

Jaarrapport Monisnel 2001

Rapport RIKZ/2002.045

Auteurs:

L. Peperzak

H. Bouma

A. Sandee

H. Peletier

INHOUD

	pagina
Samenvatting	4
1 Inleiding	5
2 Monitoring	
2.1 Abiotische gegevens 2001	6
2.2 Biotische gegevens 2001	11
3 <i>Phaeocystis</i>: mosselsterfte en andere problemen	
3.1 Mosselsterfte en Monitoring	15
3.2 Toxische H ₂ S concentraties	25
3.3 Zwemwaterkwaliteit	27
4 Detectie plaagalgen	
4.1 rRNA probes	29
4.2 Elektronenmicroscopie (EM)	30
5 <i>Pseudo-nitzschia</i>'s in het Nederlandse kustwater	
5.1 Inleiding	31
5.2 Soorten in kustwater van Nederland	32
5.3 Groei	32
5.4 Toxineproductie (domoïzuur, DA)	33
5.5 Effecten op macrofauna	35
6 HABs and HAB species	
6.1 Inleiding	36
6.2 <i>Coolia monotis</i>	37
6.3 <i>Prymnesium</i>	38
7 Projectvoortgang	
7.1 Stand van zaken	40
7.2 (Inter)-nationale contacten	40
8 Referenties	41
bijlagen:	
I. Nederlandse inbreng LifeHAB workshop 2002	
II. Schelpdierversoefingen in Europa (1991-2000)	

SAMENVATTING

Na een aantal rustige plaagalgenjaren viel 2001 uit de toon met een zeer grote *Phaeocystis*-voorjaarsbloeï in de Nederlandse kustwateren en, voor het eerst in meer dan 10 jaar werd in de Waddenzee 's zomers DSP gemeten (Diarrhoeic Shellfish Poisoning).

De *Phaeocystis*-bloeï leidde tot versnelde zuurstofloosheid in het Grevelingenmeer en een massale mosselsterfte in de Oosterschelde: 10 miljoen kg schelpdieren ter waarde van € 20 miljoen. Een nieuw fenomeen was het stilleggen van baggerwerkzaamheden in de IJmuidense buitenhaven nadat de opgebaggerde *Phaeocystis*-slurrie leidde tot toxische H₂S concentraties aan boord van de hopperzuiger. 's Zomers werd bij Hoek van Holland een nieuw wereldrecord gevestigd met 4 miljard *Phaeocystis* cellen per liter, 40x de concentratie van de voorjaarspiek. Deze zomerbloeï veroorzaakte overlast voor de badgasten. De problemen met *Phaeocystis* worden in een apart hoofdstuk behandeld. Een belangrijke factor bij alle *Phaeocystis*-bloeïen was de hoge afvoer van geëutrofeerd rivierwater.

De mosselen in de Waddenzee waren giftig geworden (DSP) door een bloei van *Dinophysis acuminata*. Deze bloei, die voor het eerst gesignaleerd werd voor de Hollandse kustzone, werd veroorzaakt door zoutstratificatie en warm zomers weer. Deze combinatie van abiotische factoren kan bij de verwachte klimaatverandering in deze eeuw vaker gaan voorkomen. In 2002 is het effect van zoutstratificatie en hoge watertemperaturen op plaagalgen nader onderzocht.

De problemen met de diverse plaagalgen in 2001 onderstrepen het belang van een snelle monitoring. Daarnaast dient specifieke kennis van de verschillende soorten plaagalgen en van de veldomstandigheden voor handen te zijn om het verloop van bloeïen, en de daar aan verbonden risico's, te kunnen voorspellen. Belangrijk hierbij is bovendien de samenwerking met collega instituten in Nederland, als ook de internationale contacten die leiden tot een versnelde kennisuitwisseling.

1 Inleiding

.....

Doelstellingen:

Het project Monisnel van het RIKZ heeft twee doelstellingen:

a. Monitoring en Advisering: het (snel) rapporteren en advies geven over het vóórkomen, bestrijden en voorkómen van bloeien van plaagalgen aan de opdrachtgevers, regionale Rijkswaterstaat Directies (RD's).

Hiervoor worden plaagalgen in de Oosterschelde en de Grevelingen, de Voordelta en de Noordzee gemonitord. Met andere woorden, we houden de "vinger aan de pols". Ten behoeve van de monitoring worden detectietechnieken verbeterd; ten behoeve van de advisering worden stuurvariabelen en andere (literatuur)-kennis over plaagalgen verzameld en bewerkt. Dit tweede onderdeel is de "kennis- en techniekontwikkeling". Zowel de monitoring als de kennis- en techniekontwikkeling wordt gefinancierd door de opdrachtgevers als capaciteit (PMA) en als uitbestedingsgeld.

b. Kennisontwikkeling Plaagalgen. Monisnel verzamelt en ontwikkelt binnen het RIKZ kennis over plaagalgen. Dit betekent dat de vaardigheden en kennis die worden opgedaan, en van belang zijn voor geheel RWS, op één plaats snel en continu beschikbaar zijn. Binnen het RIKZ wordt er daarom samengewerkt met en geadviseerd aan de afdelingen AB en IT op het gebied van monitoring, eutrofiëring en plaagalgen, inrichting, primaire productie, graadmeterontwikkeling, biodiversiteit en internationale samenwerking. De benodigde capaciteit voor de interne samenwerking wordt opgebracht door de betreffende RIKZ-projecten.

Rapportages:

De rapportage aan de RD's vond in het jaar 2001 schriftelijk plaats. Tijdens het groeiseizoen werden tweewekelijks rapporten verstuurd.

Belangrijke onderdelen in dit Jaarrapport 2001 zijn de abiotische en biotische gegevens van het afgelopen jaar; methoden om plaagalgen te detecteren en de ecologische effecten van de toxische alg *Pseudo-nitzschia multiseries*. Daarnaast wordt informatie gegeven over de levenscycli van twee plaagalgen in Europa; *Coolia monotis* in het Grevelingenmeer; de identiteit van de Nederlandse visdoder *Prymnesium*; (inter)-nationale samenwerking met onder meer Europese overzichtskaarten van DSP, PSP, ASP en AZA in de jaren 1991-2000.

In 2004 zal de in de Jaarrapporten gepresenteerde informatie worden verwerkt in de tweede nota "Plaagalgen in de Noordzee".

2 Monitoring

2.1 Abiotische gegevens 2001

De abiotische gegevens van de monitoring locaties TS135 (135 km uit de kust van Terschelling), NW10 (10 km uit de kust van Noordwijk), OS140 (Oosterschelde), Scharendijke (SCHDK, Grevelingen) en Goeree 6 (GR6, uitstroom Haringvliet) worden in deze paragraaf beschreven. De minimum en de maximum waarden van de abiotische variabelen op de verschillende locaties worden gepresenteerd in Tabel 2.1.1. Alhoewel er duidelijke seizoentrends in deze variabelen zijn te vinden, blijken er ook duidelijke verschillen tussen de monitoringpunten. Deze verschillen vormen de basis voor het verklaren van de variaties in plaagalgenvloeien.

De temperatuur van het oppervlaktewater steeg op alle locaties van eind februari tot eind augustus, waarna de temperatuur snel zakte (Fig. 2.1.1). De hoogste temperatuur van het oppervlaktewater werd waargenomen in de Grevelingen (22 °C), terwijl de maximum temperatuur op TS135 het laagst bleef (17 °C, zie ook Tabel 2.1.1). Op TS135 en SCHDK was de waterkolom gedurende de zomer gestratificeerd.

De saliniteit aan de oppervlakte was het hoogst en het meest constant op TS135 (Fig. 2.1.2). Het zoutgehalte op NW10 was het meest variabel (zie ook Tabel 2.1.1), wat kan worden verklaard door de variabele instroom van zoet water vanuit de Rijn. Van week 16 t/m week 20 (half april – half mei) was het zoutgehalte op SCHDK, OS140 en GR6 lager dan in de rest van het jaar.

De pH van het zeewater was op alle locaties vrijwel het hele jaar hoger dan 8 (Fig. 2.1.3). De hoogste waarde werd gemeten op SCHDK (in week 18, begin mei) en bedroeg 8.7 (zie ook Tabel 2.1.1). In dezelfde week was de pH op NW10 ook hoog en bedroeg 8.6.

Het zuurstofgehalte aan het oppervlak vertoonde op NW10 een opvallende piek in week 24 en 25 (tweede helft juni), toen waarden van respectievelijk 12 en 11 mg/liter werden gemeten (Fig. 2.1.4). Het laagste zuurstofgehalte aan de oppervlakte was 5 mg/liter, gemeten op SCHDK in week 28 (half juni).

Het zuurstofgehalte bij de bodem is routinematig gemeten op TS135, NW10 en GR6. Tijdens een periode van stratificatie zijn ook op SCHDK nabij de bodem metingen verricht (Fig. 2.1.5). Terwijl de concentratie op TS135 een geleidelijk verloop vertoont, was het verloop op NW10 en GR6 grillig. Op SCHDK was het zuurstofgehalte in de onderste waterlaag zeer laag (<0.1 mg/l) gedurende de periode half mei - eind augustus (week 15 –30).

De hoogste DIN (Dissolved Inorganic Nitrogen) concentratie in de winter werd gemeten op NW10 (79 $\mu\text{mol/liter}$), gevolgd door respectievelijk GR6 (65 $\mu\text{mol/liter}$), SCHDK (58 $\mu\text{mol/liter}$), OS140 (54 $\mu\text{mol/liter}$) en als laatste TS135 (7 $\mu\text{mol/liter}$) (Fig. 2.1.6 en Tabel 2.1.1). Zoals gebruikelijk was de concentratie in de zomer op alle locaties laag. Een uitzondering hierop vormt week 27 (begin juli) op NW10, toen een concentratie van 27 $\mu\text{mol/liter}$ werd gemeten, een waarde die significant hoger is dan het maandgemiddelde.

De hoogste DIP (Dissolved Inorganic Fosforzuur) concentratie in de winter was op NW10, OS140, SCHDK en GR6 vergelijkbaar en bedroeg circa 1,3 $\mu\text{mol/liter}$ (Fig. 2.1.7 en Tabel 2.1.1). Op TS135 werd een winterconcentratie van 0,6 $\mu\text{mol/liter}$ gemeten. De concentratie daalde in het voorjaar op alle locaties naar vrijwel nul. Opvallend was de hoge DIP concentratie op SCHDK in de weken 22 en 24 (eind mei – half juni), toen respectievelijk 0,7 $\mu\text{mol/liter}$ en 1,1 $\mu\text{mol/liter}$ gemeten werd

De hoogste silicium concentratie in de winter was op NW10, OS140 en SCHDK vergelijkbaar en bedroeg circa 30 $\mu\text{mol/liter}$ (Fig. 2.1.8 en Tabel 2.1.1). De hoogste concentratie op GR6 was iets lager (24 $\mu\text{mol/liter}$), terwijl de winterconcentratie op TS135 laag was (5 $\mu\text{mol/liter}$). Met uitzondering van enkele pieken (NW10 week 17, GR6 week 19) was de concentratie in het voorjaar op alle locaties laag. Vanaf week 26 (eind juni) steeg de silicium concentratie weer op alle locaties, behalve TS135.

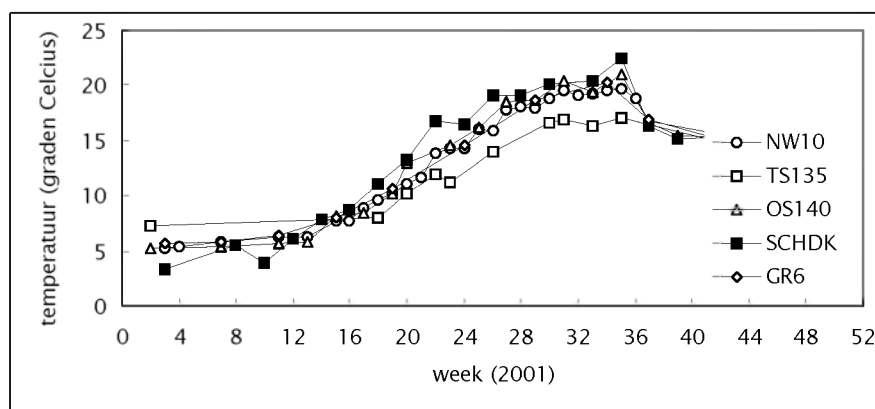


Fig. 2.1.1. Watertemperatuur (°C), oppervlakte, 2001.

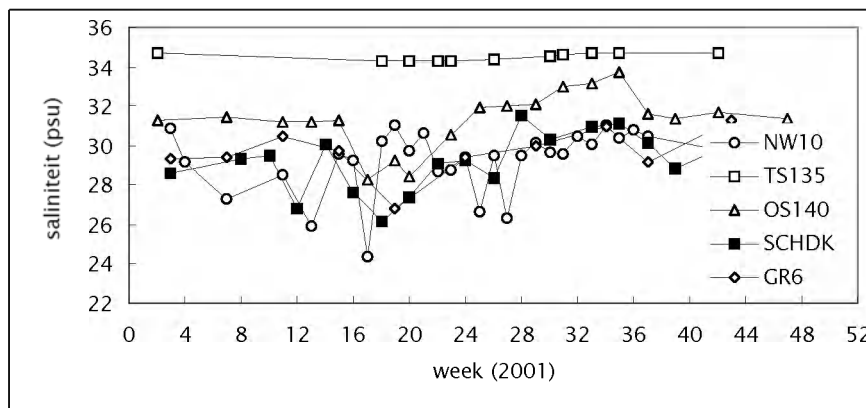


Fig. 2.1.2. Saliniteit (psu), oppervlakte, 2001.

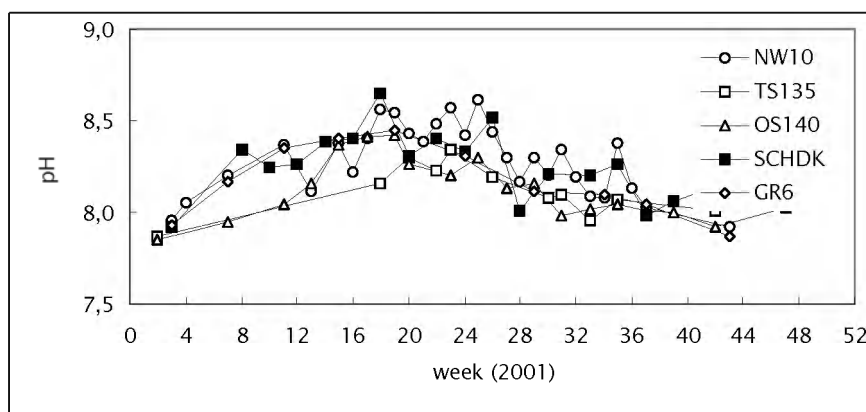


Fig. 2.1.3. pH, oppervlakte, 2001.

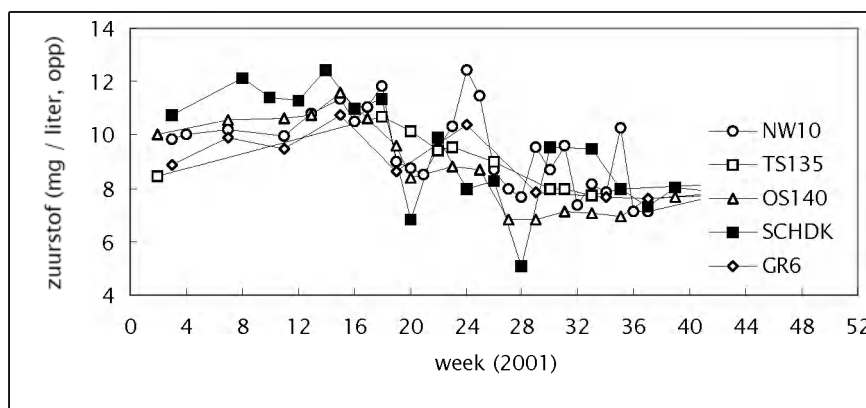


Fig. 2.1.4. Zuurstofgehalte (mg/liter), oppervlakte, 2001.

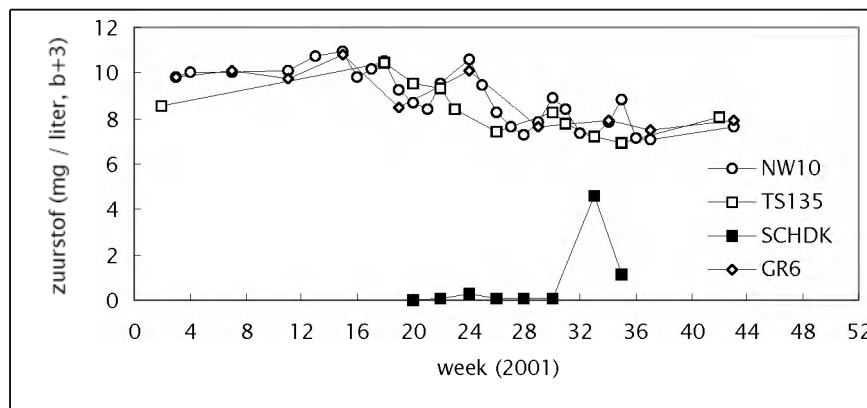


Fig. 2.1.5. Zuurstofgehalte (mg/liter), bodem + 3 m, 2001 (op OS140 wordt op deze diepte geen zuurstof gemeten). Let op de zuurstofloosheid in het Grevelingenmeer (SCHDK) bij het begin van de metingen in week 20, veroorzaakt door de *Phaeocystis*-voorjaarsbloei (hoofdstuk 3).

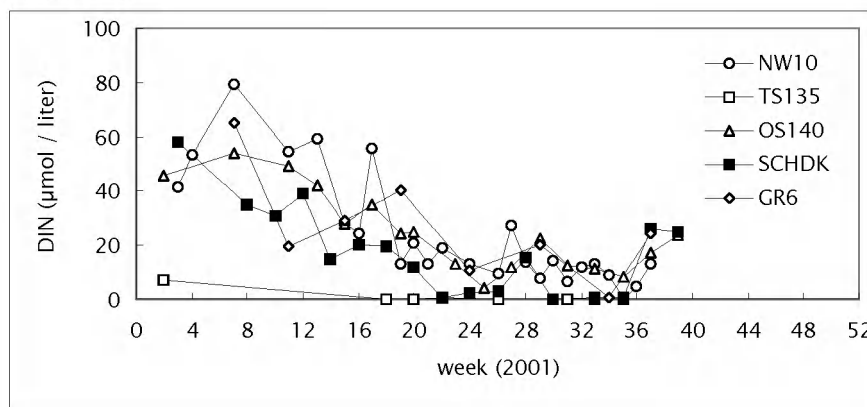


Fig. 2.1.6. Dissolved Inorganic Nitrogen ($\mu\text{mol/liter}$), oppervlakte, 2001.

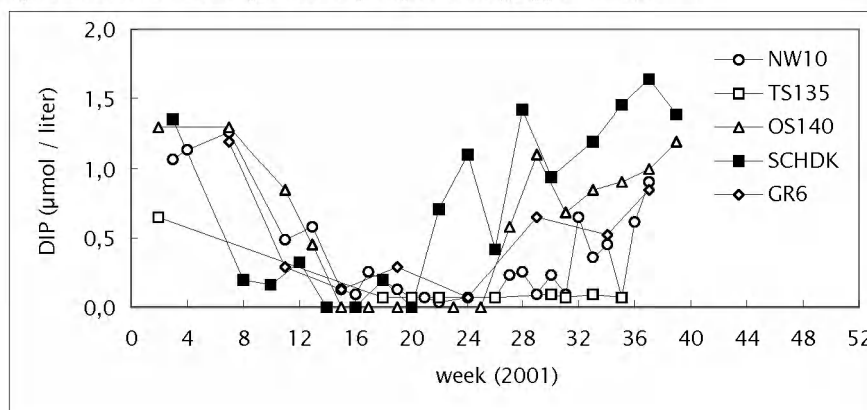


Fig. 2.1.7. Dissolved Inorganic Phosphorus ($\mu\text{mol/liter}$), oppervlakte, 2001.

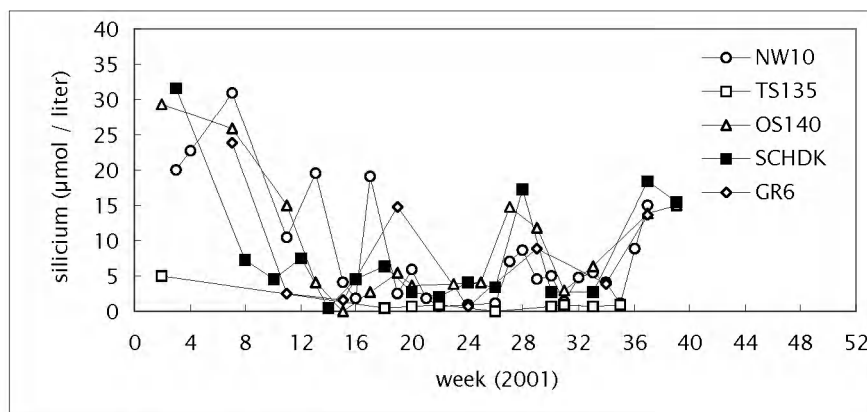


Fig. 2.1.8. Silicium-concentratie (µmol/liter), oppervlakte, 2001.

Tabel 2.1.1. De minimum en maximum gemeten waarden van de abiotische variabelen per locatie en per diepte in 2001.

	Temp ° C	Sal psu	pH	O2 mg/L	DIN µmol/L	DIP µmol/L	Si µmol/L
NW10 Opp	5 - 20	24 - 31	8.0 - 8.6	7 - 12	0 - 79	0.1 - 1.3	1 - 31
NW10 B+3	5 - 20	29 - 32	-	7 - 11	-	-	-
TS135 Opp	7 - 17	34 - 35	7.9 - 8.3	8 - 11	0 - 7	0.1 - 0.6	0 - 5
TS135 B+3	7 - 13	34 - 35	-	7 - 10	-	-	-
OS140 Opp	5 - 21	28 - 34	7.9 - 8.4	7 - 12	4 - 54	0 - 1.3	0 - 29
SCHDK Opp	3 - 22	26 - 31	7.9 - 8.7	5 - 12	0 - 58	0 - 1.6	0 - 32
GR6 Opp	6 - 20	27 - 31	7.9 - 8.5	8 - 11	0 - 65	0.1 - 1.2	1 - 24
GR6 B+3	6 - 20	27 - 31	-	7 - 11	-	-	-

2.2 Biotische gegevens 2001

De biotische gegevens die in deze paragraaf worden gepresenteerd zijn chlorofyl ('totaal algen') en de in Monisnel getelde plaagalgen. Op twee plaagalgen, *Phaeocystis* en *Pseudo-nitzschia*, wordt in de hoofdstukken 3, 4 en 5 verder ingegaan. In Tabel 2.2.1 zijn de in 2001 maximale waargenomen plaagalgenconcentraties op de standaard Monisnel bemonsteringslocaties op een rijtje gezet.

De chlorofyl *a* concentratie aan de oppervlakte was gedurende het hele jaar op TS135 laag in verhouding tot de andere locaties (Fig. 2.2.1). Dat ook in het voorjaar en de zomer hier de concentratie niet stijgt, kan verklaard worden door de temperatuurstratificatie van de waterkolom en het ontstaan van een spronglaag. De hoogste chlorofyl *a* concentraties komen voor in deze laag met relatief hoge lichtintensiteit en nutriëntenconcentraties. De hoogste chlorofyl *a* concentratie werd gemeten op GR6 in week 15 (half april) en bedroeg 46 µg/liter (zie ook Tabel 2.2.1). De chlorofyl *a* concentratie op NW10 was in de weken 15 en 16 (half april) significant hoger dan de gemiddelde aprilwaarde van 1990-2000. Ditzelfde was het geval op OS140 in de weken 13, 15 en 17 (eind maart – eind april).

Het afgelopen jaar is er sprake geweest van een langdurige *Phaeocystis*-bloei (celconcentratie > 1 miljoen cellen/liter), waarbij hoge celconcentraties bereikt werden (Fig. 2.2.2 en Tabel 2.2.1). In week 15 (half april) werd voor het eerst de 1 miljoen cellen/liter overschreden op GR6, NW10 en OS140. Op SCHDK en TS135 was dit voor het eerst in week 18 (begin mei) het geval. De bloei was op TS135 en op GR6 half mei afgelopen, terwijl dit op NW10, OS140 en SCHDK pas half juni het geval was. De voorjaarsbloei van *Phaeocystis* veroorzaakte zuurstofloosheid, mosselsterfte en toxische H₂S concentraties. Een zomerbloei leidde tot problemen met de zwemwaterkwaliteit (zie hoofdstuk 3).

De maximale *Noctiluca* concentratie die op de standaard monitoring locaties in 2001 is waargenomen, is 435 cellen/liter (NW10, oppervlakte, half juli, week 29) (Fig. 2.2.3 en Tabel 2.2.1). In deze week werd door het kustwachtvliegtuig een wit-oranje algenbloei, waarschijnlijk van *Noctiluca*, waargenomen. De maximale concentratie op SCHDK was vergelijkbaar, terwijl de hoogste concentraties op OS140 en GR6 iets lager lagen. Op TS135 zijn het hele jaar geen *Noctiluca* cellen waargenomen.

Pseudo-nitzschia spp. cellen zijn op alle bemonsteringslocaties waargenomen. In Figuur 2.2.4 is het totaal van de soorten uitgezet. Het is niet duidelijk welk deel hiervan uit (potentieel) giftige soorten bestaat, omdat het onderscheid tussen de soorten met lichtmicroscopie niet waargenomen kan worden. De hoogste concentratie werd bereikt op SCHDK, waar de concentratie in week 20 (half mei) 250.000 cellen/liter was (zie ook Tabel 2.2.1). De hoogste concentratie op GR6 en OS140 werd waargenomen in week 19 (half mei), op TS135 in week 20 (half mei) en op NW10 in week 21 (eind mei).

Tabel 2.2.2. Overzicht van de maximale waargenomen chlorofyl- en plaalgalgenconcentraties op de standaard Monisnel bemonsteringslocaties in 2001.

	Chlorofyl <i>a</i> (µg/liter)	<i>Phaeocystis</i> (10 ⁶ c/liter)	<i>Noctiluca</i> (c/liter)	<i>Pseudo- nitzschia</i> spp. (10 ³ c/liter)	<i>D. acuminata</i> (c/liter)
TS135 opp	2,9	0,6	0	6	125
TS135 hd	-	1,4	0	10	145
TS135 b+3	-	2,2	0	19	95
NW10 opp	37,4	18,5	435	192	3190
NW10 b+3	-	24,6	250	230	1225
OS140 opp	25,8	7,7	250	102	10
SCHDK	19,6	17,9	390	247	145
GR6 opp	46,0	8,2	185	170	0
GR6 b+3	-	9,4	145	152	0

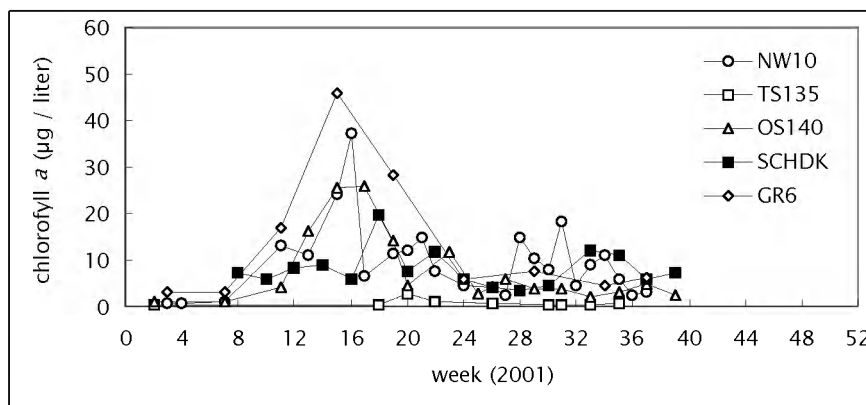


Fig. 2.2.1. Chlorofyl *a* concentratie (µg/liter), oppervlakte, 2001.

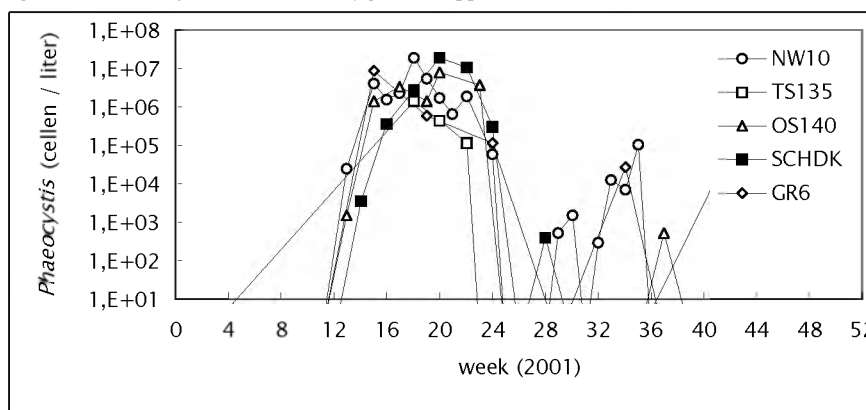


Fig. 2.2.2. *Phaeocystis* concentratie (cellen/liter) op TS135 (halve diepte), NW10, OS140, SCHDK en GR6 (oppervlakte), 2001.

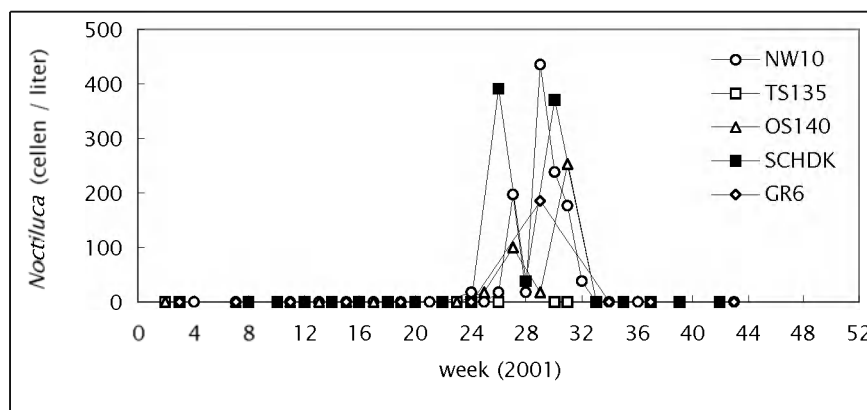


Fig. 2.2.3. *Noctiluca* concentratie (cellen/liter) op TS135 (halve diepte), NW10, OS140, SCHDK en GR6 (oppervlakte), 2001.

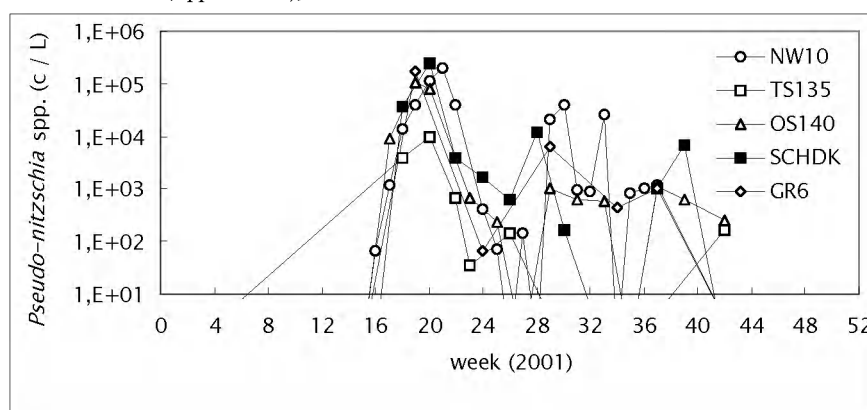


Fig. 2.2.4. *Pseudo-nitzschia* spp. concentratie (cellen/liter) op TS135 (halve diepte), NW10, OS140, SCHDK en GR6 (oppervlakte), 2001.

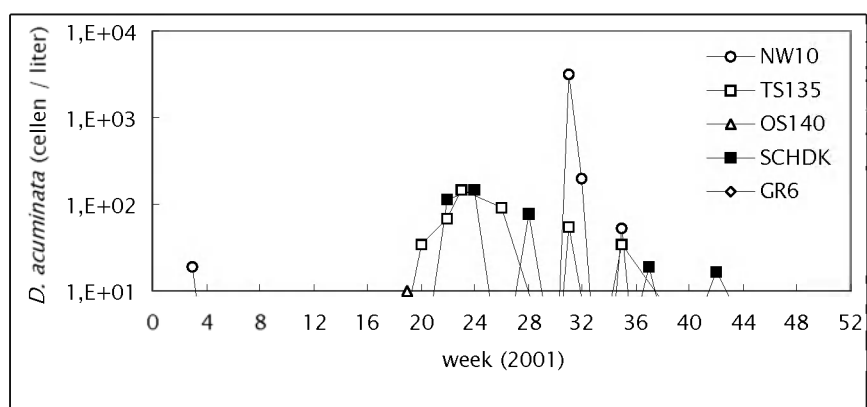


Fig. 2.2.5. *Dinophysis acuminata* concentratie (cellen/liter) op TS135 (halve diepte), NW10, OS140, SCHDK, GR6 (oppervlakte), 2001.

Begin augustus 2001 (week 31-32) vond er een *Dinophysis acuminata* bloei plaats op NW10 (zie Figuur 2.2.6). Deze bloei hing samen met een zoutstratificatie en met een relatief hoge oppervlaktetemperatuur van 19°C. De hoogste waargenomen concentratie bedroeg 3200 cellen/liter (Fig. 2.2.5 en Tabel 2.2.1). Twee weken na deze bloei op Nw10 werden door het RIVO hoge *D. acuminata* concentraties in de Waddenzee gemeten. Bovendien werd daar door het RIVO voor het eerst in meer dan 10 jaar DSP-toxine in mosselen gemeten. De mosselvisserij werd daarom tijdelijk gesloten en de toxinenmonitoring werd voor de duur van één maand verscherpt. Er werd niemand ziek door het eten van mosselen maar voor de schelpdiersector bedroegen de extra kosten voor de RIVO-monitoring € 16.000.



Fig. 2.2.6. Een cel van *Dinophysis acuminata* onder de microscoop.

3 *Phaeocystis*: mosselsterfte en andere problemen

3.1 Mosselsterfte en Monitoring

Op verzoek van Directie Zeeland heeft van 23 april t/m 22 mei 2001 een extra *Phaeocystis* monitoring plaatsgevonden bij de Brouwerssluis in de Brouwersdam (Figuur 3.1.1). In het Grevelingenmeer was namelijk in 1999 na de *Phaeocystis*-voorjaarsbloei, door dr. M. de Kluijver van de Universiteit van Amsterdam zuurstofloosheid en een verminderde kolonisatie door bentische dieren op proefopstellingen waargenomen. In 2000 echter, toen er geen *Phaeocystis*-voorjaarsbloei was, werd dit verschijnsel niet waargenomen. De vraag was of in 2001 *Phaeocystis* vroegtijdig gesignaleerd kon worden, zodat door sluiting van de Brouwerssluis de plaagalgen-intrek en de negatieve gevolgen daarvan kon worden voorkomen.

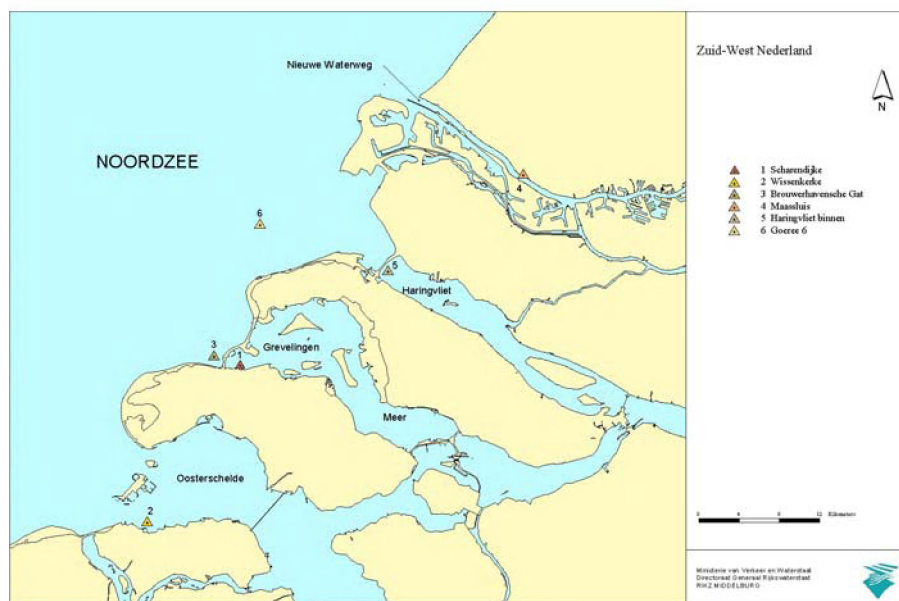


Fig. 3.1.1. Monitoring Deltawateren in 2001. Monisnelocaties zijn Scharendijke (1), Wissekerke (2) en Goeree6 (6). De Brouwersdam scheidt het Grevelingenmeer van de Noordzee. Locatie 3 ligt direct voor de Brouwerssluis; hier staat meetpaal BG8 van de directie Zeeland voor de monitoring van o.m. saliniteit en temperatuur. Locaties 4 (Nieuwe Waterweg) en 5 (Haringvliet) zijn MWTL-locaties die door RWS worden gebruikt voor de bepaling van de nutriëntenvrachten naar zee.

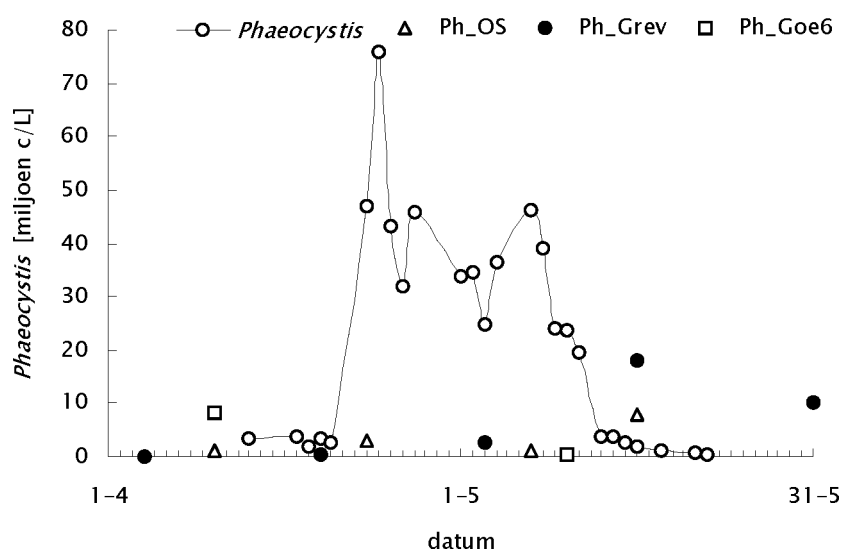


Fig. 3.1.2. *Phaeocystis* concentraties in 2001 (miljoen cellen /liter). De dagelijkse metingen in de Brouwerssluis (o), vergeleken met tweewekelijkse metingen in Oosterschelde (OS), Grevelingenmeer (Grev) en Goeree6 (Goe6). De tweewekelijkse metingen geven geen goed beeld van de omvang van de *Phaeocystis*-bloei.

In tegenstelling tot het jaar 2000, werd het voorjaar van 2001 gekenmerkt door een langdurige *Phaeocystis*-bloei. De maximale *Phaeocystis* celconcentratie werd waargenomen in de Brouwerssluis op 24 april en bedroeg het zeer hoge aantal van 76 miljoen cellen per liter (Figuur 3.1.2). Half mei trad er zuurstofloosheid op achter de Brouwerssluis in de put van Scharendijke. Omstreeks dezelfde tijd werd een enorme mosselsterfte in de Oosterschelde geconstateerd (Intermezzo 1).

De directe vraag was nu of de *Phaeocystis*-bloei in de Voordelta, zoals die in de Brouwerssluis gemeten werd, een relatie had met de mosselsterfte in de Oosterscheldemonding. Uit oude modelberekening van Johan de Kok (1996) was al eens duidelijk geworden dat er bij een hoge rivierafvoer (4500 m³/s) en drie dagen noordoostenwind (5 m/s) een 'zoetwaterbel' voor de kust ontstaat met een saliniteit lager dan 30 psu. De noordelijke wind verhindert dat het zoete water snel, zoals gebruikelijk, in noordelijke richting wordt afgevoerd langs de Hollandse kust. De uitlopers van deze 'bel' zouden volgens de modelberekeningen zelfs de Oosterschelde kunnen bereiken. Met andere woorden: als aan de voorwaarden voor zo'n 'bel' zou zijn voldaan, en de *Phaeocystis*-bloei had zich in deze 'bel' kunnen ontwikkelen, dan zou het aannemelijk zijn om aan te nemen dat de hoge *Phaeocystis* biomassa die in de Brouwerssluis was gemeten, ook in de Oosterschelde voor was gekomen.

INTERMEZZO 1

Schuimalgen verstikken mosselpercelen **Provinciale Zeeuwse Courant 15-05-2001**

*Het ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij (LNV) komt met een visverbod voor mosselen in de monding van de Oosterschelde, omdat er op mosselpercelen meer dan normale sterfte is geconstateerd. Het bezinken van schuimalgen (*Phaeocystis*) is zeer waarschijnlijk de oorzaak.*

Het visverbod geldt voor onbepaalde tijd, zolang de exacte oorzaak van de sterfte niet is vastgesteld. Europese regelgeving schrijft dat voor. Voor de mosselsector heeft het visverbod (nog) geen consequenties. Het seizoen begint pas half juli. Toch is de sterfte een fikse tegenvaller. Het aanbod van consumptiemosselen is al beperkt.

De sterfte op de mosselpercelen ligt boven de vijftien procent. Op sommige stukken is zelfs sprake van een sterfte van dertig procent. Het is niet de eerste keer dat schuimalgen voor problemen zorgen. In de jaren zeventig en tachtig kwam dit vaker voor. Het verschijnsel is sindsdien afgenomen, door het terugdringen van fosfaatlozingen.

Schuimalgen bloeien in het voorjaar. De mate waarin dat gebeurt, kan van jaar tot jaar verschillen. Als het veel stormt, krijgen ze minder kans tot bloei te komen. Mosselen filteren algen, maar schuimalgen zijn te groot en te slijmerig. Schuimalgen klonteren samen, vormen grote bruine vlokken (op het strand) en kunnen ook op mosselpercelen bezinken. Met als gevolg dat de mosselen stikken. Door de aanhoudende noordnoordoostenwind van de laatste weken zijn mogelijk veel algen van de Hollandse Noordzeekust naar Zeeland verwaaid.

Omdat de Oosterschelde, net als het Grevelingenmeer nutriëntenarm is kan de bloei zich ter plekke niet verder ontwikkelen. De *Phaeocystis*-kolonies raken gestresst door nutriëntengebrek en bezinken. Dit bezinken van kolonies is een normaal onderdeel van de levenscyclus van deze alg (Peperzak 2002).

Een eerste stap in het onderzoek naar de mosselsterfte was dus om te kijken naar de meteorologische omstandigheden. Hiervoor werd gebruikt: a) de afvoer bij Lobith, en b) windrichting en sterkte van het KNMI station Vlissingen. De uitslag van de grote rivieren op het kustwater was in 2001 nog niet bekend. De afvoer bij Lobith wordt dagelijks gemeten, terwijl de afvoer van de Rijn-Maas i.v.m. wind- en getijdenwerking pas een jaar later met een model kan worden berekend. Omdat de afvoer bij Lobith deels bepaald wordt door Alpensmeltwater en deels door neerslag is gekeken hoeveel neerslag er in 2001 maandelijks was in Duitsland (Figuur 3.1.3).

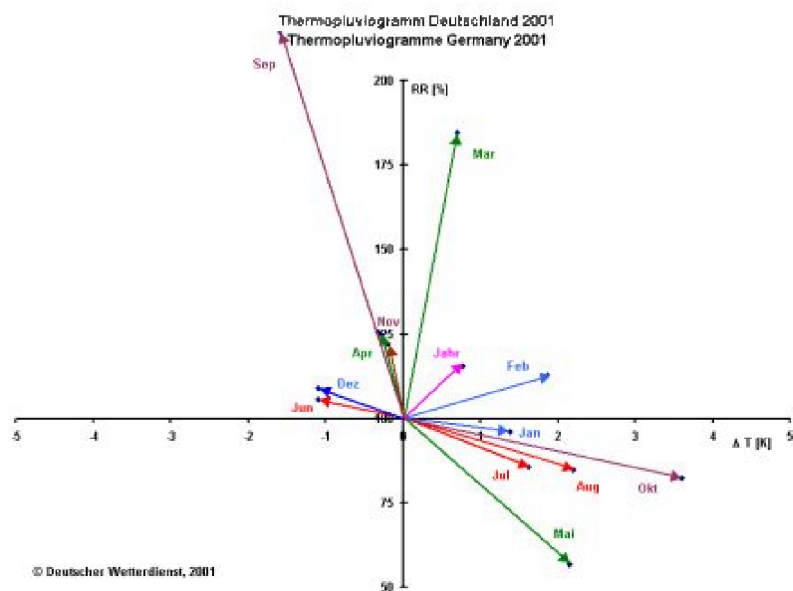


Fig. 3.1.3. Temperatuur (horizontale as) en neerslag (verticale as) in Duitsland t.o.v. de referentiejaar 1961-1990. In het voorjaar van 2001 was met name maart (Mar) bijzonder nat.

De grote hoeveelheid neerslag in Duitsland (Figuur 3.1.3) had zijn effect op de waterafvoer bij Lobith. Eind maart werd een piek bereikt van ruim 8000 m³/s, ruim twee maal het gemiddelde van de voorafgaande 10 jaar (Figuur 3.1.4).

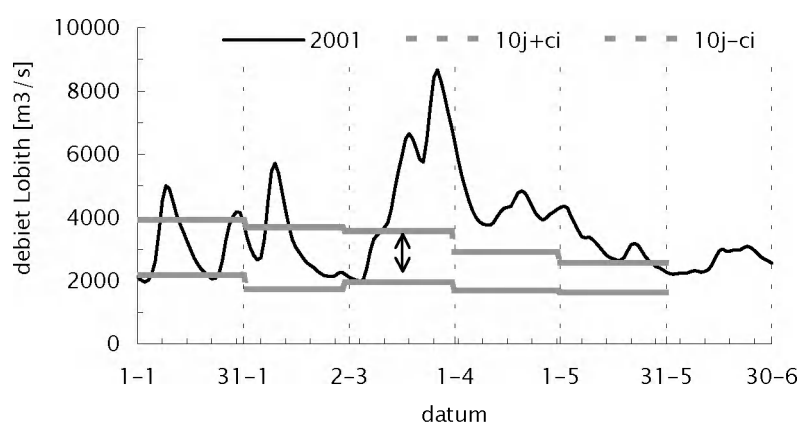


Fig. 3.1.4. Waterafvoer bij Lobith in 2001. Van eind april tot half mei is de afvoer groter dan gemiddeld (horizontale lijnen zijn het 95% betrouwbaarheidsinterval van het 10-jarig gemiddelde).

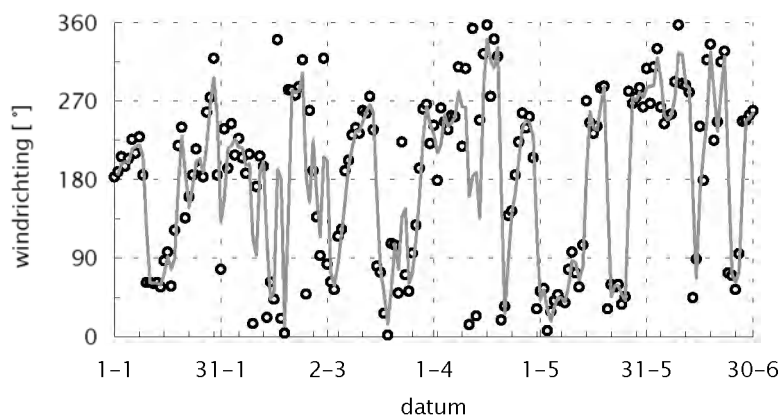


Fig. 3.1.5. Windrichting KNMI station Vlissingen in 2001. Noordoostelijke wind heeft een richting tussen 0 en 90°. De punten zijn daggemiddelden, de lijn is een zwevend gemiddelde. Begin mei is er een langdurige periode met noordoosten wind.

In de tweede helft van april was de wind af en toe noordnoordoost. Vooral begin mei was er een langdurige periode van noordoostenwinden (Figuur 3.1.5). Deze winden waren bovendien relatief sterk, d.w.z. >5 m/s (Figuur 3.1.6).

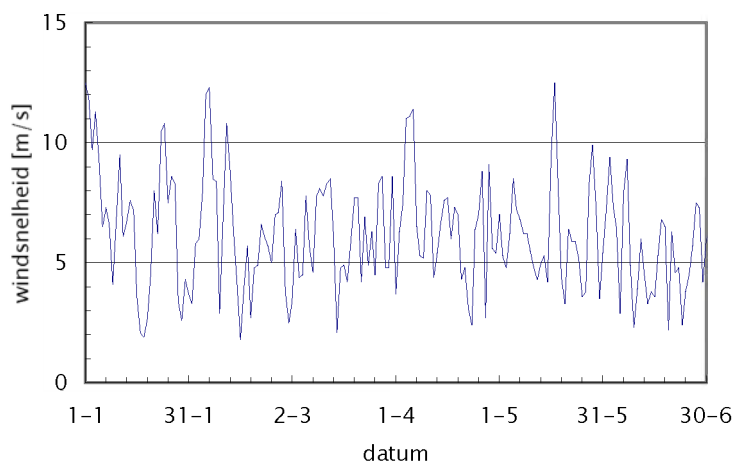


Fig. 3.1.6. Windsnelheid KNMI station Vlissingen in 2001. In het voorjaar (maart-mei) is de wind matig tot vrij krachtig: 5 - 8 m/s (4 Bf).

De voorwaarden voor een 'zoetwaterbel' waren volgens de modelberekeningen: 4500 m³/s Rijnaafvoer bij Lobith en drie dagen noordoostelijke wind van 5 m/s. Aan deze voorwaarden werd van maart tot half mei meerdere keren voldaan. In hoofdstuk 2 was al gemeld dat de saliniteit op Scharendijke (Grevelingen), Oosterschelde (OS140) en Goeree6 in de periode half april-half mei lager was dan normaal. Het is dus waarschijnlijk dat deze verlaging het gevolg was van de hoge rivierafvoer en de heersende windrichting.

INTERMEZZO 2

Zeewater krijgt een schuimkraagje; Provinciale Zeeuwse Courant 18-05-2001

Sinds enige tijd wordt op verschillende plaatsen in de Deltawateren een langgerekte witte schuimkraag waargenomen. Het is een regelmatig terugkerend verschijnsel, dat de ene keer opvallender is dan de andere. Dit komt door diverse omstandigheden, zoals de temperatuur, aanwezigheid van voedingsstoffen (fosfaten en nutriënten) en de lichtdoordringing van het water. De schuimkraag wordt veroorzaakt door de afgestorven resten van algen (de soort Phaeocystis). Het is een natuurlijk proces, dat meestal begin mei en eind juli opduikt. Volgens woordvoerder J. Geluk van Rijkswaterstaat, directie Zeeland, zijn deze zogeheten plaagalgen normaal gesproken niet gevaarlijk, ze zijn alleen wat lastig. De algen kennen een korte bloeitijd en sterven dan snel af. Het schuim is afkomstig van de afgestorven algen. Het verschijnsel verdwijnt als het goed is na enkele weken uit zichzelf.

De langgerekte of ook wel bolvormige schuimkraag wordt gevormd doordat de algenresten, die elk enkele millimeters in doorsnee zijn, samenklonteren en zo een hele kolonie vormen. De talloze ballonnetjes kleuren het water bruin-wit en hebben een dempend effect op de golfslag. Vanaf schepen of vanuit vliegtuigen bestaat daarom wel de neiging ze voor olievlekken aan te zien. Dat heeft soms geleid tot vergeefse speurtochten. De algenmassa kan overigens op het strand aanspoelen. In de monding van de Westerschelde, waar zich voor de toegang tot de veerhaven bij Vlissingen een witte schuimkraag manifesteert, is sprake van minder troebel water. Het licht kan redelijk goed doordringen en dat is een van de gunstige omstandigheden voor de algenbloei en –sterfte. "Op zich niets bijzonders op die plek. Doet het zich achterin de Westerschelde voor – daar is het water minder doorlatend – dan is het wel iets opvallends", aldus Geluk. Er wordt wel altijd onderzoek naar het aantreden van de schuimalgen gedaan.

Ook in de Oosterschelde is de plaagalg aanwezig en daar is met name voor de mosselkwekers sprake van overlast. De gezonken resten van de algen zetten zich waarschijnlijk af op de mosselpercelen en veroorzaken daar een meer dan normale sterfte onder de schelpdieren. De mossels worden als het ware verstikt onder een laag schuimalgen. Daarom heeft het ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij voorlopig een visverbod voor de mosselen in de monding van de Oosterschelde afgekondigd. Rijkswaterstaat - en trouwens ook andere instanties – wil graag weten wat er in de Oosterschelde precies aan de hand is. Het is de vraag of het daar wel om de gebruikelijke schuimalg gaat. Mogelijk zit er een ander beestje tussen, waardoor de algen samenklonteren en een slijmerige deken over de mossels uitspreiden. Begonnen is met nader onderzoek.

Het is ook mogelijk om het verloop van de saliniteit in de Voordelta te bestuderen a.d.h.v. continue metingen op meetpunt BG8 vóór de Brouwerssluis (Figuur 3.1.1). In Figuur 3.1.7. is het verband tussen windrichting en de saliniteit op BG8 duidelijk te zien: als de wind ruimt naar noordoostelijke richting dan daalt de saliniteit.

Omdat zoetwater nutriëntenrijk is, zal een verlaging van de saliniteit leiden tot een hoger nutriëntenaanbod voor het fytoplankton. Omdat in april-mei de hoeveelheid

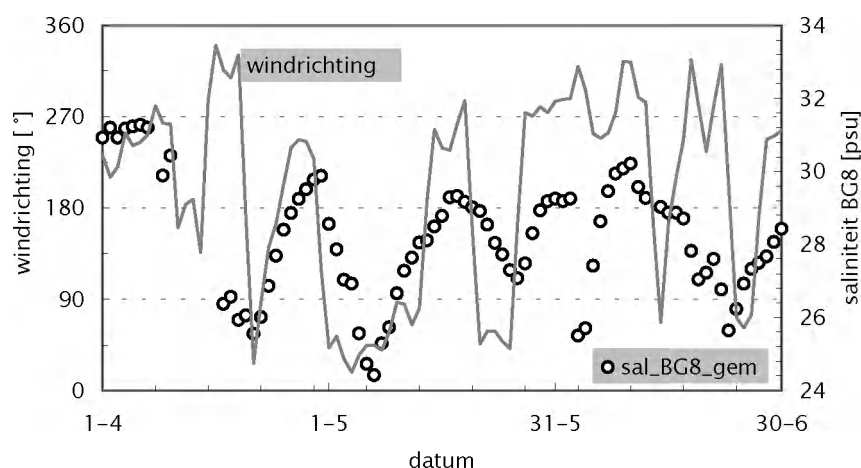


Fig. 3.1.7. Relatie tussen windrichting (Vlissingen) en saliniteit in de Voordelta (BG8). Na 1 mei draait de wind van west naar noordoost en zakt de saliniteit van 30 naar 24 psu.

licht in de waterkolom voldoende is om de bloei van de plaagalg *Phaeocystis* te starten, zal een toename van het nutriëntenaanbod deze bloei in hevigheid doen toenemen, hetzij in hoogte of in duur.

Echter, uit Figuur 3.1.8 blijkt geen direct effect van de toevoer van zoetwater op de fosfaatconcentraties op de drie Monisnel-locaties in het Deltagebied. Dit komt zeer waarschijnlijk doordat het via de rivieren toegevoerde fosfaat direct door de algen wordt opgenomen.

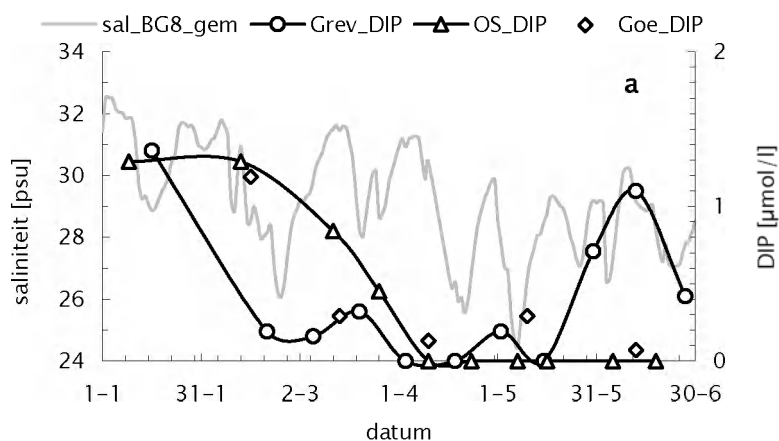


Fig. 3.1.8. De saliniteit op BG8 (lijn) en de anorganisch fosfaat (DIP) concentraties in de Grevelingen (Grev_DIP), Oosterschelde (OS_DIP) en Goeree6 (Goe_DIP). De fosfaatconcentraties zijn vanaf maart al zeer laag, ondanks de soms sterk verlaagde saliniteit half april en begin mei.

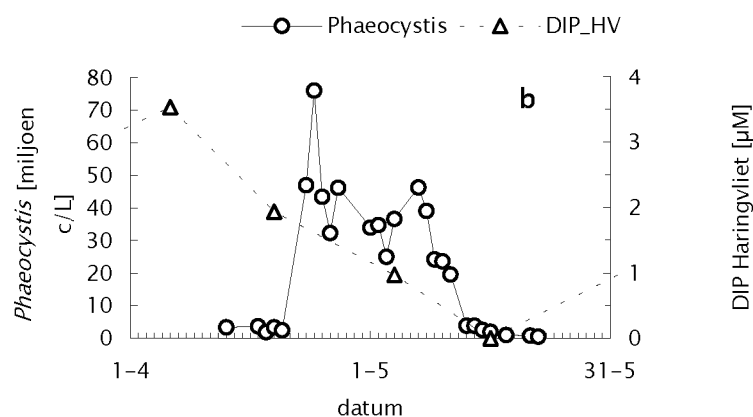


Fig. 3.1.9. De *Phaeocystis*-bloei in de Voordelta (Brouwerssluis) start als de toevoer van fosfaat uit het Haringvliet nog 2 μmol per liter is. Als halverwege mei de fosfaatvracht tot nul is gedaald dan stopt de *Phaeocystis*-bloei.

Toen de *Phaeocystis*-bloei dus half april begon (Figuur 3.1.2), waren de fosfaatconcentraties al zeer laag (Figuur 3.1.8). Dit is niet conform de algemeen aanvaarde stelling dat bloeien van *Phaeocystis* kunnen ontstaan bij (relatief) hoge fosfaat gehalten (bijvoorbeeld $> 1 \mu\text{M}$). Bovendien lijkt de bloei zich gedurende meerdere weken bij lage fosfaatconcentraties te kunnen handhaven (Figuur 3.1.8); ook dit lijkt in strijd met laboratoriumexperimenten waaruit bleek dat *Phaeocystis* onder P-limitatie slecht met andere algensoorten kan concurreren.

Als de *Phaeocystis*-bloei werd 'gevoed' met fosfaat uit het zoete Haringvlietwater, dan zou de bloei moeten stoppen op het moment dat de fosfaatvracht nul wordt. Met andere woorden: van het fosfaat, waarvan de concentratie al minimaal is, wordt dan ook de toevoer zo laag dat de *Phaeocystis*-bloei verdwijnt, hetzij door sedimentatie, hetzij door lysis (openbarsten) van de cellen. Uit Figuur 3.1.9 wordt duidelijk dat de fosfaatvracht, doordat de fosfaatconcentratie in het Haringvliet tot nul daalt, erg klein wordt. Op dat moment, half mei, stopt de *Phaeocystis*-bloei dan ook.

Pas nadat de *Phaeocystis* concentratie sterk gedaald is (Figuur 3.1.9), vindt er een stijging plaats van de fosfaatconcentratie aan het oppervlak van het Grevelingenmeer. In de Oosterschelde en op Goeree6 blijven de fosfaatconcentraties laag (Figuur 3.1.8); op deze locaties nemen de fosfaatconcentraties pas 1 maand later weer toe (Figuur 2.1.7). De vroege en sterke stijging van de fosfaatconcentratie aan het oppervlak van het Grevelingenmeer is waarschijnlijk gerelateerd aan de continue zuurstofloosheid in de onderste waterlaag (Figuur 2.1.5).

Dit leidt meteen tot de vraag: hoe aannemelijk is het dat de mosselsterfte in de Oosterschelde door zuurstofloosheid werd veroorzaakt? Uit onderwaterwaarnemingen van M. de Kluijver in het Grevelingenmeer in 1999 en

2001 bleken *Phaeocystis*-kolonies in de waterkolom uit te zakken. De sterfte van deze algenmassa wordt gevolgd door mineralisatie en verlaging van

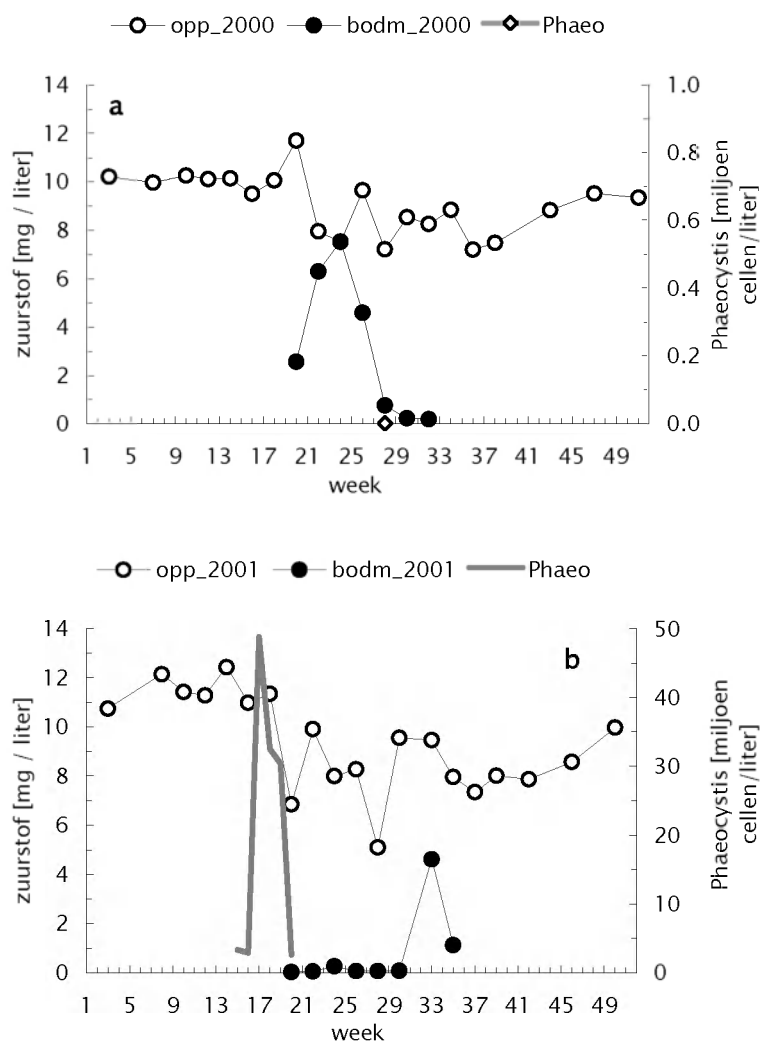


Fig. 3.1.10. De zuurstofconcentraties in het Grevelingenmeer locatie Scharendijke in 2000 (a) en 2001 (b) aan het oppervlak en bij de bodem. In 2000 was er geen *Phaeocystis*-bloei en werd de bodemlaag pas zuurstofloos in de zomer (normale situatie). Daarentegen leidde de *Phaeocystis*-bloei in 2001 (week 16-20) al tot zuurstofloosheid in week 20 toen de eerste meting werd verricht.

zuurstofconcentraties in de onderlaag van de gestratificeerde waterkolom bij Scharendijke. In 2000 was er nauwelijks een *Phaeocystis*-voorjaarsbloei. Dit betekent dat er tussen 2000 en 2001 een duidelijk verschil in de zuurstofconcentratie van de onderlaag bij Scharendijke moet zijn aan te tonen. Uit Figuur 3.1.10 a (2000) en b (2001) blijkt dat dit inderdaad het geval is.

Na afloop van de *Phaeocystis*-bloei blijkt niet alleen dat de onderlaag in het Grevelingenmeer zuurstofloos is, maar ook dat er aan het oppervlak een daling

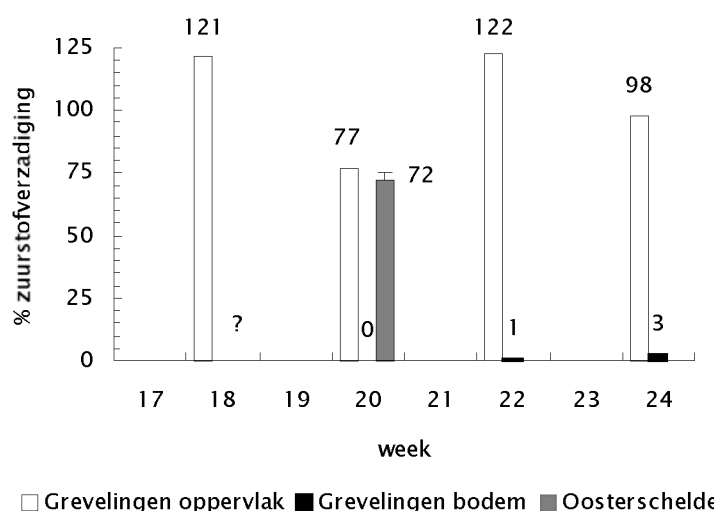


Fig. 3.1.11. Zuurstofverzadiging in het Grevelingenmeer en de Oosterschelde in het voorjaar van 2001. De waarden aan het Grevelingen oppervlak (week 18-24) en bij de bodem (week 20-24) zijn gemeten door RWS directie Zeeland. In week 20 was de *Phaeocystis*-bloei voorbij, de concentratie bij de Brouwerssluis was gedaald tot onder de 10 miljoen cellen/liter, en de zuurstofverzadiging bij de bodem was 0%. De waarden in de Oosterschelde zijn gemeten door het RIVO op locaties met 15-55% mosselsterfte (-3 tot -13 meter, n = 3). Op plaatsen waar de mosselsterfte <10% was, was de zuurstofverzadiging > 110% (-4 tot -12 meter). Er zijn geen zuurstofmetingen bij de Oosterscheldebodem uitgevoerd.

plaats vindt van ca. 12 naar 7 mg zuurstof/liter (Figuur 3.1.10 b). De zuurstofdaling aan het oppervlak wordt veroorzaakt door de zuurstofvraag in de onderlaag. Dit betekent dat een zuurstofverlaging in de bovenste waterkolom van de Oosterschelde, waar geen metingen bij de bodem plaatsvinden, een sterke aanwijzing is voor een sterke zuurstofvraag, cq. zuurstofloosheid bij de bodem.

Uit Figuur 3.1.11 blijkt dat er zowel in het Grevelingenmeer als in de Oosterschelde op plaatsen met mosselsterfte een gelijkwaardige verlaging van het zuurstofpercentage in de waterkolom optrad. Omdat op dat moment de onderlaag in het Grevelingenmeer zuurstofloos was (Figuur 3.1.10 b en 3.1.11), is het aannemelijk dat ook bij de Oosterscheldebodem zuurstofloosheid is opgetreden.

De volgende argumenten maken dit nog aannemelijker. Ten eerste kon het RIVO de mosselsterfte in de Oosterschelde in 2001 niet verklaren op grond van een infectie van de mossels door schimmels, bacteriën, virussen of parasieten (Collombon en Poelman 2001).

Ten tweede is mosselsterfte t.g.v. zuurstofloosheid door algensedimentatie al eens in de jaren tachtig waargenomen, zij het op een minder grote schaal (10-20%) (Rijkswaterstaat 1991). Daar komt bij dat voor de jaren 1988-1990 er een positieve relatie gevonden was tussen de algenconcentratie in april-mei en mosselsterfte in de westelijke Oosterschelde. Hierbij werd algensedimentatie en sterfte door

zuurstofloosheid als causaal verband gepresenteerd (Rijkswaterstaat 1991). Ook is *Phaeocystis*-sedimentatie waargenomen in mei 1999 in Jacobahaven. Een algenbrij van 10-15 cm met een zuurstofpercentage van 43% bedekte de bodem, terwijl de bovenste 3 cm van de bodem zuurstofloos was geworden (Dubbeldam *et al.* 1999). In de derde plaats is het aannemelijk dat de hoge organische biomassa die gevormd wordt door de gesedimenteerde *Phaeocystis*-bloei een geschikte voedingsbodem is voor bacteriën die zeer snel toxische stoffen als sulfide en ammonium produceren. Onder zuurstofloze omstandigheden leidt de productie van deze stoffen tot een versnelde mosselsterfte (Babarro en de Zwaan 2002). Een gebrek aan relevante veldgegevens maakt het echter onmogelijk de waargenomen mosselsterfte in de Oosterschelde aan de hand van deze literatuurstudie nader te verklaren.

Conclusie: alhoewel directe bewijzen niet voorhanden zijn is het aannemelijk dat:

- de grote *Phaeocystis*-voorjaarsbloei van 2001 in de Voordelta zich ontwikkelde door een samenloop van hoge rivierafvoer en noordoostenwind;
- sedimentatie van deze algenbloei leidde tot zuurstofloosheid bij de bodem in het Grevelingenmeer (Scharendijke) en in de Oosterscheldemonding hetgeen in de Oosterschelde leidde tot een massale mosselsterfte.

3.2 Toxische H₂S concentraties

Een nieuw fenomeen deed zich in het voorjaar van 2001 voor in de buitenhaven van IJmuiden: door hoge H₂S concentraties moest het baggerwerk worden onderbroken. De melding alsook de benodigde achtergrondgegevens zijn afkomstig van dhr. H. Lely van de Dienstkring Noordzeekanaal (DNH).

De diepte van de buitenhaven van IJmuiden (Figuur 3.2.1) wordt onderhouden door hopperzuigers. Eenmaal per drie weken wordt er een loding gedaan, en bovendien wordt er in de nieuwe en oude buitenhavens met een D2ART-sonde de dikte van de sliblaag gemeten.

Zowel uit de lodingen als uit de slibmetingen bleek er in de weken 19-21, de tweede helft van mei, een sliblaag van 2 meter dik te zijn afgezet. Deze laag was echter door de aannemer met zijn hopper niet te vinden.

Op 11 juni (week 24) moest er worden gestopt met het onderhoudsbaggeren omdat er in zowel de nieuwe als de oude buitenhaven zoveel H₂S vrijkwam dat het werken onmogelijk werd. Op 12 juni werd er in het open beun van de hopper een H₂S waarde van 330 ppm gemeten, terwijl 10 ppm de MAC waarde is (MAC = maximaal aanvaarde concentratie). Pas in week 27, begin juli, werd weer gestart met de onderhoudswerkzaamheden. Er werd nog wel H₂S geroken, maar de concentraties waren binnen de grenzen.

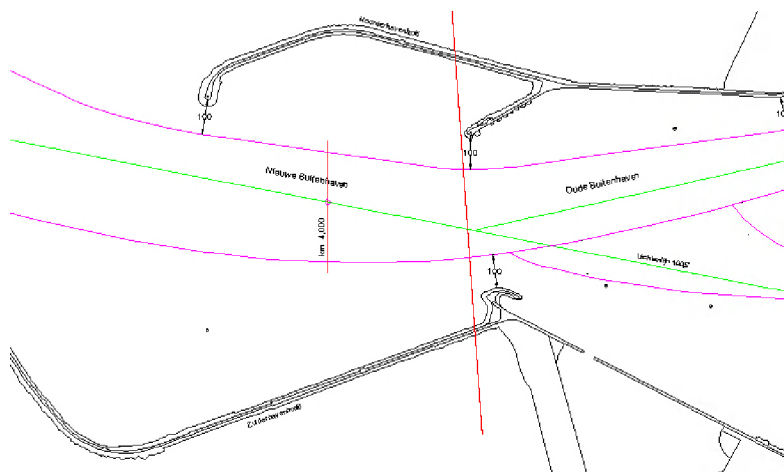


Fig. 3.2.1. De buitenhaven van IJmuiden. In week 19 en 21 leek er een sliblaag van 2 meter te zijn afgezet. In week 24 werden de baggerwerkzaamheden gestaakt vanwege 30x hoger dan toegestane H_2S concentraties in de open beun van de hopperzuiger.

De vraag van de Dienstkring was of er een biologische verklaring was voor dit fenomeen. Uitgaande van het hoge organisch S gehalte van *Phaeocystis*, in combinatie met de grote voorjaarsbloei van deze plaagalg, lijkt een verband niet ondenkbeeldig. Juist in week 18, één tot drie weken voor de 'aanslibbing' bereikte de *Phaeocystis*-bloei op het zuidelijker gelegen Nw10 met 18 miljoen cellen/liter zijn hoogtepunt (Figuur 2.2.3). Het is niet onaannemelijk dat zulke hoge *Phaeocystis* aantallen langs de gehele kust voorkwamen. Bij de bodem van Nw10 was de concentratie *Phaeocystis* in week 18 zelfs 30% hoger dan aan het oppervlak. Met andere woorden: de buitenhaven van IJmuiden liep vol met een laag bestaande uit tientallen miljoenen *Phaeocystis* cellen per liter.

Het hoge organisch zwavelgehalte in *Phaeocystis* is het gevolg van de grote dimethylsulfide-productie. Afbraak hiervan kan leiden tot de vorming van H_2S . De vorming van H_2S is ook mogelijk onder zuurstofloze omstandigheden waarbij de zwavelbron het in zeewater in hoge concentraties voorkomende sulfaat is. Er zijn echter geen waterkwaliteitsmetingen gedaan; het is dus niet bekend of er zuurstofloosheid is opgetreden. Als echter de analogie met de problemen in de put van Scharendijke in het Grevelingenmeer opgaat (vorige paragraaf), dan is zuurstofloosheid als bron voor de H_2S productie niet uit te sluiten.

De sedimentatie en ophoping van organisch koolstof en zwavel in de vorm van een uitzakkende *Phaeocystis*-bloei heeft consequenties voor zandwinning in de kustzone. De meeste ecologische schade wordt bij grootschalige winningen veroorzaakt door een groot oppervlak ondiep af te graven. Het alternatief, winnen uit een klein oppervlak, d.w.z. het maken van diepe putten kan er toe leiden dat deze bezinkputten worden voor algenbloeien. Dit leidt tot een verhoogd risico op zuurstofloosheid en H_2S -vorming.

3.3 Zwemwaterkwaliteit



Fig. 3.3.1. Watermonster van Hoek van Holland, genomen op 24 augustus 2001 door de strandwacht n.a.v. klachten over huidirritatie. De *Phaeocystis* concentratie bedroeg 4 miljard cellen/liter (1800 μg chlorofyl a per liter); een nieuw wereldrecord. De oorzaak van deze zeer hoge celantallen ligt waarschijnlijk in de plotseling hoge waterafvoer. Op 18 augustus ontstonden zware buiencomplexen die in de omgeving van Rotterdam tot wateroverlast leidden. De hoogste neerslag-maandsom van 2001 werd dan ook in augustus door het KNMI in Hoek van Holland gemeten: 216 mm (landelijk gemiddelde 108 mm, normaal is 69 mm). Aangeraden werd om badgasten het zwemmen te ontraden, te wijzen op de risico's (irritatie van huid en slijmvliezen), en douchen na het zwemmen aan te bevelen. Door een weersomslag was 3 dagen later de bloei weer 'verdwenen'.

4 Detectie van plaagalgen

4.1 rRNA probes

rRNA probes bestaan uit kleine stukjes DNA die hechten aan de ribosomen, de eiwitfabrieken in de cel. Door aan deze probes een fluorescerende merker te koppelen lichten de "geprobede" cellen op onder het fluorescentielicht van de microscoop of in de flowcytometer.

In het vorige jaarverslag is reeds gemeld dat de intensiteit van deze probes terugloopt bij afname van de groeisnelheid van de algen, bijvoorbeeld door nutriëntengebrek. In de praktijk betekent dit dat algen die in zee gestopt zijn met groeien niet meer gedetecteerd kunnen worden. De toxinegehalten in deze niet-groeïende algen kunnen echter beduidend hoger zijn dan het gehalte in groeiende algen: zie bijvoorbeeld Figuur 5.4.2. voor *Pseudo-nitzschia multiseries*. Deze vals-negatieve detectie is een wereldwijd probleem in de toepassing van rRNA probes.

In 2001 is een protocol ontwikkeld dat de vals-negatieve detectie van niet-groeïende plaagalgen moet voorkomen (Figuur 4.1.1). Het principe is dat de labelintensiteit hersteld wordt door de algen gedurende korte tijd te kweken onder goede groeiomstandigheden. Dit betekent dat aan het monster nutriënten worden toegevoegd waarna de algen bij een geschikte temperatuur en lichthoeveelheid worden geïnkubeerd.

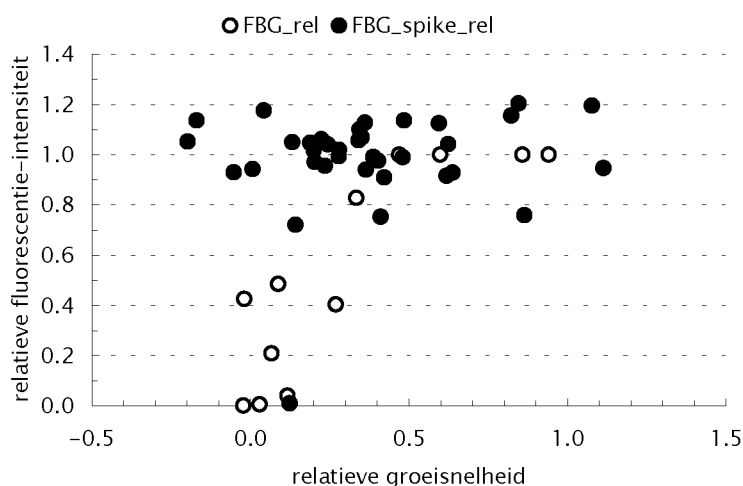


Fig. 4.1.1. De relatieve fluorescentie-intensiteit van vier rRNA-gelabelde *Pseudo-nitzschia*'s (FBG_rel = o) neemt af van 1.0 naar 0.0 als de relatieve groeisnelheid door nutriëntengebrek terugloopt van 1.0 naar 0.0 (van 100 naar 0%). Als de algen worden "gespiked" met nutriënten en 1-3 dagen worden geïnkubeerd (FBG_spike_rel = zwart o) dan komt de fluorescentie-intensiteit, op één uitzondering na, gemiddeld genomen weer terug op 1.0 (range 0.7-1.2). De relatieve groeisnelheid neemt soms af (< 0.0), meestal toe (0.0-1.1). Deze methode blijkt ook goed toepasbaar in veldmonsters en voorkomt vals-negatieve detectie (algen worden niet waargenomen maar zijn wel aanwezig).

4.2 Electronenmicroscopie (EM)

Een onmisbaar hulpmiddel voor de identificatie van bepaalde soorten en groepen plaagalgen is de elektronenmicroscop. Eén zo'n groep is *Pseudo-nitzschia*, en in 2001 zijn via een uitbesteding een aantal soorten in veldmonsters gefotografeerd (Koeman *et al.* 2001). Dit EM werk dient onder meer ter controle van onze nieuwe en nog experimentele rRNA probe methode (zie vorige paragraaf).

Daarnaast is door het onderzoeken van Monisnelmonsters van alle locaties (Wissekerke, Scharendijke, Goeree6, Nw10, Ts135) een indruk verkregen van het voorkomen van *Pseudo-nitzschia* soorten. Gecombineerd met de gegevens van 2000, waarin *Pseudo-nitzschia*'s werden geïsoleerd uit Marsdiep en Terschelling135 monsters (Koeman *et al.* 2000), blijkt bijvoorbeeld *P. pungens* op alle locaties voor te komen.

In Figuur 4.2.1 zijn een aantal voorbeelden van EM opnames weergegeven. De grootte, vorm en het streepjes- en stippeltjes patroon van de cellen zijn taxonomische karakteristieken.

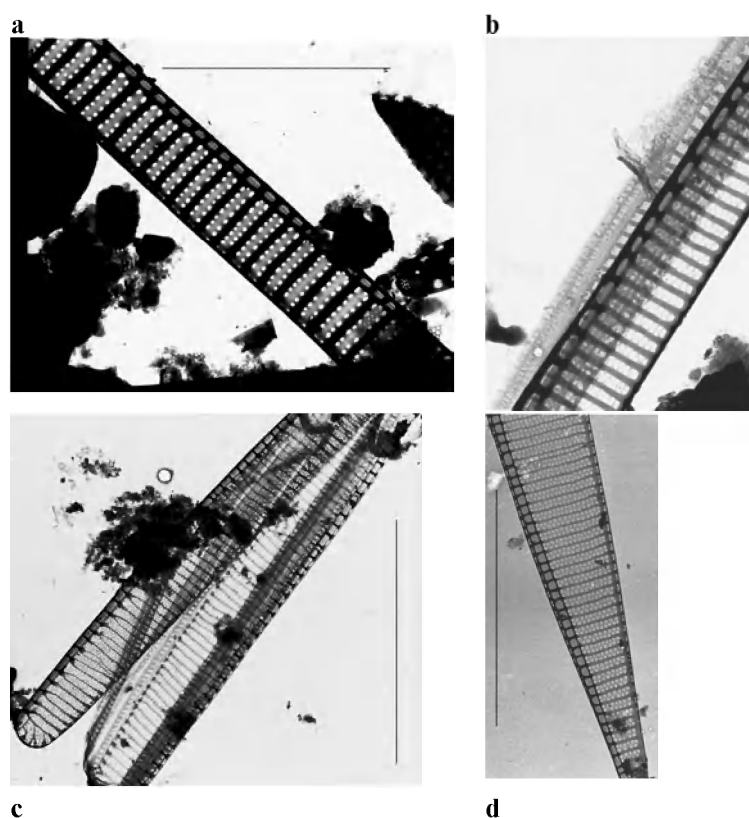


Fig. 4.2.1. a. *Pseudo-nitzschia pungens* (Goeree 6 16 juli 2001); b. *P. delicatissima*; c. *P. turgidula* (Goeree6 14 mei 2001); d. *P. fraudulenta* (Scharendijke11 juli 2001). Streep = 10 μ m. Foto's dr. R.P.T. Koeman.

5 *Pseudo-nitzschia*'s in het Nederlandse kustwater

5.1 Inleiding

Het neurotoxine domoïzuur (domoic acid of DA) wordt gesynthetiseerd door een aantal soorten van het mariene diatomeeën geslacht *Pseudo-nitzschia*. In Canada veroorzaakte dit toxine in 1987 bij verschillende mensen vergiftigingsverschijnselen na het eten van schelpdieren. Het ziektebeeld wordt Amnesic Shellfish Poisoning (ASP) genoemd, de symptomen zijn: buikkrampen, overgeven en neurologische reacties zoals verwardheid en geheugenverlies. In dit geval werd het toxine geproduceerd door de soort *Pseudo-nitzschia multiseries* (Bates, 2000). Na het vaststellen van deze ASP "outbreak" zijn in een groot aantal landen monitoringprogramma's ontwikkeld en uitgevoerd. Tijdens het uitvoeren van deze programma's in Canada werden in 1988 opnieuw hoge concentraties DA in schelpdieren uit de Bay of Fundy gemeten. De DA bron in deze periode was een andere soort uit het geslacht *Pseudo-nitzschia*, namelijk *P. pseudodelicatissima* (Martin et al., 1990). Een derde soort veroorzaakte massale sterfte van aalscholvers (*Phalacrocorax carbo*) en bruine pelikanen (*Pelecanus occidentalis*) langs de kust van Californië en Mexico. Hier was de soort *Pseudo-nitzschia australis* verantwoordelijk voor de DA productie. Deze soort was in 1999 ook de doodsoorzaak van ca. 400 zeeleeuwen (*Zalophus californianus*) in Californië, die met DA gecontamineerde ansjovis hadden geconsumeerd (Scholin et al., 2000). Deze soort, waarvan werd aangenomen dat hij alleen op het zuidelijk halfrond zou voorkomen is ook waargenomen als DA producent in Spanje en Schotland. In 1999 en 2000 veroorzaakte deze alg in Spanje en Schotland grote sterfte van schelpdieren, vnl. de grote mantel (*Pecten maximus*) en wijde mantel (*Chlamys opercularis*).

De tot nu toe laatst beschreven soort, *Pseudo-nitzschia multistriata* (Bates, 2000), werd oorspronkelijk alleen in Japanse wateren gevonden, maar recent bleken stammen uit de Golf van Napels ook DA te produceren. In totaal zijn er tot op heden negen potentieel toxische *Pseudo-nitzschia* soorten vastgesteld (Tabel 5.1.1). De morfologische verschillen tussen de verschillende soorten zijn klein en via lichtmicroscopie moeilijk vast te stellen. Determinatie van de verschillende structuren (voornamelijk poriegrootte en rangschikking) van de silicaatschaaltjes van de verschillende soorten met behulp van EM foto's (Elektronen Microscopie) is noodzakelijk (zie paragraaf 4.2, Figuur 4.2.1).

In dit hoofdstuk wordt verslag gedaan van onderzoek naar de groei en toxiciteit van Nederlandse *Pseudo-nitzschia*'s, en het effect van de toxische *P. multiseries* op het functioneren van een belangrijke macrofaunasoort: het wadslakje (*Hydrobia ulvae*).

Tabel 5.1.1. Potentieel giftige *Pseudo-nitzschia* soorten (¹aanwezig in Noordzee en toxisch, ²aanwezig in Noordzee maar niet-toxisch, ³niet aanwezig in Noordzee en potentieel toxisch)

<i>Pseudo-nitzschia multiseries</i> ¹	<i>Pseudo-nitzschia fraudulenta</i> ²
<i>Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima</i> ³	<i>Pseudo-nitzschia turgidula</i> ²
<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i> ³	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i> ²
<i>Pseudo-nitzschia australis</i> ³	<i>Pseudo-nitzschia multistriata</i> ³
<i>Pseudo-nitzschia seriata</i> ²	

5.2 Soorten in kustwater van Nederland

In 1996 is voor het eerst in Europa domoëzuurproductie van isolaten uit de Waddenzee vastgesteld. Het bleek om de soort *Pseudo-nitzschia multiseries* te gaan (Vrieling *et al.*, 1996). Als onderdeel van het MONISNEL programma wordt onderzoek verricht naar het voorkomen van deze en andere potentieel giftige *Pseudo-nitzschia* soorten in het Nederlandse kustwater (Peletier, 1999).

In 2000 zijn in watermonsters van de Noordzeekust (Noordwijk 2 en 10), de centrale Noordzee (Terschelling 135) en de westelijke Waddenzee (Marsdiep) de volgende *Pseudo-nitzschia* soorten waargenomen: *P. pungens*, *P. turgidula*, *P. delicatissima*, *P. fraudulenta* en *P. multiseries* (Koeman *et al.*, 2000). Uit deze veldmonsters zijn van al deze soorten individuele cellen geïsoleerd (Koeman *et al.*, 2000).

5.3 Groei

Allereerst is de groei van *Pseudo-nitzschia* in verschillende media gemeten (K, Provasoli, f/10, f/4, f/2); in f/2 medium was de groei het best. Hierna zijn groeicurves van de verschillende soorten in f/2 gemeten bij kweekomstandigheden die overeenkomen met de veldsituatie (zie Fig. 5.3.1 en 5.3.2).

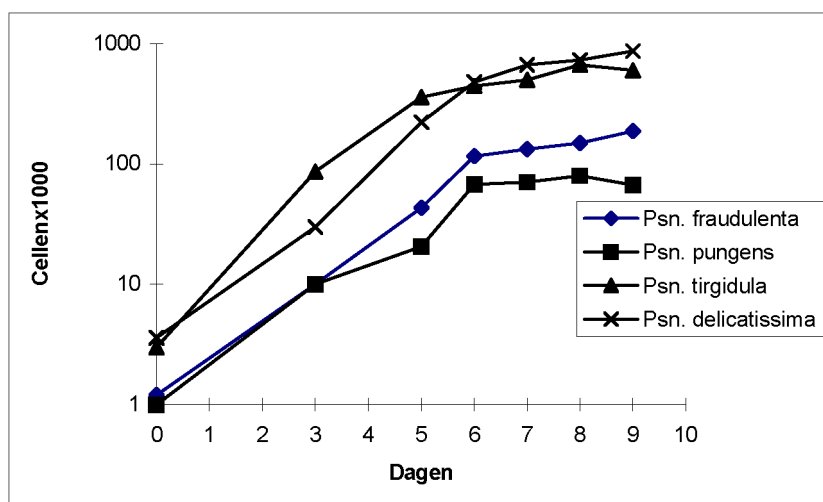


Fig. 5.3.1. Groeicurves van vier *Pseudo-nitzschia* soorten (cellen per ml). F/2 medium, 12°C, L:D = 12:12 en I = 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

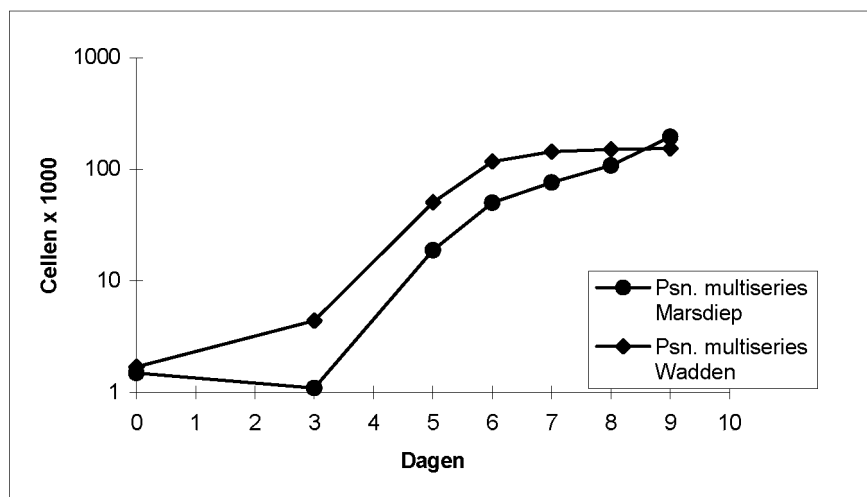


Fig. 5.3.2. Groeicurves van twee *Pseudo-nitzschia multiseries* stammen uit de Waddenzee (cellen per ml). F/2 medium, 12°C, L:D = 12:12, I = 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

De groeisnelheid van de verschillende soorten ligt tussen de 0,2 en 0,5 delingen per dag in de exponentiële fase, de maximale dichtheid wordt bereikt na ca. 7 dagen. Hierna wordt de groeisnelheid laag en uiteindelijk stopt de groei en komen de cellen in de stationaire fase. De *Pseudo-nitzschia* soorten groeien goed onder de gegeven groeicondities en kunnen hoge dichtheden bereiken.

5.4. Toxineproductie (domoïzuur, DA)

Omdat in de stationaire fase de toxineproductie optimaal is zijn tijdens deze fase monsters van alle soorten verzameld voor de DA-metingen. De concentratie DA in de algencellen werd gemeten met een chromatografietechniek (HPLC) ten opzichte van een standaard. *Pseudo-nitzschia multiseries* laat in het chromatogram een duidelijke piek zien (Figuur 5.4.1). Deze soort, die in 2000 uit watermonsters van het Marsdiep is geïsoleerd, produceert het toxine en is dus onder de gegeven groeiomstandigheden toxisch.

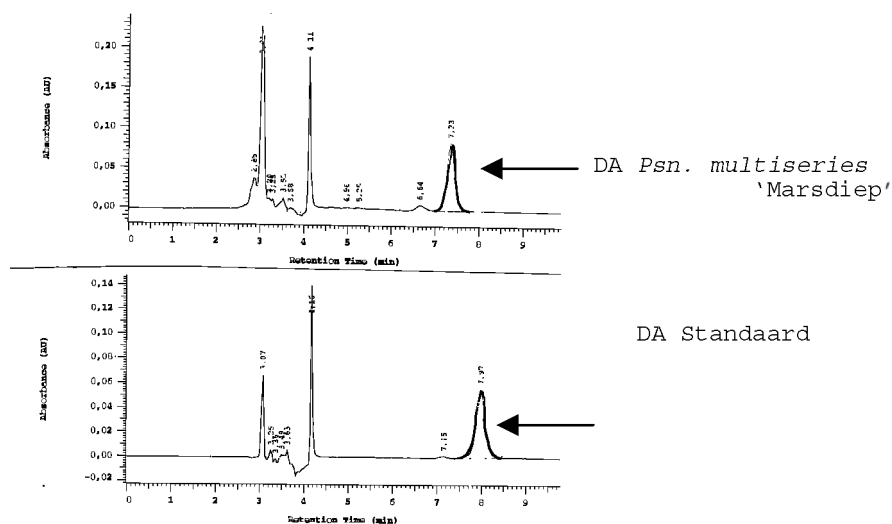


Fig. 5.4.1. Chromatogram met DA (domoïzuur) piek in een monster van de soort *Pseudo-nitzschia multiseriess* 'Marsdiep' gemeten met HPLC; daaronder het chromatogram van de (chemische) standaard.

Bij de andere *Pseudo-nitzschia* soorten is onder deze groeiomstandigheden geen toxine productie gemeten. Van *P. multiseriess* 'Marsdiep' neemt de toxineproductie in de stationaire groeifase toe van 54 tot 309 fg per cel (Figuur 5.4.2). Toxineproducerende algensoorten komen dus in watermonsters van het Marsdiep voor, en de fysiologische toestand van de alg is bepalend voor het toxinegehalte.

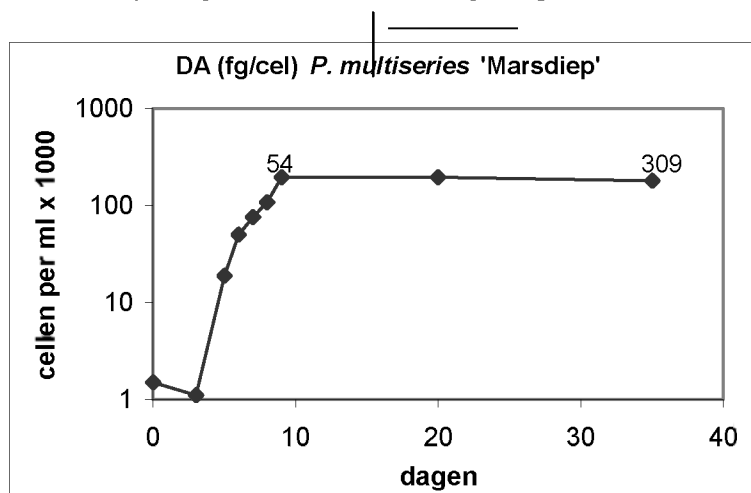


Fig. 5.4.2. Domoïzuurproductie in cellen van *Pseudo-nitzschia multiseriess* 'Marsdiep' in de stationaire fase: na 10 en 35 dagen incubatie.

5.5 Effecten op macrofauna

Van belang is te weten of giftige *Pseudo-nitzschia*'s ook gegeten worden door macrofauna, zodat er sprake is van toxinetransport in de voedselketen. Hiervoor zijn van *P. multiseriis* 'Marsdiep' en *P. multiseriis* 'Wadden' in het begin en aan het eind van de stationaire fase (met de hoogste toxinegehalten) de cellen geoogst en aangeboden aan grazende wadslakjes (*Hydrobia ulvae*). Als maat voor de 'grazing' is de faecal pellet (poep) productie gebruikt, waarbij niet giftige *P. pungens*-cellen als controle dienden. Uit dit experiment blijkt (Fig. 5.5.1) dat een toename van de toxinegehalten in de algencellen leidt tot een afname van de graassnelheid.

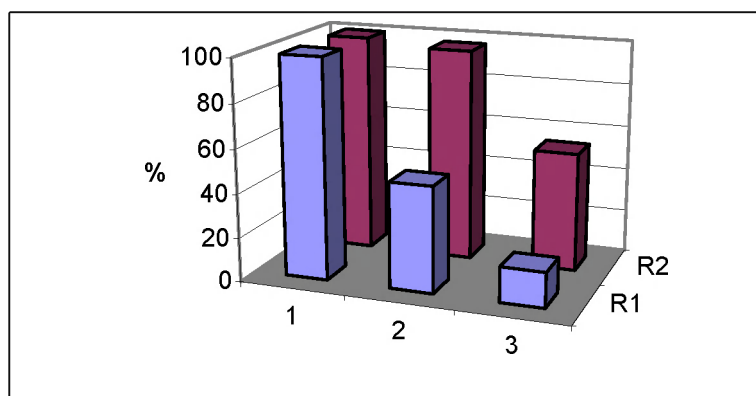


Fig. 5.5.1. Faecal pellet productie van *Hydrobia ulvae*. R2, aangeboden cellen geoogst in het begin (weinig toxinen) van de stationaire fase en R1, aan het eind van de stationaire fase (veel toxinen). 1 = *P. pungens* (geen toxine/cel) en gesteld op 100%; 2 = *P. multiseriis* 'Wadden' (weinig toxine/cel); 3 = *P. multiseriis* 'Marsdiep' (veel toxine/cel).

In de monitoring van plaagalgien neemt *Pseudo-nitzschia* een belangrijke plaats in vanwege de potentiële effecten van domoëzuur op consumenten van schelpdieren. De conclusie van dit onderzoek is dat *P. multiseriis* in de Nederlandse kustwateren ook een negatief effect kan hebben op het functioneren van het bentische ecosysteem.

6 HABs and HAB species

6.1 Inleiding

Bloeien van plaagalgen staan in het engels bekend als: Harmful Algal Blooms (HABs). Een 'gewone' algenbloei is de jaarlijkse toename van de algenbiomassa in het voorjaar en wordt meestal uitgedrukt in de concentratie chlorofyl a; zie bijvoorbeeld Fig. 2.2.1. Ook eutrofiëring, een toename van nutriëntenconcentraties, kan leiden tot een verhoging van de chlorofylconcentratie.

In tegenstelling tot gewone algenbloei, dienen bloeien van plaagalgen soortspecifiek benaderd te worden. Ook hier kan een hoge nutriëntenconcentratie een rol spelen door een hoge algenbiomassa mogelijk te maken. Maar plaagalgenbloeien kunnen ook in minder eutrofe omstandigheden voorkomen omdat bij lage algenconcentraties er al negatieve effecten kunnen optreden. Om het optreden van plaagalgenbloeien te verklaren wordt vaak in eerste instantie gekeken naar de abiotische omgevingsvariabelen (hoofdstuk 2). In de tweede plaats naar biotische variabelen (bijvoorbeeld: wordt de alg begraasd) maar daarnaast is kennis van de levenscyclus van de betreffende plaagalg van belang (sedimentatie van *Phaeocystis* als verklaring voor zuurstofloosheid, paragraaf 3.1).

In oktober 2001 werd op Mallorca een EU workshop gehouden over de relatie tussen de levenscyclus van plaagalgen en het optreden van plaagalgbloeien (LIFEHAB, Life histories of microalgal species causing harmful blooms). Veel plaagalgen hebben namelijk een ingewikkelde levenscyclus met verschillende typen cellen (flagellaten, kolonies, cysten). Kennis van deze celtypen en de cyclus is van belang omdat: a) het voorkomen van verschillende celtypen of levensstadia het abiotische bereik vergroten waarin een soort kan overleven, b) verschillende celtypen zoals cysten bijdragen aan de natuurlijke of antropogene verspreiding (ballastwater), c) seksuele gebeurtenissen in de cyclus de genetische structuur en diversiteit van een populatie veranderen hetgeen de weerbaarheid en het ecologische succes van een soort kan verhogen, d) de verschillende fases in een celcyclus een belangrijke rol kunnen spelen in de plotselinge vorming of beëindiging van een bloei en e) sommige fases een bescherming kunnen bieden tegen virussen, parasieten of grazers (zooplankton).

Het RIKZ leverde met name een inbreng op het gebied van de raphidophyten, daarbij geholpen door prof. C. Billard, dr. B. Edvardsen, drs. K. de Boer, dr. M. van Rijssel en dr. M. Lion, en *Phaeocystis*. De schriftelijke bijdragen zijn opgenomen in het LifeHAB rapport. Omdat dit rapport nog niet is gepubliceerd volgt hier de (engelse) tekst in bijlage I. De volledige tekst is te vinden op: <http://www.icm.csic.es/bio/projects/lifehab/>

In dit hoofdstuk is daarnaast nieuwe, soortspecifieke, informatie opgenomen over *Coolia monotis* (een potentieel toxische dinoflagellaat) en *Prymnesium* (een kleine flagellaat bekend van vissterftes in licht brakke wateren).

6.2 *Coolia monotis*

De potentieel toxische dinoflagellaat *Coolia monotis* werd in 2000 voor het eerst in Nederland waargenomen, geïsoleerd en in kweek gebracht (Koeman *et al.* 2000, Peperzak *et al.* 2000). In 2001 is zij opnieuw bij Scharendijke (Grevelingen) waargenomen. Deze waarnemingen werden gedaan in week 33 (half augustus, 10 cellen/liter), week 35 (eind augustus, 20 cellen/liter) en in week 46 (half november, 10 cellen/liter).

Omdat deze plaagalg goed kon worden gekweekt konden er niet alleen metingen aan de groeisnelheid worden gedaan, maar er konden ook cellen in verschillende groeistadia worden geoogst om toxinen-analyses uit te voeren. Deze analyses werden (gratis) uitgevoerd door prof. Yasumoto in Japan.

Twee stammen van *C. monotis* (stam 3 en stam 4) werden éénmalig gekweekt onder twee verschillende omstandigheden: voorjaar (15°C en 67 W h m⁻² dag⁻¹) en zomer (24°C en 448 W h m⁻² dag⁻¹). De saliniteit van het PEP-Si medium was 31 psu. De groeisnelheden van stam 4 ($\mu = 0.27$ dag⁻¹) waren ca. 30% hoger dan stam 3 ($\mu = 0.20$). Onder 'voorjaarsomstandigheden' was de gemiddelde snelheid $\mu = 0.21$; onder 'zomeromstandigheden' was dit 24% hoger ($\mu = 0.26$).

Tijdens de exponentiële en stationaire groeifase van alle vier kulturen werden cellen geoogst op GF/C filters en ingevroren bij -80°C. Voor verzending werden de filters gevriesdroogd.

De monsters werden door prof. T. Yasumoto (Japan Food Research Laboratories, Tokyo) geanalyseerd, o.a. m.b.v. LC/MS (Goto *et al.* 2001). Omdat door Holmes *et al.* (1985) was gesuggereerd dat 'cooliatoxine' yessotoxinesulfaat was, is 1-desulfo-yessotoxine door prof. Yasumoto als referentie gebruikt. Echter, in geen van de *Coolia*-monsters kon door hem 'cooliatoxine' worden aangetoond. Ook gerelateerde toxinen (yessotoxine, 45-hydroxy-yessotoxine, carboxy-yessotoxine en adriatoxine) konden niet worden aangetoond (T. Yasumoto, persoonlijke mededeling). De conclusie is derhalve dat *Coolia monotis* in het Grevelingenmeer onder de geteste omstandigheden niet toxisch is. Het is daarom waarschijnlijk dat *C. monotis* in het Grevelingenmeer niet toxisch is.

6.3 *Prymnesium*

Sinds de jaren twintig van de vorige eeuw worden er vissterftes gemeld in binnenwateren die veroorzaakt worden door bloeien van de ééncellige haptofyt *Prymnesium*. Deze giftige plaagalg wordt vaak nog ten onrechte 'goudalg' genoemd, het resultaat van een oude, foutieve taxonomische indeling. Binnen de haptofyten is het namelijk juist *Prymnesium* die als voorbeeld geldt voor de klasse der 'prymnesiofyten'. Omdat één van de belangrijke taxonomische kenmerken van deze klasse het bezit is van een haptonema, een sprietje tussen de twee zwemflagellen, is een betere benaming van *Prymnesium* daarom 'sprietalg'.

Vissterftes komen voor in najaar of voorjaar, in wateren die licht brak zijn (1-7 psu). De zuurstofconcentraties zijn nog hoog (100%) en de watertemperatuur is relatief laag (7-12°C). Kenmerkend is dat één van de nutriënten stikstof of fosfaat in een zeer lage concentratie voorkomt. Het is mogelijk dat nutriëntenlimitatie leidt tot toxineproductie maar dit is nog niet onderzocht.

Ondanks een toename in gemelde vissterftes die aan *Prymnesium* worden toegeschreven (Tabel 6.3.1) is de soortnaam nog steeds niet bekend. Meestal is, aan de hand van lichtmicroscopische waarnemingen, de soort gerekend tot *Prymnesium parvum*. Er zijn echter meerdere toxische *Prymnesium*-soorten, die alleen door elektronenmicroscopisch onderzoek van de schaaltes op de celwand kunnen worden gedetermineerd.

Tabel 6.3.1. Vissterftes veroorzaakt door *Prymnesium* in Nederland. Gegevens over de abiotische omstandigheden (saliniteit, temperatuur e.d. zijn opgenomen in de Monisnel database).

Jaar	datum	Organisme	Locatie	Dode vis
1920	15-Mar	<i>Prymnesium</i> sp.	Workum	Voorn, brasem, paling
1990	15-Dec	<i>Prymnesium</i> sp.	Botshol	Niet bekend
1993	15-Mar	<i>Prymnesium</i> sp.	IJzendijke	Brasem, karper, paling
1997	12-Nov	<i>Prymnesium</i> cf. <i>parvum</i>	Dijkwater	Paling
1998	24-Apr	<i>Prymnesium</i> cf. <i>parvum</i>	Dijkwater	Paling
1999	27-Apr	<i>Prymnesium</i> cf. <i>parvum</i>	Arnemuiden	Karper
2000	06-Apr	<i>Prymnesium</i> cf. <i>parvum</i>	BinnenSchelde	Brasem, snoek, paling

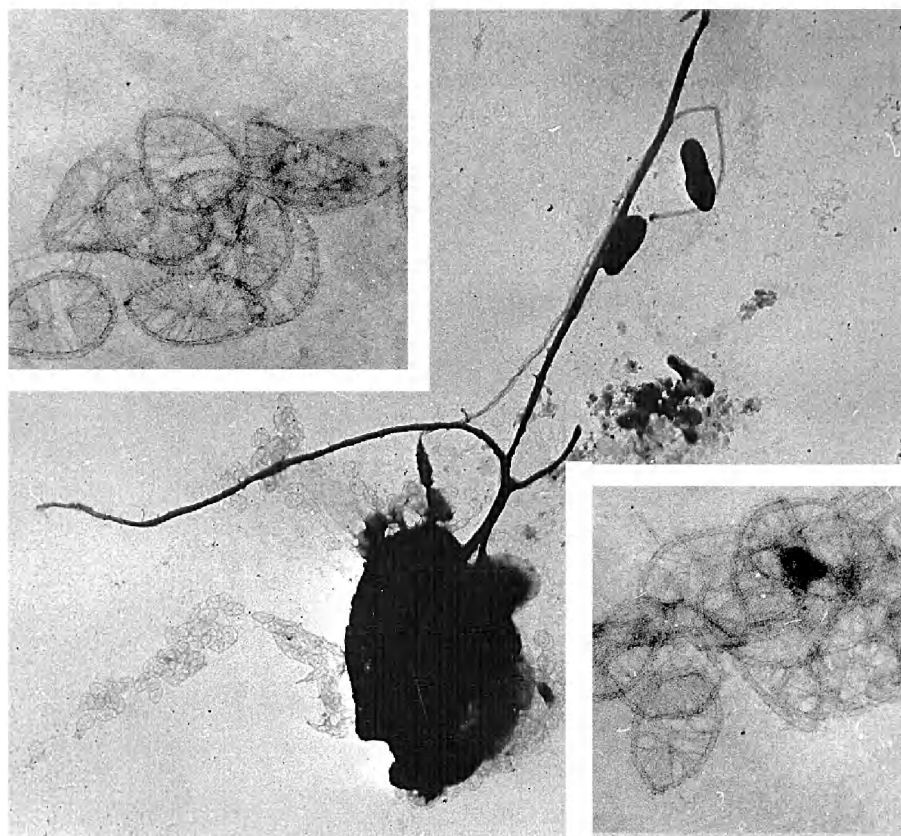


Fig. 6.3.1. Electronenmicroscopische opname van *Prymnesium* (visdodende 'sprietalg') uit de Binnenschelde. De cel op de grote foto heeft een lengte van ca. 6 μm (levend zijn de cellen ca. 8-11 μm). Links en in het midden zijn de twee lange flagellen te zien. Rechts van de flagellen is de korte haptonema ('spriet') zichtbaar. Aan de hand van de schaaltsjes (linksboven en rechtsonder met een sterkere vergroting), die afkomstig zijn van de celwand, is deze cel gedetermineerd als *Prymnesium patelliferum*: zowel aan de onder- als aan de bovenzijde van de schaaltsjes is een karakteristiek spaakvormig patroon te zien. Deze schaaltsjes, met een lengte van ca. 0,4 μm , zijn met een gewone lichtmicroscop niet zichtbaar.

Monsters genomen tijdens de vissterfte in de Binnenschelde zijn gefixeerd met Lugol, bewaard in de koelkast, en in 2001 door collega's van het Botanisch Instituut in Kopenhagen electronenmicroscopisch onderzocht (dr. G. Hansen en prof. Ø. Moestrup). Hieruit kwam naar voren dat de in de Binnenschelde aanwezige soort *Prymnesium patelliferum* was (Figuur 6.3.1). Echter, recent onderzoek heeft aannemelijk gemaakt dat *P. patelliferum* en *P. parvum* geslachtscellen zijn van één soort die dan ook de oudste naam krijgt: *P. parvum*.

7 Projectvoortgang

7.1 Stand van zaken

In 2001 werd Monisnel gefinancierd door drie regionale Directies: Zeeland, Zuid Holland en Noordzee. Tweewekelijks konden in het planktonseizoen schriftelijke voortgangsrapportages worden geleverd. Daarnaast vond ad hoc mondeling en schriftelijk contact plaats.

De volgende RIKZ medewerkers leverden belangrijke bijdragen aan Monisnel: Harry Peletier (*Pseudo-nitzschia*, domoïzuuranalyses), Ben Sandee (rRNA probes en flowcytometrie) en Louis Peperzak (projectleider). De uitvoering van de monitoring en de tweewekelijkse rapportage was in handen van Hilda Bouma, die via een uitbesteding aan de firma DPM bij het RIKZ werkzaam was.

7.2 (Inter)-nationale contacten

Het Nationaal Referentielaboratorium (NRL) Marine Biotoxinen is een overleg waarin de controle op en de detectiemethoden van algentoxinen in menselijk voedsel worden besproken. Het NRL is ondergebracht bij het RIVM in Bilthoven, en is een onderdeel van een controlesysteem van de EU. Naast het RIVM zijn de deelnemers: RIVO, Nederlands Normalisatie Instituut (NEN), Universiteit Utrecht, de Keuringsdienst van Waren (WVS) en RIKZ. Met name met het RIVO (M. Collombom, M. Poelman) vond in 2001 regelmatig overleg plaats.

HABES (HAB Expert System), een EU project met het WL in Delft als projectleider, werd in 2001 gestart. Eén van de klanten van dit project is de directie Noordzee (dr. W. Zevenboom). Diverse Europese partners onderzoeken de interacties tussen fysische en ecologische factoren die de vorming van HABS bepalen waarna er modellen gemaakt worden (op basis van fuzzy logic). Met deze modellen kunnen bloeien worden voorspeld. Het RIKZ levert fysische en biologische kennis in de personen van Johan de Kok, Bert Wetsteyn en Louis Peperzak.

WGHABD: Working Group on Harmful Algal Bloom Dynamics (ICES-IOC): in dit Europees-Noordamerikaanse overleg worden ieder jaar de "National Reports" over plaagalgbloei besproken en worden de 10-jaarlijkse overzichtskaarten van de toxische bloeien in het ICES-gebied bijgewerkt. Deze informatie wordt ook ingevoerd in HAEDAT: de Harmful Algal Event DATAbase waarin alle ICES deelnemers toxische plaagalgbloei kunnen melden, maar ook informatie kunnen terugvinden (<http://ioc.unesco.org/hab/data32.htm>). WGHABD gegevens worden o.m. gebruikt in de OSPAR rapportage (DNZ-RIKZ). Een aantal voorbeelden van de WGHABD kaarten wordt gegeven in de Bijlagen II.1 tot II.4.

Via Monisnel werden tot nu toe de Nederlandse plaagalggegevens in de werkgroep gerapporteerd. Vanwege bezuinigingen bij het RIKZ zal de deelname in 2002 worden gestopt.

8 Referenties

- Aquasense (1999) In-situ bioassays met *Nereis virens*. Ontwikkeling en uitvoering. In opdracht van: Rijksinstituut voor Kust en Zee. Rapportnummer: 99.1374.
- Babarro, J.M.F. and de Zwaan, A. (2002) Influence of abiotic factors on bacterial proliferation and anoxic survival of the sea mussel *Mytilus edulis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **273**: 33-49.
- Bates, S.S. (2000) Domoic acid producing diatoms: another genus added. *J. Phycol.* **36**: 978-983.
- Goto, H., Igarashi, T., Yamamoto, M., Yasuda, M., Sekiguchi, R., Watai, M., Tnno, K. and Yasumoto, T. (2001) Quantitative determination of marine toxins associated with diarrhetic shellfish poisoning by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *J. Chromatography A*, **907**: 181-189.
- Holmes, M.J., Lewis, R.J., Jones, A. en Hoy, A.W. (1995) Cooliatotoxin, the first toxin from *Coolia monotis* (Dinophyceae). *Nat. Toxins* **3**: 355-362.
- Koeman, R.P.M., Verwey, G.L. en Haan de A.L. (2000) Isolatie van potentieel toxische algen uit de Nederlandse Kustwateren. Koeman en Bijkerk. Rapport nr. 2000-37.
- Martin, J.L., Haya, K., Burrige, L.E., Wildish, D.J. (1990) *Nitzschia pseudodelicatissima*- a source of domoic acid in the Bay of Fundy, eastern Canada. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **67**: 177-182
- Peletier, H. (1999) Risico's van Plaagalgen, werkdocument RIKZ/OS-99.604x.
- Peletier, H. Peperzak, L., Liebezeit, G. en Meng Fu. *Pseudo-nitzschia* species isolated from Dutch Coastal Waters. Toxic and non toxic species (in preparation).
- Peperzak, L. (2002) The wax and wane of *Phaeocystis globosa* blooms. Ph.D. Thesis, University of Groningen.
- Rijkswaterstaat (1991) Nota Veilig Getij.
- Scholin, C.A. *et al.* (2000) Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom. *Nature* **403**: 80-84.
- Vrieling, E.G., Koeman, R.P.T., Scholin, C.A., Scheerman, P., Peperzak, L., Veenhuis, M. en Gieskes, W.W.C. (1996) Identification of a domoic acid-producing *Pseudo-nitzschia* species in the Dutch Wadden Sea with electron microscopy and molecular probes.

Bijlage I. Nederlandse inbreng LifeHAB workshop 2002

Raphidophytes : Introduction

The raphidophytes are a group of potentially toxic phytoflagellates with benthic cysts (Figure I.1.1). Prominent genera in marine waters are *Chattonella*, *Fibrocapsa*, and *Heterosigma*. In Europe, harmful raphidophytes have been observed recently, mainly in the past two decades (Figure I.1.2 and references therein). Ichthyotoxic blooms, killing wild and farmed fish have been recorded in the North Sea west of Denmark and in southern Sweden (Lu and Göbel 2000, Backe-Hansen *et al.* 2001), in the Adriatic Sea (Anonymous 1998), and along the Atlantic coasts of Scotland (Ayres *et al.* 1982), France (Nézan *et al.*, 1995, Erard-Le Denn *et al.* 2001), Spain and Portugal (ICES-IOC HAEDAT). In 1989 shellfish were killed in Portugal and in 1991 seafood became toxic in Spain (ICES-IOC HAEDAT).

It has been hypothesized that several raphidophyte species have been introduced recently by shellfish imports (Billard 1992) or by ballast water discharge (Connell 2000). An extension of this recent-introduction hypothesis states that the continuous introduction of formerly isolated raphidophyte populations may lead to ongoing sexual reproduction, and consequently an enhanced capability to form harmful blooms (Kooistra *et al.* 2001).

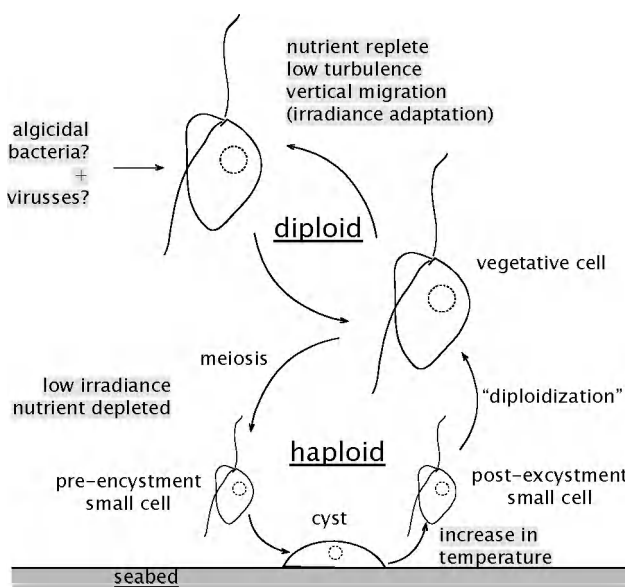


Figure I.1.1. Schematic haplo-diplontic life cycle of raphidophytes in which diploidization and meiosis have not been observed (adapted from Imai *et al.* 1998) with the environmental factors involved in growth, mortality and life cycle transitions indicated in grey. According to Nakamura *et al.* (1990), however, the haploid 'small pre-encystment cells' fuse to produce diploid 'triangle-shaped' planozygotes that in turn transform into (diploid) cysts (hypnozygotes).

Knowledge gaps

According to Yamaguchi and Imai (1994), the bloom-forming vegetative flagellate cell type of *Chattonella antiqua* and *C. marina* is large ($>20\text{ }\mu\text{m}$) and diploid, the cyst is haploid and is formed from a smaller haploid flagellate (Figure I.1.1). On the other hand, Nakamura *et al.* (1990) claim that the cyst of *C. antiqua* is diploid and is formed after the fusion of the small pre-encystment cell to a triangle-shaped planozygote.

The life cycle of *Heterosigma akashiwo* also features non-motile vegetative cells that are agglutinated in large numbers and encapsulated with mucus (Yamochi 1984, Smayda 1998). Apparently, less is known about the life cycle of *Fibrocapsa* although the presence of cysts was also confirmed (Yoshimatsu 1987). In general, cysts are formed when both nutrient concentrations and irradiance are low. Very little is known about how meiosis and the reformation of the diploid phase take place (Imai *et al.* 1998).

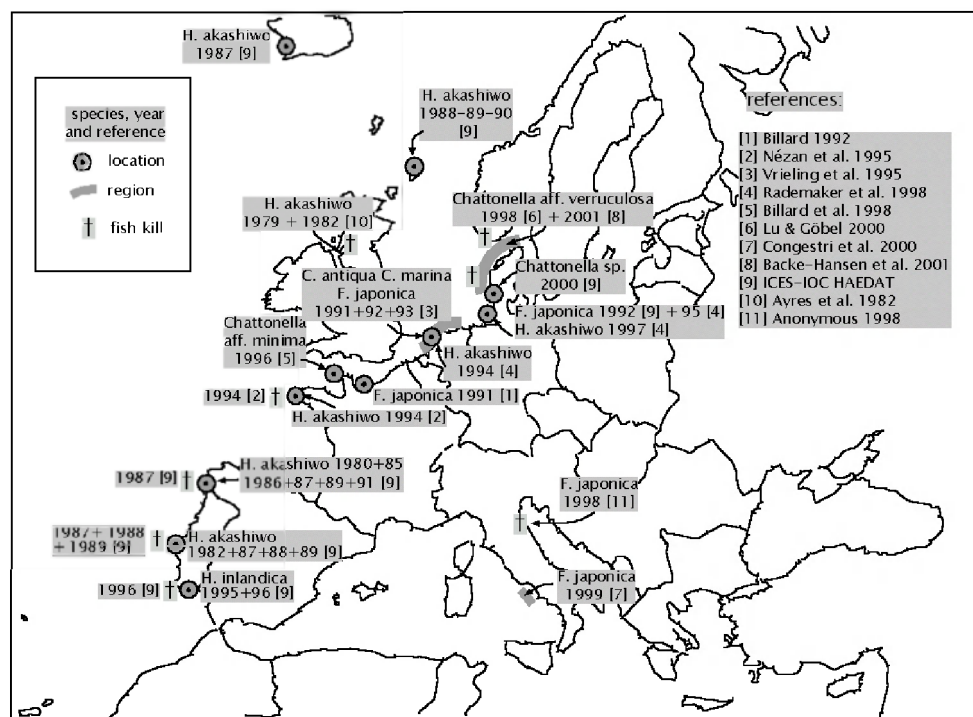


Figure I.1.2. Observations of potentially harmful raphidophytes and ichthyotoxic events in Europe [1-8] were augmented with data from the ICES-IOC HAEDAT (Harmful Event Database, [9]). Flagellate 'X' [10] is *H. akashiwo* according to Li & Smayda (2000).

The potentially harmful species identified in European waters are *C. antiqua*, *C. marina*, *C. aff. verruculosa*, *Fibrocapsa japonica*, *Heterosigma akashiwo* and *H. inlandica* (Billard 1992, Nézan *et al.* 1995, Vrieling *et al.* 1995, Anonymous 1998, Billard *et al.* 1998, Rademaker *et al.* 1998, Congestri *et al.* 2000, Lu and Göbel 2000, Backe-Hansen *et al.* 2001, ICES-IOC HAEDAT). *C. subsalsa* (Mignot 1976), *C. aff. minima* (Billard *et al.* 1998) and *Olisthodiscus* sp. have been observed in Europe but they are not considered harmful.

So far, harmful effects on fish in Europe have only been described for *H. akashiwo* (Nézan *et al.* 1995, ICES-IOC HAEDAT), *H. inlandica* (ICES-IOC HAEDAT), *F. japonica* (Anonymous 1998) and *Chattonella* aff. *verruculosa* (Lu & Göbel 2000, Backe-Hansen *et al.* 2000). *H. inlandica* allegedly caused shellfish mortality in Portugal (ICES-IOC HAEDAT).

Furthermore, with the exception of *F. japonica* (Khan *et al.* 1996) neither the composition of the toxins produced by raphidophytes in Europe, nor the toxin concentrations in raphidophyte blooms have been measured so far. Therefore, more work is needed on the capabilities of toxin production by European raphidophytes and the environmental circumstances that promote toxicity and other potentially harmful effects such as mucus production.

Identification of flagellate raphidophytes in Dutch coastal waters has been performed with light microscopy and with antibodies developed against Japanese

strains of *Chattonella* (Vrieling *et al.* 1995). The random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was used to detect differences between species and strains of cultured Japanese *Chattonella* spp. (Murayama-Kayano *et al.* 1998). Whole cell fluorescent *in situ* hybridization (FISH) and sandwich hybridization assay (SHA) techniques for the identification and quantification of *H. akashiwo* and *F. japonica* have been developed in the USA and New Zealand (Tyrell *et al.* 2001). It can be concluded that the development and application of molecular tools in the identification of raphidophytes has started. However, a complete 'tool box' for all harmful raphidophytes and their life cycle stages is still not available.

A general problem is that the fixation of the delicate raphidophyte cells is difficult, leading to morphological changes and in extreme cases to rapid disintegration and cell loss. The fragility of raphidophyte cells may jeopardize the identification and enumeration of life cycle stages when techniques are employed that are based on some kind of morphological recognition (Tomas 1997, L. Peperzak, unpublished results). For the fixation of *F. japonica* a new formaldehyde-Lugol fixative was recommended by Rademaker *et al.* (1998); this fixative should be tested on other raphidophytes too.

Cysts can be sampled and enumerated using standard techniques. The cysts of *C. antiqua* and *C. marina* are, however, morphologically indiscriminable (Imai *et al.* 1998). Raphidophyte cysts may not have been recognized by dinoflagellate-cyst investigators. Furthermore, raphidophyte cysts adhere to solid surfaces such as diatom frustules and sand grains which may obscure their presence (Imai *et al.* 1998). The presence of cysts in Europe has gone unnoticed and their possible role in bloom formation in coastal regions of Europe have not been studied. It is remarkable though, that blooms in Japan are initiated at temperatures around 20°C that induce cyst germination, while in Europe blooms consisting of vegetative cells are usually observed at lower temperatures.

Blooms may be regulated by nutrient concentrations: nutrient depletion probably induces the formation of haploid pre-encystment cells (Imai *et al.* 1998). There are indications that viruses may be involved in bloom termination too, as in the case of *H. akashiwo* (Nagasaki *et al.* 1994) whereas Imai *et al.* (1995) suggested that algicidal marine bacteria killing *C. antiqua* and other raphidophytes also influence their population dynamics.

Approach

Studies should be carried out using field samples (water and sediment) and by collecting environmental data (temperature, salinity, nutrient concentrations, irradiance in the water column). Attention should be paid to small flagellate cells (pre-and possibly post-encystment cells), cysts and the possibility of bloom-affecting species-specific viruses and bacteria.

In addition, experiments should be carried out in the laboratory. Life cycles should be reproduced for each species and the contradiction between the Nakamura *et al.* (1990) and Imai *et al.* (1998) life cycle schemes with respect to cyst formation and cyst ploidy should be resolved (see Figure I.1.1). The possible toxin production of several potentially harmful species should be established.

Pathways of raphidophyte introductions (shellfish, ballast water) should be identified and possible counter-measures should be investigated.

Methodologies and tools

In general, the techniques for studying life cycles, life cycle strategies and the inducement (triggers) of transitions between the life cycle stages that were discussed for other groups during the LifeHAB workshop may be applicable to raphidophytes. The fragility of the cells places enhances the need to use molecular techniques (e.g. SHA and RAPD) that do not depend on morphological characteristics, and of developing fast and reliable fixation and counting methods. Techniques to identify cysts are needed. Modelling blooms using fuzzy logic tools as suggested for diatoms, dinoflagellates and haptophytes will probably also be useful for raphidophytes.

Recommendations

- Investigate the presence of raphidophyte cysts in Europe, and their pathways of introduction
- Extend identification tools with non-morphological (molecular) techniques
- Extend identification tools for all life cycle stages, including the haploid small flagellates and the cyst
- Establish the role of cysts in bloom formation (especially the role of temperature in cyst germination)
- Investigate the role of viruses and bacteria in bloom termination
- Measure toxin production capabilities in European raphidophyte strains

Links with other EuroHAB activities

Raphidophytes are ichthyotoxic and, therefore, studies of their life cycle are linked to investigations of other fish killing groups: haptophytes (*Chrysochromulina*, *Prymnesium*) and dinoflagellates (e.g. *Karenia mikimotoi*), especially with regard to the identity of the toxins and the mode of toxin action. There is also a link to studies of the introduction of harmful species via ballast water. In BioHAB the role of viruses and bacteria in bloom termination is studied, which is of interest to the study of raphidophyte blooms. In HABES, fuzzy logic expert systems (models) are developed for haptophyte, dinoflagellate and diatom HABs.

Priorities

- Reliable identification and enumeration techniques
- Role of cysts in bloom dynamics
- Bloom dynamics: role of nutrients (including trace elements and vitamins), irradiance and temperature

Acknowledgements

Thanks are due to my LifeHAB colleagues for their comments. Especially the help of dr. Bente Edvardsen (NIVA Oslo), prof. Chantal Billard (Université de Caen) and Karin de Boer M.Sc. and dr. M. van Rijssel (University of Groningen) in the final preparation of the manuscript is gratefully acknowledged. Dr. Monica Lion (IOC-IEO Science Communication Centre on Harmful Algae in Vigo) kindly provided the raphidophyte events filed in HAEDAT (Harmful Alga Event Database).

References

- ANONYMOUS 1998. 1998 (settembre) – Moria di Pesci.
[http://www.regione.marche.it/mareancona/mp-9-98\(1\).htm](http://www.regione.marche.it/mareancona/mp-9-98(1).htm).
- AYRES P.A., SEATON D.D. & TETT P.B. (1982) Plankton blooms of economic importance to fisheries in UK waters 1968-1982. ICES LM 1982/L:38.
- BACKE-HANSEN P., DAHL E. & DANIELSSEN D.S. 2001. On a bloom of *Chattonella* in the North Sea/Skagerrak in April-may 1998. In: *Proceedings of the 9th International Conference on Harmful Algal Blooms* (Ed. By G.M. Hallegraeff *et al.*), Tasmania. In press.
- BILLARD C. 1992. *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae), algue planctonique nouvelle pour les côtes de France. *Cryptogamie, Algologie* 13: 225-231.
- BILLARD C., ERARD-LE DENN E. & CRASSOUS M.P. 1998. France : new observations of Raphidophyceae. *Harmful Algae News* 17: 5-6.
- CONGRETI R., ALBERTANO P., RAVIZZA P., LE FOCHE M., CALDARINI J. & ZAOTTINI E. 2000. On blooms of *Fibrocapsa* along the middle Tyrrhenian Sea (Mediterranean Sea), Italy, in spring-summer 1999. ASLO Abstract, Copenhagen.
- CONNELL L.B. 2000. Nuclear ITS region of the alga *Heterosigma akashiwo* (Chromophyta: Raphidophyceae) is identical in isolates from Atlantic and Pacific basins. *Marine Biology* 136: 953-960.
- ERARD-LE DENN E., BELIN C. & BILLARD C. 2001. Various cases of ichthyotoxic blooms in France. In: *Aquaculture, Environment and Phytoplankton*. (Ed. by G. Arzul), Editions Ifremer (in press).
- ICES-IOC HAEDAT, Database of Harmful Alga Events (<http://ioc.unesco.org/hab/data/htm>)
- IMAI I., ISHIDA Y., SAKAGUCHI K. & HATA Y. 1995. Algicidal marine bacteria isolated from Northern Hiroshima Bay, Japan. *Fisheries Sciences* 61: 628-636.
- IMAI I., YAMAGUCHI M. & WATANABE M. 1998. Ecophysiology, Life Cycle, and Bloom Dynamics of *Chattonella* in the Seto Inland Sea, Japan. In: *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. (Ed. by D.M. Anderson, A.D. Cembella & G.M. Hallegraeff), pp. 95-112. Springer Verlag, Berlin.
- KHAN S., ARAKAWA O. & ONOUE Y. (1996) Growth characteristics of a neurotoxin-producing chloromonad *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae). *Journal of the World Aquaculture Society* 27: 247-253.
- KOOISTRA W.H.C.F., DE BOER M.K., VRIELING E.G., CONNELL L.B. & GIESKES W.W.C. (2001) Variation along ITS markers across strains of *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae) suggests hybridisation events and recent range expansion. *Journal of Sea Research*. In press.

- Li Y. & Smayda T.J. 2000. *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae): On prediction of the week of bloom initiation and maximum during the initial pulse of its bimodal bloom cycle in Narragansett Bay. *Plankton Biology and Ecology* 47: 80-84.
- LU D. & GÖBEL J. 2000. *Chattonella* sp. bloom in North Sea, spring 2000. *Harmful Algae News* 21: 10-11.
- MIGNOT J.P. 1976. Compléments à l'étude des chloromonades. Ultrastructure de *Chattonella subsalsala* Biecheler flagellé d'eau saumâtre. *Protistologica* 12: 279-293.
- MURAYAMA-KAYANO E., YOSHIMATSU S., KAYANO T., NISHIO T., UEDA H. & NAGAMUNE T. 1998. Application of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique to distinguish species of the red tide phytoplankton *Chattonella* (Raphidophyceae). *Journal of Fermentation and Bioengineering* 85: 343-345.
- NAKAMURA Y., UMEMORI T., WATANABE M., KULIS D.M., & ANDERSON D.M. 1990. Encystment of *Chattonella antiqua* in Laboratory Cultures. *Journal of the Oceanographical Society of Japan* 46: 35-43.
- NÉZAN E., BILLARD C. & PICLET G. 1995. Une nouvelle algue toxique sur les côtes françaises. *La Recherche* n° 273: 194-195.
- NAGASAKI K., ANDO M., IMAI I., ITAKURA S. & ISHIDA Y. (1994) Virus-like particles in *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae): a possible red tide disintegration mechanism. *Mar. Biol.* 119: 307-312.
- RADEMAKER M., RECKERMANN M., TILLMANN U., TILLMANN-MEYER A., COLIN F., ZEVENBOOM W. & HOUP P. (1998) *Fibrocapsa japonica* and *Heterosigma adagio*: new observations. *Harmful Algae News* 17: 8-9.
- SMAYDA T.J. 1998. Ecophysiology and Bloom Dynamics of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). In: *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. (Ed. by D.M. Anderson, A.D. Cembella & G.M. Hallegraeff). pp. 113-131. Springer Verlag, Berlin.
- TOMAS C.R. (ed.) 1997. *Identifying Marine Phytoplankton*. Academic Press, San Diego.
- TYRELL J.V., BERGQUIST P.R., BERGQUIST P.L. & SCHOLIN C.A. 2001. Detection and enumeration of raphidophytes using rRNA-targeted oligonucleotide probes. Proceedings of the 9th Conference on Harmful Algal Blooms. Ed. by G.M. Hallegraeff *et al.* Tasmania (in press).
- VRIELING E.G., KOEMAN R.P.T., NAGASAKI K., ISHIDA Y., PEPPERZAK L., GIESKES W.W.C. & VEENHUIS M. 1995. *Chattonella* and *Fibrocapsa* (Raphidophyceae): first observation of, potentially harmful, red tide organisms in Dutch coastal waters. *Net. J. Sea Res.* 33: 183-191.
- YAMAGUCHI M. & IMAI I. 1994. A microfluorometric analysis of nuclear DNA at different stages in the life history of *Chattonella antiqua* and *Chattonella marina* (Raphidophyceae). *Phycologia* 33: 163-170.
- YAMOCHI S. 1984. Mechanisms for outbreak of *Heterosigma akashiwo* red tide in Osaka Bay, Japan. Part 3; Release of vegetative cells from bottom mud. *J. oceanogr. Soc. Japan* 40: 343-348.
- YOSHIMATSU S. 1987. The cysts of *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae) found in bottom sediment in Harima-Nada, Eastern Inland Sea of Japan. *Bull. Plank. Soc. Japan* 34: 25-31.

Phaeocystis : Introduction

The wax and wane of blooms formed by the prymnesiophyte *Phaeocystis globosa* affect water quality in the North Sea by water discolouration, oxygen depletion and foam (Lancelot *et al.* 1987). *Phaeocystis pouchetii* is thought to produce substances toxic to fish (Aanesen *et al.* 1998). Unidentified *Phaeocystis* species have been recorded on the shelf of the Atlantic Ocean (Kashkin 1963) but these, together with the newly described *Phaeocystis* species in the Mediterranean, *P. cordata* and *P. jahnii* (Zingone *et al.* 1999), do not appear to be harmful. The distribution of *Phaeocystis* species is shown in Figure I.2.1.

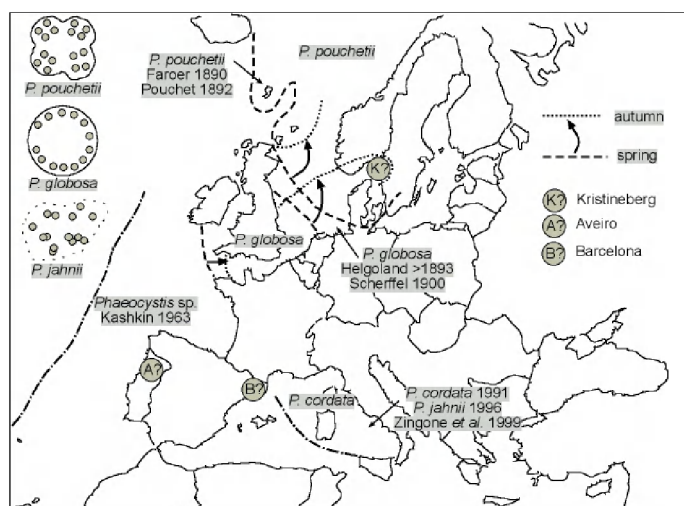


Figure I.2.1. Distribution of *Phaeocystis* in Europe. The first microscopic observations of *P. pouchetii* were made by Pouchet (1892), of *P. globosa* by Scherffel (1900) and of *P. cordata* and *P. jahnii* by Zingone *et al.* (1999). The colonial forms of *P. pouchetii*, *P. globosa* and *P. jahnii* (top left) can be distinguished with the light microscope. The flagellate forms of *Phaeocystis* (including *P. cordata*) can only been identified with electron microscopy. There is an overlap in the spring-autumn distribution of *P. pouchetii* and *P. globosa* in the North Sea (Ostenfeld 1910). The identity of the *Phaeocystis* species occurring on the Atlantic shelf (Kashkin 1963) and in Barcelona, Aveiro and Kristineberg (L. Peperzak, personal observations) are unknown.

Life cycle and blooms

Three different flagellates and a non-flagellate cell type are distinguished in the life cycle of *P. globosa*. The macroflagellate and the non-flagellate cell are diploid, while the micro- and mesoflagellates are haploid (Peperzak *et al.* 2000) (Figure I.2.2). Environmental variables that trigger the transitions are turbulence, nutrient

concentrations and daily irradiance. Figure I.2.2 is constructed from experimental, field and literature data and has not been tested rigorously in culture. Results of sediment incubation experiments and field observations suggest that neither *P. pouchetii* nor *P. globosa* have benthic resting stages (Eilertsen *et al.* 1995, Peperzak 2002).

The macroflagellate-to-colony transition takes place when turbulence is low, as on the surface of diatoms. Blooms of colonial non-flagellate *P. globosa* cells start under nutrient-replete conditions (upwelling, anthropogenic eutrophication) after a daily irradiance threshold has been passed. The upper limit of the bloom maximum, 100 million cells litre⁻¹, is determined by the inorganic carbon (C_i) metabolism of the colony (Peperzak 2002). The duration of the bloom is set by the second limiting nutrient which usually is nitrogen or phosphorus.

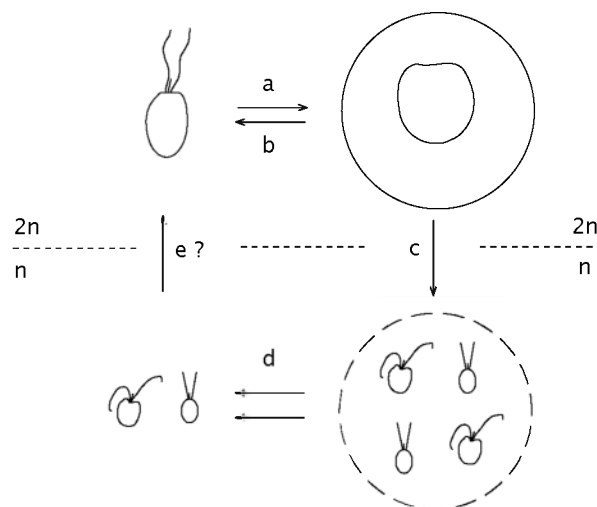


Fig. I.2.2.

= haploid,
(a) A
flagellate

from a macroflagellate under non-turbulent conditions when nutrients and daily irradiance are sufficient. Normal, vegetative reproduction can lead to a colony consisting of thousands of non-flagellate cells. (b) Diploid macroflagellates from non-flagellate cells are produced physically, e.g. by turbulence. Macroflagellates have a life-time of less than a day. (c) Under nutrient stress and irradiance limitation haploid micro- and mesoflagellates are formed intracolony. (d) Meso- and microflagellates escape the colonial matrix. Both are able to reproduce vegetatively. (e) Presumed syngamy of micro- and mesoflagellates leads to the diploid macroflagellate. This step has not been observed yet (Peperzak *et al.* 2000).

When N or P limit further bloom development, the accumulated *Phaeocystis* biomass (in the form of non-flagellate cells and organic colony matrix) is dissipated via several processes:

1. colonies settle on to the sea floor and are buried or mineralized (Savage & Hardy 1934, Jennes & Duineveld 1985), or
2. non-flagellate cells transform into flagellates that escape the colony (Peperzak *et al.* 2000)
3. microzooplankton invades deteriorating colonies and grazes on cells (Peperzak *et al.* 1998)
4. cells lyse and together with colony remains are mineralized pelagically (Brussaard *et al.* 1995, Rousseau *et al.* 2000)

Negative effects of *Phaeocystis* blooms

The negative effects of *Phaeocystis* blooms can be grouped as follows:

1. water discoloration and foam
2. oxygen depletion
3. fish toxins
4. miscellaneous

The most pronounced effect, observed during the wane of *Phaeocystis globosa* blooms, is thought to be the formation of foam (Lancelot *et al.* 1987). However, there is no formal proof that *Phaeocystis* is indeed the cause of this foam: even the foam composition is unknown. Only recently, a significant correlation between *Phaeocystis* blooms and the frequency of foam was established (Figure I.2.3). Beer foam is composed of proteins, and the study of beer foam production may therefore be helpful in investigating *Phaeocystis*-foam production.

When large amounts of organic *Phaeocystis* carbon are concentrated near the seabed by sedimentation, oxygen may be depleted (Rogers & Lockwood 1990). In 2001 oxygen depletion is thought to be the cause of a € 20 million mortality of blue mussels in the Oosterschelde, The Netherlands (L. Peperzak, unpublished). The third negative effect could be the production of ichthyotoxins by *P. pouchetii* (Aanesen *et al.* 1998). However, the toxin has not been identified, and it may be possible that the increased lethality of cod larvae (Aanesen *et al.* 1998) was related to *Phaeocystis*-produced DMS. For instance, blooms of *P. globosa* have long been known to affect the migration of herring (Savage 1930).

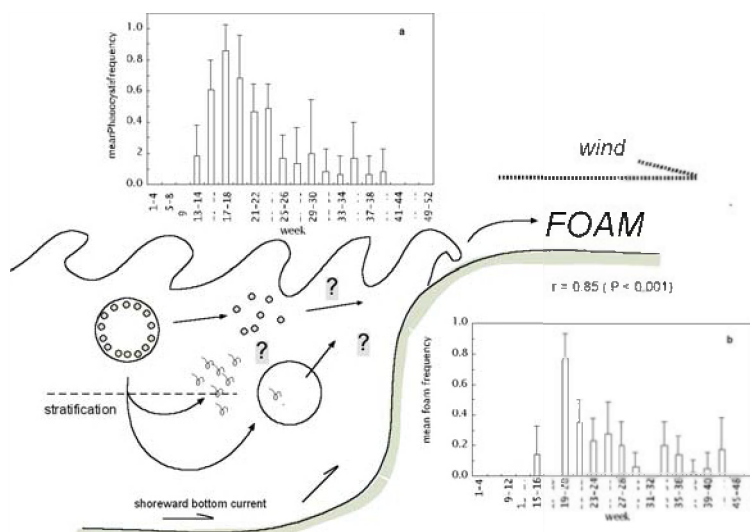


Figure I.2.3. *Phaeocystis globosa* blooms and foam on the coast. The correlation between the bloom frequency of *P. globosa* in the Dutch coastal zone (panel a) and the frequency of foam observations on the nearby coast of Holland (panel b) was significant ($r = 0.85$). (L. Peperzak, M. Rademaker & L.P.M.J. Wetsteyn, unpublished). However, the exact mode of production and foam composition is unknown.

Miscellaneous Dutch reports of negative bloom effects in 2001 include, for instance, the release of H_2S from sediments after the large *P. globosa* bloom in spring which led to the stop of dredging activities in the outer IJmuiden harbour. In August, skin irritation of swimmers was reported when very high concentrations of colonial *P. globosa* occurred near the mouth of the Rhine.

Future needs

Basic ecophysiological data on the processes that explain the competitiveness of the various life cycle stages of *Phaeocystis* with other micro-algae, such as irradiance adaptations and the uptake rates of nutrients, have still not been examined properly. Furthermore, as for the life cycle transitions, the ecophysiology of species other than *P. globosa* have hardly been investigated. Further studies, including the underlying life cycle transitions, will help in better understanding the effects of:

1. eutrophication on the functioning and sustainability of the ecosystem
2. hydrodynamical changes (by e.g. building artificial islands) on the light climate of the water column and *Phaeocystis* blooms
3. long-term climatic changes on *Phaeocystis* abundance

Furthermore, there is a general need for sensitive methods in *Phaeocystis* research and monitoring to:

1. rapidly enumerate cells in field samples
2. identify the cells of the various species
3. identify the various life cycle stages.

Knowledge of the life cycle, life cycle transitions, the various factors that influence growth and mortality and *Phaeocystis* monitoring data, are all needed for a better understanding of *Phaeocystis* bloom dynamics. Eventually, this knowledge allows the mathematical modelling of the blooms into scientific or management tools. One such model is presently being developed in the EU-project HABES (Harmful Algal Bloom Expert System) using fuzzy logic rules.

References

- AANESEN R.T., EILERTSEN H.C. & STABELL O.B. 1998. Light-induced toxic properties of the marine alga *Phaeocystis pouchetii* towards cod larvae. *Aquatic Toxicology* 40: 109-121.
- BRUSSAARD C.P.D., RIEGMAN R., NOORDELOOS A.A.M., CADÉE G.C., WITTE H., KOP A.J., NIEUWLAND G., VAN DUYL F.C. & BAK R.P.M. 1995 Effects of grazing, sedimentation and phytoplankton cell lysis on the structure of a coastal pelagic food web. *Marine Ecology Progress Series* 123: 259-271.
- EILERTSEN H.C., SANDBERG S. & TØLLEFSEN H. 1995. Photoperiodic control of diatom spore growth: a theory to explain the onset of phytoplankton blooms. *Marine Ecology Progress Series* 116: 303-307.
- JENNES M.I. & DUINEVELD G.C.A. 1985. Effects of tidal currents on chlorophyll a content of sandy sediments in the southern North Sea. *Marine Ecology Progress Series* 21: 283-287.
- KASHKIN N.I. 1963. Materials on the ecology of *Phaeocystis pouchetii* (Hariot) Lagerheim, 1893 (Chrysophyceae) II. Habitat and specifications of biogeographical characteristics. *Okeanologiya*, Moscow 3: 697-705.
- LANCELOT C., BILLEN G., SOURNIA A., WEISSE T., COLIJN F., VELDHUIS M.J.W., DAVIES A. & WASSMAN P. 1987. *Phaeocystis* blooms and nutrient enrichment in the continental coastal zones of the North Sea. *Ambio* 16: 38-46.
- OSTENFELD C.H. 1910. *Halosphaera* and flagellata. Bulletin trimestriel des résultats acquis pendant les croisières périodiques et dans la périodes intermédiaires. *Conseil Permanent international pour exploration du Mer*. Première Partie: 20-29.
- PEPERZAK L., COLIJN F., GIESKES W.W.C. & PEETERS J.C.H. 1998. Development of the diatom-*Phaeocystis* spring bloom in the Dutch coastal zone of the North Sea: the silicon depletion versus the daily irradiance threshold hypothesis. *Journal of Plankton Research* 20: 517-537.
- PEPERZAK L., COLIJN F., VRIELING E.G., GIESKES W.W.C. & PEETERS J.C.H. 2000. Observations of flagellates in colonies of *Phaeocystis globosa*

- (Prymnesiophyceae); a hypothesis for their position in the life cycle. *Journal of Plankton Research* 22: 2181-2203.
- PEPERZAK L. (2002) The wax and wane of *Phaeocystis globosa* blooms. Ph.D. Thesis. University of Groningen.
- POUCHET M.G. 1892. Sur une algue pélagique nouvelle. *Comptes Rendus Hebdomadaires Séances et Mémoires Société. Biologiques* 44: 34-36.
- ROGERS S.I. & LOCKWOOD S.J. 1990. Observations on coastal fish fauna during a spring bloom of *Phaeocystis pouchetii* in the Eastern Irish Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 70: 249-253.
- ROUSSEAU V., BECQUEVORT S., PARTENT J.-Y., GASPARINI S., DARO M.-H., TACKX M. & LANCELOT C. 2000. Trophic efficiency of the planktonic food web in a coastal ecosystem dominated by *Phaeocystis* colonies. *Journal of Sea Research* 43: 357-372.
- SAVAGE R.E. 1930. The influence of *Phaeocystis* on the migrations of the herring. *Fishery Investigations*, series 2, 12: 1-14.
- SAVAGE R.E. & HARDY A.C. 1934. Phytoplankton and the herring. Part I, 1921-1932. *Fishery Investigations*, series 2, 14: 1-73.
- SCHERFFEL A. (1900) *Phaeocystis globosa* nov. spec. nebst einigen Betrachtungen über die Phylogenie niederer, insbesondere brauner Organismen. *Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen Abteilung Helgoland N.F.* Bd.4: 1-29.
- ZINGONE A., CHRÉTIENNOT-DINET M.-J., LANGE M. & MEDLIN L. (1999) Morphological and genetic characterization of *Phaeocystis cordata* and *P. jahnii* (Prymnesiophyceae), two new species from the Mediterranean Sea. *Journal of Phycology* 35: 1322-1337.

II. Schelpdiervergiftigingen in Europa (1991-2000)



Fig. II.1. Diarrhoeic Shellfish Poisoning in Europa: ICES-IOC kaart van de werkgroep plaagalgen (WGHABD). Plaagalg: *Dinophysis* spp.

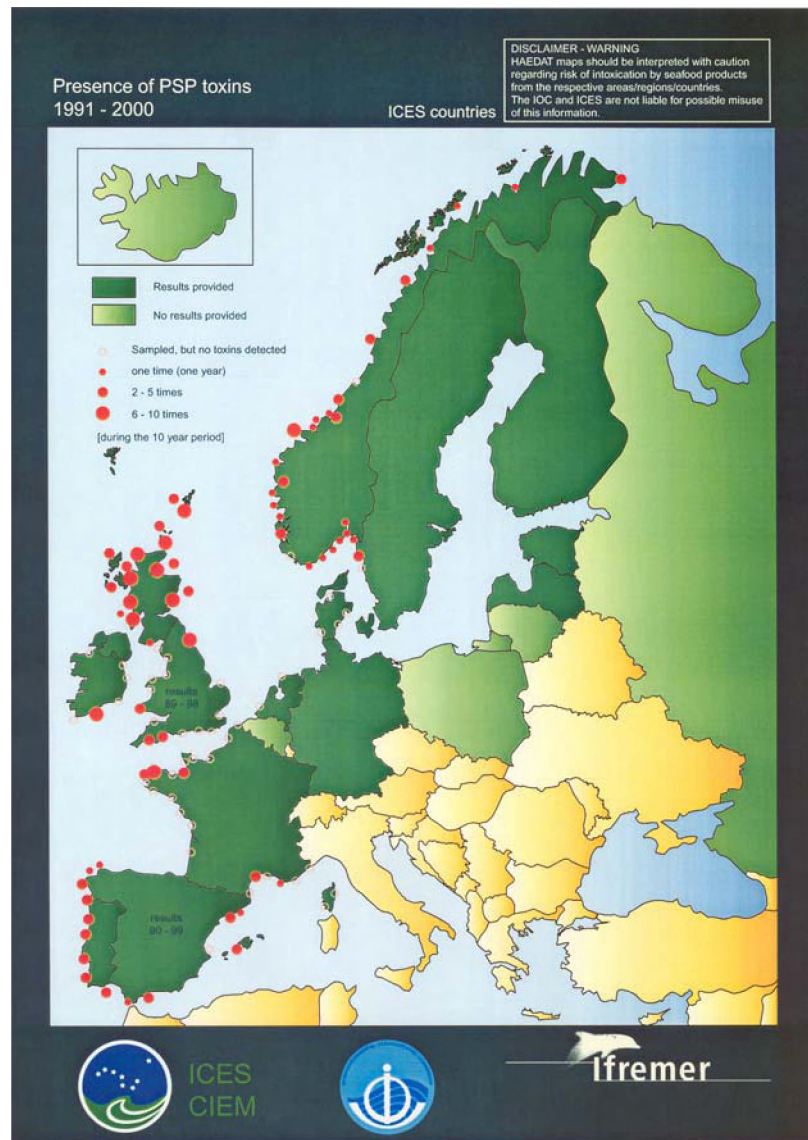


Fig. II.2. Paralytic Shellfish Poisoning in Europa: ICES-IOC kaart van de werkgroep plaagalgen (WGHABD). Plaagalg: *Alexandrium* spp.



Fig. II.3. Amnesic Shellfish Poisoning in Europa: ICES-IOC kaart van de werkgroep plaagalgen (WGHABD). Plaagalg: *Pseudo-nitzschia* spp.



Fig. II.4. AZP (Azapiracid Poisoning) in Europa: ICES-IOC kaart van de werkgroep plaagalg(en) (WGHABD). Plaagalg: vermoedelijk *Protoceratium crassipes*.