



Bachelor scriptie

Aeres Hogeschool Almere

Toegepaste biologie

Fort Bay, 19 April 2022

Afstudeerdocent: Jeffrey van Lent



Overleving en groei van juvenile Diadema zee-egels

Praktijkonderzoek op Saba,
Caribisch Nederland

Kei Veenstra



Disclaimer

Dit rapport is gemaakt door een student van Aeres Hogeschool als onderdeel van zijn/haar opleiding.

Het is géén officiële publicatie van Aeres Hogeschool. Dit rapport weerspiegelt niet de visie of mening van Aeres Hogeschool. Aeres Hogeschool aanvaard geen enkele aansprakelijkheid voor enige schade voortvloeiend uit het gebruik van de inhoud van dit rapport.

Kei Veenstra

Fort Bay, Saba

April 2022

Voorwoord

Deze scriptie is geschreven aan het einde van mijn bachelor studie als afstudeerwerkstuk voor de opleiding toegepaste biologie aan Aeres Hogeschool Almere. Voor deze scriptie heb ik 4 maanden op Saba in het Caribische gebied doorgebracht, waar ik onderzoek op locatie heb mogen doen aan een van de best bewaard gebleven koraalriffen in het Caribisch gebied.

Deze scriptie is geschreven voor iedereen die zich inzet voor het behoud van productieve mariene ecosystemen, op wat voor manier dan ook.

Bij deze betuig ik mijn dank aan de Saba Conservation Foundation, die mij in mogelijkheid hebben gesteld om mijn scriptie op Saba uit te voeren en mij gedurende mijn onderzoek ten alle tijden hebben ondersteunt. Ook wil ik Jeffrey van Lent bedanken voor de voortdurende steun en feedback die ik van hem heb mogen ontvangen. Verder wil ik ook Hogeschool Van Hall Larenstein, waar ik voor de tweede keer tijdens mijn studie terecht kon voor een stage, en Tom Wijers bedanken voor wederom een geduldige en goede begeleiding gedurende het hele proces. Tot slot gaat mijn dank uit naar de mensen met wie ik gedurende mijn tijd op Saba met veel plezier samen heb mogen werken en van wie ik veel heb mogen leren, Britt, Michael, Bob, Stella, Alwin, Tom, Marijn, Oliver, Åsa, Otto en Walter.

Inhoudsopgave

Disclaimer	1
Voorwoord	2
Samenvatting.....	4
Summary	5
Inleiding	6
Hoofdvraag en deelvragen	8
Doelstelling.....	8
Materiaal en Methode	9
Proefopzet	9
Data verzamelen.....	10
Resultaten	11
Deelvraag 1: Groeisnelheid en overlevingskansen bij de 10-liter flessen methode	11
Deelvraag 2: Groeisnelheid en overlevingskansen bij de 1-liter flessen methode	12
Statistische toets	13
Discussie	14
Vergelijking met data van voorgaande jaren	14
Verloop van het proces	14
Methode.....	15
Conclusies en aanbevelingen	16
Deelvragen	16
Hoofdvraag.....	16
Relevantie.....	16
Aanbevelingen.....	16
Bronnen.....	18
Bijlagen	19

Samenvatting

Sinds de massasterfte van de belangrijke zee-egel soort *Diadema Antillarum* in het begin van de jaren 1980 zijn de koraalriffen in het Caribisch gebied sterk achteruit gegaan in productiviteit en biodiversiteit. Meerdere pogingen zijn gedaan om de populaties te herstellen, veelal met wisselend succes. In 2020 werd er een methode ontwikkeld waarbij er meerdere honderden juveniele *Diadema*'s gekweekt konden worden op schudtafels (de 1-liter flessen methode). Deze methode word ook toegepast op Saba, in Caribisch Nederland, naast een andere, nieuwere methode waarbij gebruik word gemaakt van luchtbellen om de larven van de *Diadema* in suspensie te houden (de 10-liter flessen methode).

Het doel van dit onderzoek was om richting te bieden aan herstellpogingen van de populaties *Diadema Antillarum* door uitsluitel te geven over de algemene gezondheid van de juveniele *Diadema*'s die afkomstig zijn van de twee verschillende kweekmethoden.

De volgende vraag is bij dit praktijkonderzoek beantwoord: Welke methode van opkweken (10-liter flessen of 1-liter flessen) produceert juveniele *Diadema Antillarum* met het hoogste overlevingspercentage en de beste groei?

Om deze vraag te beantwoorden zijn er twee groepen opgezet met in elke groep 4 herhalingen. Deze groepen bestonden uit bolvormige flessen met een inhoud van 10 liter waarbij in elke fles 20 juveniele *Diadema*'s werden geplaatst. Nadat de juveniele zee-egels een maand in de fles hadden doorgebracht werden hun aantallen vastgesteld en hun afmetingen gemeten en vergeleken met hun originele afmetingen en aantallen

Zowel de overleving als de groei is het hoogst bij de juveniele *Diadema*'s gekweekt volgens de 1-liter flessen methode. Bij deze methode bedroeg de gemiddelde groei over vier weken 497,5 micrometer (μm), waar dit bij de 10-liter flessen 132,75 μm bedroeg. Het overlevingspercentage voor de juvenielen van deze methode was 60,55%, tegenover 22,85% voor de 10-liter flessen methode. Het verschil tussen deze twee groepen bleek na een statistische analyse significant.

Aan de hand van deze resultaten kan worden gesteld dat de juveniele *Diadema*'s die opgekweekt zijn volgens de 1-liter flessen methode een betere algemene gezondheid hebben dan de juveniele *Diadema*'s opgekweekt volgens de 10-liter flessen methode.

Terugkomend op het doel van dit onderzoek, om richting te bieden aan toekomstige pogingen om populaties van de *Diadema Antillarum* te herstellen, zijn niet alleen de resultaten van dit onderzoek belangrijk, maar is het ook van belang om andere factoren zoals beschikbare tijd, geld en ruimte in acht te nemen bij het nemen van een beslissing over een geschikte kweekmethode.

Summary

Since the mass die-off of the keystone species *Diadema Antillarum* at the start of the 1980's, the coral reefs in the Caribbean have shown strong decreases in biodiversity and productivity. There have been several attempts at restoring the populations ever since, with mixed results overall. In December 2020 however, a method was developed that could culture hundreds of juvenile *Diadema*'s (the 1-litre bottle method). This method was also utilised on Saba, in the Dutch Caribbean. Along with another, newer method (the 10-litre bottle method) that used air bubbles instead of a shaker table to keep the larvae in suspension.

The goal of this research was to give heading to future restoration efforts of *Diadema* populations throughout the Caribbean by providing certainty about the overall health of the juvenile *Diadema*'s that have been cultured using these two different methods.

The question that has been answered for this experiment is the following: which method of culturing (the 1-litre bottle method or the 10-litre bottle method) yields juvenile *Diadema*'s with the best overall health (measured in survival and growth)?

To answer this question, two groups with 4 replications each have been set up. These groups consisted of rounded bottles of 10 litres where every bottle contained 20 juvenile *Diadema*'s. After being in these bottles for 4 weeks their numbers were counted and their dimensions were measured, prior to being compared to their numbers and dimensions at the start of the experiment.

Both the growth and the survival of the 1-litre bottle method was higher than that of the 10-litre bottle method. The growth of the 1-litre bottle method averaged at 497,5 micrometer (μm) over 4 weeks, where the 10-litre bottle method showed a growth of only 132,75 μm . The percentage of surviving juveniles in the 1-litre bottle group was 60,55%, against 22,85% for the 10-litre bottle method. These differences turned out to be significant after an independent t-test was conducted.

The results indicate that juvenile urchins that have been cultured using the 1-litre bottle method have a higher overall health than the juveniles that have been cultured using the 10-litre bottle method.

Linking this back to the goal of this research to give heading to future attempts at restoring *Diadema* populations, while these are important results, other factors are also important to take into account when choosing the right culture method such as available time, money and space.

Inleiding

Hoewel ze nog geen 0,1 procent van het aardoppervlak beslaan, zijn koraalriffen een van de meest productieve ecosystemen ter wereld (Atkinson & Grigg, 1984). Koraalriffen vormen niet alleen voedergronden voor haaien en andere pelagische soorten, maar zijn ook schuilplekken en paargronden voor talloze andere mariene soorten. Ongeveer 20 procent van alle koraalriffen wereldwijd zijn verdwenen en nog eens 26 procent is direct bedreigd door een veelvoud van factoren (Riegl, Bruckner, Coles, Renaud & Dodge, 2009). De verdwijning van koraalriffen wereldwijd is niet alleen een probleem voor vele organismen die er direct afhankelijk van zijn van dit ecosysteem. De mens staat namelijk indirect ook in nauw contact met koraalriffen. Zo zijn de koraalriffen in Zuid-Florida in de Verenigde Staten alleen al verantwoordelijk voor 4 miljard dollar per jaar aan inkomsten in sectoren zoals toerisme en de visserij (Riegl et al., 2009). Het verdwijnen van gezonde koraalriffen wereldwijd zou een enorme impact hebben op de biodiversiteit van kustwateren, de soorten die indirect afhankelijk zijn van het rif en geassocieerde economische sectoren.

In onder andere het Caribisch gebied is de achteruitgang van het koraalrif de afgelopen jaren goed te zien geweest. Riffen om en nabij Jamaica (Hughes, 1994), Costa Rica (Cortés & Jiménez, 2003), en andere plekken in het Caribisch gebied (Mora, 2008) zijn de afgelopen jaren in productiviteit en biodiversiteit achteruit gegaan. Naast vervuiling, opwarming van het zeewater en het verzuren van oceanen als gevolg van wereldwijde klimaatverandering hebben koraalriffen, zoals vele andere ecosystemen, ook te maken met dodelijke ziekten

Een goed voorbeeld van zo'n ziekte, en de impact die het kan hebben, is de massale sterfte van de zee-egel soort *Diadema Antillarum* in het begin van de jaren 80. Begin 1983 werd er in Panama voor het eerst melding gedaan van zichtbaar zieke en dode *Diadema* zee-egels. Een jaar later had de ziekte zich over het gehele Caribisch gebied verspreid en werd de ziekte zelfs in Bermuda waargenomen (Lessios, Robertson & Cubit, 1984). Waar er voor de massasterfte in het begin van de jaren 80 nog miljarden *Diadema* zee-egels over het hele Caribisch gebied verspreid waren, zijn de populaties verminderd tot soms minder dan 1 procent van de oorspronkelijke aantallen, zoals rondom Curaçao (Bak, Carpay & De Ruyter Van Steveninck, 1984).

De ecologische kettingreactie die plaatsvond als gevolg van het verdwijnen van de belangrijkste herbivoor op Caribische koraalriffen zijn desastreus geweest voor de diversiteit en productiviteit van de ecosystemen die ervan afhankelijk zijn.

Diadema Antillarum is een van de belangrijkste sleutelsoorten van de Caribische koraalriffen (Lessios, 1988). Dit omdat de soort binnen het voedselweb een belangrijke rol als mariene grazer vervuld. De macroalgen, die de belangrijkste voedselbron voor de *Diadema* zee-egels zijn, vormen ook een belangrijke bedreiging voor het koraalrif. Een onderzoek van Contreras-Silva et. al (2020) wees uit dat van de 125 onderzochte koraalriffen die in 1978 nog gedomineerd werden door harde koralen, er nu 80% gedomineerd word door macroalgen. Onder andere deze nieuwe balans heeft bijgedragen aan het aftakelen van koraalriffen in de regio. Andere onderzoeken hebben laten zien dat op de zeldzame plekken waar de dichtheid van *Diadema*-zee egels hoger is dan normaal (na de massasterfte), settlement, overleving en groei van koralen hoger zijn dan op andere plekken (Lessios, 2016). De herintroductie van de soort is dus een belangrijke stap in het herstel van de koraalriffen.

Sinds de massasterfte in 1983 zijn er talloze pogingen gedaan om de *Diadema* zee-egels te herintroduceren op de koraalriffen in het Caribisch gebied, veelal met beperkt succes. Onderzoeken naar factoren die de zee-egel larven aanzetten tot het omvormen naar een juveniele zee-egel (Mos,

Cowden, Nielsen & Dworjanyn, 2011), het kunstmatig induceren van voortplanting het grootbrengen van zee egels onder gecontroleerde omstandigheden (Pilnick, O'Neil, Moe, & Patterson, 2021) en het daadwerkelijke uitzetten van *Diadema*'s op het rif (Williams, 2022) zijn in de afgelopen decennia op verschillende plaatsen ter wereld uitgevoerd. Hoewel sporadisch voortgang werd geboekt, bleef een volwaardige terugkeer van de soort naar het wild uit.

Ook op Saba, in de Oostelijke Caraïben, worden dit soort onderzoeken uitgevoerd met oog op een door de mens ondersteunde herintroductie van *Diadema* zee-egels. Experimenten waren gericht op de overleving en opgroei van larven en juveniele zee egels. Ook wordt er gekeken naar omstandigheden waarin de larven zich het beste omvormen naar juveniele zee-egel. Ook is er rondom Saba onderzoek gedaan naar het laten settelen van *Diadema* larven die van nature in de wateren rond Saba voortkomen op kunstmatig substraat. Uit dit onderzoek bleek dat in de waterkolom gesuspendeerde Bio ballen (geplooiden ballen) de beste en meest reproduceerbare methode waren voor het verzamelen van settlers van de *Diadema* zee-egel (Hylkema et al., 2022).

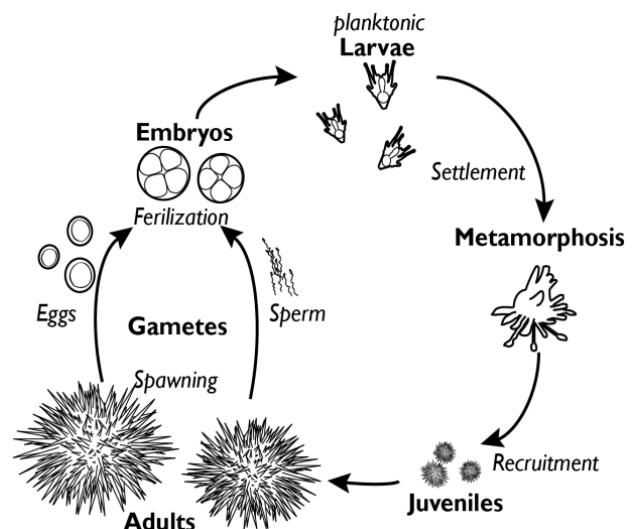
Een noemenswaardige voortgang in de herintroductie van de *Diadema*'s in het wild werd gerealiseerd in 2020, toen er een succesvolle methode werd ontwikkeld om larven van de *Diadema* zee-egels onder gecontroleerde omstandigheden op te kweken en klaar te maken voor omvorming tot kleine zee-egels, waardoor er honderden juvenielen geproduceerd konden worden (persoonlijke communicatie, T. Wijers, 2020). Dit onderzoek is in de daaropvolgende zomer van 2021 voortgezet op Saba in Caribisch Nederland. Het ontwikkelen van deze methode was een belangrijke stap in de ondersteunde herintroductie van *Diadema* zee-egels. Hiervoor was het namelijk nog niet gelukt om op een dergelijke schaal *in vitro* juveniele *Diadema* zee-egels te kweken (Hart van Nederland, 2021).

Over bepaalde delen van de reproductieve cyclus van de *Diadema* zee-egel is nog relatief weinig bekend. De soort begint als een larve, die na ruim een maand klaar is om zich te hechten aan een vast oppervlak, alvorens om te vormen tot een juveniele zee-egel (zie figuur 1). Elke stap is, variërend in succes, nagebootst danwel *in vitro*, danwel *in situ*. Er is echter nog relatief weinig bekend over de overlevingskansen van juveniele *Diadema*-zee egels die *in vivo* en *in situ* opgekweekt zijn.

Voor de herintroductie van de *Diadema* zee-egels op de koraalriffen in het Caribisch gebied zijn de overlevingskansen van de juveniele zee-egels een belangrijk vraagstuk. In het wild hebben juveniele zee-egels te maken met een veelvoud aan factoren die hun

overlevingskansen beïnvloeden zoals predatie, stormen, vervuiling van het water en natuurlijk ziekten (Kalam Azad, McKinley & Pearce, 2010). Herintroductie van onder gecontroleerde omstandigheden opgekweekte *Diadema*'s op het koraalrif loopt het risico te mislukken door een te hoge mortaliteit van de juveniele zee-egels. Dit zou een gevolg kunnen zijn van de methode waarmee deze juveniele *Diadema*'s zijn opgekweekt. Om de succeskansen van de herintroductie te vergroten dient er meer kennis vergaard te worden over de groeisnelheid en overlevingskans van onder gestandaardiseerde omstandigheden opgekweekte *Diadema Antillarum* zee-egels.

Om juveniele *Diadema* zee-egels te verkrijgen worden er op Saba twee methoden gehanteerd: het opkweken van de larven in 1-liter flessen en het opkweken van de larven in 10-liter. De eicellen



Figuur 1: levenscyclus van *Diadema Antillarum*. Bron: Research Gate

dienen direct na bevruchting in suspensie gehouden te worden. Om dit te realiseren worden er bij beide methoden andere manieren van waterverplaatsing gehanteerd. Bij de 1-liter flessen methode wordt het water in de flessen constant in beweging gehouden doormiddel van een schudtafel. De 10-liter flessen methode maakt gebruik van lucht dat via een pipet naar de bodem van de fles wordt gepompt. Door de opwaartse beweging van het stijgende lucht ontstaat er in de bolvormige flessen een circulaire stroming die de larven in het water gesuspenderd houdt. Dit verschil in de manier van larven in suspensie houden is het belangrijkste verschil tussen de twee methoden, gezien de resterende factoren die van belang zijn, zoals het aantal larven per milliliter water en de hoeveelheid en soort voer, hetzelfde is voor beide methoden. De methode die 1-liter flessen gebruikt om de larven op te kweken is in Leeuwarden in 2020 ontwikkeld en is bekend redelijk constant juveniele *Diadema* zee-egels te produceren. De methode kost echter relatief veel tijd, ruimte en energie om te onderhouden in vergelijking met de 10-liter flessen methode, die daarbij ook een grotere capaciteit heeft. Van de 10-liter flessen methode is echter nog relatief weinig bekend over de opbrengst van juveniele *Diadema* zee-egels ervan. Het doel van dit onderzoek is om een duidelijker beeld te krijgen over de groeisnelheid en de overlevingskansen voor de efficiëntere 10-liter flessen methode in verhouding tot de 1-liter flessen methode.

Hoofdvraag en deelvragen

Om de herintroductie van de *Diadema*'s in het wild soepeler te laten verlopen, zal de volgende hoofdvraag beantwoord worden: Welke methode van opkweken (10-liter flessen of 1-liter flessen) produceert juveniele *Diadema Antillarum* met het hoogste overlevingspercentage en de beste groei?

Om de hoofdvraag te beantwoorden zijn er een tweetal deelvragen opgesteld

- Wat is de mate van groeisnelheid en overlevingskansen van de juveniele *Diadema*'s die gedurende hun larvale fase in suspensie worden gehouden doormiddel van luchtballen (10-liter flessen methode)?
- Wat is de mate van groeisnelheid en overlevingskansen van de juveniele *Diadema*'s die gedurende hun larvale fase in suspensie worden gehouden doormiddel van een schudtafel (1-liter flessen methode)?

Doelstelling

Het antwoord op de hoofd- en deelvragen draagt bij aan de terugkeer van *Diadema* populaties op de koraalriffen in het Caribisch gebied. Het antwoord op dit vraagstuk dient een concrete uitsluiting te bieden over de groei en overlevingskansen van onder verschillende omstandigheden opgekweekte *Diadema*'s en zo een richting bieden aan de opschaling van *Diadema* kweek en toekomstige pogingen om populaties te herstellen doormiddel van herintroductie.

Dit experiment onderzoekt een aspect van juveniele *Diadema*'s dat nog niet eerder is onderzocht. Het is daarom moeilijk om in te schatten welke groep de beste groei en overleving zal vertonen. Er zijn geen gegronde redenen om aan te nemen dat een van de methoden betere groei en overleving zal vertonen dan de andere. Dit experiment wordt vooral uitgevoerd om vast te stellen of er een verschil is tussen de groeisnelheid en overlevingskansen van de *Diadema*'s die opgekweekt zijn volgens de bekende methode met 1-liter flessen, en de groeisnelheid en overlevingskansen *Diadema*'s die opgekweekt zijn volgens de nieuwe, efficiëntere methode met 10-liter flessen.

Materiaal en Methode

In dit hoofdstuk zal worden toegelicht welke variabelen worden onderzocht en hoe deze worden onderzocht. Voor alle deelvragen zal worden ingegaan op de relevante data te verzamelen en hoe dit gedaan zal worden. Daarvoor zal echter de proefopzet beschreven worden. Daarnaast zal verwezen worden naar protocollen die aangehouden zijn bij het verzamelen van de data

Proefopzet

De opzet van het experiment bestond uit twee groepen (1-liter flessen methode en 10-liter flessen methode) van elk 4 bolvormige flessen met een inhoud van 10 liter (zie bijlage 17). Elke groep bevatte juveniele *Diadema* zee egels die in volgens een andere methode waren opgekweekt van hun bevruchting tot hun late larvale stadium. Na vier weken in de bolflessen te zijn gebleven werd het aantal egeltjes vastgesteld en werden ze gemeten.

Methode 1: 1-liter flessen

De eerste groep juveniele *Diadema*'s was opgekweekt volgens de methode die eind 2020 in Leeuwarden succesvol bleek. Mediumflessen van 1 liter staan op schudtafels waarmee de larven, gesuspenseerd in 500 milliliter water, in beweging worden gehouden (zie bijlage 9). Twee keer per week werd het water in de flessen verschoond en werden de larvencultures gevoerd met oplopende aantallen microalgen (zie bijlage 1 & 2). Na 92 dagen zijn de larven, toen bijna allemaal competent, aangezet om te settelen volgens een gestandaardiseerde methode en de daaruit voortkomende juveniele *Diadema*'s zijn gebruikt voor de "1-liter flessen" groep van het experiment.

Methode 2: 10-liter flessen

De larven uit de tweede groep van het experiment waren opgekweekt volgens een nieuwe methode. Bij deze methode zijn de larven in bolvormige flessen van 10 liter geplaatst en in suspensie gehouden doormiddel van lucht dat via een glazen pipet in de fles werd gepompt (zie bijlage 9). De constante luchtstroom zorgt ervoor dat de larven in suspensie gehouden worden, wat essentieel is voor hun overleving. Vergelijkbaar met de 1-liter flessen, werden de 10-liter flessen twee keer per week verschoond en werden de larven van nieuw voer voorzien (zie bijlage 1 & 3). Na 47 dagen opgekweekt te worden zijn de larven gecontroleerd op competentie en na 49 dagen volgens dezelfde gestandaardiseerde methode als de 1-liter flessen aangezet tot settelen. Deze methode was wat betreft ruimte, energie en tijd een stuk efficiënter dan de 1-liter flessen methode. Over de successen wat betreft de gezondheid van de door deze methode geproduceerde juveniele *Diadema*'s was echter een stuk minder bekend.

Het laten settelen van de competente larven is volgens een voor alle groepen gestandaardiseerde methode gebeurd. Competente larven werden per 10 in een Petri schaal met daarin 15 milliliter artificieel zeewater (ASW) (zie protocol "ASW maken") en 4 vierkante centimeter *Lobophora spp.* Deze larven werden vervolgens 4 dagen achter elkaar elke 24 uur gecontroleerd op settlement (het vasthechten van een competente larven aan een oppervlakte en het omvormen tot juveniele *Diadema*). De larven die binnen deze tijd in een juveniele *Diadema* waren getransformeerd werden in een 10-liter fles van hun respectievelijke groep geplaatst (i.e. de juveniele *Diadema*'s die opgekweekt zijn a.d.h.v. de 1-liter flessen methode werden in een bolfles geplaatst die bij de "1-liter flessen methode" groep hoorde, etc.). Hierbij werden de egels gelijk verdeeld over de flessen zodat elke fles bij aanvang van het experiment 20 juveniele *Diadema*'s bevatte

In de 10-liter flessen werd 150 milliliter lucht per minuut gepompt ter behoeve van de waterverplaatsing. Dit werd gedaan doormiddel van een glazen pipet. Toen de eerste juveniele Diadema's in hun respectievelijke flessen werden geplaatst hadden deze flessen een biofilm van 6 dagen oud. Na vier weken werden de Diadema's geteld en gemeten met behulp van het programma ImageJ om hun overleving en groei te berekenen.

Data verzamelen

De variabelen bij de deelvragen zijn de diameter van de juveniele Diadema's en hun aantallen aan het einde van het experiment ten opzichte van hun aantallen bij opzet van het experiment.

Deze data is verzameld nadat het experiment 4 weken op heeft gestaan. De data is verzameld volgens een gestandaardiseerde methode die op alle groepen is toegepast. Eerst werden de aantallen van de overlevende Diadema's vastgesteld door ze handmatig uit hun respectievelijke fles te verwijderen en te tellen. De groei werd bepaald door de egels die uit de fles verwijderd waren te fotograferen, alvorens de diameter te meten met het programma ImageJ. Dit werd vervolgens vergeleken met de afmetingen van de Diadema's bij aanvang van het experiment. Dit werd voor beide groepen gedaan om zo beide deelvragen te beantwoorden

Omdat het onmogelijk is om elke Diadema individueel te volgen worden van zowel de overleving als de groei de gemiddelden genomen om de vergelijking tussen de groepen op een concrete manier te maken.

Om de twee groepen met elkaar te vergelijken zal de data geanalyseerd worden doormiddel van een onafhankelijke t-toets.

Resultaten

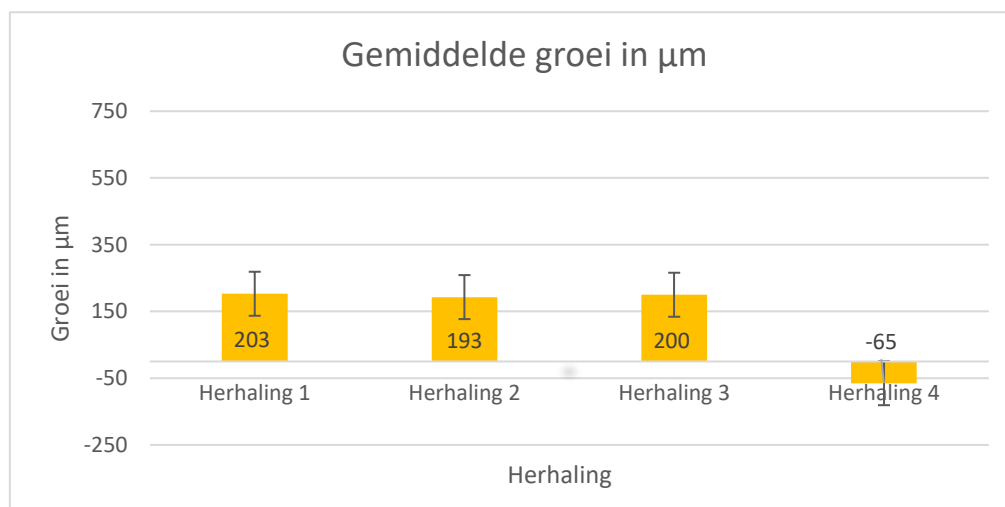
In dit hoofdstuk zal de gevonden data per deelvraag weergegeven worden. De data wordt gepresenteerd in de vorm van tabellen, grafieken en samenvattende statistische maten. Voor de ruwe data, zie bijlage 13.

De gegevens zijn verzameld door alle levende juveniele Diademas uit de flessen te halen en in een vierkante petrischaal met een raster van vierkante centimeters te plaatsen. Hierna werden er met een Olympus camera foto's gemaakt van de verzamelde Diademas. De afmetingen van de juvenielen werden vervolgens bepaald doormiddel van het programma ImageJ. Hierin verschillen deze metingen van de metingen die zijn gedaan bij het opzetten van het experiment, die zijn uitgevoerd met het programma CellSens. Dit verschil in gebruikte programma's is het gevolg van onvoorziene technische problemen omtrent de benodigde hardware.

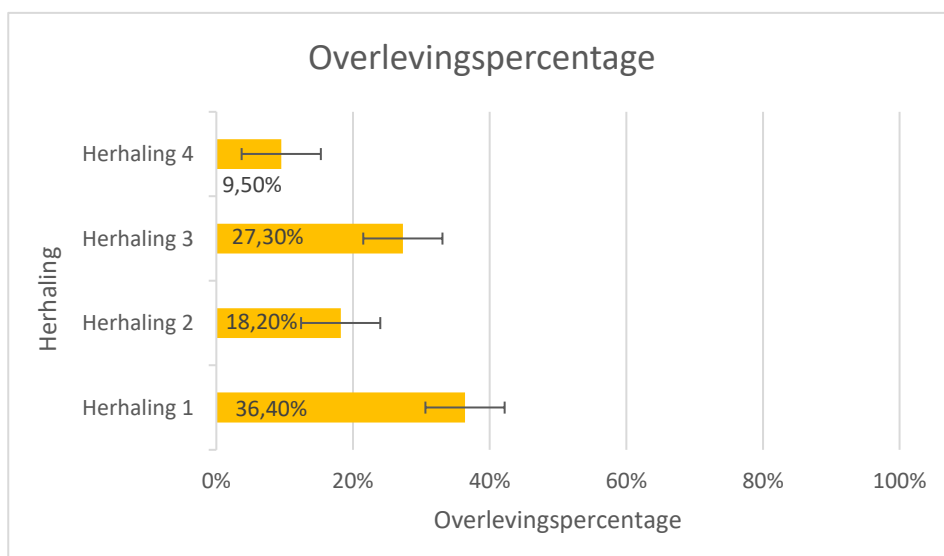
Deelvraag 1: Groeisnelheid en overlevingskansen bij de 10-liter flessen methode

Deze deelvraag kijkt naar de groeisnelheid en overlevingskansen van de juveniele Diadema's die zijn opgekweekt doormiddel van de 10-liter flessen methode, waarbij de larven in suspensie worden gehouden doormiddel van luchtbelletjes.

De gemiddelde groei van alle herhalingen was $133\text{ }\mu\text{m}$ (micron) en de standaarddeviatie van deze groep betreft $132\text{ }\mu\text{m}$. Het gemiddelde overlevingspercentage van deze groep was 22,85% met een standaarddeviatie van 11,59%. Zie bijlage 11 voor de tabel met gemiddelden per herhaling van deze groep.



Figuur 2: Gemiddelde groei in μm per herhaling van de "10-liter flessen" groep

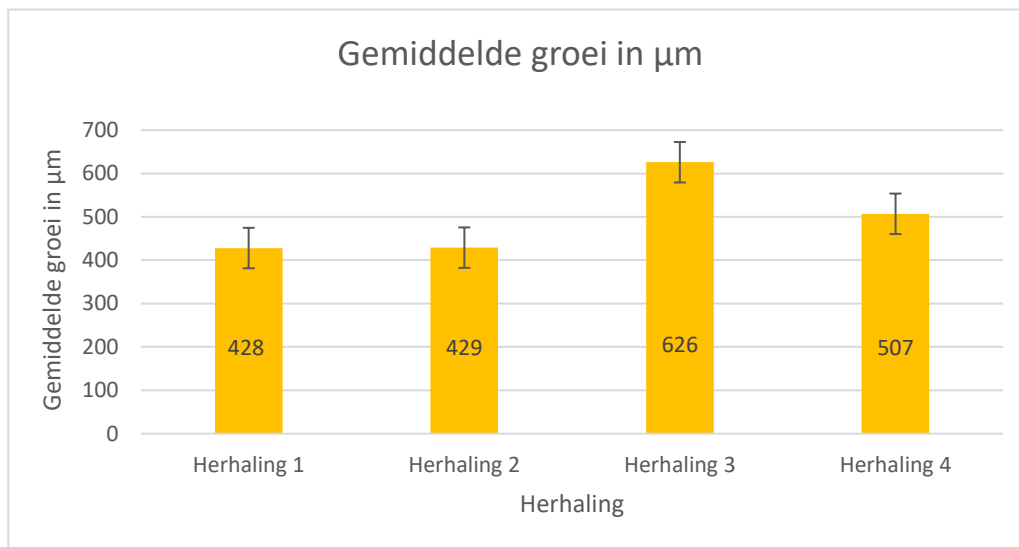


Figuur 3: Gemiddelde overlevingspercentages per herhaling van de "10-liter flessen" groep

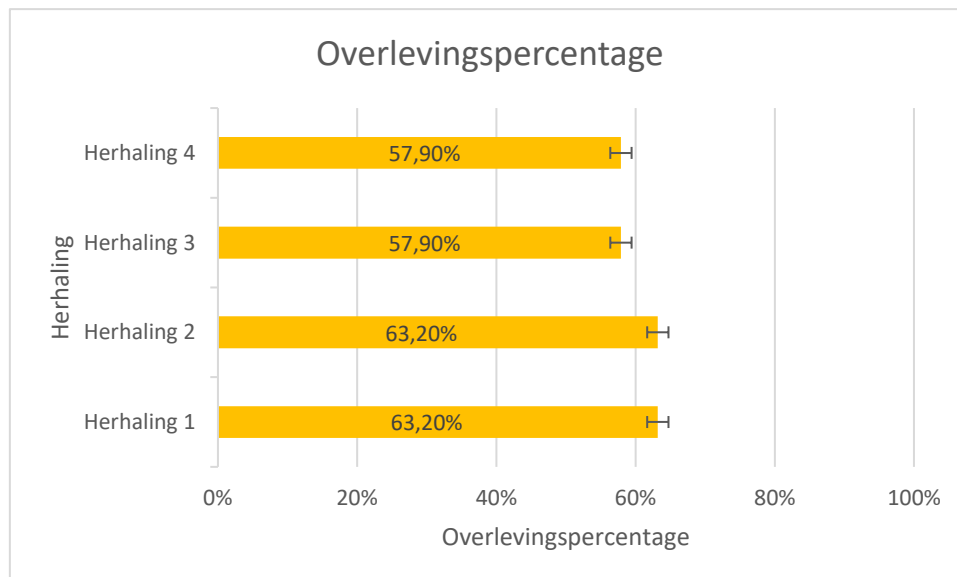
Deelvraag 2: Groeisnelheid en overlevingskansen bij de 1-liter flessen methode

Bij deze deelvraag is gekeken naar de groeisnelheid en overleving van de juveniele Diademas die in 1-liter flessen op schudtafels zijn opgekweekt. De larven die doormiddel van deze methode zijn opgekweekt zijn in suspensie gehouden door de beweging van de schudtafel, wat het belangrijkste verschil tussen de twee groepen maakt.

De gemiddelde groei per herhaling was 498 μm en de standaarddeviatie was 93 μm . Het gemiddelde overlevingspercentage voor deze groep bedroeg 60,55%. De standaarddeviatie hiervoor is 0.03%. zie bijlage 12 voor de tabel met gemiddelden per herhaling van deze groep



Figuur 4: Gemiddelde groei in μm per herhaling van de "1-liter flessen" groep



Figuur 5: Gemiddelde overlevingspercentages per herhaling van de "1-liter flessen" groep

Statistische toets

Om te bepalen of er een significant verschil is tussen de groeisnelheid en overlevingspercentages van de beide groepen is gebruik gemaakt van een t-toets voor ongepaarde steekproeven. Voor de uitvoering van deze toetsen is gebruik gemaakt van het programma RStudio. De α -waarde voor beide toetsen is 0.05. Beide groepen hebben 6 vrijheidsgraden. Voor het uitvoeren van de toetsen is de package “*tidyverse*” gebruikt

Eerst is de t-toets uitgevoerd met de gegevens van de gemiddelde groei voor beide groepen. Hier kwam een p-waarde van 0.004 en een t-waarde van 4,515 uit (zie bijlage 14). De p-waarde ligt lager dan de α -waarde van 0.05, dus kan er gesteld worden dat er tussen de twee groepen een significant verschil bestaat.

Ook voor de gemiddelde overlevingspercentages van beide groepen is een t-toets uitgevoerd. De uitslag van deze toets is een p-waarde van 0.0007 en een t-waarde van 6,29 (zie bijlage 15). Ook hier ligt de p-waarde lager dan de α -waarde en is het verschil tussen de groepen dus significant.

Discussie

In dit hoofdstuk zullen de bij het onderzoek gehanteerde methode en de resultaten bediscussieerd worden. Allereerst zal worden ingegaan op de manier waarop het experiment is opgezet en de data is verzameld. Hierna zal worden ingegaan op de uiteindelijk verzamelde data. Ook zullen de sterke punten van het onderzoek worden belicht.

De doelstelling van dit onderzoek was om duidelijkheid te krijgen over de algemene successen, uitgedrukt in groeisnelheid en overlevingspercentage, van juveniele Diademas die volgens verschillende methoden zijn opgekweekt. De resultaten dienden uitsluitsel te bieden over welke methode het beste gebruikt kon worden voor het opkweken van juveniele Diadema's en zo richting te bieden aan toekomstige pogingen om populaties van de *Diadema Antillarum* te herstellen.

De hoofdlijn van de resultaten van beide deelvragen is dat de juvenielen die opgekweekt zijn doormiddel van de 1-liter flessen methode een aanzienlijk betere overleving en groeisnelheid laten zien dan de juvenielen opgekweekt aan de hand van de 10-liter flessen methode. Het verschil tussen deze twee bleek significant te zijn na een t-toets voor ongepaarde steekproeven.

Vergelijking met data van voorgaande jaren

In augustus 2019 is er op Saba vergelijkbare data verzameld als bij dit onderzoek. Alex Van Der Last heeft toen de groeisnelheid van uit het wild verzamelde juveniele Diadema's gemonitord als onderdeel van zijn afstudeerwerkstuk bij de Saba Conservation Foundation (SCF). Ook is er toen gekeken naar het overlevingspercentage van uit het wild verzamelde individuen. Hieruit is gebleken dat de gemiddelde overleving 58,33% is en de gemiddelde groei na drie weken 1666 μm (zie bijlage 6). Hoewel het percentage overlevende individuen overeenkomt met de 1-liter flessen methode, is de groei velen malen hoger dan beide groepen van dit onderzoek. Dit duidt erop dat de in situ verzamelde individuen een stuk sneller groeien dan de in vitro opgekweekte individuen, maar niet per se een lagere mortaliteit laten zien. Hoewel het verzamelen van in het wild gesettelde Diadema's door deze data alleen als een aantrekkelijke optie kan worden gezien, zijn er meer factoren die meespelen bij het verzamelen van juvenielen uit het wild. Zo is de hoeveelheid gevonden juvenielen sterk afhankelijk van het seizoen en de locatie van de settler traps. Voor vergelijkende figuren tussen de groei en overleving van alle drie de groepen, zie bijlage 7 & 8.

Verloop van het proces

Het experiment is grotendeels verlopen zoals gepland. Het grootste verschil tussen het verloop van het experiment en de originele planning is het feit dat de data van de derde groep (juveniele Diadema's uit het wild) niet als officieel onderdeel van dit onderzoek is verzameld. De data van de derde groep is verzameld in voorgaande jaren en is voor dit onderzoek gebruikt ter vergelijking met de andere twee groepen. De reden hiervoor was een tekort aan in situ verzamelde juvenielen ter gevolg van een sterke afname in de Diadema populaties rond Saba door een sterfte in Maart 2022. Waar er minstens 80 juveniele Diadema's nodig waren voor het opzetten van de derde groep, werden er in de eerste paar maanden na de sterfte zelden meer dan enkele verzameld doormiddel van *settler traps*, artificiële structuren in het water gemaakt om Diadema settlers te verzamelen (zie bijlage 5). Omdat het moeilijk is om op dit soort ingrijpende externe invloeden te anticiperen is het lastig te zeggen hoe dit soort problemen bij toekomstige onderzoeken voorkomen kunnen worden. Wel kan er adequaat op gereageerd worden door bijvoorbeeld onderzoeksplannen aan te passen of uit te stellen. Het voorbereiden en opzetten van de andere twee groepen is echter wel volgens planning verlopen. De gegevens die zijn verzameld voor het onderzoek zijn niet heel talrijk. De reden hiervoor was dat er niet genoeg ruimte noch juveniele Diadema's waren om meer herhalingen op te

zetten. De gegevens die zijn verzameld zijn echter consistent en op tijd verzameld, en dus betrouwbaar.

Methode

De vooraf bepaalde methode is grotendeels aangehouden bij het opzetten van het experiment en het verzamelen van de data. Het enige verschil tussen de planning en het uiteindelijke verloop van het verzamelen van de data is het fotograferen en meten van de juveniele Diadema's bij afloop van het experiment. Bij het opzetten werden de juvenielen gefotografeerd en gemeten met het programma CellSens. Hiervoor werd er een laptop doormiddel van een kabel verbonden aan een camera die een live beeld uitzond van de stereomicroscoop waaronder de juveniele Diadema's bekeken konden worden. Met het bijbehorende programma konden vervolgens foto's worden gemaakt en gemeten. De kabel is echter ter gevolge van aanraking met zout water buiten werking gesteld na de opzet van het experiment. Voor het verzamelen van de data aan het einde van het experiment is daarom een handbediende Olympus camera gebruikt. De daarmee genomen foto's zijn vervolgens gemeten doormiddel van het programma ImageJ. Dit verschil in gebruikte middelen heeft echter geen effect gehad op de betrouwbaarheid van de resultaten.

Tot slot is het van belang om te vermelden dat er met het oog op de geassisteerde herstel van Diadema populaties niet enkel gekeken moet worden naar de in dit onderzoek onderzochte factoren. Hoewel de algemene gezondheid van de geproduceerde juvenielen een belangrijk onderdeel is, zijn er andere, afhankelijk van de omstandigheden even belangrijke factoren die ook in acht genomen moeten worden bij het nemen van een beslissing over de beste methode om juveniele Diadema's op te kweken. In een situatie waar tijd, ruimte en/of kosten een beperkende factor zijn, dient er gekeken te worden naar een vollediger beeld van de beide methoden om tot een goed geïnformeerde beslissing en uiteindelijk de meest geschikte methode te komen. Zie voor een samenvattend figuur over deze factoren bijlage 16.

Conclusies en aanbevelingen

Het onderwerp van deze scriptie is de vergelijking tussen twee methoden voor het opkweken van juveniele *Diadema Antillarum* zee-egels. De methoden zijn vergeleken aan de hand van de algemene gezondheid van de juvenielen, uitgedrukt in groeisnelheid en overlevingspercentage. De doelstelling van dit onderzoek is om uitsluitel te geven over welke methode de gezondste juvenielen produceert en richting te bieden aan toekomstige pogingen om *Diadema* populaties te herstellen.

In dit hoofdstuk zullen de resultaten van het onderzoek overzichtelijk worden weergegeven. Ook zal worden besproken wat deze resultaten betekenen voor het herstel van de *Diadema* populaties.

Deelvragen

Deelvraag 1: Wat is de mate van groeisnelheid en overlevingskans van de juveniele *Diadema*'s die gedurende hun larvale fase in suspensie worden gehouden doormiddel van luchtbellen (10-liter flessen methode)?

Gemiddelde groeisnelheid: 132,75 μm na 4 weken

Gemiddeld overlevingspercentage: 22,85% na vier weken

Deelvraag 2: Wat is de mate van groeisnelheid en overlevingskans van de juveniele *Diadema*'s die gedurende hun larvale fase in suspensie worden gehouden doormiddel van een schudtafel (1-liter flessen methode)?

Gemiddelde groeisnelheid: 497,50 μm na 4 weken

Gemiddeld overlevingspercentage: 60,55% na vier weken

Hoofdvraag

Welke methode van opkweken (10-liter flessen of 1-liter flessen) produceert juveniele *Diadema Antillarum* met het hoogste overlevingspercentage en de beste groei?

De resultaten van de deelvragen zijn geanalyseerd met behulp van het programma RStudio. Na het uitvoeren van een t-toets voor ongepaarde steekproeven is gebleken dat er een significant verschil bestaat tussen de twee groepen voor zowel de groeisnelheden als de overlevingspercentages. Er kan dus geconcludeerd worden dat de 1-liter flessen methode juveniele *Diadema Antillarum* produceert met het hoogste overlevingspercentage en de beste groei.

Relevantie

Deze resultaten wijzen erop dat er een degelijk verschil zit tussen de successen van de beide methoden. Deze resultaten, in combinatie met andere factoren die relevant zijn bij het opzetten van een kweek voor *Diadema Antillarum* kunnen gebruikt worden voor het kiezen van de meest geschikte methode van opkweken met oog op herstel van populaties van deze soort. Voor een geassisteerde terugkeer van deze soort in het wild kan er namelijk voor gekozen worden om de natuurlijke populatie aan te sterken met in vitro opgekweekte individuen. De resultaten van dit onderzoek wijzen uit dat het in zo'n geval uitmaakt welke methode hiervoor wordt gebruikt.

Aanbevelingen

Aan de hand van de resultaten van het onderzoek wordt aanbevolen dat er, gekeken naar de algemene gezondheid van de geproduceerde juvenielen, gebruik wordt gemaakt van de 1-liter flessen methode bij het opkweken van *Diadema Antillarum*. Naast gezondheid alleen is het echter ook

belangrijk om andere factoren zoals de beschikbare hoeveelheid tijd, geld en ruimte in acht te nemen bij het maken van een beslissing over de ideale kweekmethode.

Voor vervolgonderzoek wordt aanbevolen dat er zo mogelijk grotere groepen met meer herhalingen worden ingezet om het onderzoek meer kracht bij te zetten. Daarnaast wordt er geadviseerd om de controlegroep als onderdeel van het onderzoek op te zetten en hiervoor niet data van voorgaande jaren te gebruiken. Hoewel data van voorgaande jaren in dit onderzoek gebruikt kon worden is dit niet altijd het geval en is data die als deel van het lopende onderzoek verzameld wordt over het algemeen betrouwbaarder om mee te werken.

Bronnen

- Atkinson, M. J., & Grigg, R. W. (1984). Model of a coral reef ecosystem. *Coral Reefs*, 3(1), 13-22.
- Bak, R. P. M., Carpay, M. J. E., & De Ruyter Van Steveninck, E. D. (1984). Densities of the sea urchin *Diadema antillarum* before and after mass mortalities on the coral reefs on Curacao. *Marine ecology progress series. Oldendorf*, 17(1), 105-108.
- Contreras-Silva, A. I., Tilstra, A., Migani, V., Thiel, A., Pérez-Cervantes, E., Estrada-Saldívar, N., Elias-Ilosvay, X., Mott, C., Alvarez-Filip, L. & Wild, C. (2020). A meta-analysis to assess long-term spatiotemporal changes of benthic coral and macroalgae cover in the Mexican Caribbean. *Scientific reports*, 10(1), 1-12.
- Cortés, J., & Jiménez, C. (2003). Past, present and future of the coral reefs of the Caribbean coast of Costa Rica. In *Latin American coral reefs* (pp. 223-239). Elsevier Science.
- Hughes, T. P. (1994). Catastrophes, phase shifts, and large-scale degradation of a Caribbean coral reef. *Science*, 265(5178), 1547-1551.
- Hylkema, A., Debrot, A. O., Pistor, M., Postma, E., Williams, S. M., & Kitson-Walters, K. (2022). High peak settlement of *Diadema antillarum* on different artificial collectors in the Eastern Caribbean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 549, 151693.
- Kalam Azad, A., McKinley, S., & Pearce, C. M. (2010). Factors influencing the growth and survival of larval and juvenile echinoids. *Reviews in Aquaculture*, 2(3), 121-137.
- Lessios, H. A., Robertson, D. R., & Cubit, J. D. (1984). Spread of *Diadema* mass mortality through the Caribbean. *Science*, 226(4672), 335-337
- Lessios, H. A. (1988). Mass mortality of *Diadema antillarum* in the Caribbean: what have we learned?. *Annual review of ecology and systematics*, 19(1), 371-393.
- Lessios, H. A. (2016). The great *Diadema antillarum* die-off: 30 years later. *Annual review of marine science*, 8, 267-283.
- Mora, C. (2008). A clear human footprint in the coral reefs of the Caribbean. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275(1636), 767-773.
- Mos, B., Cowden, K. L., Nielsen, S. J., & Dworjanyn, S. A. (2011). Do cues matter? Highly inductive settlement cues don't ensure high post-settlement survival in sea urchin aquaculture. *PLoS One*, 6(12), e28054.
- Pilnick, A. R., O'Neil, K. L., Moe, M., & Patterson, J. T. (2021). A novel system for intensive *Diadema antillarum* propagation as a step towards population enhancement. *Scientific reports*, 11(1), 1-13.
- Primeur in Leeuwarden: deze zee-egels moeten het koraalrif gaan redden. (24 Maart 2021) *Hart van Nederland*. Geraadpleegd op 25/04/2022 van <https://www.hartvannederland.nl/nieuws/opmerkelijk/leeuwarden-zee-egels-koraalrif-redden>
- Riegl, B., Bruckner, A., Coles, S. L., Renaud, P., & Dodge, R. E. (2009). Coral reefs: threats and conservation in an era of global change. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1162(1), 136-186.
- Sammarco, P. W. (1982). Echinoid grazing as a structuring force in coral communities: whole reef manipulations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 61(1), 31-55.
- Williams, S. M. (2022). The reduction of harmful algae on Caribbean coral reefs through the reintroduction of a keystone herbivore, the long-spined sea urchin *Diadema antillarum*. *Restoration Ecology*, 30(1), e13475.

Bijlagen

Bijlage I: Protocol voor het tellen van algen en het toedienen van de correcte hoeveelheid algenculture aan de larvenculture

Protocol: Microalgal cell counting & feeding

Materials

- Algae solution
- Bürker and turk / Haemocytometer
- Microscope
- Iodine
- ASW (artificial seawater)
- 50 ml bottle / vial
- VWR tube 50 ml
- 1 ml pipet with pipet tips
- Click counter

Iodine solution preparation

To dilute the algal sample and stop the cells from moving you need to have an iodine solution.

1. Take a 50 ml vial and fill it to ~45 ml with ASW
2. Add 5-6 drops of iodine solution to the ASW
3. Gently mix the solution
4. You should now have a yellow/brownish solution you can use to dilute your algal sample

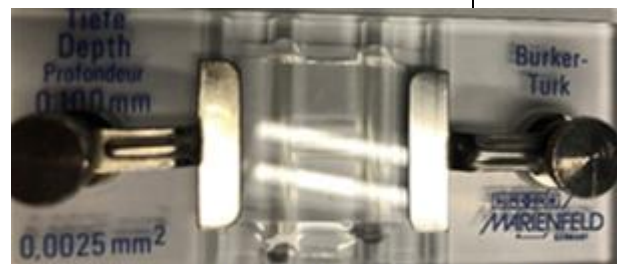
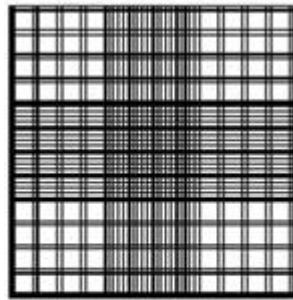


Figure 1: Haemocytometer with cover glass, fully filled with diluted algal sample

Method

1. Clean the surface you are working on, preferably with 70% alcohol
2. Remove the cap of the culture and place it on a clean surface or hold it in your hand, making sure it does not touch anything
3. Pour some of the culture in a new small bottle
4. Take the 1 ml pipet and pipet 1 ml into a 50 ml vial.
5. Dilute the sample depending on the density of the culture, light color 1:2, normal 1:4, dark 1:8 (most often). For example, to make a 1:4 dilution, add 3 ml iodine solution to 1 ml algal culture
6. Prepare the haemocytometer by covering the grid with the cover glass



SV210

Figure 2: Counting grid, the haemocytometer has two of this grids

a.

5. Take a homogeneous sample from your diluted algal sample with a 1 ml pipet and fill the counting chamber until the cover glass is fully filled (Fig 1)
6. Place the haemocytometer under a microscope with a 40x magnification and sharpen until the grid in Fig 2 is visible. There are two of these grids on the haemocytometer with each 4 chambers with 16 cells (4x4).
7. Count 25 squares of one grid (top or bottom) by counting all algal cells with the click counter within a cell and the adjacent top and left bar of each square, cells that touch the line are counted.
! For example count 6 grids in each chamber and one extra in the last 4x4 chamber (4x6+1=25 cells) !
8. Repeat step 9 for the other grid on the haemocytometer
9. Fill the two countings and the dilution that was used in the provided excel sheet. What the excel calculates for you is:

- Average the counting of the two grids
- The average is multiplied by 10.000 and multiply by the dilution used. This results in the number of cells per ml of algal sample.
! For example 80 was counted in the top grid and 100 in the bottom grid, a dilution of 1:4 was used. This results in (90 (average of 80 and 100)x10000x4=3.6 million cells per ml !
- Volume in the bottle containing the larvae can be filled in. The excel sheet then calculates how much mL of algal solution needs to be added in order to reach a concentration of 15.000, 30.000 or 45.000, depending on the age of the larvae. This is calculated with: mL algal solution needed = (volume larvae bottle * algae concentration goal dependent on larvae age) / calculated algae cells per mL

For example: mL algal solution needed for 500 larvae of <3 DPF (15000 algae concentration) = (500 * 15000) / 3600000

Feeding

Materials

- Algae sample
- "Rhodomonas cell count calculator" excel sheet

- Pipet 10 ml

Methods

1. Calculate feeding amount in excel sheet by noting down the 2 counting's and the dilution.
1. Add the amount needed to each bottle with the pipet from the algae sample. !!! *Do not take the algae from the cultivation bottles, always from a sample that is poured into another bottle !!!!*

Bijlage II: Protocol voor het schoonmaken van de 1-liter flessen

Protocol: Cleaning 1-litre bottles

Materials

- Sterile 60 ml pipet with balloon
- Clean 1L bottles
- Filter (53, 120 or 250 micron, depending on size of the larvae)
- Yoghurt cup
- Small squeeze pipet
- Small squeeze pipet with large opening (top cut off)
- ASW (artificial seawater)
- Dishwash tray
- Big bucket

Method

1. Gently swirl the bottle to get the larvae of the bottom
2. If you can clearly see big lumps of debris floating in the water, try and remove these with the 60 ml pipet
3. Put your filter (53, 110 or 250 micrometres, size depending on the size of the larvae, they should not go through) in a dishwash tray
4. Gently swirl the bottle and slowly empty in the filter, check if the bottle is empty and no larva are left behind. If some are left behind use some fresh artificial seawater (ASW) to rinse them out of the bottle.
5. Use the small squeeze pipet to remove any debris such as fibres, excrement's, hairs and foam.
6. Pick up the filter and gently rinse with fresh ASW
7. Put the filter up side down on a clean yoghurt cup.
8. Gently rinse ASW over the filter to wash the larvae of the filter.
9. From the yoghurt cup pour the larvae into a clean bottle. Add ASW until the bottle is filled with 500 ml of ASW

10. If any larva are stuck on the filter, put the filter back in the dishwash tray with sea water and carefully take them out with your small squeeze pipet with large opening (creating a flow might help) and pipet them in the clean bottle.
11. Double check if any larva are in the dishwash tray, filter or dirty bottle and if so, pipet them in the clean bottle
12. Dispense of the dirty water in the big bucket
13. Repeat for all of the bottles until all of them are cleaned.
14. Note down bottle number, DPF and date on the bottle.

Bijlage III: Protocol voor het schoonmaken van de bolvormige 10-liter flessen

Cleaning the big bottles

Materials

- 4 buckets of filtered artificial seawater (ASW)
- An empty bucket
- A 53 micron filter

- Depending on the size of the larvae, a 120 or 250 micron filter
- A funnel
- Dish soap
- A rubber brush
- A big white container

- A 20 litre bucket
- A 1 litre bottle
- A yoghurt cup
- A tray of ozone water
- A buddy

Making filtered ASW

- Have a buddy hold the 53 micron filter over the empty bucket
- Pour the ASW from the grey container on the roof of the SCF office over the filter and into the empty bucket
- Once filtered, put the seawater inside the container and cover with a lid to prevent debris from blowing in

Cleaning: step by step

1. Make sure all larvae are in suspension by putting the aeration on high and bringing the glass aeration tube over the bottom a few times
2. Disconnect the bottle from the aeration, put the lid and the glass aeration tube in the dirty dishes tray
3. Put the 120 or 250 micron filter in a funnel and have a buddy hold it over the 20 litre bucket
4. Carefully pour the contents of the bottle over the filter and into the white container, to make sure no larvae are left behind in the bottle, sway the bottle a few more times before completely emptying it
5. When empty, fill the bottle with a little filtered ASW and sway a few times before emptying it again in order to make sure all of the contents of the bottle are poured over the filter
6. When all of the larvae are laying on the filter, use a small pipet to remove any debris till floating around on the filter. When you are doing this, a buddy can wash the big bottle (see cleaning bottles protocol)
7. Once clean, fill the big bottle about halfway to the neck with the filtered ASW
8. Once finished with cleaning out the last debris from the filter, flip the filter over and put the filter and funnel over the clean (half-filled) bottle
9. Fill a yoghurt cup with some filtered seawater and use this to pour the larvae from the filter into the newly cleaned big bottle.
10. Screw the lid back on and put the aeration tube back in
11. Write the number of the bottle, the amount of larvae (per ML), the DPF and the date on the bottle Put the used filters and funnels in the ozone water
12. Repeat step 1-11 until for all of the big bottles

Bijlage IV: Protocol voor het maken van ASW

Protocol: making new artificial sea water (ASW)

Materials

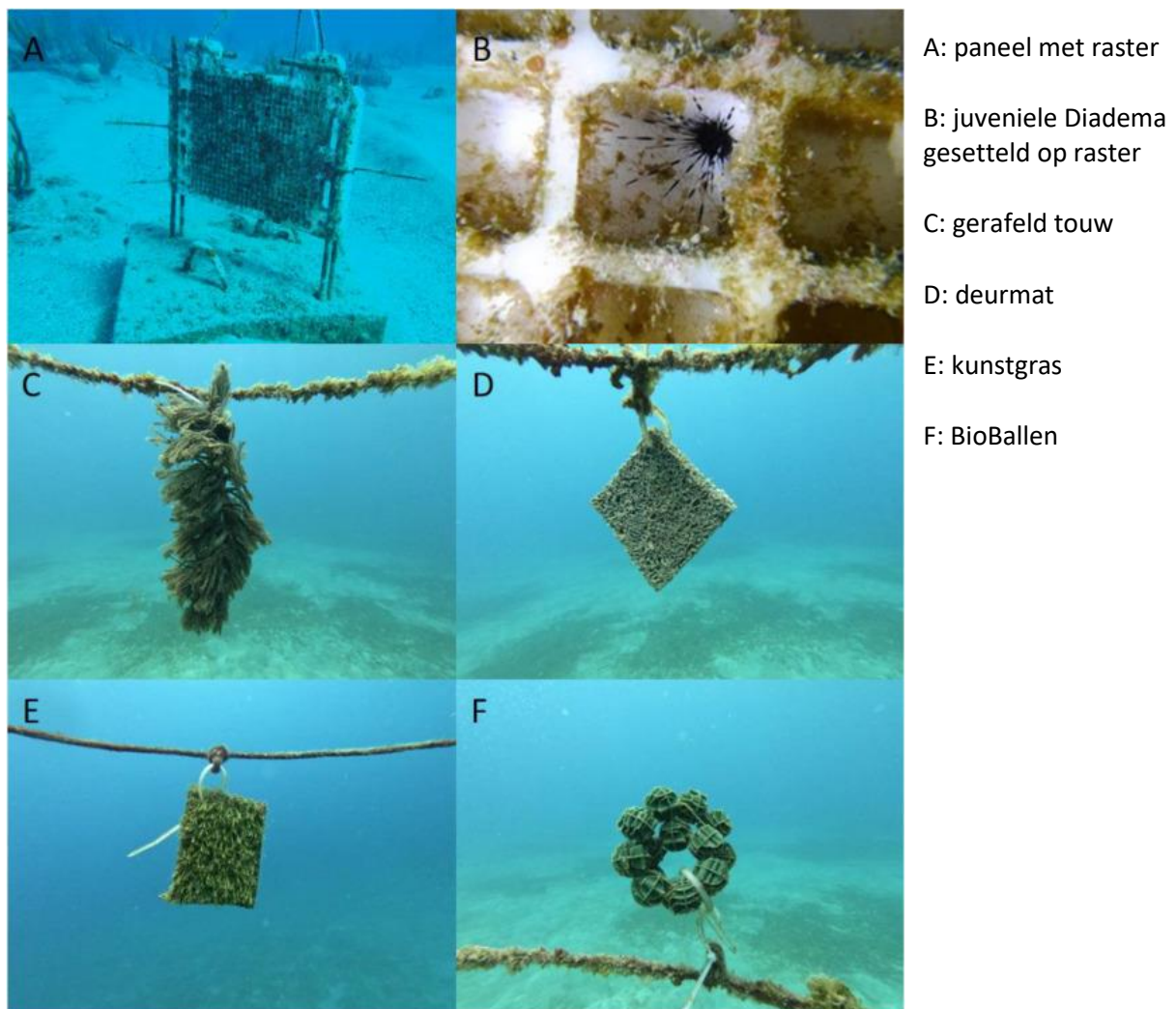
- Artificial sea salt
- Bottled drinking water (5L bottles)
- Vinegar
- Weighing scale
- Measuring cup

Prepare ASW at least 2 days prior to use to make sure 100% of the salt is dissolved, not damaging the larvae.

Methods

1. Make sure there is no white (calcareous) residue on the bottom of the big containers. If so add a little bit of vinegar and let sit for 15 minutes. Swirl 30 seconds. Pour out. Rinse with water 4 times.
2. Weigh 400 grams of artificial sea salt.
3. Add one bottle of water (5L) to the container.
4. Add the 400 gram artificial sea salt to the container.
5. Add the second bottle of water (5L) to the container.
6. Shake and swirl for one minute.
7. Check if all salt is dissolved, if not repeat shaking until all salt is dissolved

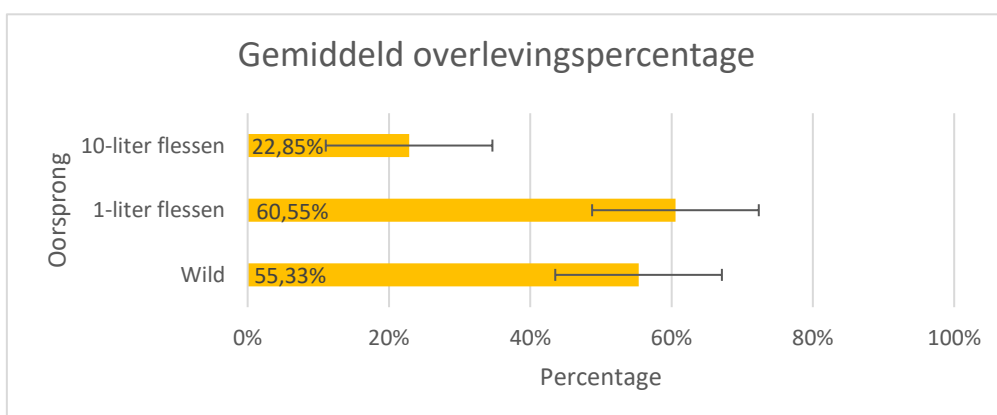
Bijlage V: Voorbeeld van verschillende settler traps. Bron: Alwin Hylkema



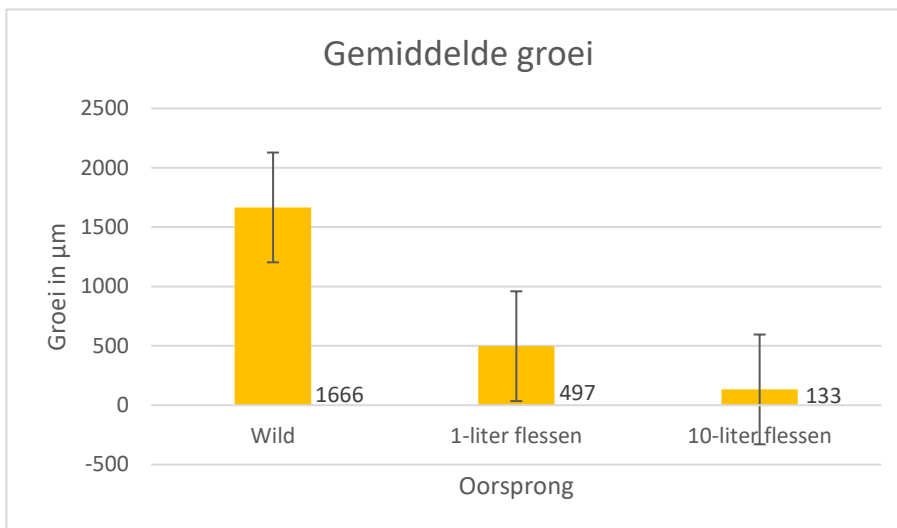
Bijlage VI: Samenvattende tabel van gegevens over de Groeisnelheid en overlevingspercentages verzameld in Augustus 2019. Maten zijn in μm

OORSPRONG	OVERLEVINGSPERCENTAGE	GEM. DIAMETER BEGIN EXPERIMENT	GEM. DIAMETER EIND EXPERIMENT	GEM. GROEI
In situ verzameld	55,88 %	989	2654	1666

Bijlage VII: Gemiddelde overlevingspercentages van alle oorsprongen



Bijlage VIII: Gemiddelde groei van alle oorsprongen



Bijlage IX: 1-liter flessen methode: larven opkweken met behulp van flessen op een schudtafel of schudstoof



Bijlage X: 10-liter flessen methode: larven opkweken met behulp van bolvormige flessen waar lucht in word gepompt voor de waterverplaatsing



Bijlage XI: Tabel van de gemiddelde groei en overlevingspercentages per herhaling van de “10-liter flessen” groep

HERHALING	OVERLEVINGSPERCENTAGE	GEM. DIAMETER BEGIN EXPERIMENT	GEM. DIAMETER EIND EXPERIMENT	GEM. GROEI
1	36,4%	617	821	203
2	18,2%	623	816	193
3	27,3%	622	822	200
4	9,5%	608	543	-65

Bijlage XII: Tabel van de gemiddelde groei en overlevingspercentages per herhaling van de “1-liter flessen” groep

HERHALING	OVERLEVINGSPERCENTAGE	GEM. DIAMETER BEGIN EXPERIMENT	GEM. DIAMETER EIND EXPERIMENT	GEM. GROEI
1	63,2%	646	1074	428
2	63,2%	666	1095	429
3	57,9%	673	1299	626
4	57,9%	670	1177	507

Bijlage XIII: Tabel van de grootte en aantallen van de juveniele Diadema’s na afloop van het experiment. 1LB: opgekweekt volgens de 1-liter flessen methode. BB: opgekweekt volgens de 10-liter flessen methode

	Urchin #	Diameter in μm
BB 1	1	1398
BB 1	2	1237
BB 1	3	920
BB 1	4	538
BB 1	5	595
BB 1	6	664

BB 1	7	618
BB 1	8	595
BB 2	1	1305
BB 2	2	586
BB 2	3	699
BB 2	4	674
BB 3	1	907
BB 3	2	977
BB 3	3	541
BB 3	4	1213
BB 3	5	568
BB 3	6	724
BB 4	1	600
BB 4	2	486
1LB 1	1	1596
1LB 1	2	1421
1LB 1	3	1489
1LB 1	4	1653
1LB 1	5	1004
1LB 1	6	788
1LB 1	7	1245
1LB 1	8	989
1LB 1	9	810
1LB 1	10	498
1LB 1	11	747
1LB 1	12	650
1LB 2	1	1992
1LB 2	2	1776
1LB 2	3	1548
1LB 2	4	674
1LB 2	5	1175
1LB 2	6	770
1LB 2	7	1014
1LB 2	8	747
1LB 2	9	1224
1LB 2	10	670
1LB 2	11	760
1LB 2	12	786
1LB 3	1	1328
1LB 3	2	1700
1LB 3	3	2090
1LB 3	4	2173
1LB 3	5	626
1LB 3	6	976
1LB 3	7	1644
1LB 3	8	1488

1LB 3	9	827
1LB 3	10	705
1LB 3	11	731
1LB 4	1	1005
1LB 4	2	1505
1LB 4	3	1518
1LB 4	4	1340
1LB 4	5	1127
1LB 4	6	1182
1LB 4	7	1383
1LB 4	8	1594
1LB 4	9	812
1LB 4	10	789
1LB 4	11	692

Bijlage XIV: t-toets voor ongepaarde steekproeven, uitgevoerd door RStudio met de gegevens van de gemiddelde groei in micrometer per groep.

```
Two Sample t-test

data: Diameter by Group
t = 4.515, df = 6, p-value = 0.004039
alternative hypothesis: true difference in means between group 1-litre bottles and group Big Bottles is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 167.0722 562.4278
sample estimates:
mean in group 1-litre bottles      mean in group Big Bottles
          497.50                  132.75
```

Bijlage XV: t-toets voor ongepaarde steekproeven, uitgevoerd door RStudio met de gegevens van de gemiddelde overlevingspercentages per groep.

```
Two Sample t-test

data: Survival by Group
t = 6.2881, df = 6, p-value = 0.0007531
alternative hypothesis: true difference in means between group 1-litre bottles and group Big Bottles is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 0.2302975 0.5237025
sample estimates:
mean in group 1-litre bottles      mean in group Big Bottles
          0.6055                  0.2285
```

Bijlage XVI: Vergelijkend figuur over de verschillende aspecten van beide methoden. Alle cijfers zijn op basis van een kweek van 6 weken (gemiddelde tijd tot competentie voor een *Diadema Antillarum* larve). Bron: Adviesrapport afstudeerstage K. Veenstra, 2022.

Methode	Kosten	Tijd	Energieverbruik	Ruimteverbruik (per schudtafel/schudstoof/10-liter fles)
1-liter flessen methode (bij gebruik van schudstoven)	€10.677,-	62 uur	27,26 kWh	0.57 M ²
1-liter flessen methode (bij gebruik schudtafels)	€2.677,-	62 uur	296,06 kWh	0.22 M ²
10-liter flessen	€900,-	59 uur	27,26 kWh	0.09 M ²

Bijlage XVII: Enkele bolfles

