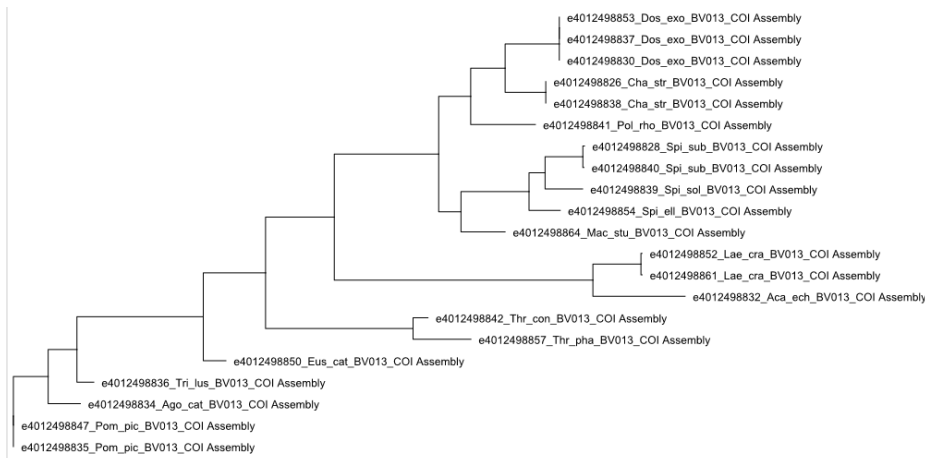
Om DNA-sequenties in een monster te kunnen identificeren is een betrouwbare DNA-database nodig. Het DNA van 641 geïdentificeerde organismen (232 verschillende macrobenthos soorten) en 16 niet-geïdentificeerde organismen is geïsoleerd, geamplificeerd en gesequenced. De volledige tabel met alle soorten en aantal per soort is te vinden in bijlage 2. Om te controleren of DNA isolatie & -amplificatie is gelukt is het DNA op een E-gel gerund om de aanwezigheid van PCR-producten zichtbaar te maken (Figuur 2). Omdat alleen de aanwezigheid van PCR-product aangetoond werd en de lengte van de producten niet van belang was, is er geen marker meegenomen. Bij het bewerken van verkregen sequenties wordt de kwaliteit en lengte gecontroleerd. Figuur 2 is een representatief voorbeeld van een E-gel te zien waarbij goed te zien is of een laan een PCR-product bevat door middel van een oplichtend bandje. De negatieve controles bij alle PCR platen bevatte geen product. De succesvolle PCR-producten zijn bij elkaar op een plaat gepoold en gesequenced via Sanger sequencing bij Baseclear B.V..



*Figuur 2: UV-foto van een E-gel om de extracten te controleren op vorming van PCR-product. Er is geen marker meegenomen. De foto is bewerkt m.b.v. E-editor waarbij de verschillende lanen gerangschikt zijn per rij. van PCR-product is te zien d.m.v. een band in het midden van de laan.*

Om een betrouwbare database te krijgen werden de verkregen sequenties bewerkt in geneious prime om sequenties met lage confidence en veel onduidelijkheden eruit te filteren zoals beschreven werd in de materiaal en methode sectie. Als controle werden de sequenties geblast tegen de NCBI-database. Er werden meerdere organismen van dezelfde soort meegenomen en er werd een fylogenetische boom berekend (Figuur 3). Figuur 3 bevat een voorbeeld van een boom. De takken zijn beschreven met een indexnummer (e-nummer), de eerste drie letters van de genus en het soort, en de PCR waarvan het afkomstig is. de onderlinge taxa werden gecontroleerd op correctheid door de positie van

verschillende soorten in de boom te vergelijken via de eerste letters. Sequenties met een incorrecte positie werden als controle geblast tegen de NCBI GenBank BLAST database.

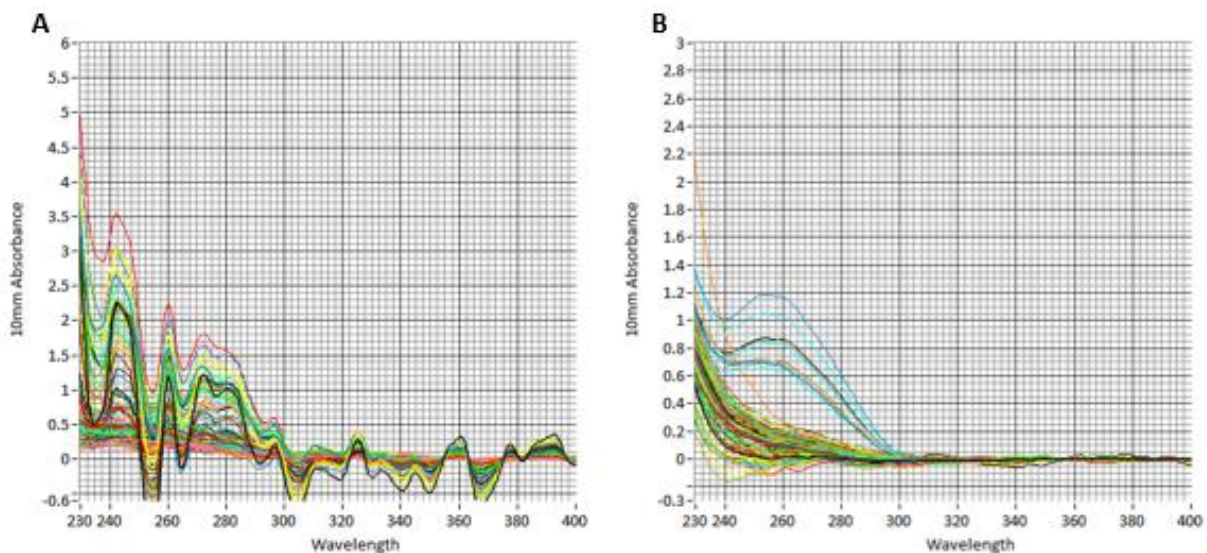


*Figuur 3: Fylogenetische boom van verkregen sequenties, representatief voor alle sequenties. De takken bevatten een indexnummer (e-nummer), de eerste drie letters van de genus en het soort, en de PCR waarvan het afkomstig is. Zichtbaar is dat sequenties afkomstig van hetzelfde soort bij elkaar staan.*

Na het controleren van de kwaliteit van de sequenties met behulp van de fylogenetische boom werden 351 FASTA sequenties, ca. 54,76% procent van alle meegenomen submonsters, toegevoegd aan de Naturalis DNA-database.

### DNA Metabarcoding:

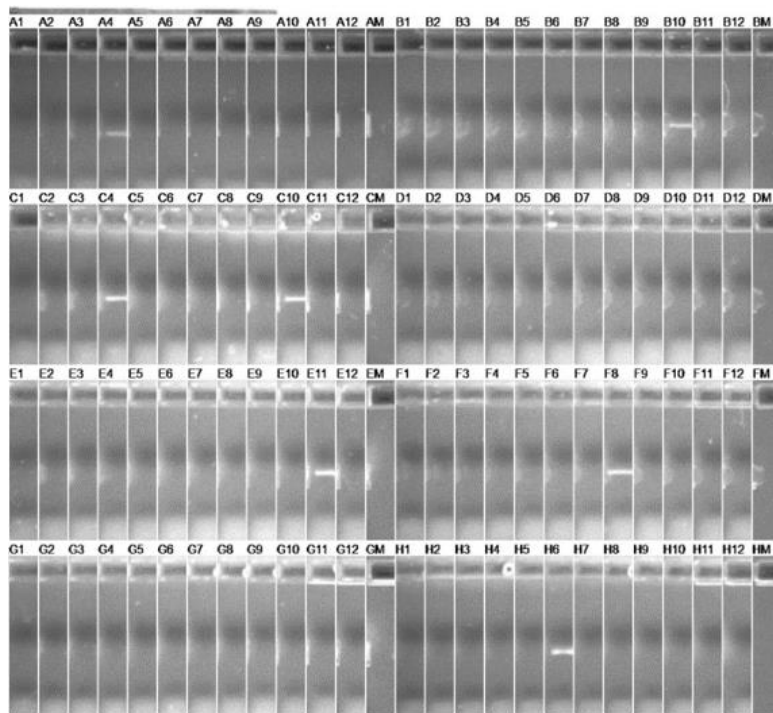
Om het DNA te extraheren werden de monsters vooraf gehomogeniseerd met een vijzel. Het DNA werd geëxtraheerd met de “Magattract powersoil kit”. Het DNA werd vervolgens gemeten met de dropsense 96, waarna het werd opgeschoond met de “Onestep-96 PCR inhibitor removal” kit en nog een keer werd gemeten met de dropsense 96 (figuur 3). De bijbehorende tabellen met DNA-concentraties en absorptiewaarde bij verschillende golflengtes zijn terug te vinden in bijlage 3.1 en 3.2.



*Figuur 4: Dropsense-96 absorptiegrafiek van 90 monsters uit T0-T4. Op de Y-ax staat de hoeveelheid absorptie in 10mm met op de X-ax De golflengte in nm. Elke lijn is representatief voor 1 monster en is hierbij op kleur gemarkeerd. De bijbehorende tabel voor elk monster is terug te vinden in tabel 3 in bijlage 3. (A) Analyse van de monsters voor het opschonen van de DNA-extracten. (B) Analyse van de monsters na het opschonen van de DNA-extracten met de Zymo “Onestep-96 PCR inhibitor removal” kit*

Figuur 4 bevat een Absorptiegrafiek van de dropsense 96 van 90 monsters T0-T4 voor het opschonen (A) en na het opschonen (B) van de DNA-extracten. Hierbij representeert elke lijn in de grafiek een monster. In Figuur 3A zijn er veel pieken te zien, waaronder bij 260- en 280nm, waarmee de DNA-concentratie berekend kon worden. De DNA-concentraties en de vervuiling (RRSE%, zie bijlage 3.1/3.2) tussen monsters varieerde tussen de 15 en 112ng/μl. Van het DNA was een groot gedeelte enkelstrengs of gedegradeerd en bevatte ook vervuiling, zie bijlage 3.2. Na het opschonen is de vervuiling verlaagd (Zie bijlage 3.2). De DNA-concentratie is echter ook verminderd met concentraties tussen de 0,22 en 10 ng/μl, met een paar uitschieters ronde de 40ng/μl. In de grafiek is de daling zichtbaar in de hoogte van de piek bij 260nm. Deze resultaten zijn gevonden bij alle DNA extracten, wat aangeeft dat veel DNA verloren is gegaan bij het opschonen.

Om te controleren of de DNA-extracten geschikt zijn om te sequencen werden deze geamplificeerd m.b.v. een PCR met de kapa hifi readymix. Hierna werden de monsters bekeken op een E-gel om de vorming van PCR-producten te controleren (Figuur 5).



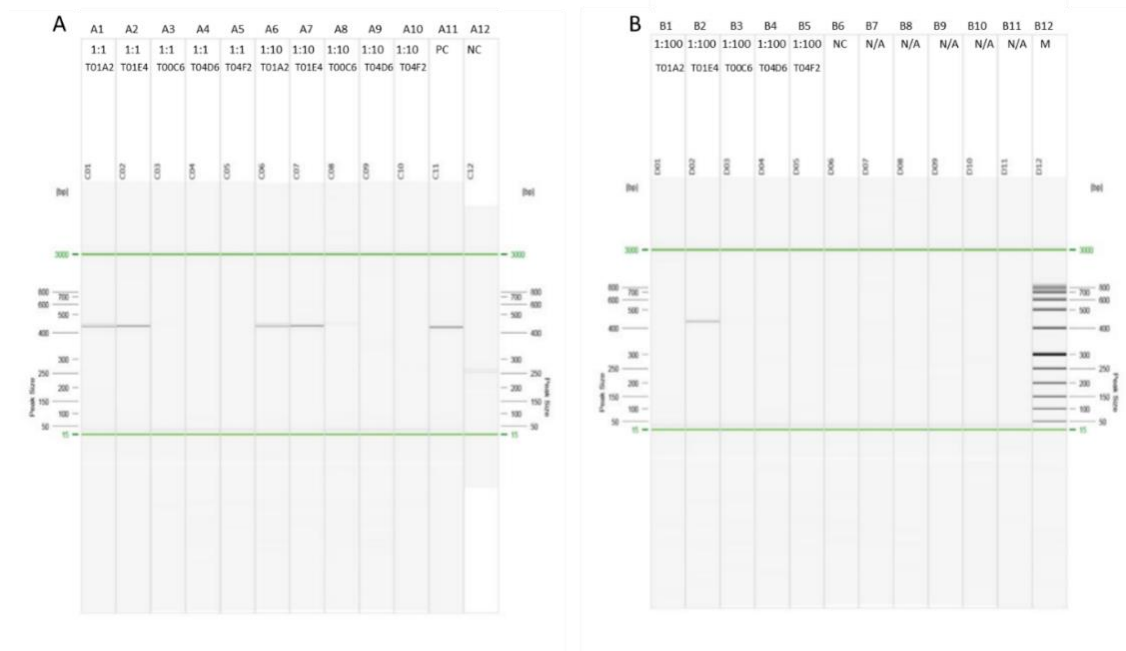
Figuur 5: E-gel van PCR-producten van monsters T0-T4, geamplificeerd met de Kapa hifi readymix. Laan C04 en F08 bevatten positieve controles. Bij 5 monsters is de aanwezigheid van een PCR product te zien in de vorm van een band in het midden van de laan (A4, B10, C10, E11 & H6).

In figuur 5 is te zien dat er bij vijf van de negentig monsters (A4, B10, C10, E11 & H6) en de positieve controles (C4 & F8), een PCR-product zichtbaar is. Bij de andere monsters is geen PCR-product zichtbaar.

Vanwege de tegenvallende resultaten zijn andere PCR-mixen getest om meer monsters werkende te krijgen. Hiervoor werden twee eerder positief geteste (laan A4&H6) en drie eerder negatief geteste monsters gebruikt om de verschillende PCR-mixen en condities te testen. De monsters gaven met verschillende verdunningen, Annealing temperaturen, en het gebruik van een andere PCR-mix eenzelfde resultaat. Bij de environmental PCR mix was de positieve controle negatief (zie bijlage 3.3). Hieruit kunnen geen conclusies getrokken worden aangaande de bruikbaarheid van deze mix.

Een representatieve Qiaxcel gel image is te zien in figuur 6. De bijbehorende PCR is uitgevoerd met de phire ii hotstart PCR mix met een annealing temperatuur van 50°C. Bij de 2 positief geteste monster is er PCR product te zien bij de onverdunde en de 10x verdunde DNA extracten, net zoals bij de positieve

controle. Bij de 100x verdunning was maar 1 van de twee monsters positief. Bij de 3 negatief geteste monsters is er bij geen enkele verdunningen een PCR product te zien. De laatste well (B12) bevat een 50-800bp Marker. Dit wijst samen met de dropsense-96 data wijst op een te lage DNA-kwaliteit en concentratie waardoor er geen amplificatie kan plaats vinden.



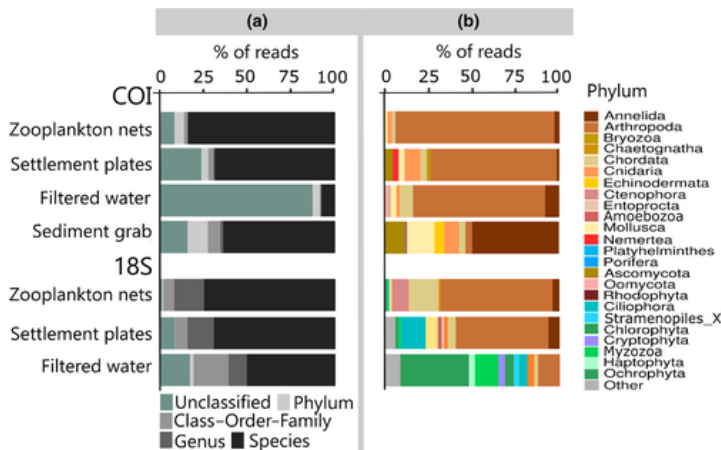
Figuur 6: QIAxcel gel image van de QIAxcel Screengel Software van 2 eerder positief geteste monsters (T01A2, T01E4) en 3 negatief geteste monsters (T00C6, T04D6, T04F2) met de phire ii Hotstart PCR mix. (A) Gel Image van de onverdunde en 10x verdunde monsters samen met een positieve (PC; A11) en negatieve controle (NC; A12). De twee eerder positief geteste monsters geven bij de onverdunde en 10x verdunning resultaat. De andere drie monsters zijn negatief. (B) Gel Image van de 100x verdunning van de monsters, een negatieve controle en een 50-800bp Marker (M; B12)). Maar 1 van de twee positief geteste monsters heeft een PCR product gevormd.

## Discussie

In dit onderzoek is de potentie van de toepassing van DNA metabarcoding onderzocht voor het biomonitoren van de ecologische impact van het mechanisch oogsten van de zeeper *Arenicola marina* op de biodiversiteit van het waddengebied. Hiervoor werd het DNA uit sedimentbulsamples geïsoleerd. Macher *et al* (2018) heeft aangetoond dat het gebruik van bulkmonsters, waarbij hele organismen in het monster (kunnen) zitten, meer overeenkomt met morfologische identificatiemethodes dan andere eDNA monsters. (e.g. watermonsters). Ook zijn er meer Bioindicator taxa, organismen reageren op stressoren in een ecosysteem met veranderingen in diversiteit en biomassa (e.g. macrobenthos), gevonden met bulkmonsters<sup>35</sup>. Daarentegen zijn er over het algemeen in totaal meer taxa gevonden met eDNA monsters. Tevens is de impact van stressfactoren op grote schaal beter terug te zien met andere eDNA monsters<sup>35</sup>.

Een ander alternatief voor eDNA is het gebruik eRNA. eRNA degradeert sneller dan eDNA en geeft hierdoor mogelijk een meer recent beeld van het ecosysteem<sup>36,37</sup>. Laroche, *et al* (2017) heeft bij een onderzoek naar de impact van een olieplatform op ecosystemen dicht bij en veraf van het platform meer verschil gevonden bij het gebruik van eRNA. Het sneller degraderen van RNA zorgt daarentegen ook voor verhoogde kosten door het gebruik van meer complexe methodes rondom het werken met RNA. eDNA is daarnaast betrouwbaarder om een accurate compositie van het ecosysteem te weergeven.

Het gebruik van verschillende bemonsteringsmethoden heeft het nadelige effect dat studies onderling niet vergeleken kunnen worden. Veel onderzoeken naar eDNA plaatsen de focus op standaardisatie van methodes<sup>11,17,23,38</sup>. De optimale methode is echter afhankelijk van de methode en de doel organismen. Rey *et al* (2020) en Klunder, *et al* (2019) vonden verschillen in teruggevonden taxa tussen bemonsteringsmethodes (Figuur 7; <sup>39</sup>).



Figuur 7: (Rey *et al.*, 2020) taxonomic assignment per barcode and per sampling method. (a) Percentage of reads assigned to each taxonomic level. (b) Relative abundance of reads classified to at least Phylum level for the 10 most abundant phyla

Hoewel de kosten van het onderzoek verhoogd worden door het gebruik van een combinatie van verschillende bemonsteringsmethoden, kan dit mogelijk het beste resultaat geven in sequencing diepte en teruggevonden taxa<sup>26,39</sup>. Door de toenemende kosten wordt het voordeel ten opzichte van traditionele methodes gereduceerd.

Goede opslag van de monsters is eveneens essentieel voor metabarcoding. Vriesdrogen, de techniek gebruikt in dit onderzoek, is een praktische conservatiemethode voor monsters. Zeker voor veldwerk en transport over langere afstanden, waarbij geen speciale verpakkingen of declaraties voor chemicaliën zoals ethanol nodig zijn<sup>40</sup>. Er is geen risico op DNA schade door ontdooien en de morfologie van de aanwezige organismen wordt niet beschadigt. Dit is voordelig voor identificatie van deze organismen<sup>31</sup>. Zhang, *et al*, (2017) stellen dat het meenemen van een cryo-protectant en de opslagtemperatuur invloed heeft op DNA-degradatie tijdens en na het vriesdrogen. Monsters opgeslagen bij kamertemperatuur toonden na 28 dagen veel meer DNA degradatie dan voor of direct na het vriesdrogen. De DNA-schade van monsters opgeslagen bij 4°C na 28 dagen was veel lager. Hieruit volgt dat het DNA in de monsters na vriesdrogen niet volledig beschermd is tegen degradatie. De monsters zijn in NBC bewaard bij -20°C tot verder gebruik. Met betrekking tot de opslag en/of het vriesdrogen met/zonder cryo-protectant op het NIOZ is geen informatie bekend.

Een alternatief voor vriesdrogen is conservering in ethanol. Het gebruik van ethanol voor conservatie wordt in de meeste onderzoeken toegepast<sup>10,11,14,17,28,41-43</sup> en monsters gepreserveerd in ethanol kunnen goed bewaard worden bij kamertemperatuur en zelfs bij 32°C over een periode van 60 dagen<sup>44,45</sup>. Het gebruik van één dezelfde conservatiemethode draagt ook bij aan de standaardisatie van de het proces waarbij dezelfde monsterbehandeling voor DNA-extractie tussen onderzoeken mogelijk is. Voor vervolgonderzoek wordt het gebruik van ethanol in plaats van vriesdrogen aanbevolen.

In dit onderzoek zijn de monsters gehomogeniseerd met een vijzel en vloeibaar stikstof. Deze methode van homogenisatie zou resulteren in minder cel schade dan andere technieken<sup>46,47</sup>. Het DNA werd geëxtraheerd met de "MagAttract powersoil kit". Hiervoor is in eerste instantie 250mg (de maximum aangeraden hoeveelheid) gebruikt. Later is de extractie nog een keer met 200mg



uitgevoerd vanwege de tegenvallende DNA-concentraties. Bij 200mg monsters trok er minder vloeistof in het sediment. Dit resulteerde in een grotere opbrengst van het extract.

Na de DNA-extractie werd de DNA-concentratie en zuiverheid van de extracten gemeten. De extracten werden hierna opgeschoond en nog een keer gemeten. Uit de metingen kwam dat veel DNA verloren is gegaan tijdens het opschonproces. Het verlies van DNA bij opzuiveren met de gebruikte opschoningskit is eerder aangetoond, hoewel er in eerdere studies wel resultaat verkregen kon worden van de opgeschoonde monsters<sup>48-50</sup>. Echter was een groot deel van het overgebleven DNA in onze studie gedegradeerd. Gedegradeerd DNA wordt mee geïsoleerd en opgezuiverd met het volledige DNA<sup>51,52</sup>. Een mogelijke oorzaak van de degradatie is de incorrecte opslag van de gevriesdroogde monsters<sup>32</sup>, zoals hiervoor besproken.

Om te testen of de opgeschoonde DNA-extracten gebruikt kunnen worden voor sequencing zijn verschillende PCR's uitgevoerd. Hiervoor zijn de monsters onverdund, in een 10x verdunning en een 100x verdunning meegenomen. Vanwege de tegenvallende resultaten zijn er drie verschillende PCR mixen getest om de monsters werkende te krijgen. De eerste mix is de Kapa Hifi hotstart readymix. Deze mix gebruikt een proof-reading polymerase wat de betrouwbaarheid verhoogt en de error rate verlaagt<sup>53</sup>. Dit verlaagt bovendien het percentage mismatch en chimerische sequenties tijdens het sequencen, waardoor het veelvuldig gebruikt wordt voor NGS<sup>54</sup>. Een nadeel is dat de mix niet gericht is op DNA met lage kwaliteit, zoals in dit onderzoek. De tweede PCR mix, de Taqman environmental mastermix, is gericht op monsters met hoge concentratie inhibitiefactoren en kan de aanwezigheid hiervan omzeilen<sup>55,56</sup>. Echter waren de positieve controles bij deze mix negatief en kon er geen conclusie uit deze testen getrokken worden. De derde mix is de Phire hotstart ii. De phire hotstart ii polymerase heeft een kortere reactietijd en kan gebruikt worden in directe amplificatie (zonder DNA extractie)<sup>57</sup>. Naast het meenemen van verschillende PCR-mixen is de anealing-temperatuur verlaagd naar 50°C om de primers beter te laten binden. De gebruikte primers zijn in een eerder onderzoek van Naturalis (Kistemaker et al; 2019) getest op marine macrobenthos en zijn gevalideerd voor de positieve controle bij de Kapa hifi hotstart en Phire Hotstart mix<sup>29,30</sup>. Bij alle PCR-reacties gaven dezelfde monsters resultaat. Dit wijst erop dat de oorzaak van het probleem van het lage percentage succesvolle PCR's gezocht worden in een combinatie van verlaagde DNA concentratie en de hoeveelheid gedegradeerd DNA.

Ondanks dat de resultaten van de Environmental Mastermix in dit onderzoek niet betrouwbaar zijn kan deze mix met behulp van literatuur toch aangeraden worden voor vervolgonderzoeken bij gebruik van bodemonsters vanwege de werking bij hogere concentraties inhibitie factoren<sup>55,56,58</sup>. Daarentegen is het wel belangrijk een goed werkende positieve controle mee te nemen.

Het DNA werd opnieuw geëxtraheerd en verdund in plaats van opgeschoond om de werking van inhibitors te verlagen. Dit werd gedaan om verlies van DNA te voorkomen en een PCR al kan werken met een paar moleculen van de gewenste sequentie<sup>24,58,59</sup>. Gebaseerd op de dropsense-metingen voor het opschonen van het DNA is de verwachting dat deze methode meer succesvolle PCR reacties zal opleveren.

Een belangrijk onderdeel van metabarcoding is een uitgebreide en betrouwbare DNA referentie database<sup>7,9,13,60</sup>. Openbare DNA databases zijn gevoelig voor verkeerd geïdentificeerde sequenties en sequenties met een lage kwaliteit<sup>13</sup>. De "Barcode of Life Data Systems (BOLD)" database, welke voornamelijk gericht is op barcoding markers zoals CO1, Matk, ITS en RBCL, voorkomt dit probleem door het gebruik van kwaliteitsfilter voor de toegevoegde sequenties. Door de kwaliteitscontrole en focus op marker genen wordt de BOLD database vaak gebruikt voor de referentie database. Een probleem met BOLD is dat DNA-sequenties van veel soorten in een aantal taxonomische groepen,

soms tot 50%, alleen aanwezig zijn in niet openbare sequenties (volgens een onderzoek van Weigand et al (2019)). Een oplossing hiervoor is het genereren van een eigen database met beschikbare sequenties waarbij de missende taxa door middel van barcoding aangevuld worden <sup>17</sup>.

Bij het NIOZ zijn de organismen eerst uit het monster gefilterd en geïdentificeerd. Bij het identificeren is er geen subsample van elk organisme genomen. In het vervolg kan een subsample genomen worden om de identificatie genetisch te controleren. Tevens kan er een custom referentie database gegenereerd worden.

Voor eDNA metabarcoding is er nog geen standaard methodiek ontwikkeld. Dit betekent dat er veel variatie bestaat tussen de methoden van verschillende onderzoeken, welke invloed hebben op de verkregen resultaten <sup>11,15,17</sup>. De verschillende methoden moeten goed onderzocht en vergeleken worden om deze variatie beter te begrijpen en te streven naar een gestandaardiseerde methode. Met de aanbevelingen gegeven in dit onderzoek komen we dichterbij dit doel

## Conclusie

De onderzoeksvraag “Kan metabarcoding gebruikt worden voor het biomonitoren van de ecologische impact van het mechanisch oogsten van de zeepest *Arenicola marina* op de biodiversiteit van het Waddengebied” kan aan de hand van de verkregen resultaten niet duidelijk worden beantwoord. Gebaseerd op eerdere onderzoeken kan er gesuggereerd worden dat metabarcoding de potentie heeft om gebruikt te worden voor biomonitoring, maar dat er veel onderzoek voor nodig is en consensus bereikt moet worden over de gebruikte methode.

## Literatuurlijst.

1. Kenny AJ, Jenkins C, Wood D, et al. Assessing cumulative human activities, pressures, and impacts on North Sea benthic habitats using a biological traits approach. *ICES J Mar Sci.* 2018;75(3):1080-1092. doi:10.1093/icesjms/fsx205
2. Hu C, Dong J, Gao L, Yang X, Wang Z, Zhang X. Macrobenthos functional trait responses to heavy metal pollution gradients in a temperate lagoon. *Environ Pollut.* 2019;253:1107-1116. doi:10.1016/j.envpol.2019.06.117
3. Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, Møller PR, Rasmussen M, Willerslev E. Detection of a Diverse Marine Fish Fauna Using Environmental DNA from Seawater Samples. *PLoS One.* 2012;7(8). doi:10.1371/journal.pone.0041732
4. Loh J, Green RE, Ricketts T, et al. The Living Planet Index: Using species population time series to track trends in biodiversity. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* Vol 360. Royal Society; 2005:289-295. doi:10.1098/rstb.2004.1584
5. Valentini A, Taberlet P, Miaud C, et al. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Mol Ecol.* 2016;25(4):929-942. doi:10.1111/mec.13428
6. Lambertini M. *A NEW GLOBAL DEAL FOR NATURE AND PEOPLE URGENTLY NEEDED.*
7. Bagley M, Pilgrim E, Knapp M, Yoder C, Santo Domingo J, Banerji A. High-throughput environmental DNA analysis informs a biological assessment of an urban stream. *Ecol Indic.* 2019;104:378-389. doi:10.1016/j.ecolind.2019.04.088
8. Lobo J, Shokralla S, Costa MH, Hajibabaei M, Costa FO. DNA metabarcoding for high-throughput monitoring of estuarine macrobenthic communities. *Sci Rep.* 2017;7(1). doi:10.1038/s41598-017-15823-6
9. Klunder L, Duineveld GCA, Lavaleye MSS, van der Veer HW, Palsbøll PJ, van Bleijswijk JDL. Diversity of Wadden Sea macrofauna and meiofauna communities highest in DNA from extractions preceded by cell lysis. *J Sea Res.* 2019;152. doi:10.1016/j.seares.2019.101764

10. Pawlowski J, Kelly-Quinn M, Altermatt F, et al. The future of biotic indices in the ecogenomic era: Integrating (e)DNA metabarcoding in biological assessment of aquatic ecosystems. *Sci Total Environ.* 2018;637-638:1295-1310. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.05.002
11. Aylagas E, Mendibil I, Borja Á, Rodríguez-Ezpeleta N. Marine sediment sample pre-processing for macroinvertebrates metabarcoding: Mechanical enrichment and homogenization. *Front Mar Sci.* 2016;3(OCT). doi:10.3389/fmars.2016.00203
12. Laramie MB, Pilliod DS, Goldberg CS. Characterizing the distribution of an endangered salmonid using environmental DNA analysis. *Biol Conserv.* 2015;183:29-37. doi:10.1016/j.biocon.2014.11.025
13. Deiner K, Bik HM, Mächler E, et al. Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Mol Ecol.* 2017;26(21):5872-5895. doi:10.1111/mec.14350
14. Aylagas E, Borja Á, Muxika I, Rodríguez-Ezpeleta N. Adapting metabarcoding-based benthic biomonitoring into routine marine ecological status assessment networks. *Ecol Indic.* 2018;95:194-202. doi:10.1016/j.ecolind.2018.07.044
15. Mauvisseau Q, Burian A, Gibson C, Brys R, Ramsey A, Sweet M. Influence of accuracy, repeatability and detection probability in the reliability of species-specific eDNA based approaches. *Sci Rep.* 2019;9(1). doi:10.1038/s41598-018-37001-y
16. Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, Brochmann C, Willerslev E. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Mol Ecol.* 2012;21(8):2045-2050. doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05470.x
17. Aylagas E, Borja Á, Irigoien X, Rodríguez-Ezpeleta N. Benchmarking DNA metabarcoding for biodiversity-based monitoring and assessment. *Front Mar Sci.* 2016;3(JUN). doi:10.3389/fmars.2016.00096
18. Levy SE, Myers RM. Advancements in Next-Generation Sequencing. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2016;17(1):95-115. doi:10.1146/annurev-genom-083115-022413
19. Qiu D, Yan J, Ma X, et al. How vegetation influence the macrobenthos distribution in different saltmarsh zones along coastal topographic gradients. *Mar Environ Res.* August 2019:104767. doi:10.1016/j.marenvres.2019.104767
20. Xu Y, Li X, Wang H, Zhang B. Status of macrobenthic diversity and distribution in Subei Shoal, China. *Aquat Ecosyst Heal Manag.* 2016;19(4):411-419. doi:10.1080/14634988.2016.1249257
21. Chen J, Hu D, Zhang C, Ding Z. Temporal and spatial changes of macrobenthos community in the regions frequently occurring black water aggregation in Lake Taihu. *Sci Rep.* 2018;8(1). doi:10.1038/s41598-018-24058-y
22. Pawlowski J, Esling P, Lejzerowicz F, Cedhagen T, Wilding TA. Environmental monitoring through protist next-generation sequencing metabarcoding: Assessing the impact of fish farming on benthic foraminifera communities. *Mol Ecol Resour.* 2014;14(6):1129-1140. doi:10.1111/1755-0998.12261
23. Bohmann K, Evans A, Gilbert MTP, et al. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends Ecol Evol.* 2014;29(6):358-367. doi:10.1016/j.tree.2014.04.003
24. Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F, Taberlet P. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol Lett.* 2008;4(4):423-425. doi:10.1098/rsbl.2008.0118
25. Lacoursière-Roussel A, Côté G, Leclerc V, Bernatchez L. Quantifying relative fish abundance with eDNA: a promising tool for fisheries management. *J Appl Ecol.* 2016;53(4):1148-1157. doi:10.1111/1365-2664.12598
26. Bylemans J, Furlan EM, Pearce L, Daly T, Gleeson DM. Improving the containment of a freshwater invader using environmental DNA (eDNA) based monitoring. *Biol Invasions.* 2016;18(10):3081-3089. doi:10.1007/s10530-016-1203-5
27. Balasingham KD, Walter RP, Heath DD. Residual eDNA detection sensitivity assessed by quantitative real-time PCR in a river ecosystem. *Mol Ecol Resour.* 2017;17(3):523-532. doi:10.1111/1755-

0998.12598

28. Wangenstein OS, Palacín C, Guardiola M, Turon X. DNA metabarcoding of littoral hardbottom communities: High diversity and database gaps revealed by two molecular markers. *PeerJ*. 2018;2018(5). doi:10.7717/peerj.4705
29. Leray M, Yang JY, Meyer CP, et al. 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. *Front Zool*. 2013;10(1):34. doi:10.1186/1742-9994-10-34
30. Yu DW, Ji Y, Emerson BC, et al. Biodiversity soup: metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring. *Methods Ecol Evol*. 2012;3(4):613-623. doi:10.1111/j.2041-210X.2012.00198.x
31. Mason WT, Lewis PA, Weber CI. An evaluation of benthic macroinvertebrate biomass methodology - Part 1. Laboratory analytical methods. *Environ Monit Assess*. 1983;3(1):29-44. doi:10.1007/BF00394030
32. Zhang M, Oldenhof H, Sydykov B, Bigalk J, Sieme H, Wolkers WF. Freeze-drying of mammalian cells using trehalose: Preservation of DNA integrity. *Sci Rep*. 2017;7(1). doi:10.1038/s41598-017-06542-z
33. Rapley R. Principles and techniques of Biochemistry and Molecular Biology. In: Wilson K, Walker J, eds. 7th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2010:164-194.
34. Valencia CA, Pervaiz MA, Husami A, Qian Y, Zhang K. Sanger Sequencing Principles, History, and Landmarks. In: Springer, New York, NY; 2013:3-11. doi:10.1007/978-1-4614-9032-6\_1
35. Macher J-N, Vivancos A, Piggott JJ, Centeno FC, Matthaei CD, Leese F. Comparison of environmental DNA and bulk-sample metabarcoding using highly degenerate cytochrome c oxidase I primers. *Mol Ecol Resour*. 2018;18(6):1456-1468. doi:10.1111/1755-0998.12940
36. Laroche O, Wood SA, Tremblay LA, Lear G, Ellis JI, Pochon X. Metabarcoding monitoring analysis: The pros and cons of using co-extracted environmental DNA and RNA data to assess offshore oil production impacts on benthic communities. *PeerJ*. 2017;2017(5). doi:10.7717/peerj.3347
37. Wood SA, Biessy L, Latchford JL, et al. Release and degradation of environmental DNA and RNA in a marine system. *Sci Total Environ*. 2020;704:135314. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.135314
38. Lacoursière-Roussel A, Howland K, Normandeau E, et al. EDNA metabarcoding as a new surveillance approach for coastal Arctic biodiversity. *Int J Bus Innov Res*. 2018;17(3):7763-7777. doi:10.1002/ece3.4213
39. Rey A, Basurko OC, Rodriguez-Ezpeleta N. Considerations for metabarcoding-based port biological baseline surveys aimed at marine nonindigenous species monitoring and risk assessments. *Ecol Evol*. 2020;10(5):2452-2465. doi:10.1002/ece3.6071
40. Straube D, Juen A. Storage and shipping of tissue samples for DNA analyses: A case study on earthworms. *Eur J Soil Biol*. 2013;57:13-18. doi:10.1016/j.ejsobi.2013.04.001
41. Turon X, Cebrian E, Palacín C. Under the canopy: Community-wide effects of invasive algae in Marine Protected Areas revealed by metabarcoding. *Mar Pollut Bull*. 2018;127:54-66. doi:10.1016/j.marpolbul.2017.11.033
42. Hajibabaei M, Spall JL, Shokralla S, van Konynenburg S. Assessing biodiversity of a freshwater benthic macroinvertebrate community through non-destructive environmental barcoding of DNA from preservative ethanol. *BMC Ecol*. 2012;12(1):28. doi:10.1186/1472-6785-12-28
43. Hajibabaei M, Shokralla S, Zhou X, Singer GAC, Baird DJ. Environmental Barcoding: A Next-Generation Sequencing Approach for Biomonitoring Applications Using River Benthos. Voolstra CR, ed. *PLoS One*. 2011;6(4):e17497. doi:10.1371/journal.pone.0017497
44. McNevin D. Preservation of and DNA extraction from muscle tissue. *Methods Mol Biol*. 2016;1420:43-53. doi:10.1007/978-1-4939-3597-0\_4

45. Papaïakovou M, Pilotte N, Baumer B, et al. A comparative analysis of preservation techniques for the optimal molecular detection of hookworm DNA in a human fecal specimen. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(1). doi:10.1371/journal.pntd.0006130
46. Volossiouk T, Robb EJ, Nazar RN. *Direct DNA Extraction for PCR-Mediated Assays of Soil Organisms*. Vol 61.; 1995.
47. Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM. *DNA Recovery from Soils of Diverse Composition*. Vol 62.; 1996.
48. Williams KE, Huyvaert KP, Piaggio AJ. Clearing muddied waters: Capture of environmental DNA from turbid waters. *PLoS One*. 2017;12(7). doi:10.1371/journal.pone.0179282
49. Goldberg CS, Turner CR, Deiner K, et al. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods Ecol Evol*. 2016;7(11):1299-1307. doi:10.1111/2041-210X.12595
50. McKee AM, Spear SF, Pierson TW. The effect of dilution and the use of a post-extraction nucleic acid purification column on the accuracy, precision, and inhibition of environmental DNA samples. *Biol Conserv*. 2015;183:70-76. doi:10.1016/j.biocon.2014.11.031
51. Dabney J, Meyer M. Extraction of highly degraded DNA from ancient bones and teeth. In: *Methods in Molecular Biology*. Vol 1963. Humana Press Inc.; 2019:25-29. doi:10.1007/978-1-4939-9176-1\_4
52. Zhou B, Dong Q, Ma R, et al. Rapid isolation of highly pure single-stranded DNA from phagemids. *Anal Biochem*. 2009;389(2):177-179. doi:10.1016/j.ab.2009.03.044
53. Pereira RPA, Peplies J, Brettar I, Höfle MG. Development of a genus-specific next generation sequencing approach for sensitive and quantitative determination of the Legionella microbiome in freshwater systems. *BMC Microbiol*. 2017;17(1):79. doi:10.1186/s12866-017-0987-5
54. Li S, Deng Y, Wang Z, et al. Exploring the accuracy of amplicon-based internal transcribed spacer markers for a fungal community. *Mol Ecol Resour*. 2020;20(1):170-184. doi:10.1111/1755-0998.13097
55. Verhaegen B, De Reu K, De Zutter L, Verstraete K, Heyndrickx M, Van Coillie E. Comparison of droplet digital PCR and qPCR for the quantification of shiga toxin-producing Escherichia coli in bovine feces. *Toxins (Basel)*. 2016;8(5). doi:10.3390/toxins8050157
56. Strand D, Holst-Jensen A, Viljugrein H, et al. Detection and quantification of the crayfish plague agent in natural waters: direct monitoring approach for aquatic environments. *Dis Aquat Organ*. 2011;95(1):9-17. doi:10.3354/dao02334
57. Kitpipit T, Chotigeat W, Linacre A, Thanakiatkrai P. Forensic animal DNA analysis using economical two-step direct PCR. *Forensic Sci Med Pathol*. 2014;10(1):29-38. doi:10.1007/s12024-013-9521-8
58. Sidstedt M, Rådström P, Hedman J. PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS—mechanisms and solutions. *Anal Bioanal Chem*. 2020;412(9):2009-2023. doi:10.1007/s00216-020-02490-2
59. Bar T, Kubista M, Tichopad A. SURVEY AND SUMMARY Validation of kinetics similarity in qPCR. doi:10.1093/nar/gkr778
60. Weigand H, Beermann AJ, Čiampor F, et al. DNA barcode reference libraries for the monitoring of aquatic biota in Europe: Gap-analysis and recommendations for future work. *bioRxiv*. 2019:576553. doi:10.1101/576553

## Bijlage

### Bijlage 1: Coördinaten van de stations per verzamelevents

Tabel 3: Coördinaten van verzamellocaties van sedimentmonsters

Transect	Location	N (fixed)	E op T=0	E op T=1	E op T=2	E op T=3	E op T=4	E op T=5	E op T=6	E op T=7	E op T=9	E op T=10
A	2	53°06.118	004°54.108	004°54.098	004°54.099	004°54.109	004°54.103	004°54.099	004°54.110	004°54.100	004°54.093	004°54.101
A	4	53°06.118	004°54.138	004°54.135	004°54.129	004°54.139	004°54.133	004°54.129	004°54.140	004°54.130	004°54.123	004°54.131
A	6	53°06.118	004°54.168	004°54.165	004°54.159	004°54.169	004°54.163	004°54.159	004°54.170	004°54.160	004°54.153	004°54.161
B	2	53°06.146	004°54.108	004°54.098	004°54.099	004°54.109	004°54.103	004°54.099	004°54.110	004°54.100	004°54.093	004°54.101
B	4	53°06.146	004°54.138	004°54.135	004°54.129	004°54.139	004°54.133	004°54.129	004°54.140	004°54.130	004°54.123	004°54.131
B	6	53°06.146	004°54.168	004°54.165	004°54.159	004°54.169	004°54.163	004°54.159	004°54.170	004°54.160	004°54.153	004°54.161
C	2	53°06.234	004°54.108	004°54.098	004°54.099	004°54.109	004°54.103	004°54.099	004°54.110	004°54.100	004°54.093	004°54.101
C	4	53°06.234	004°54.138	004°54.135	004°54.129	004°54.139	004°54.133	004°54.129	004°54.140	004°54.130	004°54.123	004°54.131
C	6	53°06.234	004°54.168	004°54.165	004°54.159	004°54.169	004°54.163	004°54.159	004°54.170	004°54.160	004°54.153	004°54.161
D	2	53°06.262	004°54.108	004°54.098	004°54.099	004°54.109	004°54.103	004°54.099	004°54.110	004°54.100	004°54.093	004°54.101
D	4	53°06.262	004°54.138	004°54.135	004°54.129	004°54.139	004°54.133	004°54.129	004°54.140	004°54.130	004°54.123	004°54.131
D	6	53°06.262	004°54.168	004°54.165	004°54.159	004°54.169	004°54.163	004°54.159	004°54.170	004°54.160	004°54.153	004°54.161
E	2	53°06.344	004°54.108	004°54.098	004°54.099	004°54.109	004°54.103	004°54.099	004°54.110	004°54.100	004°54.093	004°54.101
E	4	53°06.344	004°54.138	004°54.135	004°54.129	004°54.139	004°54.133	004°54.129	004°54.140	004°54.130	004°54.123	004°54.131
E	6	53°06.344	004°54.168	004°54.165	004°54.159	004°54.169	004°54.163	004°54.159	004°54.170	004°54.160	004°54.153	004°54.161
F	2	53°06.368	004°54.108	004°54.098	004°54.099	004°54.109	004°54.103	004°54.099	004°54.110	004°54.100	004°54.093	004°54.101
F	4	53°06.368	004°54.138	004°54.135	004°54.129	004°54.139	004°54.133	004°54.129	004°54.140	004°54.130	004°54.123	004°54.131
F	6	53°06.368	004°54.168	004°54.165	004°54.159	004°54.169	004°54.163	004°54.159	004°54.170	004°54.160	004°54.153	004°54.161

## Bijlage 2: Soorten lijst voor DNA Barcoding.

Tabel 4: Soorten lijst en aantal voor DNA barcoding.

TAXON	Aantal samples
<b>Abra alba</b>	2
<b>Acanthocardia echinata</b>	1
<b>Acanthocardia paucicostata</b>	1
<b>Acanthodoris pilosa</b>	5
<b>Acrocnida brachiata</b>	1
<b>Actinia equina</b>	2
<b>Aeolidia filomenae</b>	2
<b>Aeolidiella alderi</b>	1
<b>Aeolidiella glauca</b>	11
<b>Aequipecten opercularis</b>	2
<b>Agonus cataphractus</b>	2
<b>Alcyonium digitatum</b>	2
<b>Ammothea hilgendorfi</b>	5
<b>Amphipholis squamata</b>	7
<b>Anguinella palmata</b>	2
<b>Antiopella cristata</b>	3
<b>Aplidium glabrum</b>	3
<b>Aplysilla rubra</b>	1
<b>Asbjornsenia pygmaea</b>	2
<b>Ascidiella aspersa</b>	5
<b>Asterias rubens</b>	4
<b>Atelecyclus undecimdentatus</b>	1
<b>Aurelia aurita</b>	3
<b>Balanus crenatus</b>	2
<b>Bispira polyomma</b>	1
<b>Botrylloides cf. diegensis</b>	4
<b>Botrylloides cf. leachii</b>	4
<b>Botrylloides violaceus</b>	2
<b>Botryllus schlosseri</b>	1
<b>Branchiostoma lanceolatum</b>	3
<b>Bryozoa sp.</b>	2
<b>Cadlina laevis</b>	1
<b>Callianassa subterranea</b>	3
<b>Callinectes sapidus</b>	1
<b>Calliostoma zizyphinum</b>	2
<b>Cancer maenas</b>	3
<b>Cancer pagurus</b>	1
<b>Caprella mutica</b>	1
<b>Catriona aurantia</b>	3
<b>Catriona aurantia (eitjes)</b>	1
<b>Celtodoryx ciocalyptoides</b>	4

<i>Cephalothrix cf rufifrons</i>	1
<i>Cerianthus lloydii</i>	3
<i>Chaetopterus variopedatus</i>	1
<i>Chamelea striatula</i>	3
<i>Ciliata mustela</i>	1
<i>Ciona intestinalis</i>	6
<i>Clathrina coriacea</i>	1
<i>Clavelina lepadiformis</i>	2
<i>Conopeum reticulum</i>	1
<i>Corbula gibba</i>	3
<i>Corystes cassivelaunus</i>	1
<i>Crangon allmanni</i>	2
<i>Crangon crangon</i>	6
<i>Crisularia plumosa</i>	2
<i>Crustaceae larven sp.</i>	1
<i>Dendronotus aff. frondosus</i>	3
<i>Dendronotus europaeus</i>	1
<i>Diadumene lineata</i>	2
<i>Diaphorodoris luteocincta</i>	3
<i>Didemnum vexillum</i>	5
<i>Diogenes pugilator</i>	3
<i>Diplosoma listerianum</i>	1
<i>Donax vittatus</i>	3
<i>Doris pseudoargus</i>	8
<i>Dosinia exoleta</i>	4
<i>Dosinia lupinus</i>	2
<i>Doto coronata</i>	10
<i>Dynamena pumila</i>	1
<i>Ebalia tumefacta</i>	2
<i>Echiichthys vipera</i>	2
<i>Electra pilosa</i>	3
<i>Elysia viridis</i>	5
<i>Emplectonema gracile</i>	3
<i>Enchelyopus cimbrius</i>	1
<i>Ensis ensis</i>	2
<i>Epitonium clathrus</i>	3
<i>Eualus cranchii</i>	1
<i>Eubbranchus exiguus</i>	6
<i>Eubbranchus linensis</i>	5
<i>Eubbranchus linensis</i>	1
<i>Eubbranchus pallidus</i>	7
<i>Eubbranchus rupium</i>	5
<i>Eudendrium arbuscula</i>	1
<i>Eudendrium ramosum</i>	1



<b>Euspira catena</b>	2
<b>Euspira nitida</b>	2
<b>Facelina bostoniensis</b>	5
<b>Flabelligera affinis</b>	2
<b>Flustrellidra hispida</b>	1
<b>Gammarus Fabricius,</b>	1
<b>Gari fervensis</b>	3
<b>Gattyana cirrhosa</b>	3
<b>Geitodoris planata</b>	1
<b>Geitodoris planata (eiersnoer) (afgezet in Vitro )</b>	1
<b>Golfingia vulgaris</b>	3
<b>Goneplax rhomboides</b>	1
<b>Goniodoris castanea</b>	7
<b>Goniodoris nodosa</b>	1
<b>Halecium halecinum</b>	4
<b>Halichondria bowerbanki</b>	2
<b>Halichondria panicea</b>	4
<b>Haliclona (Soestella) xena</b>	2
<b>Haliclona oculata</b>	2
<b>Halisarca dujardinii</b>	1
<b>Hemigrapsus sanguineus</b>	1
<b>Hippocampus hippocampus</b>	1
<b>Hippolyte varians</b>	2
<b>Hyas aff. areneus</b>	2
<b>Hydractinia echinata</b>	1
<b>Hydrallmania falcata</b>	1
<b>Hydroid sp</b>	3
<b>Hydrozoa sp.</b>	2
<b>Hymeniacidon perlevis</b>	10
<b>Hyperia galba</b>	2
<b>Idotea balthica</b>	5
<b>Idotea linearis</b>	6
<b>Inachus phalangium</b>	2
<b>Janolus hyalinus</b>	1
<b>Kelkdier tjes sp</b>	1
<b>Laevicardium crassum</b>	3
<b>Lagis koreni</b>	7
<b>Lanice conchilega</b>	8
<b>Lepidochitona cinerea</b>	2
<b>Lepton squamosum</b>	1
<b>Leptosynapta inhaerens</b>	5
<b>Leucoselenia variabilis</b>	1
<b>Limacia clavigera</b>	3

<i>Linnaeus longissimus</i>	1
<i>Liocarcinus navigator</i>	3
<i>Lipophrys pholis</i>	1
<i>Littorina obtusata</i>	5
<i>Macropodia cf rostrata</i>	3
<i>Macropodia parva</i>	1
<i>Macropodia rostrata</i>	3
<i>Mactra stultorum</i>	1
<i>Mastocarpus stellatus</i>	1
<i>Membranipora membranacea</i>	1
<i>Metridium senile</i>	5
<i>Microchlamylla gracilis</i>	1
<i>Mullus surmuletus</i>	1
<i>Musculus subpictus</i>	1
<i>Mya truncata</i>	1
<i>Mycale (Carmia) micracanthoxea</i>	1
<i>Myoxocephalus scorpius</i>	1
<i>Mysia undata</i>	3
<i>Mytilus edulis</i>	4
<i>Myxilla rosacea</i>	1
<i>Nasarius reticulatus</i>	1
<i>Nephrops norvegicus</i>	1
<i>Nephtys hombergii</i>	2
<i>Nucella lapillus</i>	5
<i>Nucula nitidosa</i>	3
<i>Obelia geniculata</i>	1
<i>Obelia longissima</i>	4
<i>Ocenebra erinaceus</i>	1
<i>Ocinebrellus inornata</i>	1
<i>Okenia pulchella</i>	1
<i>Onchidoris bilamellata</i>	2
<i>Ophelia borealis</i>	3
<i>Ophiothrix fragilis</i>	4
<i>Ophiura albida</i>	1
<i>Ophiura ophiura</i>	2
<i>Orbinia sertulata</i>	3
<i>Owenia fusiformis</i>	3
<i>Pagurus bernhardus</i>	7
<i>Palaemon adspersus</i>	1
<i>Palaemon elegans</i>	4
<i>Palaemon macrodactylus</i>	3
<i>Palaemon serratus</i>	4
<i>Patella vulgata</i>	4
<i>Pectinaria belgica</i>	3
<i>Perophora japonica</i>	1

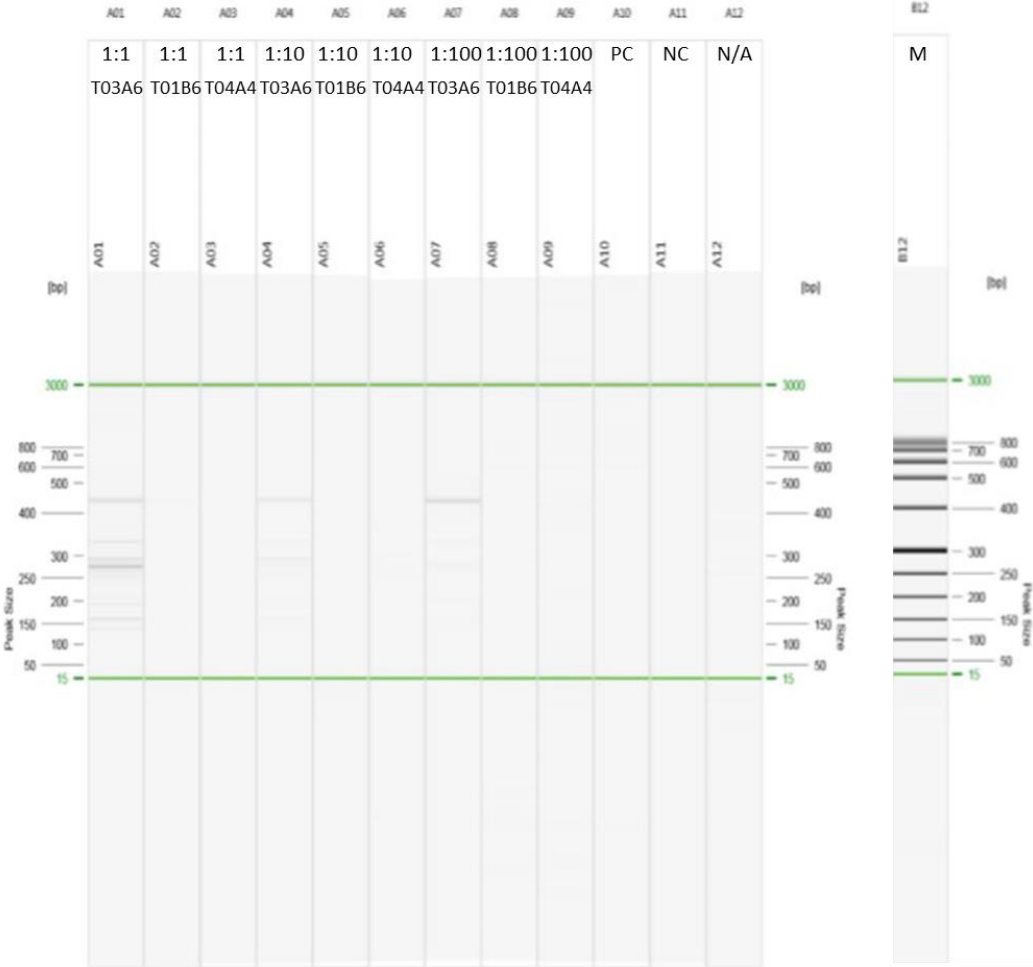
<i>Pestarella tyrrhena</i>	3
<i>Phaxas pellucidus</i>	2
<i>Philine quadripartita</i>	6
<i>Philocheras trispinosus</i>	3
<i>Pholis gunnellus</i>	4
<i>Phoronis hippocrepia</i>	1
<i>Pinnotheres pisum</i>	3
<i>Pisidia longicornis</i>	3
<i>Plathyhelminthes sp.</i>	1
<i>Platynereis dumerilii</i>	3
<i>Polititapes rhomboides</i>	2
<i>Polycera quadrilineata</i>	11
<i>Pomatoschistus minutus</i>	6
<i>Pomatoschistus pictus</i>	4
<i>Porcellana platycheles</i>	9
<i>Portumnus latipes</i>	3
<i>Praunus flexuosus</i>	4
<i>Processa modica</i>	4
<i>Pycnogonida sp.</i>	1
<i>Rubramoena amoena</i>	6
<i>Sabella pavonina</i>	2
<i>Sabellaria spinulosa</i>	3
<i>Sagartia elegans</i>	6
<i>Sagartia troglodytes</i>	3
<i>Sagartiogeton undatus</i>	3
<i>Sagartiogeton undatus</i>	1
<i>Schizomavella (Schizomavella) linearis</i>	2
<i>Scoloplos armiger</i>	4
<i>Sertularella ellisii</i>	2
<i>Sertularia cupressina</i>	3
<i>Spirobranchus lamarcki</i>	10
<i>Spisula elliptica</i>	2
<i>Spisula solida</i>	6
<i>Spisula subtruncata</i>	3
<i>Styela clava</i>	2
<i>Suberites ficus</i>	1
<i>Suberites massa</i>	1
<i>Sycon ciliatum</i>	5
<i>Sycon scaldiense</i>	1
<i>Syngnathus acus</i>	1
<i>Syngnathus rostellatus</i>	2
<i>Tellina tenuis</i>	3
<i>Thecacera pennigera</i>	5
<i>Thia scutellata</i>	3
<i>Thracia convexa</i>	2

<b>Thracia phaseolina</b>	2
<b>Travisia forbesii</b>	3
<b><i>Trinchesia cf caerulea</i></b>	1
<b><i>Trinchesia cuanensis</i></b>	3
<b>Trisopterus luscus</b>	1
<b><i>Tritia nitida</i></b>	1
<b><i>Tritonia hombergii</i></b>	3
<b><i>Tritonia plebeia</i></b>	3
<b><i>Trivia arctica</i></b>	3
<b>Tubilaria indifisa</b>	1
<b><i>Tubularia indivisa</i></b>	2
<b>Turritella communis</b>	3
<b>Upogebia deltaura</b>	2
<b>Zeepok sp.</b>	1
<b>Ongeïdentificeerd</b>	16





Bijlage 3.3: QIAxcel gel image van Environmental mastermix PCR



Figuur 8: QIAxcel gel image van de QIAxcel Screengel Software. 3 monsters (T03A6, T01B6, T04A4) zijn onverdund, 10x verdund en 100x verdund geamplificeerd met de Taqman™ Environmental MasterMix. Bij de Postitieve controle (PC, A10) is geen PCR product te zien in de vorm van een band in de laan. Hieruit kan geen conclusie getrokken worden.



### KingFisher 96 process

**Table 1** Pipetting instructions for KingFisher 96 and NucleoMag 96 Tissue protocol.

Plate *	Plate	Content	Sample/ Reagent volume
A	1	Lysed Sample	225 µl
		Magnetic Beads (added after lysis step)	24 µl
		Binding buffer MB2 (added after lysis step)	360 µl
A	2	Wash buffer MB3	600 µl
A	3	Wash buffer MB4	600 µl
A	4	Wash buffer MB5	800 µl
B	5	Elution buffer MB6	100 µl

\*A = Microtiter 96 DW plate, B = KingFisher 96 KF plate

1. Add 205 µl of buffer T1 and 20 µl of proteinase K solution to sample. Perform lysis at 56°C for 1h -16h depending on samples. Following lysis load lysed sample, 24 µl of resuspended Magnetic Beads and 360 µl Binding Buffer MB2 to plate 1.
2. Add 600 µl of Wash Buffer MB3 to plate 2.
3. Add 600 µl of Wash Buffer MB4 to plate 3.
4. Add 800 µl of Wash Buffer MB5 to plate 4.
5. Add 100 µl of Elution Buffer MB6 to plate 5.
6. Combine the tip comb and The KingFisher plate. See KingFisher 96 User manual.
7. Select the NucleoMag 96 Tissue protocol using arrow keys and press START button.
8. Load the plates according to protocol request and press START after every plate to confirm the action.
9. **Note!** Confirm that the plates are placed in correct orientation: A1 well to be pointed to upper right corner of the plate holder in turntable. A1 row of the plate is then always located in the inner circle of the turntable.
10. The purification protocol will start when the last plate is loaded and START button is pressed.
11. After lysis-step add 24 µl of resuspended Magnetic Beads and 360 µl of Binding Buffer MB2 to plate 1. Beads and Binding buffer may be premixed before addition to plate 1.
12. After the purification process is completed the plates are removed according to instructions shown in instrument screen.

Press START after each plate removal to confirm the action.

13. When the last plate is removed text End\_of\_run will appear. Press STOP to complete the run.

### Description of NucleoMag 96 Tissue protocol with KingFisher 96

1. Samples are lysed with buffer T1 and proteinase K for 1-16 h at 56°C. Lysis incubation time depends on sample type. Refer NucleoMag 96 Tissue kit protocol for details. Following Lysis all further steps are done on the KingFisher 96 instrument.
2. Lysed samples are incubated first with magnetic beads and Binding Buffer MB2 in plate 1 for 5 minutes. Magnetic bead/DNA complexes are formed.
3. Magnetic beads are washed with Wash Buffer MB3 and MB4 in plates 2 and 3 respectively.
4. A final short wash step of magnetic beads with Wash buffer MB5 in plate 4 removes ethanol from previous wash buffers.
5. DNA is released to Elution Buffer in plate 5 for 10 minutes with heating.
6. Beads are discarded into plate 3.



## Bijlage 4.2: Dropsense 96 (trinean)

### 3.1.3.2 Manual sample loading on a DropPlate

Take care not to introduce large air-bubbles into the dispensed sample. When dispensing samples into the DropPlate, put the tip of the pipettor into the input well at an angle of 10° angle (or more) until the tip makes contact with the inner wall of the well and then deliver the liquid by gently pressing the push button of the pipettor until the first stop (pressing further down to the second stop inevitably will create bubbles in the sample). Lift the pipette up carefully after dispensing. The sample will be sucked automatically into the meander reservoir by capillary force.

The black colored aluminum DropFrame and 96well mould of the DropPlate96 create a difference in visual contrast between empty and filled meander-shaped reservoirs of the DropPlate disposables. This allows a quick and easy visual control of the loaded wells. Furthermore, this visual inspection can be used to estimate the amount of sample dispensed or the presents of air bubbles in the samples, as shown in the figure below.

### 3.2.1 Instrument start up

The power switch is located on the back panel of the DropSense96. Push the rocker switch to the ON position. The instrument automatically pulls in the microplate tray when the tray was in the open position. When the DropSense96 instrument is powered on, double-click the DropQuant software icon on the computer desktop to start the program. Once logged in, a first message will indicate that the USB connection is being made, the instrumental hardware settings are being read and diagnostic checks are performed to ensure correct functioning.



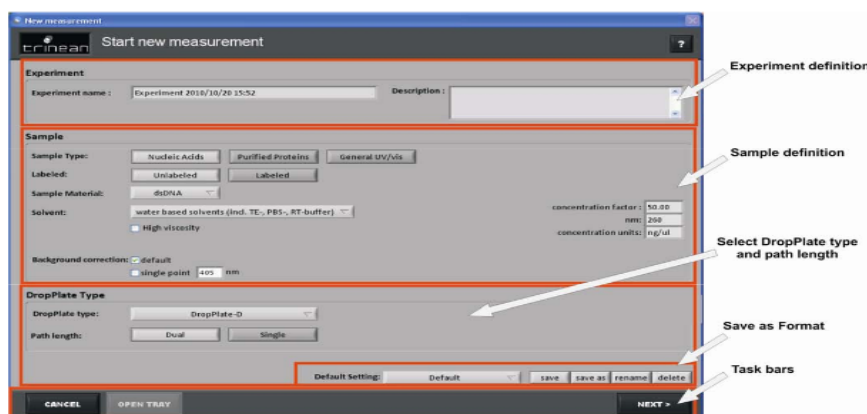
If the pumps or spectrophotometer don't perform as expected during the diagnostic check-up, an information window will automatically pop-up (see examples below). Please contact your distributor for a thorough system check and recalibration.



### 3.2.2 Loading of a DropPlate96 on the DropSense96

The plate carrier of the DropSense96 can be opened at any time (except during measurements) using the 'open/close tray' button in the DropQuant software. The tray opens automatically when pushing the 'start test' button in the software (see further) to load the DropPlate96 or a standard 96well microtiter plate before reading. When reading is complete, the drawer of the DropSense96 opens, allowing you to remove the DropPlate. The drawer closes automatically after 30 seconds (this feature is not active when the DropSense96 is integrated).

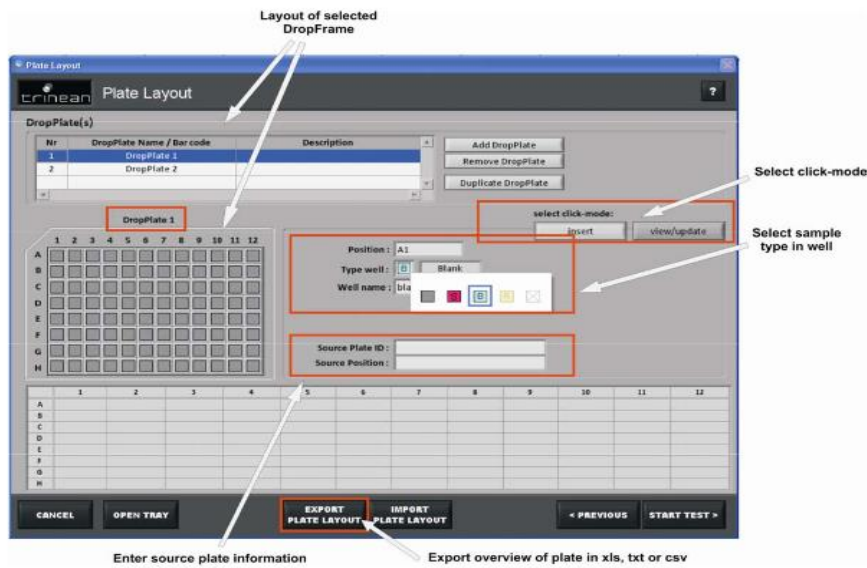
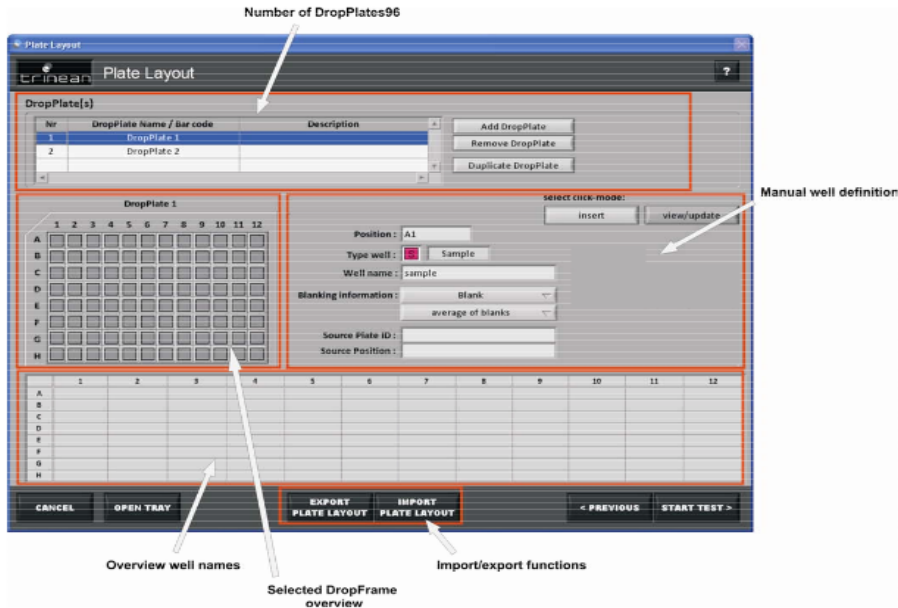
This 'new measurement' button on the main menu screen opens the application definition screen to define novel measurements. The operating software has been tailored to meet the life scientist's needs.



Several screen features are built in:

- **Experiment definition:** The user can define the experiment by name and include extra information in the description box. A preset name is generated for every experiment including date and time for easy chronologic storing. All the experiment information will be included in the final experiment report.
- **Sample definition:** Several pre-configured applications have been included for quick and easy experiment definition. Detailed description of these applications can be found in chapter 5.
  - o **Nucleic acids** (See chapter 5.1)
    - Unlabeled: DNA/RNA concentration (A260) and purity (260/280 and 260/320 ratio) measurements
    - Labeled: DNA/RNA and fluorescent dye labeling density quantification
  - o **Purified Proteins** (See chapter 5.2)
    - Unlabeled: protein concentration (A280) and purity (260/280 ratio) measurements
    - Labeled: protein and fluorescent dye labeling density quantification
  - o **General UV-VIS** (See chapter 5.3)
- **Background selection:** Choice between the default background correction using the spectral range of 400-600 nm or a single wave/length of choice.
- **DropPlate type:** Depending on the application or sample concentration range, a choice of DropPlate-S or DropPlate-D can be made. Both DropPlates are explained in detail in section 3.1. Alternatively, a standard 96well microtiter plate can be read. This selection requires additional information like path length or sample volume and plate brand.
- **Path length selection:** When selecting the DropPlate-D, the user can further choose between a single or dual path length measurement. The single measurement requires 1  $\mu$ l of sample to perform a single pumping step and a small chamber measurement for high concentration sample analysis (2 to 110 OD for a 10mm path). The dual measurement, requiring 3  $\mu$ l of sample, uses both measurement chambers for the analysis creating the large concentration measurement range (0.05 to 110 OD for a 10mm path). When using a DropPlate-S, only a single path length measurement is possible. This selection requires a sample volume of 2  $\mu$ l and generates a measurement range of 0.05-44 OD (for a 10mm path).
- **Save as Format:** When all the above selections have been made, the user can save these in a new format for future use. These formats are account dependent. Only the lab manager account has the possibility to make a format that is available for all users. The formats can be deleted, renamed, ...
- **Task bars:** A general task bar is included at the bottom of every screen. This allows the user to cancel the experiment, open the microplate tray at any time and continue to the next software screen.

Pressing the 'next' button on the 'Start new measurement' screen will open the screen where information on sample positioning on a 96well display can be entered. The positioning information can be done manually or can be imported from an excel, text or csv-file.



Select click-mode

Select click-mode contains two choices: 'insert' or 'view/update'. The insert mode will directly insert the information below (type well/well name,...) in the selected well in the 96 matrix on the left. So, the user can change the information for a well first and by clicking on the well, the information is stored. With the view/update mode, the user can click on a well and obtain the information of this well without changing it. If the information of the well needs to be changed, the user can change the info (type well/well name,...) and then click 'update' above right on the screen.

Type well

Three well types can be chosen by clicking on the colored square: **Empty** (grey), **Blank** (blue), **Sample** (red). The yellow reference cannot be chosen yet but will be used in future applications. The empty option can be used to erase errors. However, a safety procedure is implemented in the software to avoid erasing blank wells.

## Instructions for Use

---

**Introduction** Instructions to perform electrophoresis using a Mother E-Base™ device and Daughter E-Base™ device are described in this section.

For sample preparation, refer to the manual supplied with the gels.

---

### Connecting a Daughter E-Base™ device

Ensure the Mother E-Base™ device is unplugged prior to attaching a Daughter E-Base™ device.

1. Connect the Daughter E-Base™ device to a Mother E-Base™ device or another Daughter E-Base™ device already connected to a Mother E-Base™ device.
2. Plug the Mother E-Base™ device into an electrical outlet using the electrical plug on the base.

The displays show EP or the last program used (EP or EG) if there are no gel cassettes on the bases.

---

### Selecting a Program

Select the appropriate program for your application prior to inserting a gel into the E-Base™ device.

1. Plug the Mother E-Base™ device into an electrical outlet using the electrical plug on the base.  
The display shows EP or the last program used (EP or EG) if there is no gel cassette on the base.
2. Select the appropriate program for the type of gel by pressing and releasing the **pwr/prg** button:

Gel Type	Program	Default Run Time
E-Gel®	EG	12 minutes
E-PAGE™	EP	14 minutes

## Bijlage 4.4: MagAttract PowerSoil DNA Kit

Quick-Start Protocol

June 2016

### MagAttract® PowerSoil® DNA KF Kit

The MagAttract PowerSoil DNA KF Kit (cat. no. 27000-4-KF) can be stored at room temperature (15–25°C) until the expiry date printed on the box label. RNase A solution should be stored at 2–8°C.

#### Further information

- Safety Data Sheets: [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety)
- Technical assistance: [support.qiagen.com](mailto:support.qiagen.com)

#### Notes before starting

- Before starting, add 400 µl of RNase A Solution to each 75 ml of PowerMag Bead Solution for every 96-well plate you plan to process.
  - If the SL Solution has precipitated, heat at 60°C until precipitate dissolves.
1. Carefully peel off the Square Well Mat that covers the PowerMag Bead Plate and set aside. Add 0.25 g of soil sample to each well of the PowerMag Bead Plate.  
**Note:** This is an appropriate stopping point. You can store the PowerMag Bead Plate at 2–8°C covered with the Square Well Mat.
  2. Add 750 µl of PowerMag Bead Solution/RNase A Solution to each well of the plate.
  3. Add 60 µl of SL Solution to each well. Secure the Square Well Mat tightly.  
**Note:** A proper seal of the mat is critical to prevent loss of sample and leakage
  4. Place PowerMag Bead Plate with mat securely fastened between 2 adapter plates (cat. no. 11990) on a Plate Shaker or TissueLyser II (cat. no. 85300).
  5. Shake at speed 20 Hz for 10 min. Re-orient plates so that the side that was closest to the machine body is now farthest from it and shake again at speed 20 for 10 min.
  6. Centrifuge the plate at room temperature for 6 min at 4500 x g.



#### - Sample to Insight

7. Carefully remove and discard the Square Well Mat. Transfer supernatant to a clean 1 ml collection plate.  
**Note:** The supernatant may still contain some soil particles.
8. Add 450 µl of IRT Solution to each well and apply sealing tape. Vortex horizontally for 5 s. Incubate at 2–8°C for 10 min. Centrifuge at room temperature for 6 min. at 4500 x g.  
**Note:** You can skip the 10 min incubation. However, if you have already validated the MagAttract PowerSoil extractions with this incubation, we recommend you retain this step.
9. Remove and discard sealing tape. Avoiding the pellet, transfer the entire volume of supernatant to a new collection plate.
10. Apply sealing tape. Centrifuge at room temperature for 6 min. at 4500 x g.
11. Taking care to avoid any residual pellet, transfer no more than 450 µl of supernatant from each well to a clean KingFisher® Deep Well 96 Plate.  
**Note:** If you wish to use the remaining 400 µl of supernatant in each well, transfer to another KingFisher® Deep Well 96 Plate and store at 2–8°C until they can be processed.
12. Resuspend ClearMag® Beads by vortexing. For each 96-well plate to be processed, add 2 ml of the resuspended ClearMag Beads to 45 ml of ClearMag Binding Solution and mix well. Immediately transfer to a multi-channel pipette reservoir.  
**Note:** Maintain the ClearMag Beads in suspension to ensure uniform distribution.
13. Add 470 µl of the ClearMag Beads/ClearMag Binding Solution to each well containing lysate in a KingFisher Microtiter Deep Well 96 Plate.
14. Place the plate on the robotic deck at the specified location indicated in the program.
15. Add 500 µl of ClearMag Wash Solution to each well of three clean KingFisher Microtiter Deep Well 96 plates. Place on the robotic deck at the specified locations indicated in the program.
16. Add 100 µl of EB Solution to each well of a clean KingFisher 96 KF plate and place on the robotic deck at the specified location. Initiate the robotic program.
17. Upon completion of the robotic program, cover the wells of the KingFisher 96 KF plate with an appropriate storage seal. DNA is now ready for downstream applications.

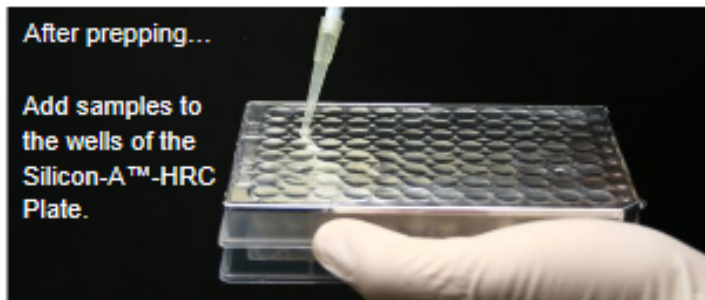
## Bijlage 4.5: Zymo OneStep-96 PCR Inhibitor Remover

### Kit Contents:

	Qty.	Storage Temp.
Prep Solution	30 ml	Room Temp.
Silicon-A™-HRC Plates	2 plates	4 °C-Room Temp.
Elution Plates	4 plates	Room Temp.
Product Information Sheet	1	-

**Protocol:** (Note: Make sure the matrices are located at the bottom of the wells of the Silicon-A™-HRC Plate by firmly tapping the plate against a flat surface.)

**Before Starting:** The Silicon-A™-HRC Plate needs to be prepared prior to use by: 1) mounting the plate onto an Elution Plate, 2) adding 150 µl Prep Solution to the wells by piercing the cover foil in the middle, 3), waiting for 5 minutes before centrifuging the plate at exactly 3,500 x g for 5 minutes.



**Transfer** 50-100 µl DNA or RNA (in water, TE, or similar) through the holes in the foil to the wells of a prepared Silicon-A™-HRC Plate mounted on an Elution Plate. Centrifuge the assembly at exactly 3,500 x g for 3 minutes. The filtered DNA (or RNA) is suitable for PCR, (RT), and other downstream applications.