

University of Groningen

## Marine benthic metabarcoding

Klunder, Lise Margriet

DOI:  
[10.33612/diss.135301602](https://doi.org/10.33612/diss.135301602)

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*  
Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*  
2020

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*  
Klunder, L. M. (2020). *Marine benthic metabarcoding: Anthropogenic effects on benthic diversity from shore to deep sea; assessed by metabarcoding and traditional taxonomy*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.135301602>

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

# SAMENVATTING



## SAMENVATTING

Het mariene ecosysteem is wereldwijd een van de meest waardevolle natuurlijke bronnen. Het voorziet ons, direct of indirect, van voedsel, medicijnen, zuurstof en een stabiel klimaat. Bodemlevende organismen, ook wel benthos, zijn een belangrijke schakel binnen dit ecosysteem door hun rol in de nutriënten-cyclus, de voedings-keten en hun primaire en secundaire productie. Een hoge biodiversiteit in deze benthische gemeenschap draagt bij aan het beter functioneren van het complete mariene ecosysteem. Echter, dit benthos wordt bedreigd door menselijke invloeden zoals verandering in hun natuurlijke habitat, (over-)bevissing en vervuiling. Hierdoor kan de soortensamenstelling veranderen, soorten kunnen verdwijnen of juist gaan domineren en/of de totale biodiversiteit kan afnemen. Om te kunnen anticiperen op zulke verandering is het belangrijk deze verandering te kunnen waarnemen. Daarom is het nodig om de benthische biodiversiteit op een consequente en betrouwbare manier te meten. Traditionele methodes, gebaseerd op morfologische taxonomie van individuele organismen, zijn vaak tijd-rovend, arbeidsintensief en vereist een taxonomische kennis die steeds minder tot de algemene kennis onder mariene onderzoekers behoort. Als gevolg hiervan wordt er vaak alleen naar grotere en met het blote oog waarneembare soorten, ook wel de macrofauna, gekeken en worden kleinere soorten, de micro- en meiofauna, genegeerd terwijl deze kleine soorten minstens zo belangrijk zijn voor het functioneren van het ecosysteem. Een goede biodiversiteitsanalyse is met de traditionele methodes dus meestal niet mogelijk.

Moleculaire methodes, en meer specifiek, DNA metabarcoding gecombineerd met 'next-generation-sequencing' (NGS) heeft in het afgelopen decennium zich ontwikkeld tot een alternatieve methode om grote aantal soorten tegelijk te identificeren. DNA metabarcoding is gebaseerd op soortidentificatie via zogenoemde DNA barcodes. Deze DNA barcodes zijn korte variable regio's in het DNA die waardevolle taxonomische informatie bevatten. Met behulp van de NGS technologie kunnen grote hoeveelheden van deze barcodes gelijktijdig verwerkt worden, iets wat voorheen niet mogelijk was. Met metabarcoding is het mogelijk om de benthische biodiversiteit, onafhankelijk van het ecosysteem, via een consequente en herhaalbare methode te analyseren.

In mijn proefschrift heb ik onderzoek gedaan naar de toepassing van metabarcoding methodes om de mariene benthische biodiversiteit te analyseren. In hoofdstuk 2-3 heb ik metabarcoding methodes vergeleken met traditionele taxonomische methodes op zowel kwalitatieve als kwantitatieve aspecten. In hoofdstuk 4-6 heb ik de metabarcoding methodes toegepast op studies naar anthropogenische invloeden op het benthische ecosysteem, van het wad tot aan de diep-zee. Deze samenvatting beschrijft de belangrijkste punten en uitkomsten per hoofdstuk.

### **Metabarcoding methodologie**

Het gebruik van metabarcoding om de biodiversiteit of soortensamenstellingen te bepalen heeft de laatste jaren een vlucht genomen. Dit geldt mede voor de toepassing van deze methodes in het marien bentische werkveld. De metabarcoding procedure is gebaseerd op een isolatie van al het DNA vanuit een omgevingsmonster, bijvoorbeeld sediment of water. Vanuit het geïsoleerde DNA worden de specifieke barcodes vermenigvuldigd en vertaald in DNA-sequenties. Deze sequenties kunnen worden vergeleken met een referentiedatabase om zo de sequenties te koppelen aan een taxonomische groep en dus zo de soortensamenstelling van het DNA in het omgevingsmonster te bepalen. Voor elke stap in deze procedure zijn verschillende methodes beschikbaar, elk met zijn eigen voor- en nadelen. In het eerste deel van mijn proefschrift heb ik verschillende methodes voor een aantal stappen in de metabarcoding procedure onderzocht.

In Hoofdstuk 2 heb ik verschillende DNA isolatie methodes en bio-informatica protocollen vergeleken. De directe DNA isolatie methode, een methode waarbij DNA direct uit een kleine hoeveelheid sediment wordt geïsoleerd zonder enige tussenstappen, bleek het meest geschikt om zowel de macrofauna als wel de kleinere meiofauna fractie te bepalen binnen één analyse. Andere methodes, waarbij het monster eerst gezeefd werd of waarbij eerst het extracellulair DNA werd gescheiden van het sediment lieten een minder goed beeld zien van de biodiversiteit. Op het gebied van bio-informatica en meer specifiek, het vergelijken van DNA-sequenties met een database, leverde de RDP-classifier, een bayesian classifier, betere resultaten dan het veel bekendere BLAST-algoritme. Daarnaast laat het onderzoek in dit hoofdstuk zien dat het toevoegen van een mock-community, een vooraf samengesteld soort gemeenschap, een waardevolle toevoeging is om meer inzicht te krijgen in de werking en eventueel fouten van de verschillende stappen in de metabarcoding procedure.

Hoofdstuk 3 gaat verder waar hoofdstuk 2 is geëindigd, de directe DNA isolatie methode wordt hier verder getest naar kwantitatieve eigenschappen. Uitkomsten van de metabarcoding methode werden vergeleken met abundantie en biomassa bepalingen per soortsgroep verkregen met de traditionele morfologische methode. De resultaten in dit hoofdstuk laten zien dat kwantitatieve metingen met de metabarcoding procedure belemmerd worden door ecologische aspecten van het DNA. Hierbij valt bijvoorbeeld te denken aan verschillende hoeveelheden uitscheiding van DNA tussen soorten, seizoensmatige verschillen binnen soorten of de verspreidingspatronen van een soort. De enige taxonomische groep die wel een positieve relatie liet zien voor zowel abundantie als biomassa was *Pygospio*, een kleine, wijdverspreide wormen groep.

### **Toepassing van metabarcoding methodes**

In het tweede deel van mijn proefschrift heb ik de metabarcoding methode toegepast om antropogene effecten op mariene bentische ecosystemen te onderzoeken. Hierbij lag de

focus zowel op de ecologische vraag, “wat is het effect?”, als ook op de toepasbaarheid van de metabarcoding methodes om deze vraag te beantwoorden. De complexiteit van de ecosystemen waarin de methodes worden toegepast werden opgebouwd van een relatief simpel ecosysteem met lage biodiversiteit: de getijdenplaten in de Waddenzee, gevolgd door de continentale plaat in de Noordzee, en uiteindelijk een complex diepzee ecosysteem: een hydrothermale bron in de Atlantische Oceaan.

In Hoofdstuk 4 werd de invloed van bodemvisserij naar de wadpier *Arenicola* spp. op de benthische biodiversiteit onderzocht. Hiervoor zijn zowel de traditionele taxonomische methode als ook een metabarcoding methode gebruikt en ook beide methodes lieten significante verschillen zien tussen de controle raaien en de beviste raaien. Kleine, opportunistische soorten herstelden zich snel in de beviste raaien en werden hier al snel dominant. Anderzijds, grotere en langlevende soorten herstelden langzaam en bleven qua aantallen achter op de controle raaien gedurende de gehele experimentele periode van 1,5 jaar. Hoewel de uitkomsten van beide methodes vergelijkbaar was, was het met de metabarcoding methode mogelijk om de effecten van de visserij op de benthische soorten voor meer taxonomische groepen te bekijken, dit maakt deze methode uiteindelijk krachtiger ten opzichte van de traditionele taxonomische methode.

In Hoofdstuk 5 zijn de lange termijn effecten van de aanwezigheid van een gasplatform in de zuidelijke Noordzee op de benthische biodiversiteit rond dit platform onderzocht. Menselijke bouwwerken, zoals gasplatforms, kunnen hun omgeving beïnvloeden door o.a. veranderende stroming rond het bouwwerk of doordat ze als substraat dienen voor een artificieel rif. Tijdens dit onderzoek was de biodiversiteit op vier raaien, elk in een andere windrichting bepaald met behulp van zowel de traditionele morfologische methode als ook de metabarcoding methode. Vergeleken met de traditionele methode, was de metabarcoding in staat om tot drie keer meer taxonomische groepen te detecteren. Beide methodes lieten kleine verschillen in soortensamenstelling zien tussen de raaien, onafhankelijk van de afstand tot het platform. Dit suggereert dat het gasplatform wel degelijk een invloed heeft op de omliggende biodiversiteit.

In Hoofdstuk 6 is de invloed van een hydrothermale pluim op de omliggende benthische biodiversiteit onderzocht. Een hydrothermale pluim is een pluim of wolk uitgestoten door een hydrothermale bron vol met opgeloste mineralen, mineralen die langzaam weer uit de pluim neerslaan op de onderliggende zeebodem. Over de biodiversiteit op deze onderliggende zeebodem is nog weinig bekend maar zijn wel potentieel bedreigd door toekomstige diepzee mijnbouw rond hydrothermale bronnen. Naast dat deze mijnbouw activiteiten de biodiversiteit ter plekke zal aantasten worden hierbij ook sediment pluimen vol met giftige metalen geproduceerd welke de biodiversiteit in de omgeving kan aantasten. Door de huidige biodiversiteit onder een natuurlijke pluim te bestuderen hopen we meer inzicht te

krijgen hoe deze beïnvloed zal worden door een mijnbouw gerelateerde pluim. Resultaten van dit onderzoek laten zien dat de benthische biodiversiteit verschilde tussen monster locaties en significant gecorreleerd was aan de neerslag uit de pluim. Biodiversiteit was het laagst dicht bij de hydrothermale bron, de soortsamenvatting werd hier gedomineerd door kreeftachtigen. We concluderen dat diepzee mijnbouw, en meer specifiek de pluim hierbij, een potentieel groot effect kan hebben op de biodiversiteit in de omgeving.

## CONCLUSIE

In dit proefschrift laat ik zien dat metabarcoding een waardevolle methode is om antropogene effecten op de benthische biodiversiteit te bepalen. Vergeleken met traditionele morfologische methoden werden met de metabarcoding methode dezelfde conclusies getrokken omtrent het antropogene effect. Bovendien, het aantal taxonomische groepen die meegenomen kon worden in de analyse was voor de metabarcoding methode veel groter waardoor de analyses uiteindelijk krachtiger waren en ook kleinere effecten gemeten konden worden. Vooral voor onbekendere en complexere ecosystemen, zoals de diepzee, overtreft de metabarcoding methode de traditionele morfologische methode. Echter, de metabarcoding methode heeft ook een aantal nadelen ten opzichte van de traditionele morfologische methode. Zo is het bijvoorbeeld lastig om soortgroepen te kwantificeren op zowel abundantie als biomassa en kunnen door hiaten in de referentie databank niet altijd alle DNA-sequenties worden vertaald in een taxonomische groep. Een beter begrip van de exacte eigenschappen, en de daarbij horende limiteringen, van de metabarcoding methode kan ervoor zorgen dat de methode uiteindelijk nog krachtiger wordt. Hoewel de traditionele morfologische methode al eeuwen lang is toegepast in het marien benthische werkveld en de methode hierdoor redelijk uitontwikkeld is, geldt dit niet voor de metabarcoding methode. De methode ontwikkeld zich nog altijd erg snel, en deze snelle ontwikkelingen zullen hopelijk in de toekomst huidige limiteringen overkomen en de methode een nog waardevolle aanvulling in het werkveld maken.

