95-14

IZWO
Instituut voor Zeewetenschappelijk Onderzoek (vzw)
Institute for Marine Scientific Research
WANDELAAN 3 - B-8400 OOSTENDE BELGIUM
Tel. +32-(0)59-32.10.45 - Fax. +32-(0)59-32.11.35

Toxische algen tussen Noordwijk- en Terschelling-raai

Eindrapport van het BEON project: Opsporing en detectie van toxische algenbloeien (OTAB)

Beleidsgericht ecologisch onderzoek van de Noordzee/Waddenzee

BEON

RIVO-DLO
RUG
RWS-DNZ
RWS-RIKZ

B

Toxische algen tussen Noordwijk- en Terschelling-raai

Eindrapport van het BEON project: Opsporing en detectie van toxische algenbloeien (OTAB)

599

L. Peperzak (RWS-RIKZ)
W. Zevenboom (RWS-DNZ)
R. Dijkema (RIVO-DLO)
C. Schol (RIVO-DLO)
E.G. Vrieling (RUG)
G.J. Snoeijer (RUG)
W.W.C. Gieskes (RUG)

Oktober 1995

BEON rapport nr. 95-14

BEON project RIKZ 94 E 05

ISSN 0924-6576

INHOUD

Samenvatting *7*

Lijst van tabellen, figuren en intermezzi *9*

1 Inleiding *11*

2 Toxische algen in de Noordzee *13*

2.1. Toxische algen in de Noordzee: een selectie *13*
2.2. Detectietechnieken: een overzicht *15*
2.3. Monsterlocaties OTAB *17*

3 Monstername en monsterverwerking *19*

3.1. Inleiding *19*
3.2. Fout in de Niskinbemonstering *19*
3.2.1. Inleiding *19*
3.2.2. Methode *20*
3.2.3. Resultaten en discussie *20*

3.3. Fout in de mikroskooptelling *21*
3.3.1. Inleiding foutenanalyse mikroskooptelling *21*
3.3.2. Methode *22*
3.3.3. Resultaten en discussie *22*

4 Interkalibraties *25*

4.1. Interkalibratie I: planktonnet vs. Niskinfles *25*
4.1.1. Inleiding *25*
4.1.2. Methode *25*
4.1.3. Resultaten en discussie *27*

4.2. Interkalibratie II: Lugol- vs. formaldehydefixatie *31*
4.2.1. Inleiding *31*
4.2.2. Methode *31*
4.2.3. Resultaten en discussie *31*

5 Toxische algen op NW10 (kust) *35*

5.1. Inleiding *35*
5.2. Materiaal en methoden *35*
5.3. Resultaten en discussie *35*

6 Toxische algen op TS135 (Oestergronden) *37*

6.1. Inleiding *37*
6.2. Materiaal en methoden *37*
6.3. Resultaten en discussie *37*

7. Vergelijking NW10 en TS135 *41*

7.1. Inleiding *41*
7.2. Fysische variabelen *41*
7.3. Chemische variabelen *47*
7.4. Biologische variabelen *51*

8 Extra metingen: *Dinophysis*-bloei Hollandse kust *53*

8.1. Inleiding *53*
8.2. Methoden *53*
8.3. Resultaten *54*
8.4. Discussie *57*

9 Conclusies en aanbevelingen *61*

10 Referenties *64*

Bijlagen

SAMENVATTING

In 1994 werd door de 4 Nederlandse instituten die zich bezighouden met monitoring en detectie van toxische algen samengewerkt in het BEON project OTAB. Deze 4 instituten zijn het Rijksinstituut voor Kust en Zee/*RIKZ* en de Directie Noordzee (DNZ) van Rijkswaterstaat, het Rijksinstituut voor Visserij Onderzoek (RIVO-DLO) en de afdeling Mariene Biologie van de Rijksuniversiteit Groningen (RUG). Dit unieke samenwerkingsverband bood de mogelijkheid kennis te nemen van elkaars methoden en technieken die kunnen worden gebruikt voor de Opsporing en detectie van Toxische AlgenBloeien (OTAB).
Hiertoe werden, naast plenaire vergaderingen, ook gezamenlijke bemonsteringen en planktonanalyses uitgevoerd. Verschillende technieken werden aan interkalibraties onderworpen. Hieruit vloeide o.a. de aanbeveling uit om niet met planktonnetten te monsteren, en om de monsters te fixeren met methanal (formaline; 0,2% eindconcentratie). De detectielimiet van de gebruikte telmethode was ca. 50 cellen/liter: 1000 ml monster concentreren tot ca. 100 ml, hiervan 2 ml submonster tellen. Indien de concentratie cellen in het monster < 1000/liter is (<20 cellen geteld in het submonster) dan is een duplo telling een minimum noodzaak; een goede betrouwbaarheid wordt bereikt als er in totaal ≥ 200 cellen geteld worden (≥ 2 submonsters).

Omdat er in 1994 twee continue mooring-projecten plaatsvonden in de Noordzee, is daar door OTAB op aangesloten om zo een goed beeld te kunnen krijgen van het effect van fysische variabelen op het ontstaan van toxische algenbloeien. Het punt Noordwijk 10 is representatief voor de kustzône; mooring i.h.k.v. MAST*PROFILE. De lokatie Terschelling 135 is representatief voor het centrale deel van de Nederlandse Noordzee; mooring i.h.k.v. Integrated North Sea Program (INP). Na analyse van de resultaten bleek dat wekelijkse scheepsbemonsteringen voldoende zijn voor het monitoren van toxisch fytoplankton in de kustzône.

Verschillende detectietechnieken, waaronder de nog in ontwikkeling zijnde immunochemische labelling van toxische algen (RIKZ-RUG project DETOXA), werden op monsters van NW10 en TS135 toegepast.
De verschillen in fysische en chemische variabelen tussen NW10 en TS135 worden in dit rapport eveneens behandeld, evenals de verschillen in het voorkomen van toxisch fytoplankton.

Een groot aantal extra metingen in een 3000 km² groot gebied werd uitgevoerd in de zomer van 1994. Er werd namelijk een massale bloei geconstateerd voor de Hollandse kust van de toxische alg *Dinophysis acuminata*. Het gevaar bestond dat deze bloei ten gevolge van de noordwaartse residustroming in de Waddenzee zou terecht komen. Voor een deel was dit inderdaad het geval; de mosselvisserij werd gedurende korte tijd stilgelegd.

Het rapport eindigt met een aantal conclusies en aanbevelingen,

waarvan er een aantal al in 1995 in praktijk gebracht zijn.

De hoofddoelstelling van het project was om te onderzoeken of bloeien van toxisch fytoplankton al in een vroegtijdig stadium konden worden gedetecteerd. T.a.v. deze en de andere doelstellingen wordt het volgende geconcludeerd:

1. Potentieël toxische algen zijn in lage concentraties te meten vóórdat een bloei optreedt. Van groot belang is hierbij dat de monsterfrequentie hoog genoeg is, d.w.z. minimaal 1x per week.

2. De immunochemische labelling van toxische algen is een snelle methode voor de identificatie van toxisch fytoplankton. Er zijn echter geen immunolabels voor alle in de Noordzee voorkomende toxische soorten. Meer onderzoek is nodig om te komen tot een routinematig gebruik van deze labels in de monitoring.

3. Wekelijkse bemonsteringen van fytoplankton, en van chemische en fysische variabelen in de waterkolom, lijken voldoende om een eerste indruk te krijgen van die factoren die een rol spelen bij het begin van een potentieël toxische algenbloei. De *Dinophysis*-bloei voor de Hollandse kust bijvoorbeeld, kon gerelateerd worden aan de veranderingen in de watertemperatuur en de waterkolom-stratificatie. Voor de Oestergronden, waar een wekelijkse bemonstering logistiek moeilijk is, is een continue mooring van meetapparatuur mogelijk een alternatief.

Bovenstaande conclusies leiden er toe voor te stellen de monitoring van plaagalgen te concentreren op een aantal karakteristieke lokaties in de Noordzee, de Waddenzee en de estuaria en om deze lokaties met een hoge frequentie te bemonsteren. De monsterverwerking dient snel te zijn en daarom is het gebruik van moderne technieken als immunolabelling noodzakelijk. Eveneens dient de rapportage te worden versneld. Zodoende moeten risicovolle situaties direct onder de aandacht van bijvoorbeeld de waterbeheerder gebracht kunnen worden.

Ten slotte is er, naast de algen-concentratiemetingen, ook onderzoek nodig naar de factoren die bepalen of een potentieël toxische alg ook daadwerkelijk toxinen produceert. Een mogelijkheid is om naast bovengenoemde metingen ook de toxinen te bepalen, bijvoorbeeld in speciaal daarvoor in zee uitgehangen mosselen (Actieve Biologische Monitoring).
Voor een meer beleidsgerichte aanpak van de problematiek, bijvoorbeeld voor de modellering van toxische algenbloeien, is o.a. meer autecologisch onderzoek gewenst.

Lijst van tabellen, figuren, intermezzi en bijlagen

Tabel 2.1. Overzicht van de geselecteerde potentieël toxische algen *14*
Tabel 3.1. Meetresultaten foutenanalyse Niskinbemonstering *20*

Tabel 4.1 Meetresultaten interkalibratie I: planktonnet vs. Niskinfles *29*
Tabel 4.2. Meetresultaten interkalibratie II: Lugol- vs. formaldehydefixatie *33*

Figuur 2.1. Monsterlocaties *16*
Figuur 3.1. Telfoutanalyse *Gyrodinium aureolum* *22*
Figuur 3.2. Telfoutanalyse *Pseudonitzschia* *23*

Figuur 4.1. Box-plots interkalibratie net-fles *26*
Figuur 4.2. X-Y plot interkalibratie net-fles voor 3 soorten *28*
Figuur 4.3. Box-plots interkalibratie Lugol-formaline *32*
Figuur 4.4. X-Y plot interkalibratie Lugol-formaline voor 3 soorten *34*

Figuur 5.1. Toxische algen op NW10, 1994 *36*

Figuur 6.1. Toxische algen op TS135 oppervlak, 1994 *38*
Figuur 6.2. Toxische algen op TS135 spronglaag, 1994 *39*
Figuur 6.3. Toxische algen op TS135 bodem + 3 meter, 1994 *40*

Figuur 7.1. Saliniteit NW10 en TS135, 1994 *42*
Figuur 7.2. Temperatuur NW10 en TS135, 1994 *43*
Figuur 7.3. Brunt-Väsälä frequenties NW10 en TS135, 1994 *44*
Figuur 7.4. Spronglaagdieptes NW10 en TS135, 1994 *45*
Figuur 7.5. DIN concentraties NW10 en TS135, 1994 *47*
Figuur 7.6. DIP concentraties NW10 en TS135, 1994 *49*
Figuur 7.7. Si concentraties NW10 en TS135, 1994 *50*
Figuur 7.8. Fluorescentie NW10 en TS135, 1994 *52*

Figuur 8.1. Monsterpunten extra *Dinophysis*-metingen *54*
Figuur 8.2. Verloop van temperatuur, saliniteit, *D. acuminata*/liter, DIN en DIP, tijdens de zomerbloei 1994, NW10 *55*
Figuur 8.3. *D. acuminata* als functie van de saliniteit, 1994 *56*
Figuur 8.4. *D. acuminata* als functie van de stratificatie, 1994 *57*
Figuur 8.5. Lengte- en breedtematen *Dinophysis spp.* *58*
Figuur 8.6. *Dinophysis acuminata*: verschillende celgroottes *59*
Figuur 8.7. Lengte- en breedte *D. acuminata*: contourplots grootte *59*
Figuur 8.8. Paarvorming (sexuele fusie) bij *D. rotundata* *60*

Intermezzo 1. Box plots *18*
Intermezzo 2. Brunt-Väsälä frequenties *46*

Bijlage 1. Methode bepaling fout mikroskooptelling
Bijlage 2. Methode immunochemische detectie

1 Inleiding

De afgelopen vijf jaar zijn er in het Nederlandse deel van de Noordzee een aantal tot dan toe niet eerder gevonden, potentieël toxische fytoplanktonsoorten ontdekt (Peperzak *et al.* 1995; Vrieling *et al.* 1995; Peperzak *et al.* submitted). Deze giftige plaagalgen vormen een bedreiging voor andere organismen in zee, zoals vissen en bodemdieren, maar ook voor de mens ten gevolge van accumulatie van toxinen in schelpdieren. Deze algen zijn daarom een belemmering voor de duurzame ontwikkeling en het gebruik van het ecosysteem. Er zijn economische en volksgezondheid aspecten in het geding. Het Rijksinstituut voor Visserijonderzoek (RIVO-DLO) is daarom belast met de controle op potentieël toxische algen in de schelpdier-productiegebieden, en van in Nederland verhandelde schelpdieren op algentoxinen. Het voorkomen van potentieël toxische algen in alle Nederlandse zoute wateren, hun stuurvariabelen en de mogelijke relatie met eutrofiëring wordt door het Rijksinstituut voor Kust en Zee/RIKZ van de Rijkswaterstaat onderzocht. De directie Noordzee van de Rijkswaterstaat (DNZ) hanteert o.a. remote-sensing technieken voor algenbloeien en voert bemonsteringen op zee uit. Tevens heeft DNZ namens de Rijkswaterstaat zitting in internationale beleidskaders m.b.t. nutriënten en algenbloeien.

Zowel het RIKZ, het RIVO-DLO en DNZ zijn betrokken bij biologische monitoring van de Noordzee. Monitoring is onder meer van belang om maatregelen te kunnen treffen in een vroegtijdig stadium van een plaagalgenbloei. Dat wil zeggen voordat een toxische planktonbloei een hoogtepunt bereikt dienen lage concentraties al te kunnen worden gemeten. Hiertoe is door het RIKZ in samenwerking met de Rijksuniversiteit Groningen (RUG) een project gestart om een zeer specifieke, immunochemische, detectiemethode te ontwikkelen die kan worden gebruikt in een geautomatiseerd telapparaat, de flowcytometer. Indien een bloei van toxische algen vanaf het begin kan worden gemeten, dan is het in principe tevens mogelijk een relatie te leggen met de chemische en fysische stuurvariabelen die aan deze bloei hebben bijgedragen.

In 1994 werd in de Noordzee op twee lokaties onderzoek verricht naar de fysica en fytoplanktonontwikkeling in de waterkolom. De eerste lokatie, Noordwijk 10, is een meetpunt dat sterk onder invloed staat van de Rijn. Door de getijdestroming wordt verondersteld dat de waterkolom in de kustzône gemengd is. Door een grote zoetwaterafvoer is echter stratificatie mogelijk. Continue metingen vonden op NW10 plaats in het kader van het project MAST*PROFILE. De tweede lokatie, Terschelling 135, bevindt zich in de centrale Noordzee (Oestergronden) en staat daarom veel minder onder invloed van getijdestroming en rivierafvoeren. 's Zomers vindt daar dan ook temperatuurstratificatie plaats. Continue metingen vonden daar plaats van 1991 tot en met 1994 in het kader van het Integrated North Sea Program (INP).
Beide punten zijn tevens BIOMON-punten van het RIKZ. Dit betekent

dat er minimaal tweewekelijks monsters genomen werden voor chemische variabelen en fytoplanktonsamenstelling door de directie Noordzee van Rijkswaterstaat (DNZ). Tegelijkertijd werden door DNZ zogenaamde hydrografische on-line metingen in de waterkolom verricht.

Deze twee continue monitoringprojecten in de Noordzee boden de mogelijkheid tot aansluiting met een toxische algen onderzoek. Dit leidde tot OTAB: Opsporing en detectie van Toxische AlgenBloeien. Het primaire doel van het onderzoek was om potentieel toxische algen in lage concentraties te detecteren. Een aantal verschillende monstername- en detectietechnieken zijn hiervoor ingezet. Deze technieken zijn in de toekomst in te zetten voor een zogenaamd "early warning" systeem. Voordat hiertoe werd overgegaan zijn er eerst een aantal onderzoeken verricht naar monstername, fixatie van de monsters en analysefouten. Omdat de instituten van elkaar verschillende technieken gebruiken, zijn er meerdere interkalibraties verricht. Hiermee werd het tweede doel van OTAB vervuld. In de derde plaats was het mogelijk de invloed van chemische en fysische factoren op de bloei van plaagalgen te bestuderen door een vergelijking te maken tussen NW10 en TS135. Deze gegevens kunnen een uitgangspunt vormen voor de modellering van algenbloeien in het kader van beleidsondersteuning.

Dankzegging.

De auteurs willen de volgende personen en instanties danken voor hun onmisbare hulp:
Het personeel van de directie Noordzee, zowel zij aan de wal als de waarnemers aan boord van de "Holland" voor hun inzet t.b.v. de planning en de uitvoering van de monsternames. Kapitein en bemanning van de "Holland" vormden wederom een onmisbare schakel tussen de wal en de zee. Ook bedanken wij de kapitein en de bemanning van de "Pelagia" voor een aantal gastvrije tochten naar de INP mooring.
Reinoud Koeman (Koeman & Bijkerk, Haren) verleende onmisbare steun bij de analyse van toxische dinoflagellaten.
Louise Janmaat en Marion Rademaker van TRIPOS-Aquasense Amsterdam worden bedankt voor het snelle waarschuwen voor, en de hulp bij de analyse van, de *Dinophysis*-bloei in de zomer van 1994.
Verder danken wij de vele collega's van de directie Noordzee en het RIKZ die zorg droegen voor de planning en distributie van monsters, en voor het uitvoeren en rapporteren van de fysische en chemische analyses en meetgegevens.

2 Toxische algen in de Noordzee:

2.1. Toxische algen in de Noordzee: overzicht en selectie

In de Noordzee bevinden zich potentieël toxische algen uit verschillende taxonomische klassen. De meest voorkomende in dit verband, en de bekendste, is de klasse van de dinoflagellaten. Giftige dinoflagellaten zijn onder meer berucht omdat hun toxinen zich kunnen ophopen in schelpdieren die, na consumptie door de mens, kunnen leiden tot vergiftigingen. In het engels worden deze verschijnselen Diarrheic Shellfish Poisoning (DSP) en Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) genoemd, afhankelijk van de symptomen. Een derde vorm van schelpdiervergiftiging is Amnesic Shellfish Poisoning (ASP), maar die wordt veroorzaakt door een diatomee. In de Noordzee/Waddenzee zijn fytoplanktonsoorten gevonden die potentieël aanleiding kunnen geven tot zowel DSP, PSP als ASP. In Nederland is tot op heden echter alleen DSP gedetecteerd. Meer informatie over toxische algen in de Noordzee is te vinden in de nota "Plaagalgen in de Noordzee" (Peperzak 1994).
Tenslotte zijn er een aantal flagellaten van verschillende klassen die een toxine uitscheiden in het water. Dit toxine kan leiden tot de dood van bodemdieren en vissen en dit mechanisme wordt daarom ichthyotoxiciteit (IT) genoemd.

In OTAB is een selectie van de te onderzoeken soorten gemaakt: zie Tabel 2.1. Uitgangspunten waren hierbij:

- uit iedere taxonomische groep minstens 1 soort,
- alle vormen van toxiciteit (DSP, PSP, ASP en IT),
- detectie mogelijk, hetzij met normale lichtmikroskopie, fluorescentiemikroskopie, elektronenmikroskopie, of immunofluorescentie-technieken.

Uit tabel 2.1 wordt duidelijk dat met de licht- en fluorescentiemikroskoop alle soorten tot op genus te determineren zijn. Omdat deze apparatuur bij alle deelnemers voorhanden is, is er voor gekozen het zwaartepunt van de technieken hier te laten vallen. De immunofluorescentie-techniek werd uitgevoerd in de monsters van NW10 en TS135. In § 2.2. worden de detectietechnieken uitgebreid behandeld.

Het is niet waarschijnlijk dat alle soorten aangetroffen worden omdat sommige van hen, bijvoorbeeld *Chrysochromulina spp.* relatief zelden voorkomen. Het gebruik van een planktonnet (§ 5.1) sluit de mogelijkheid van detectie van deze kleine flagellaten bovendien vrijwel uit.

Klasse	Soort	Toxiciteit[0]	LM[1]	FM[2]	EM[3]	IF[4]
Dinophyceae	*Gyrodinium aureolum*	IT	+	-	±	++
	Gymnodinium catenatum	PSP	+	-	±	+[6]
	Alexandrium tamarense	PSP	±	++	++	+[5]
	Alexandrium minutum	PSP	±	+	+	+[6]
	Dinophysis spp.	DSP	+	-	++	-
Bacillariophyceae	*Pseudonitzschia spp.*	ASP	±[7]	-	++	+[8]
Prymnesiophyceae	*Chrysochromulina spp.*[10]	IT	±[7]	-	+	-
Raphidophyceae	*Chattonella marina*	IT	+	-	-	+[9]

Noten:

[0] IT = icthyotoxisch, d.w.z. het toxine wordt in het water uitgescheiden en heeft een effect op de zich daarin bevindende dieren (o.a. vissen); ASP = Amnesic, DSP = Diarrheic en PSP = Paralytic Shellfish Poisoning (zie ook Peperzak 1994)
[1] LM = normale lichtmikroskopische determinatie
[2] FM = fluorescentiemikroskopie m.b.v. Calcofluor white (fluorescent brightner)
[3] EM = elektronenmikroskopie (scanning of transmissie)
[4] IF = immunofluorescentie na labelling met soortspecifieke antilichamen
[5] monoklonalen uit Japan, in de loop van 1994 ontwikkeld aan de RUG
[6] polyklonalen uit Spanje (E. Costas, in voorbereiding)
[7] LM determinatie mogelijk tot genus
[8] polyklonalen uit Canada (S.S. Bates), in de loop van 1994 ontwikkeld aan de RUG
[9] monoklonalen uit Japan
[10] vanwege de geringe grootte niet geselecteerd

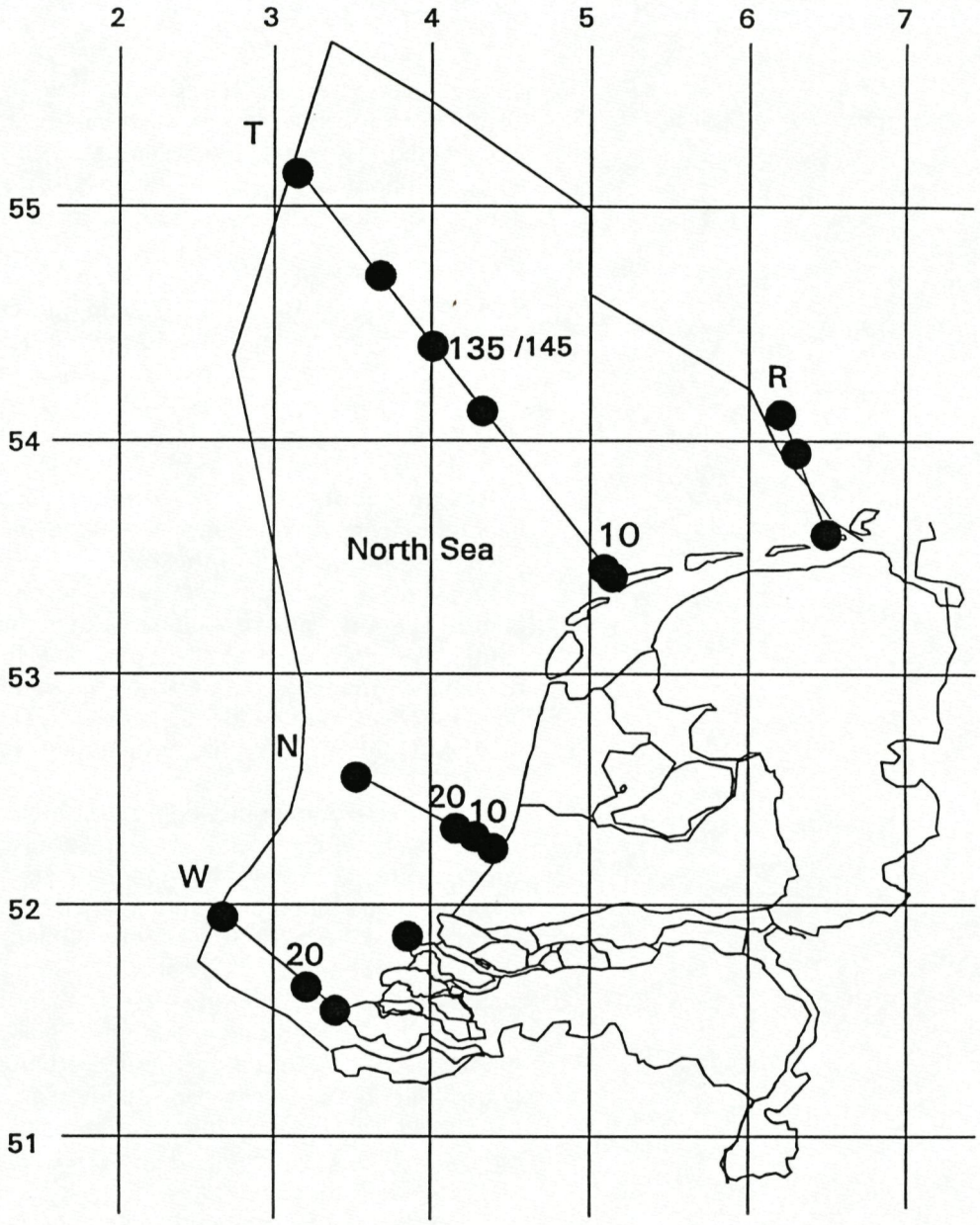
Tabel 2.1. Overzicht van in de Noordzee voorkomende, in OTAB geselecteerde potentieël toxische algen

2.2. Detectietechnieken: een overzicht

In deze paragraaf zal een kort overzicht gegeven worden van de ter beschikking staande detectietechnieken. Iedere techniek heeft zijn voor- en nadelen. Hierop zal niet in detail worden ingegaan. In de hierna volgende hoofdstukken zal dit wel gebeuren, met name v.w.b. de normale mikroskoop- en immunofluorescentiemethode.

De klassieke detectietechniek voor de identificatie van een fytoplanktonsoort is het met behulp van een lichtmikroskoop analyseren van de morfologie van de cel. Deze methode is in het algemeen geschikt voor diatomeeën en bepaalde dinoflagellaten zoals *Dinophysis spp.*
Juist in het geval van ASP veroorzakende diatomeeën als *Pseudonitzschia pungens f. multiseries* en *P. pseudodelicatissima* doet zich het probleem voor dat soortkenmerken te klein zijn om met de lichtmikroskoop waar te nemen. *Chrysochromulina spp.* worden gedetermineerd met behulp van zeer kleine schubben op de celwand die eveneens met een lichtmikroskoop niet waarneembaar zijn. Voor mikroskopische analyse van deze soorten dient dan gebruik te worden gemaakt van de elektronenmikroskoop. Niet ieder laboratorium beschikt echter over zo'n apparaat en bovendien heeft deze techniek als nadelen de langere monsterpreparatie en de lage telsnelheid. Twee instituten binnen OTAB hebben de beschikking over een elektronenmikroskoop: RIVO-DLO (via J. Buntsma, Ijmuiden en RUG).

PSP veroorzakende dinoflagellaten, met name *Alexandrium spp.*, zijn alleen betrouwbaar met een mikroskoop te determineren door analyse van de structuur van het pantser dat deze algen omgeeft. Naast elektronenmikroskopie kan gebruik worden gemaakt van een lichtmikroskopische fluorescentietechniek. Het pantser wordt gekleurd met calcofluor white (fluorescent brightener) en doordat de randen van de pantserplaatjes meer kleurstof absorberen is hun vorm duidelijker herkenbaar. De methode is echter specialistisch en arbeidsintensief.
Een nieuwe methode is immunofluorescentie. Hierbij wordt een fluorescerende kleurstof door middel van een soortspecifiek antilichaam gekoppeld aan de celwand van de alg waartegen het antilichaam is opgewekt. Deze techniek is relatief eenvoudig en er is geen dure elektronenmikroskoop voor nodig (zie bijlage 2). Het nadeel is dat alleen die soorten waarvoor een antilichaam beschikbaar is gedetecteerd kunnen worden.
Binnen OTAB zijn monoklonale antilichamen beschikbaar tegen *Gyrodinium aureolum, Alexandrium tamarense, Pseudonitzschia pungens f. multiseries* en *Chattonella marina*. Mogelijk kunnen i.s.m. Spaanse onderzoekers ook polyklonale antilichamen tegen *A. minutum* en *Gymnodinium catenatum* gebruikt worden.



Figuur 2.1. Monsterlocaties OTAB 1994

De stippen zijn de RIKZ fytoplankton biomonitoring punten in de Noordzee. W=Walcheren-, N=Noordwijk, T=Terschelling en R=Rottumraai. NW10 en TS135 zijn de continue mooring lokaties. De mooring op TS135 is in week 32 van 1994 verplaatst naar TS145.
Lokaties op 20 km uit de kust (W, N en T-raai) zijn RIVO monitoringpunten voor toxisch fytoplankton; in OTAB is TS20 vervangen door TS10 (monitoring lokatie RWS).

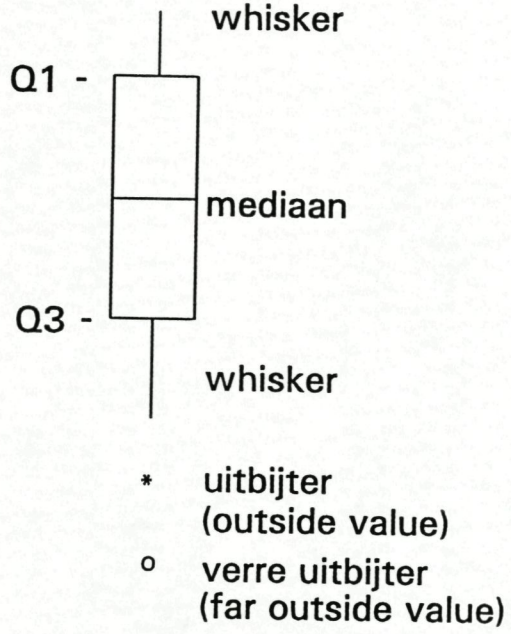
2.3. Monsterlocaties

De lokaties van Noordwijk 10 (NW10) en Terschelling 135 (TS135) zijn vermeld in Figuur 3.1. Op 9 augustus 1994 (week 32) werd de continue INP meetopstelling (mooring) van TS135 verplaatst naar TS145. NW10 werd ongeveer wekelijks bemonsterd, en TS135/145 ongeveer tweewekelijks, vanaf week 16 (april) t/m week 45 (november) in 1994.

Ten behoeve van de interkalibratie tussen net- en flesmonsters (hoofdstuk 5) zijn er een aantal malen extra monsters genomen op de RWS monitoringstations Walcheren 20 (W20), Noordwijk 20 (NW20) en Terschelling 10 (TS10). W20 en NW20 zijn monitoringstations van het RIVO-DLO, evenals TS20. Omdat TS20 echter geen Rijkswaterstaat monsterpunt is werd het punt 10 km kustwaarts (TS10) genomen. De interkalibratiepunten zijn eveneens vermeld in Figuur 2.1.

In de weken 34, 35 en 36 (augustus-september) zijn er extra monsters genomen in de kustzône in verband met een *Dinophysis*-bloei. Omdat dit soort grote bloeien maar eens in de ca. 5 jaar voorkomt werd besloten er extra capaciteit aan te besteden. De monsterpunten werden zo gekozen dat er een goede dekking ontstond van het zeegebied tussen de uitmonding van de Nieuwe Waterweg (Rijn) en de Terschellingraai. De reststroom in dit gebied is noordoost, en omdat op NW10 ca. 10.000 *D. acuminata* cellen werden gemeten in week 33 bestond er een grote kans dat deze bloei zich richting Waddenzee zou verplaatsen. Daarom werden ook de DNZ-(project TOXALG)-meetpunten Molengat en Schulpengat aan de ingang van het Marsdiep bemonsterd. De resultaten van dit onderzoek worden gepresenteerd in hoofdstuk 9.

Een overzicht van de monsterlocaties wordt gegeven in Figuur 2.1.



Intermezzo 1. De Box-and-whisker plot.

De Box-and-whisker plot, of kortweg box-plot, geeft de verdeling van een variabele weer. De box is de rechthoek tussen Q1 en Q3. Q1 is het eerste kwartiel en Q3 is het derde kwartiel. M.a.w.: 50% van de waarden ligt in de box. De waarneming die het midden van de verdeling aangeeft is de mediaan. De laagste 25% van de waarnemingen liggen onder de box, de hoogste 25% liggen er boven: dit zijn de whiskers (snorharen), uitgezonderd de waarnemingen die 1,5x groter zijn dan het verschil tussen Q1 en Q3 (de hoogte van de box). Outside values (uitbijters: *) zijn waarnemingen die > 1,5x de boxhoogte van een boxrand afliggen. Far outside values (verre uitbijter: o) zijn de waarden die op meer dan 3 boxhoogtes van de dichtsbijzijnde boxrand afliggen.
De box-plot van een mooie normaal verdeelde variabele zal een mediaan in het midden van de box hebben, een kleine boxhoogte en kleine whiskers, en geen uitbijters.

3 Monstername en monsterverwerking

3.1 Inleiding

Voordat de resultaten van de verschillende interkalibraties, en de NW10 en TS135 metingen worden gepresenteerd, wordt in dit hoofdstuk een beschrijving gegeven van de gebruikte methoden. Tevens wordt van een aantal van deze methoden een foutenanalyse gepresenteerd. Hieruit moet een indruk verkregen worden over de betrouwbaarheid van de in latere hoofdstukken te tonen resultaten.

3.2. Fout in de Niskinfles-bemonstering

3.2.1. Inleiding

De eerste fout bij de bepaling van de fytoplanktonconcentratie in zee ontstaat al bij de monstername. De aanname is dat dit watermonster representatief is voor de gehele waterkolom van het betreffende meetpunt. De tweede aanname daarbij is dat deze kolom goed gemengd is, zoals bij de kust. Op gestratificeerde (gelaagde) meetpunten in de centrale Noordzee is de aanname dat elke laag homogeen gemengd is, en dat de monsters elk representatief zijn voor elk van deze lagen. In hoofdstuk 8 zal blijken dat ook een meetpunt in de relatief turbulente kustzône toch vaak gelaagd is.
Om een indruk te krijgen van de monsterfout, d.w.z. van de spreiding in celconcentratie t.g.v. het monsteren, is een experiment uitgevoerd met grote, makkelijk te identificeren en te tellen fytoplanktoncellen. Alle cellen in een 1 liter monster werden geteld om subsamplefouten te vermijden. In het kort worden in deze paragraaf bovendien de verschillende monstertechnieken van de directie Noordzee beschreven.

Door deze directie worden watermonsters op twee manieren genomen. In de eerste plaats kan men "varend" monsteren. Het schip vaart langzaam over de monsterlocatie en via een buis aan de voorzijde wordt 60 liter water van 1,5 tot 3 meter diepte opgepompt en opgeslagen in een vat. Dit vat wordt vervolgens bemonsterd voor de analyse van chemische variabelen en fytoplankton.
De tweede manier van monstername gaat m.b.v. "Niskinflessen" die op de gewenste diepte van de waterkolom kunnen worden gesloten. Deze flessen zijn gemonteerd op een zogenaamde rosette-sampler waaraan eveneens CTD (Conductivity Temperature Depth) apparatuur bevestigd is. De CTD-waarden worden continu gemeten en geregistreerd, het zogenaamde on-line meten. Ook wordt de *in vivo* fluorescentie van het fytoplankton gemeten. Tijdens de zogenaamde "downcast", het laten zakken van de rosette-sampler van het oppervlak naar de bodem, ontstaat een eerste indruk van de homogeniteit van de waterkolom. De

CTD-waarden worden ingelezen, en de Niskinflessen worden gevuld, tijdens de "upcast". Na het binnenhalen van de flessen worden submonsters genomen. Het schip ligt hierbij stil op de monsterlocatie. Deze wijze van bemonsteren kost meer tijd maar is noodzakelijk als op meerdere dieptes monsters genomen moeten worden. Dat is het geval als de waterkolom niet homogeen is, bijvoorbeeld door stratificatie.

Beide manieren leveren een zelfde type monster op, een zogenaamd totaalmonster. Dat wil zeggen dat alle zwevend stof deeltjes (inclusief het fytoplankton) bemonsterd worden.

3.2.2. Methode

De opzet van het experiment, bepaling van de fout de in Niskin-bemonstering, was als volgt. De monstername was op 21 september (week 37) op TS145. Op 3 dieptes (oppervlak - 1 meter, midden en bodem + 3 meter) werden 3 Niskinflessen gevuld. Uit iedere fles werd in drievoud een fytoplanktonmonster (1 liter) genomen. Het fixatiemiddel was formaldehyde. Het totaal aantal monsters bedroeg 27 (3 dieptes x 3 Niskinflessen per diepte x 3 fytoplanktonmonsters per Niskinfles). De duidelijk herkenbare dinoflagellaat *Ceratium furca* werd geteld in een met 25 μm planktongaas in zijn geheel geconcentreerd monster. De verdunning met formaldehyde is in de berekening naar cellen per liter betrokken.

3.2.3. Resultaten en discussie

De resultaten staan vermeld in Tabel 3.1.

Niskinfles	1	2	3	gemiddeld per diepte
opp	x=80 s=15 n=3	x=92 s=2 n=3	x=90 s=11 n=3	x=88 s=10 n=9
½diepte	x=95 s=7 n=3	x=91 s=8 n=3	x=93 s=10 n=3	x=93 s=7 n=9
bodem+3m	x=78 s=16 n=3	x=94 s= - n=1	x=71 s=13 n=3	x=77 s=14 n=7

Tabel 3.1. Spreiding in celaantallen van *Ceratium furca* bij bemonstering op 3 diepten (oppervlak, ½ diepte en bodem+3m), met 3 Niskinflessen per diepte, en 3 monsters van één liter per Niskinfles. x = gemiddelde, s = standaarddeviatie, n = aantal waarnemingen.

Het is niet bekend of de waterkolom gestratificeerd was omdat er geen CTD metingen zijn verricht. De daaropvolgende week was de waterkolom op TS145 zwak gestratificeerd. Uit de *C. furca* concentraties (Tabel 3.1) ontstaat echter de indruk dat in week 37 de kolom goed gemengd was.

De gemiddelde fout van een bemonstering in drievoud uit 1 Niskinfles is 12% (n=8). De gemiddelde fout per diepte is 11% aan het oppervlak (n=9), 8% op halve diepte (n=9) en 18% bij de bodem (n=7); totaal gemiddeld: 12% (n=3).
Uit verdere statistische analyses zal moeten blijken of er significante verschillen aantoonbaar zijn. De eerste indruk is dat de spreiding die ontstaat uit het 3x subsampelen van 1 Niskinfles, van dezelfde grootte is als het 3x bemonsteren van de waterkolom met een Niskinfles.

Conclusie. Het nemen van een watermonster met een Niskinfles introduceert een relatief kleine fout van ca. 10% in de concentratie van een grote, in lage hoeveelheden aanwezige fytoplanktonsoort. Het subsampelen uit een Niskinfles geeft een fout van dezelfde orde van grootte en lijkt daarmee overbodig.

De fout in de bemonstering kan echter fors groter worden als het plankton zeer inhomogeen in de waterkolom verdeeld is (patchiness), of als de waterlaag waaruit bemonsterd wordt zeer dun is. Bijvoorbeeld de spronglaag op de Oestergronden is soms ca. 1-2 meter dik; de Niskinfles is al 1,5 meter hoog, en door de deining aan het zeeoppervlak kan de fytoplanktonpiek in of bij deze spronglaag moeilijk bemonsterd worden.

3.3. Fout in de mikroskooptelling

3.3.1. Inleiding

In de praktijk worden monsters met Lugol (4ml/liter) of formaldehyde (40 ml 3.7% gebufferde oplossing/liter) gefixeerd en bij 4°C bewaard (zie ook § 4.2. voor de interkalibratie van deze twee methoden). De bewerking bestaat bij de 1 liter-monsters normaliter uit concentratie van het partikulaire materiaal in ca. 100 ml door 900 ml van het bovenstaande water na sedimentatie af te hevelen. Eén of meerdere submonsters (1-10 ml) van het geconcentreerde monster worden m.b.v. een mikroskoop geteld. Uit het aantal getelde deeltjes wordt de oorspronkelijke concentratie berekend. De fout in de concentratieberekening is grotendeels afhankelijk van het totaal aantal getelde deeltjes. Een algemene regel is dat daarom per soort 200 cellen geteld dienen te worden. Echter, bij celconcentraties kleiner dan 200 per liter, kan dit aantal niet bereikt worden. Vaak wordt vanwege tijdsdruk ook maar 1 subsample geteld; d.w.z. 1/10 - 1/100 van het monster. Een minimum van 200 cellen per telling wordt dan alleen gehaald bij concentraties (in het oorspronkelijke monster) van 2000-20.000 cellen/liter.

Om een protocol voor de monsterverwerking op te stellen, en om de

grootte van de analytische telfout te bepalen, is een experiment uitgevoerd met fytoplanktonkultures. In deze kultures kunnen hoge concentraties algen gekweekt worden, en deze concentraties kunnen vanwege het grote aantal cellen betrouwbaar gemeten worden. Door verdunning van zo'n kulture kan een reeks gemaakt worden met een bekende, aflopende celconcentratie. Door deze reeksen te verwerken, d.i. te concentreren en te tellen als veldmonsters, is een schatting te maken van de telfout bij lagere concentraties.

3.3.2. Methode.

zie bijlage 1

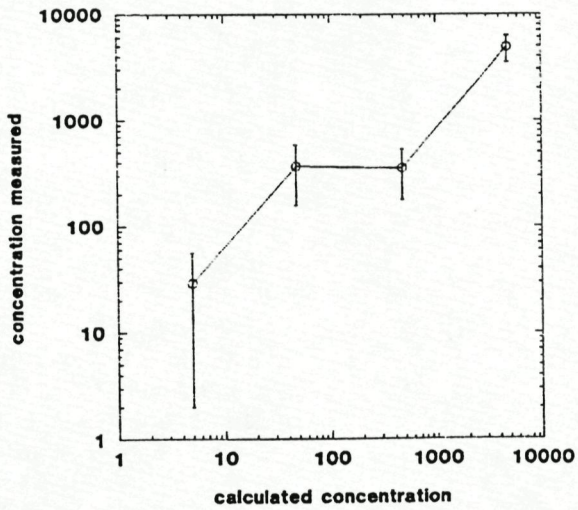
Omdat de concentraties een factor 10 van elkaar verschillen, zijn de gegevens log (+1) getransformeerd. D.w.z. dat voor de berekeningen alle getallen met 1 zijn verhoogd waarna de logaritme genomen werd. Deze procedure voorkomt dat monsters waarin nul cellen worden geteld niet in de berekening worden betrokken.

De 5 subsamples per verdunning werden genomen uit het concentraat van 1 monster (1 liter). Eventuele afwijkingen t.g.v. pipetteer- en subsamplefouten tijdens het maken van deze verdunningen kunnen dus niet achterhaald worden.

De uitkomsten van de *Pseudonitzschia*-telling werden met inbegrip van de verdunningen verrekend. Dit betekent dat de berekende concentraties in principe gelijk moeten zijn. De gebruikte soort is *P. pungens f. pungens*. Deze maakt geen domoïzuur, zoals *P.pungens f. multiseries*, maar het is wel een ketenvormende diatomee van dezelfde grootte en hij is daarom goed vergelijkbaar.

3.3.3. Resultaten en discussie.

G. aureolum:

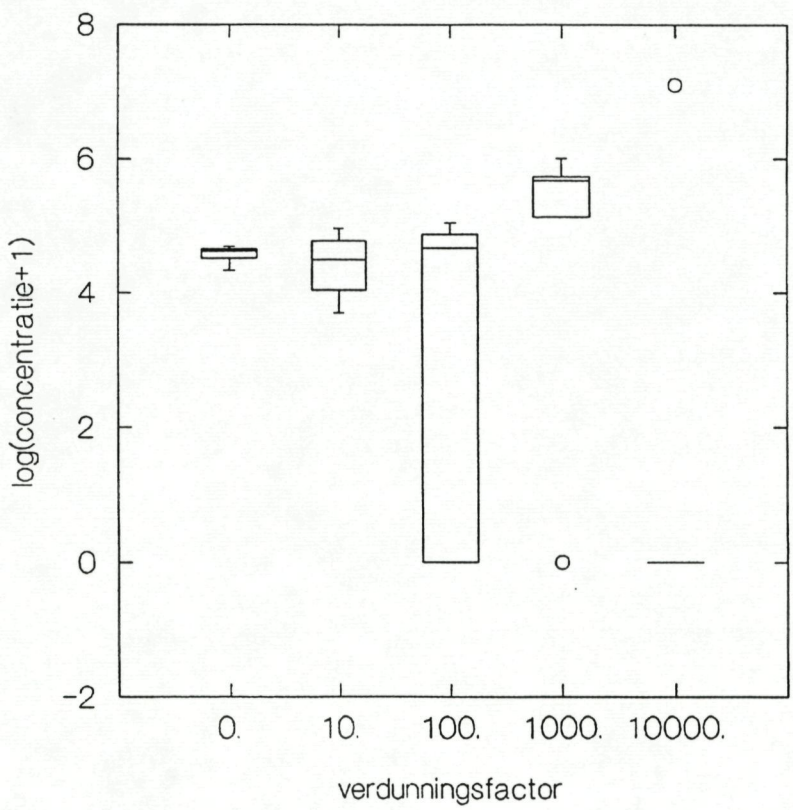


Figuur 3.1. Telresultaat van een verdunningsreeks van *Gyrodinium aureolum*. De waarden op de x-as zijn berekend na een telling van een geconcentreerd monster (47,5 ± 9,0 x 10^3 c.l^{-1}). Op de y-as de gemeten concentraties. Alle tellingen werden verricht in vijfvoud.

Pseudonitzchia:

Geteld werden subsamples van 2 ml die afkomstig waren uit ca. 150 ml concentraat (= ca. 1000 ml monster). De minimale ketenlengte was 5 cellen. Stel dat 1 keten wordt geteld in een subsample; de minimale concentratie of ondergrens is dan: 150/2 x 5 = 375 cellen/liter.

In Figuur 3.2 zijn de concentraties uitgezet in zogenaamde box and whisker-plots (zie intermezzo 2). De medianen van het 0, 10 en 100x verdunde monster zijn gelijk (concentraties: $10^{4.5}$ = 31.000 cellen/liter). De spreiding neemt echter fors toe, in de 100 x verdunning (310 cellen/liter) wordt in 2 van de 5 subsamples nul cellen geteld. Bij verdunningen groter dan 100x komt de concentratie onder de theoretische detectielimiet. Door toeval, en omdat er 5 subsamples onderzocht worden, zijn er toch nog cellen geteld. De mediane concentratie van het 1000x verdunde monster is echter een factor 10 te hoog.



Figuur 3.2. Concentraties van *Pseudonitzschia* als functie van de verdunning, teruggerekend naar de oorspronkelijke concentratie.

In het 10000x verdunde monster wordt 4x geen en 1x wel cellen geteld. In het laatste geval leidt dit tot een concentratie van ca. 10^7 cellen/liter, d.w.z. meer dan 100x boven de werkelijke waarde.

Conclusie: het aantal *Pseudonitzschia* cellen (5 cellen/keten) in een monster is alleen dan redelijk te berekenen indien de concentratie 10x of meer de ondergrens van de telmethode bedraagt (> 4000 cellen/liter). Bij lagere concentraties dient op zijn minst in triplo geteld te worden.

4 Interkalibraties

4.1. Interkalibratie I: planktonnet vs. Niskinfles

4.1.1. Inleiding

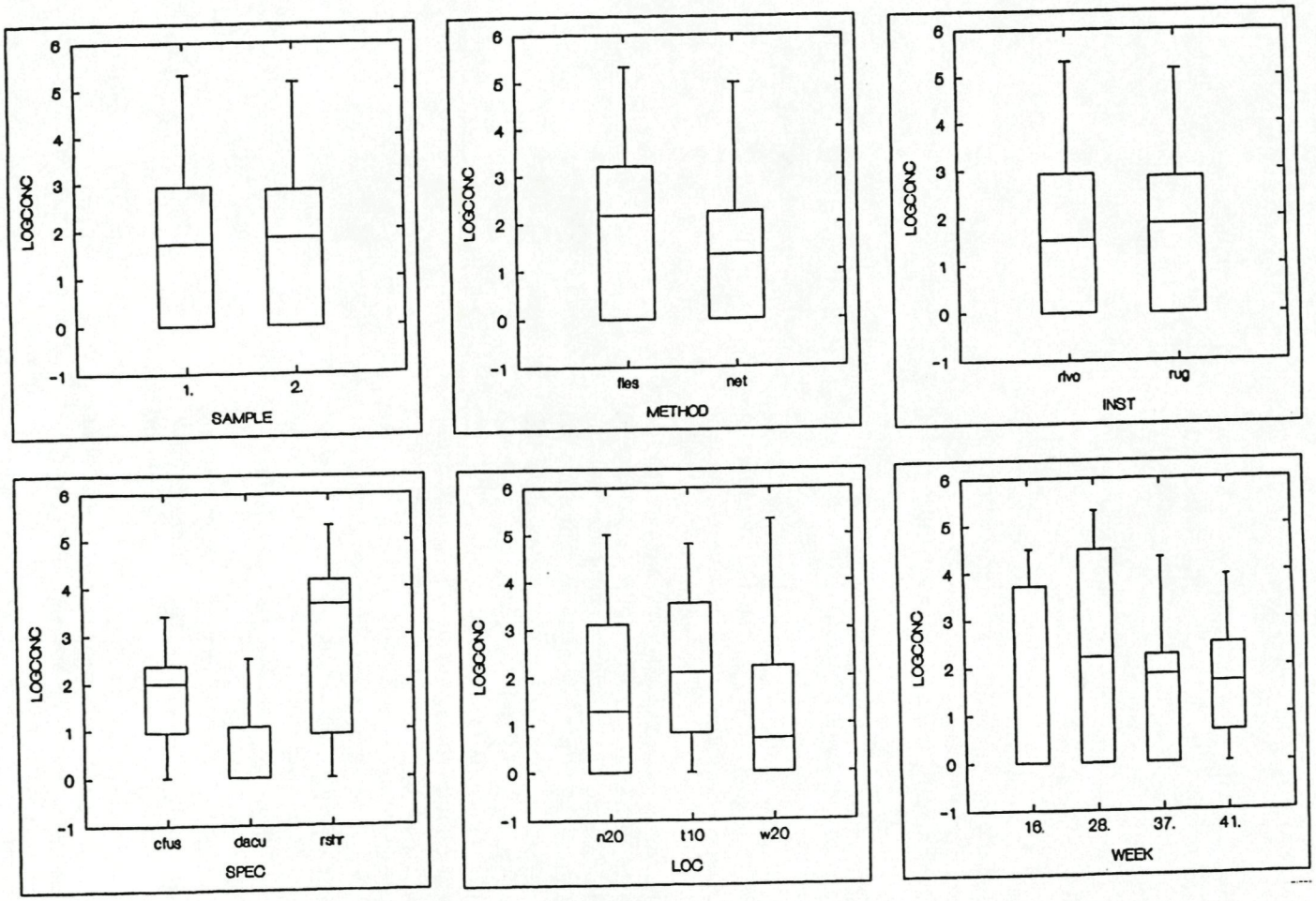
RIVO-DLO en DNZ van de Rijkswaterstaat gebruiken verschillende bemonsteringstechnieken: respectievelijk het planktonnet en de Niskinfles/"varend monsteren (zie § 3.21.). Beide methoden hebben hun voordelen en nadelen. Het is belangrijk om inzicht te krijgen hoe het gebruik van deze technieken leidt tot verschillen in (toxische) fytoplanktonconcentraties.
Omdat in het verleden, voor de Tweede Wereldoorlog, planktonnetten algemeen gebruikt werden in het planktononderzoek, en omdat juist gegevens uit die tijd van belang zijn in het onderzoek naar trends in het voorkomen van plaagalgen, zal deze interkalibratie ook in andere opzichten bruikbare resultaten opleveren.

Door het RIVO-DLO worden fytoplanktonmonsters genomen door 60 liter water door een fytoplanktonnet van gaas met een maaswijdte van 25 μm te filtreren. Een voordeel van deze methode is dat de theoretische detectielimiet, de laagste detecteerbare algenconcentratie 60x lager wordt t.o.v. 1 liter monsters. Indien toxische algen in lage concentraties aanwezig zijn, dan wordt omdat meer cellen geteld kunnen worden, de analytische fout van de meting eveneens lager. Een bijkomend voordeel is dat in troebel water slib door het gaas gespoeld wordt. Dit vergemakkelijkt de latere mikroskopische analyse van de algen. In tegenstelling tot de flesmonsters worden vanwege het gaas niet alle zwevend stofdeeltjes, en dus ook niet alle fytoplanktoncellen bemonsterd. In de RIKZ fytoplanktonmonitoring wordt uit de Niskinfles of uit een 60 liter vat een subsample van 1 liter genomen (§ 3.2.1).

Voor de monstername is gekozen voor de RIVO-DLO-monitoringpunten in het Zeeuwse, Hollandse en Wadden-kustgebied (Figuur 2.1). Omdat de grootte van de algen voor de interkalibratie van belang is, en omdat het groottespectrum van het fytoplankton seizoensafhankelijk is, zijn er monsters genomen in het voorjaar, de zomer en het najaar. Vanwege de lage concentraties toxische algen, zijn er ook een aantal grote, makkelijk te identificeren fytoplanktonsoorten geteld.

4.1.2. Methode

Monsternames vonden plaats op 3 lokaties in de Noordzee: W20, NW20 en TS10 (Figuur 2.1) in de weken 16, 28, 37 en 41. Alle monsters werden gefixeerd met formaline (in duplo), eindconcentratie 0.2%.



Figuur 4.1. Box plots van de verdelingen van de log getransformeerde (log x+1) telresultaten (y-as) van de net-fles interkalibratie. Op de x-as resp.: sample (vergelijking duplo's), method (fles en net), inst (RIVO en RUG), spec (cfus = *Ceratium fusus*, dacu = *Dinophysis acuminata* en rshr = *Rhizosolenia shrubsolei*), loc (NW20, TS10 en W2), en week (week van de monstername). De bovenste 3 verdelingen (sample, method en inst) verschillen niet significant van elkaar; in deze box-plots en berekeningen zijn alle tellingen gebruikt, d.w.z. van alle soorten, alle locaties en alle weken.
Er zijn wel significante verschillen in de onderste 3 verdelingen (Tabel 4.1.), d.w.z. tussen de soorten, de locaties en de weken.

De flesmonsters en de netmonsters worden in duplo geteld door zowel de RUG als het RIVO-DLO d.m.v. normale lichtmikroskopie (§ 2.2.). De monsterverwerking en telprocedure kwamen in grote lijnen overeen. De netmonsters (60 liter) werden uiteindelijk geconcentreerd tot 150-300 ml; hiervan werd 0.1 ml (RUG) of 1 ml (RIVO) geteld. De detectielimieten waren resp. 25-50 en 2,5-5 cellen/liter.
De flesmonsters (1 liter) werden geconcentreerd tot 100-200 ml (RUG) of 50-150 ml (RIVO); hiervan werd 2 ml (RUG) of 1 ml (RIVO) geteld. In dit geval waren de detectielimieten: 50-100 en 50-150 cellen/liter.

Alle gegevens werden log(x+1) getransformeerd en uitgezet in Box-plots (Intermezzo 1). Omdat de getransformeerde waarden nog niet normaal waren verdeeld, zijn verdelingsvrije toetsen (Mann Whitney U-test en Kruskal Wallis test) gebruikt om significante ($P < 0,05$) verschillen op te sporen. Meer geavanceerde statistische methoden zijn vooralsnog niet toegepast.

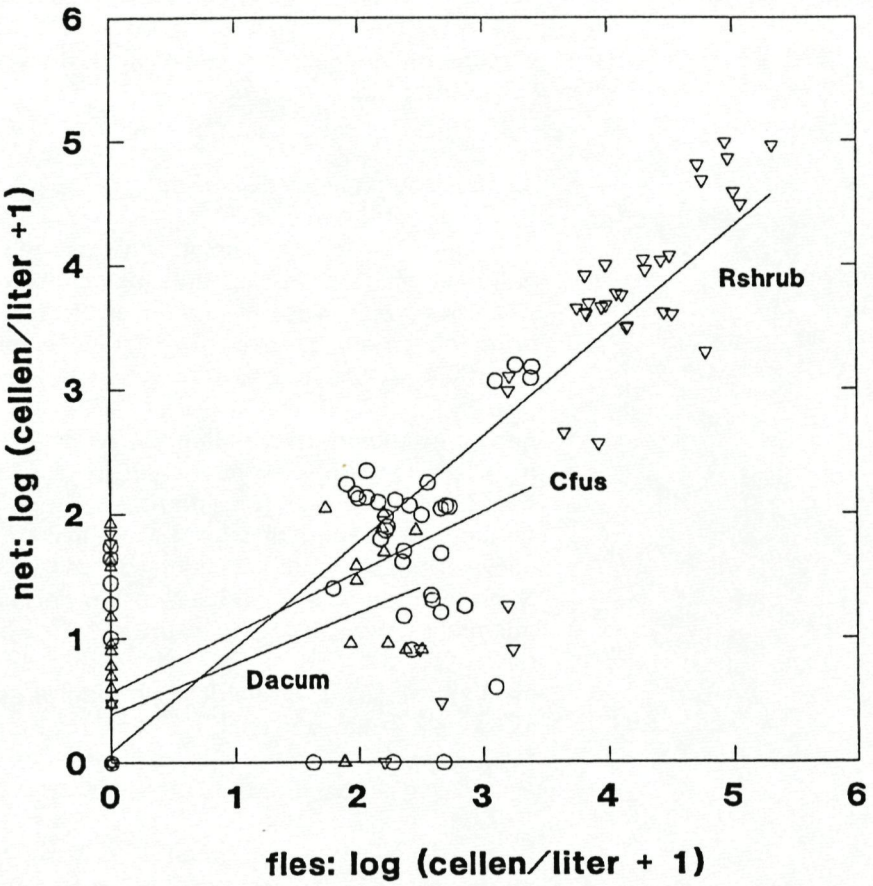
4.1.3. Resultaten en discussie

Uit een eerste voorlopige mikroskopische analyse bleek in de netmonsters slechts in enkele gevallen, en in lage concentraties *Dinophysis spp.* voor te komen. In de flesmonsters kwamen de relatief grote diatomee *Rhizosolenia shrubsolei* en de dinoflagellaat *Ceratium fusus* voor. Deze drie soorten werden geteld.

Een grote moeilijkheid tijdens de tellingen werd gevormd door de grote hoeveelheid partikulair materiaal. In het NW20 monster bestond dit in hoofdzaak uit slib en detritus. Deze storing verwacht men in netmonsters veel minder (§ 4.1.1). In de netmonsters kwam echter óók veel partikulair materiaal voor, dit maal in de vorm van fytoplankton. Niet alleen de gewenste soorten worden namelijk geconcentreerd, maar ook alle andere aanwezige soorten (> 25 μm).

In Figuur 4.1. zijn de verdelingen van de log-getransformeerde waarden in Box plots uitgezet. Er blijkt een grote range aan concentraties te zijn. *D. acuminata* blijkt in een groot aantal gevallen niet geteld te zijn, terwijl *R. shrubsolei* concentraties tussen de 10 en 10.000 liggen.

Er zijn geen significante verschillen tussen de duplo's, de verschillende methoden, of de verschillende instituten aangetroffen (Tabel 4.1). Hierbij dient opgemerkt te worden dat, door het samenvoegen van alle resultaten, d.w.z. van alle soorten, van alle 3 de lokaties en van de 4 monsterdata, de spreiding zodanig toeneemt dat de kans op het vinden van significante verschillen afneemt. Daarom zijn voor de 3 getelde fytoplanktonsoorten en voor de 2 methoden (fles vs. net) de telgegevens nogmaals uitgezet in een x-y plot (Figuur 4.2).



Figuur 4.2. X-Y plot van de resultaten van de interkalibratie tussen de fles- (X-as) en net-methode (Y-as) voor *R. shrubsolei* (▾), *C. fusus* (○) en *D. acuminata* (▴).

groep	test	P	welk verschil in log (c/l +1) getest?
sample	U	0,89	tussen 1e en 2e telling
method	U	0,20	tussen fles- en netmonsters
instituut	U	0,63	tussen RUG en RIVO-DLO
species	KW	<0,001	tussen de 3 soorten
locatie	KW	<0,005	tussen de 3 locaties
week	KW	<0,05	tussen de 4 weken

Tabel 4.1. Verdelingsvrije toetsen, U = Mann-Whitney U-test en KW = Kruskal Wallis test, met de gegevens van de 1e interkalibratie. Een verschil is signifikant indien $P < 0,05$.

Uit Figuur 4.2. wordt direct een voordeel van de netmethode duidelijk: de lagere detektielimiet. Deze is: < 10 (net, RIVO) resp. > 100 cellen/liter (fles, RIVO: zie § 4.1.2). De y-intercepten zijn daarom voor de soorten met een lage concentratie (*D. acuminata* en *C. fusus*) signifikant groter dan nul ($P \leq 0.01$, lineaire regressie). Dit komt omdat in de flesmonsters, bij lage concentraties, niets wordt geteld.
De helling van de regressielijn is, als er geen verschillen tussen de methoden zou bestaan, gelijk aan 1. Dit voor geen van de drie soorten het geval. *R. shrubsolei*, de soort met de hoogste concentraties, heeft een helling van 0.84 (berekend m.b.v. lineaire regressie), de helling van de andere soorten is nog lager (0.41 voor *D. acuminata*). Dit kan betekenen dat er in de netmonsters relatief minder cellen worden geteld dan in de flesmonsters. Dit zal vooral een rol spelen bij kleine cellen zoals van *D.acuminata* die slechts iets groter zijn dan 20 μm (zie Figuur 8.5), de maaswijdte van het net. Duidelijke verschillen tussen fles- en netmonsters zijn inderdaad voor deze soort gevonden (Schol en Dijkema, ongepubliceerde gegevens). De hellingen van de regressielijnen in Figuur 4.2 worden echter sterk bepaald door de monsters met lage concentraties, en daarom is verlies door te grote mazen niet de enige reden voor de te kleine hellingen.

Conclusie. Zowel de fles- als de netmethode hebben als nadeel dat partikulair materiaal, detritus/slib of ander plankton, het mikroskoopbeeld "vervuilen" en de tellingen bemoeilijken. De netmethode heeft als voordeel dat een lagere detektielimiet in principe mogelijk is (1 cel/60 liter vs. 1 cel/liter). Het nadeel is dat celconcentraties te laag uitvallen omdat er algen door de mazen van het net glippen. Geconcludeerd wordt daarom dat de netmethode moet worden afgeraden.

4.2. Interkalibratie II: Lugol- vs. formaldehydefixatie

4.2.1. Inleiding

Lugol wordt routinematig in de Rijkswaterstaat biomonitoring gebruikt. Het RIVO-DLO daarentegen gebruikt normaliter methanal (=formaldehyde = formaline). De mogelijke verschillen in fytoplanktonconcentraties ten gevolge van deze verschillende methoden is in OTAB onderzocht.
Beide fixatieven hebben hun voor- en hun nadelen, alhoewel de Lugol-fixatie door het toepassen van nieuwe detectietechnieken zoals fluorescentiemikroskopie en immunofluorescentie (§ 2.2) steeds minder de voorkeur geniet. Het bruine jodium van de Lugol kan namelijk, in tegenstelling tot het kleurloze formaldehyde (methanal), storend werken. Omdat Lugol zuur is, lossen de kalkschaaltjes van coccolithoforen op. Methanal heeft als nadeel dat het vluchtig is en daarom alleen in goed geventileerde ruimtes mag worden toegepast.

Om een grote variatie in fytoplanktonsoorten te krijgen werden er monsters genomen op een kustpunt en op een punt in de centrale Noordzee, zowel in het voorjaar als in de zomer. De Lugol-monsters en de formaline-monsters werden geanalyseerd door de RUG én door het RIVO-DLO.

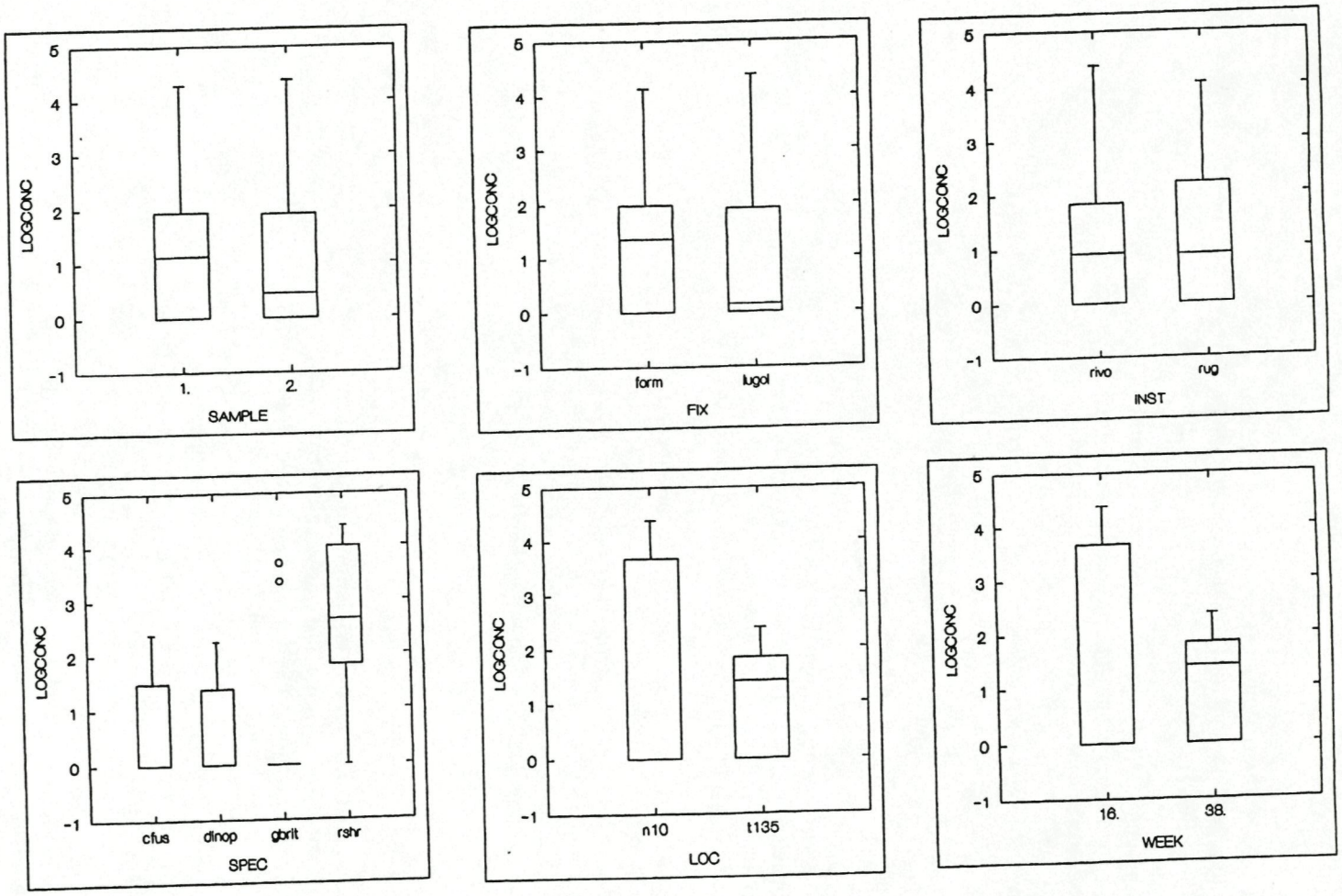
4.2.2. Methode

Monsternames vonden plaats op NW10 en TS135 (Figuur 2.1) in de weken 16 en 38. De monsters werden gefixeerd met formaline of met Lugol (§ 3.3.1), en binnen 12 maanden geanalyseerd. De 1 liter monsters werden in duplo geteld door zowel de RUG als het RIVO-DLO d.m.v. normale lichtmikroskopie (§ 2.2.). De flesmonsters (1 liter) werden geconcentreerd tot 100-200 ml (RUG) of 50-150 ml (RIVO); hiervan werd 2 ml (RUG) of 1 ml (RIVO) geteld. De detectielimieten waren: 50-100 en 50-150 cellen/liter.
Alle gegevens werden log(x+1) getransformeerd en uitgezet in Box-plots. Omdat de getransformeerde waarden nog niet normaal waren verdeeld, zijn verdelingsvrije toetsen (Mann Whitney U-test en Kruskal Wallis test) gebruikt om significante ($P < 0,05$) verschillen op te sporen.

4.2.3. Resultaten en discussie

Uit een eerste, voorlopige analyse bleken er geen toxische soorten aanwezig te zijn. Geselecteerd werden daarom in eerste instantie: *Rhizosolenia shrubsolei, Ceratium fusus* en de niet gepantserde *Gymnodinium brittanicum*. Later bleek ook *Dinophysis acuminata* en *D. rotundata* aanwezig te zijn, en zijn deze soorten ook geteld. *G. brittanicum* is alleen door het RIVO-DLO geteld.

In Figuur 4.3 staan de Box-plots van de log (x+1) getransformeerde resultaten. Ook hier blijkt er weer een flinke spreiding te zijn, alsmede een groot aantal waarnemingen van 0 cellen/liter.



Figuur 4.3. Box plots van de verdelingen van de log getransformeerde (log x+1) telresultaten (y-as) van de Lugol-formaline interkalibratie. Op de x-as resp.: sample (vergelijking duplo's), fix (Lugol of formaline), inst (RIVO en RUG), spec (cfus = *Ceratium fusus*, dinop = *Dinophysis acuminata en D. rotundata*, gbrit (*Gymnodinium britannicum*), en rshr = *Rhizosolenia shrubsolei*), loc (NW10 en TS135) en week (week van de monstername). Het verschil tussen de fixatieven is niet signifikant; voor deze vergelijking bijvoorbeeld, zijn alle concentraties, d.w.z. van alle samples, van beide instituten, van 3 soorten (*B. brittanicum* niet), van beide locaties en beide monsterweken gebruikt. Zie ook Tabel 4.2.

In Tabel 4.2 worden de resultaten van de verdelingsvrije toetsen vermeld.

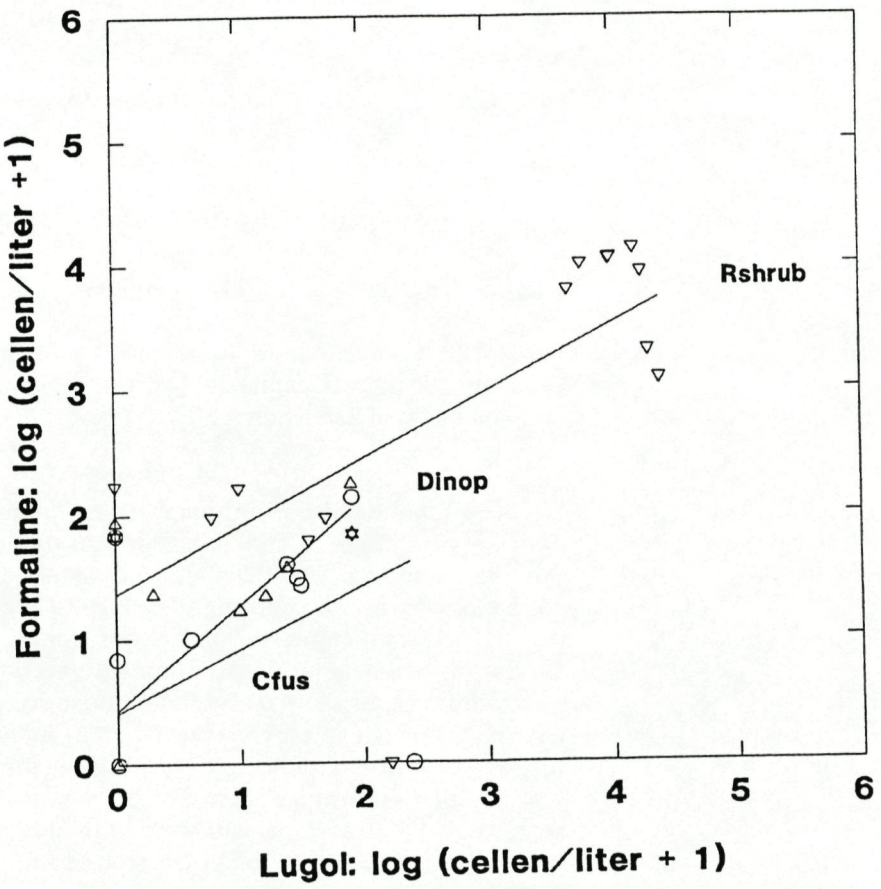
groep	test	P	welk verschil in log (c/l +1) getest?
sample	U	0,57	tussen 1e en 2e telling
fix	U	0,39	tussen formaldehyde en Lugol
instituut	U	0,84	tussen RUG en RIVO-DLO
spec	KW	<0,001	tussen 3 soorten (ex *G. britannicum*)
loc	KW	0,21	tussen de 2 locaties
week	KW	0,21	tussen de 2 weken

Tabel 4.2. Verdelingsvrije toetsen, U = Mann-Whitney U-test en KW = Kruskal Wallis test, met de gegevens van de 2e interkalibratie. Een verschil is signifikant indien $P < 0,05$.

Uit deze tabel blijkt dat het enige significante verschil werd veroorzaakt door de verschillen in concentraties van de verschillende soorten. Uit de Box-plot van de verschillende fixatieven (Figuur 4.3) blijkt dat de mediane waarde van de Lugol monsters bijna een factor 10 lager ligt dan de mediaan van de formaline monsters.
Omdat dit het belangrijkste onderdeel van de interkalibratie is, zijn deze gegevens nogmaals per fytoplanktonsoort uitgezet in een X-Y plot: Figuur 4.4. In deze plot verwacht men, indien er geen verschil bestaat tussen beide methoden, een regressielijn met een helling van 1 en een y-intercept van nul. Zoals uit Figuur 4.4. blijkt hebben alle regressielijnen een positief y-intercept, d.w.z. dat bij lage celconcentraties relatief meer cellen in de formaline gefixeerde monsters werd gevonden. Het y-intercept van de regressielijn van *R. shrubsolei* is overigens de enige die signifikant groter is dan nul ($P < 0,01$). De hellingen van deze lijnen zijn echter allen < 1, d.w.z. dat het effect (meer cellen in formaline monsters) niet systematisch optreedt. Het is dan ook onduidelijk of het effect ook inderdaad veroorzaakt wordt door het verschil in fixatief. Bovendien is het aantal waarnemingen gering, en zijn de meetpunten niet normaal verdeeld.

Conclusie. Op grond van dit experiment is geen uitspraak te doen over verschillen in celconcentraties t.g.v. het gebruik van formaline en Lugol als fixatief.

Het is aan te raden dit experiment te herhalen met kultures van fytoplankton. Er kunnen dan naast diatomeeën en gepantserde flagellaten ook ongepantserde (zwakkere) soorten onderzocht worden. Bovendien is dan het effect van Lugol en formaldehyde als fixatief (een goede fixatie van de morfologie van de cel) en als preservatief (een langdurige bescherming tegen bederf) makkelijker te meten.



Figuur 4.4. X-Y plot van de resultaten van de interkalibratie tussen de Lugol- (X-as) en formaline-fixatie (Y-as) voor *R. shrubsolei* (▾), *C. fusus* (○) en *Dinophysis spp.* (▴).

5 Toxische algen op NW10 (kust)

5.1. Inleiding.

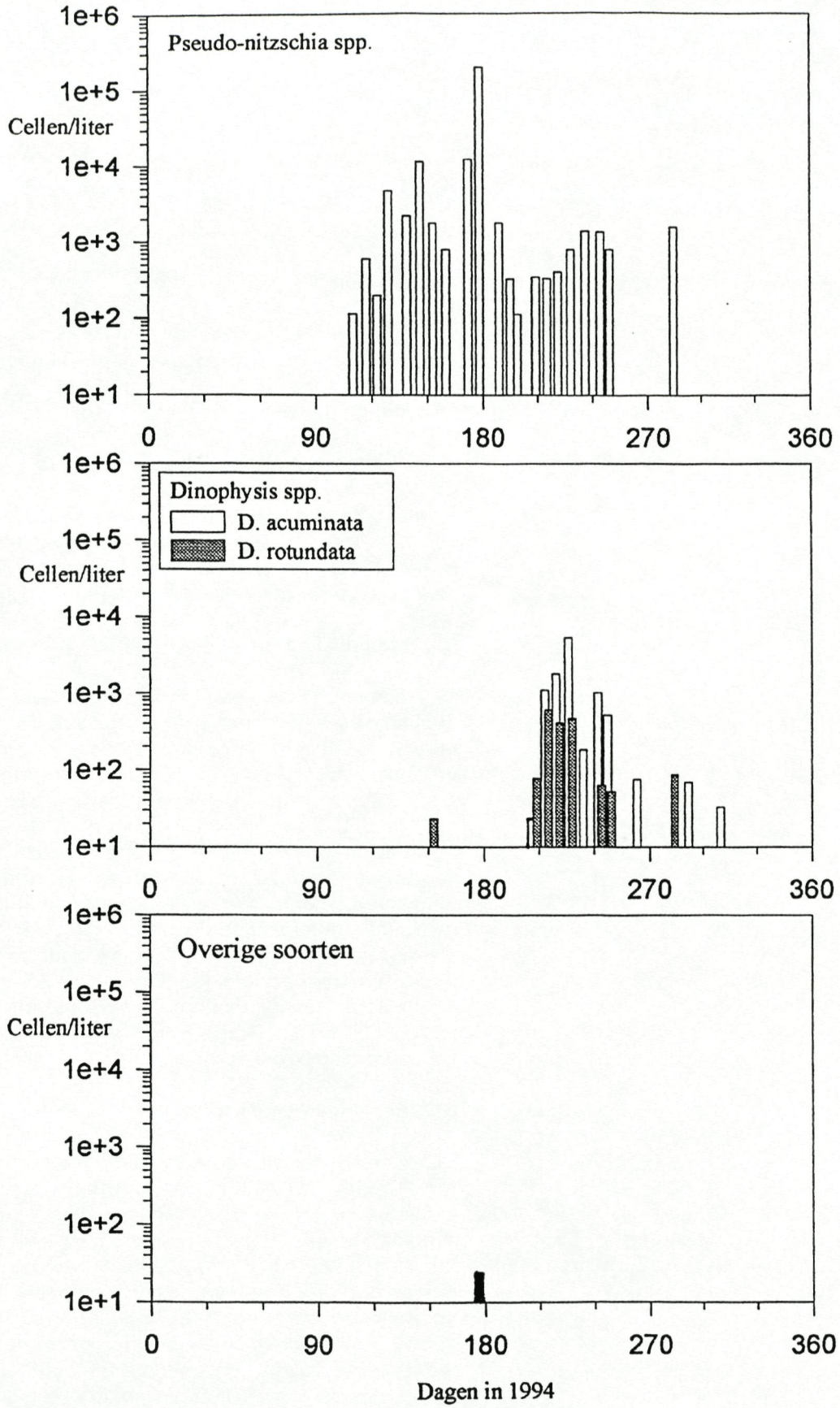
In dit hoofdstuk worden de resultaten van de toxische algen tellingen van 1994 in NW10 monsters gepresenteerd. NW10 is een standaard monitoringpunt van DNZ dat vanaf maart wekelijks wordt bemonsterd. Daarom is de seizoensvariatie in diverse variabelen redelijk goed te volgen. De doelstelling van OTAB is nu juist om toxische fytoplanktonsoorten in lage concentraties te meten, waardoor het begin van een bloei goed te volgen is. Er kunnen dan relaties met de op dat moment heersende fysische en chemische factoren (stuurvariabelen) gelegd worden. Deze informatie moet uiteindelijk leiden tot meer inzicht in de processen die een toxische algenbloei stimuleren, en hoe daar beleidsmatig op gereageerd kan worden.

5.2. Materiaal en methoden

De bemonstering werd uitgevoerd met Niskinflessen (§ 3.2). Subsamples van 1 liter werden gefixeerd met formaline (methanal; 40 ml van een 3,7% oplossing, eindconcentratie 0,14%). Na sedimentatie van het seston werd 850-900 ml water afgeheveld. Van het sediment werd 2 ml, in duplo, geteld met de lichtmikroskoop (LM), zie ook Tabel 2.1. De detektielimiet was daarom 50-75 cellen/liter. De duplo's werden gemiddeld. In de monsters met potentieël toxische algen die niet tot soortniveau konden worden gedetermineerd werd een tweede analyse uitgevoerd, met a. fluorescent brightner (FB, *Alexandrium spp.*), of b. de immunofluorescentie (IF) methode (§ 2.1 en 2.2). Van het sediment werden respectievelijk 2 en 5 ml onderzocht. De FB methode werd uitgevoerd in dezelfde kuvet als de LM telling door dr. R. Koeman (Koeman & Bijkerk, Haren). De IF methode werd uitgevoerd volgens bijlage 2. Het filter werd in zijn geheel geteld m.b.v. een fluorescentiemikroskoop.

5.3. Resultaten en discussie

Diatomeeën van het geslacht *Pseudonitzschia* werden in concentraties tot 100.000 per liter aangetroffen. Met IF analyse kon worden aangetoond dat de potentieël toxische *P. pungens f. multiseries* niet aanwezig was. Deze analysemethode is niet alleen zeer specifiek (hoofdstuk 2), hij is ook relatief snel. Op één dag kunnen ca. 16 monsters verwerkt worden. Potentieël toxische soorten waren voornamelijk van het geslacht *Dinophysis* (Figuur 5.1.). M.n. de bloei van *D. acuminata* is van belang, deze zal in hoofdstuk 8 uitgebreid worden behandeld. De monsterfrequentie van 1x per week, en de detektielimiet van <100 cellen/liter bleken voldoende om de bloei-ontwikkeling redelijk te kunnen volgen. De eerste *D. acuminata* cellen werden 3 weken vóór het hoogtepunt van de bloei ontdekt (Figuur 8.2.c).
M.b.v. de IF methode werd op dag 178 *G. aureolum* aangetoond in een zeer lage concentratie (<100 cellen/liter).



Figuur 5.1. Verloop van de concentraties potentieël toxische algen op NW10 in 1994. *Dinophysis spp.* en *Pseudonitzschia spp.* zijn geteld en gedetermineerd m.b.v. LM. De *Pseudonitzschia*'s zijn gecontroleerd m.b.v. immunofluorescentie:*P. pungens f. multiseries* werd niet aangetroffen. Op dag 178 werd m.b.v. IF *G. aureolum* gedetekteerd.

6 Toxische algen op TS135 (Oestergronden)

6.1. Inleiding.

In dit hoofdstuk worden de resultaten van TS135/TS145 gepresenteerd. Dit INP punt wordt normaliter minder frequent bemonsterd dan NW10: tweewekelijks i.p.v. wekelijks.

6.2. Materiaal en methoden

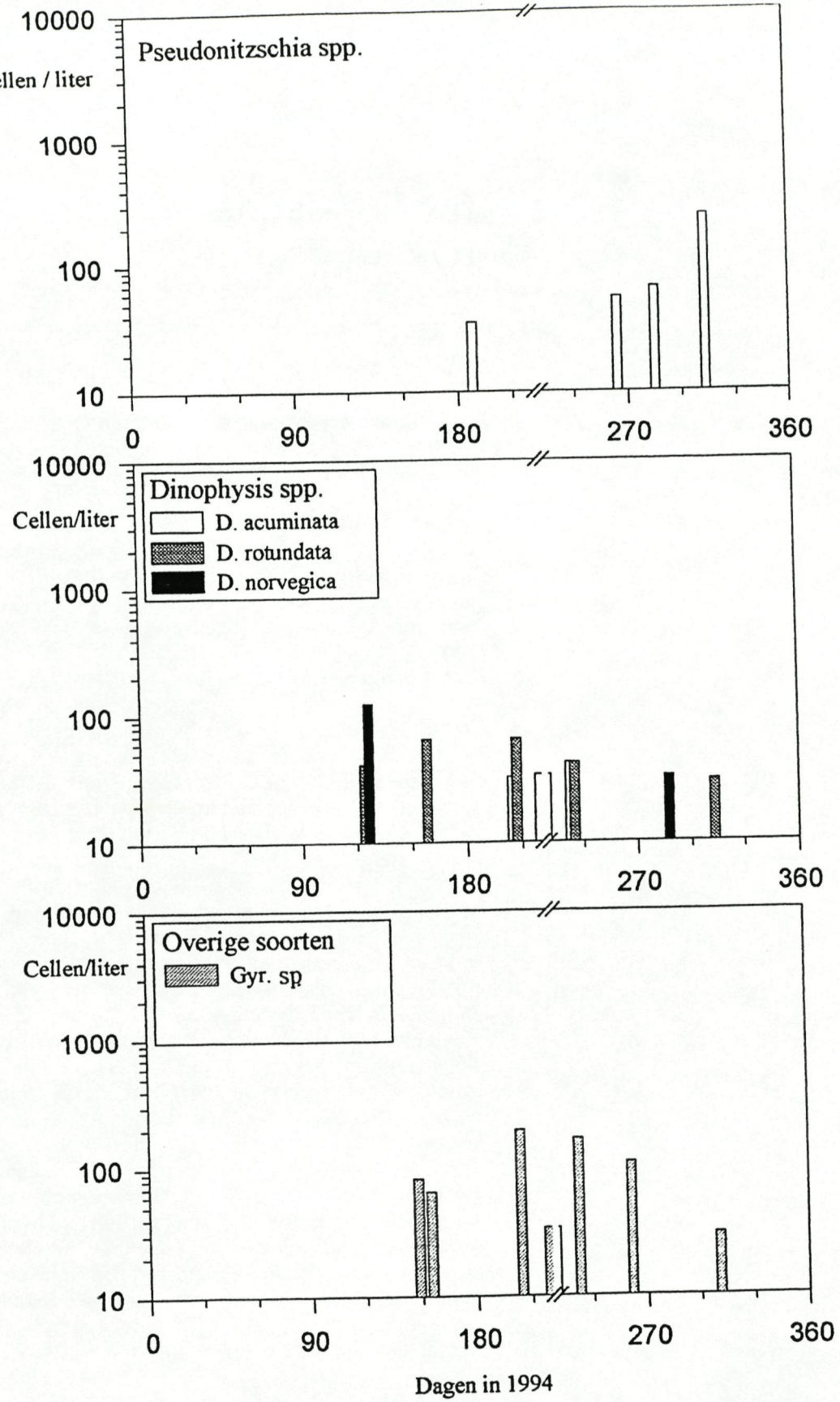
Zie § 5.2. In tegenstelling tot NW10 werd op 3 dieptes gemonsterd: oppervlak (-3 meter), spronglaag (in vivo fluorescentie maximum) en bodem (+3 meter).

6.3. Resultaten en discussie

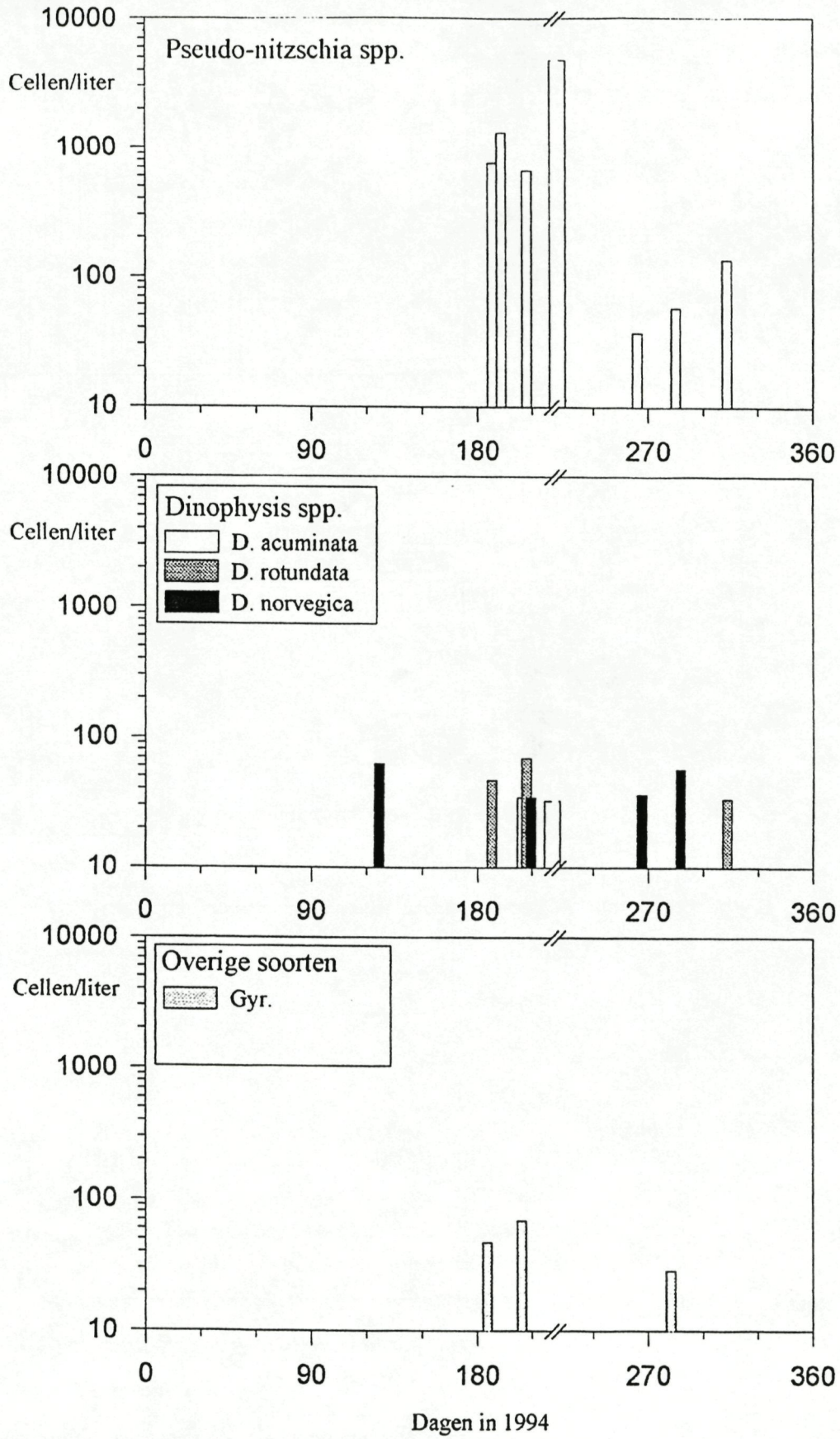
Van *Alexandrium* werden verdachte cellen met LM waargenomen. Slechts in 1 monster (dag 234, bodem +3 meter) kon met IF een *A. tamarense* worden geïdentificeerd (Figuur 6.3).
De met LM waargenomen *Gyrodinium sp.* en *Pseudonitzschia spp.* behoorden tot niet-toxische soorten.

Uit de figuren 6.1, 6.2 en 6.3 blijkt dat de flagellaten op alle dieptes in vergelijkbare, lage, concentraties voorkomen. Dit is niet ongewoon, jaren met hoge concentraties toxische algen (in de spronglaag) kunnen worden afgewisseld door jaren met lage concentraties (Peperzak *et al.* 1995). De oorzaak hiervan is nog niet duidelijk.
Dinophysis spp. kwamen op TS135 het gehele fytoplanktonseizoen (april-oktober) voor zonder duidelijke pieken, dit in tegenstelling tot *D. acuminata* op NW10 (Figuur 5.1). De bloei van deze toxische dinoflagellaat begon op NW10 toen de watertemperatuur steeg tot boven 19°C (Figuur 8.2). Deze temperatuur werd ook bereikt op TS135 (Figuur 7.2). De tweede factor die van belang was bij de NW10 bloei (zie hoofdstuk 8) was stratificatie. Echter, ook TS135 was gestratificeerd (Figuur 7.4). Nutriëntenconcentraties waren laag op beide punten (Figuren 7.5 en 7.6), het duidelijkste verschil in abiotische variabelen is te vinden in de saliniteit (Figuur 7.1). In hoofdstuk 8 zal blijken dat *D. acuminata* concentraties voor de Hollandse kust juist een slechte relatie hadden met deze variabele (Figuur 8.3), m.a.w. een hoge saliniteit (ca. 34.5 op TS135) biedt in dit geval geen verklaring voor het verschil in flagellaatconcentratie tussen kust en Oestergronden.

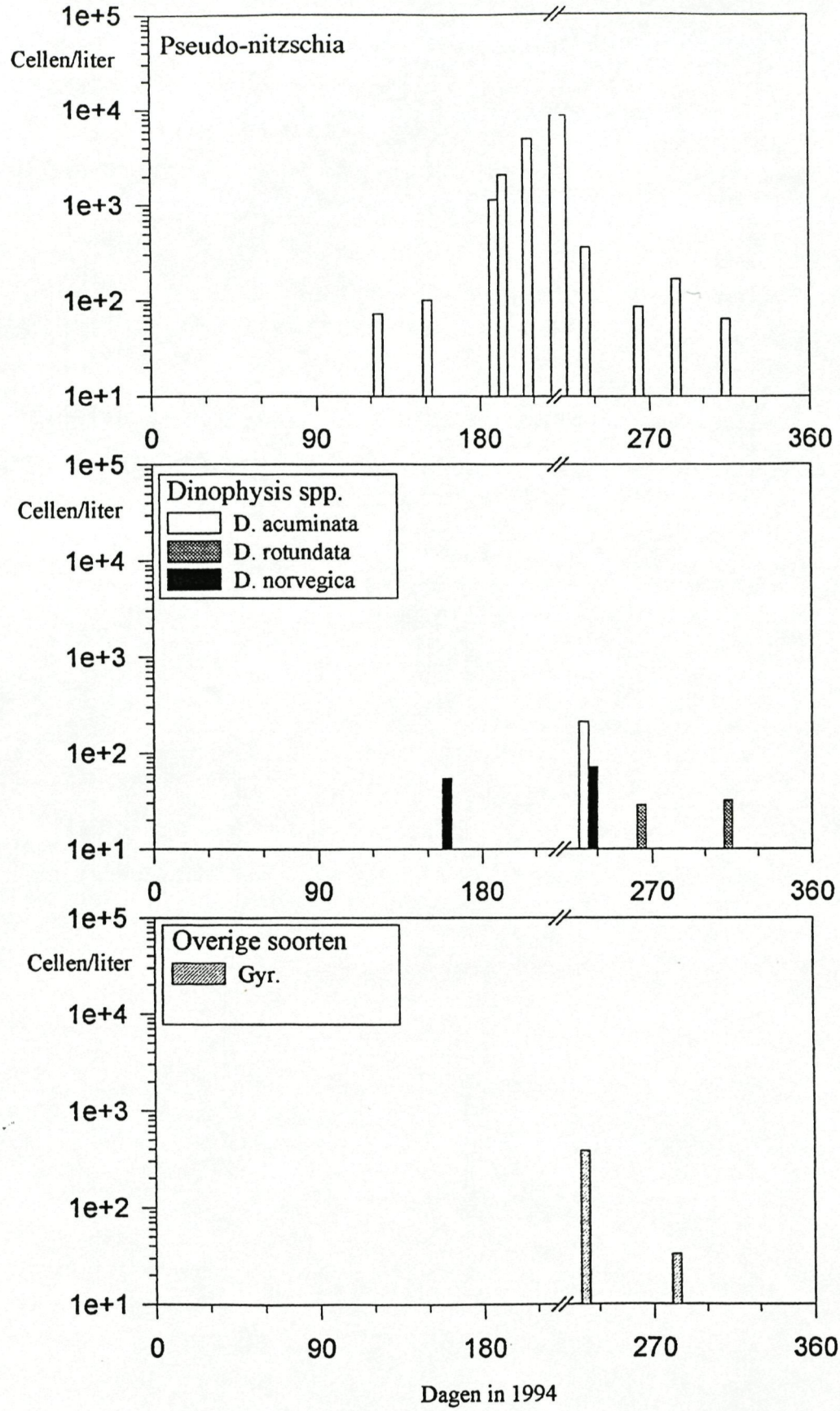
Pseudonitzschia's kwamen relatief meer voor in spronglaag en bodemmonsters van TS135 dan in de oppervlaktemonsters. De concentraties waren niet veel lager dan aan de kust (Figuur 5.1). Wel kwamen *Pseudonitzschia's* voornamelijk pas ná dag 180 op TS135 voor; op NW10 (Figuur 5.1) werden de hoogste concentraties van deze diatomee juist rond dag 180 gemeten.



Figuur 6.1. Verloop van de concentraties potentieël toxische algen aan het oppervlak van op TS135/145 in 1994. De soorten zijn in eerste instantie geteld en gedetermineerd m.b.v. LM. De *Pseudonitzschia spp.*- en *Gyrodinium sp.* determinaties zijn gecontroleerd m.b.v. immunofluorescentie; er werden geen toxische soorten aangetroffen.



Figuur 6.2. Verloop van de concentraties potentieël toxische algen in de spronglaag op TS135/145 in 1994. De soorten zijn in eerste instantie geteld en gedetermineerd m.b.v. LM. De *Pseudonitzschia spp.* en *Gyrodinium sp.* determinaties zijn gecontroleerd m.b.v. immunofluorescentie; er werden geen toxische soorten aangetroffen.



Figuur 6.3. Verloop van de concentraties potentieël toxische algen in de onderlaag van TS135/145 in 1994. De soorten zijn in eerste instantie geteld en gedetermineerd m.b.v. LM. De *Pseudonitzschia spp.* en *Gyrodinium sp.* determinaties zijn gecontroleerd m.b.v. immunofluorescentie; er werden geen toxische soorten aangetroffen. *A. tamarense* werd gedetekteerd m.b.v. immunofluorescentie.

7 Vergelijking NW10 en TS135

7.1. Inleiding

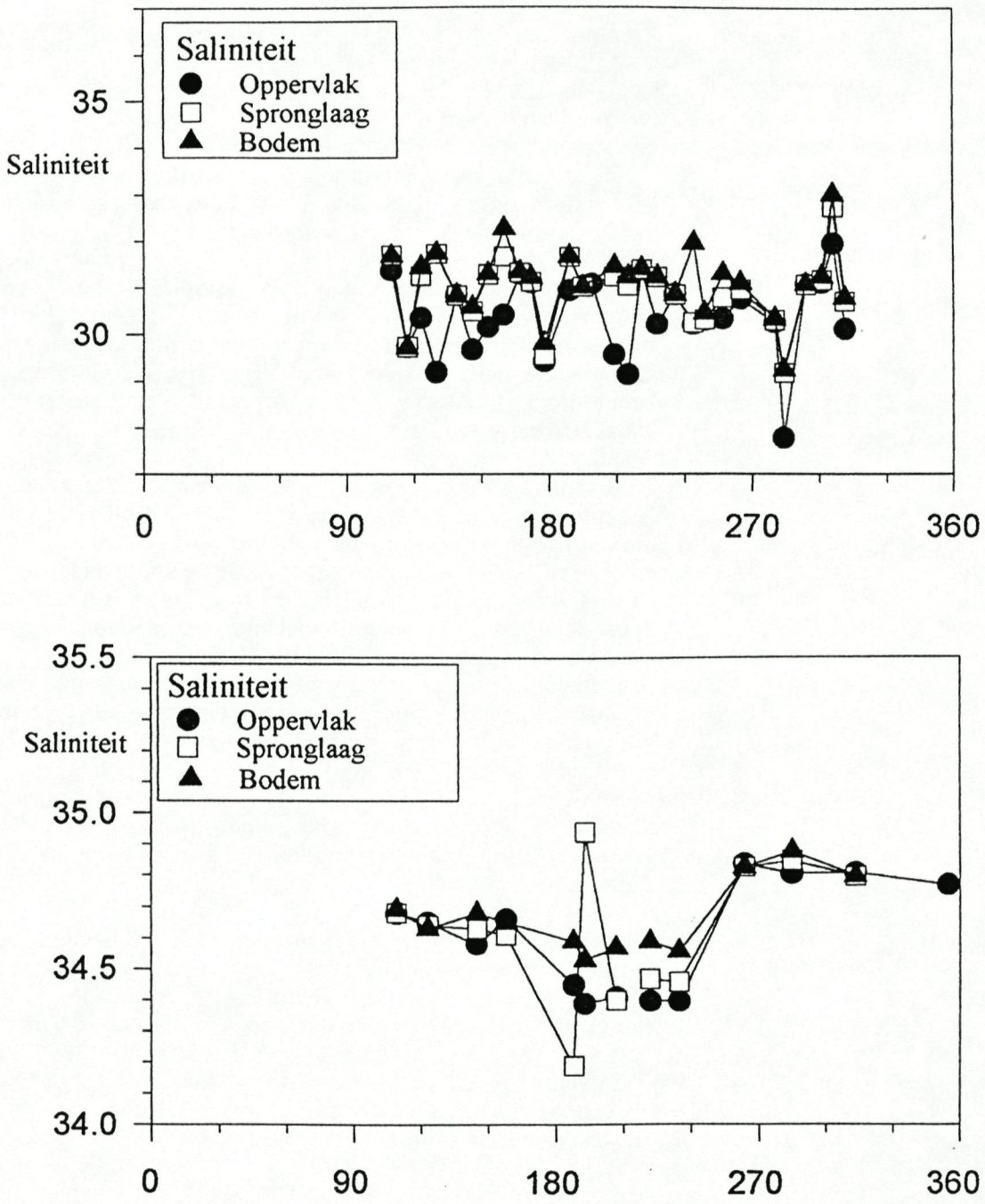
NW10 en TS135 zijn in deze studie gekozen omdat ze representatief worden beschouwd voor de kust (NW10) en voor het centrale deel van de Nederlandse Noordzee: de Oestergronden (TS135). Het kustpunt is, vergeleken met de Oestergronden ondiep (20 vs. 40 meter) en door de getijdestroming zal het kustwater turbulent en goed gemengd zijn. Op de Oestergronden raakt de waterkolom in het voorjaar gelaagd. Deze gelaagdheid of stratificatie ontstaat door opwarming door de zon van het oppervlaktewater. Door de grotere diepte en de lagere stroomsnelheden van het water is de turbulentie hier relatief laag. Daarom wordt het warme water niet gemengd met het koelere water in de onderste helft van de waterkolom. Het warme water drijft op het koude water omdat er een dichtheidsverschil bestaat: het warmere water heeft een lagere dichtheid.

Turbulentie in het water van de bovenlaag wordt veroorzaakt door luchtstroming, wind, aan het oppervlak. Turbulentie in de onderlaag ontstaat door stroming, getijbeweging, aan de bodem. De overgang van deze twee, onder- en bovenlaag, wordt de spronglaag genoemd. Deze is slechts enkele meters diep, en de turbulentie is er minimaal. Juist in deze laag worden veel flagellaten gevonden, waaronder enkele potentieël toxische (Peperzak *et al.* 1995).
De scheiding van de waterlagen in het voorjaar heeft tot gevolg dat plankton zonder eigen beweging, bijvoorbeeld diatomeeën, in de onderlaag zakt. De planktonconcentraties, en daarmee de nutriëntenconcentraties, in de bovenlaag nemen af. In de onderlaag nemen deze toe. Omdat de onderlaag d.m.v. de spronglaag als het ware afgesloten is van de bovenlaag, daalt in de zomer de zuurstofconcentratie in de onderlaag als functie van de afbraak van het organische materiaal.

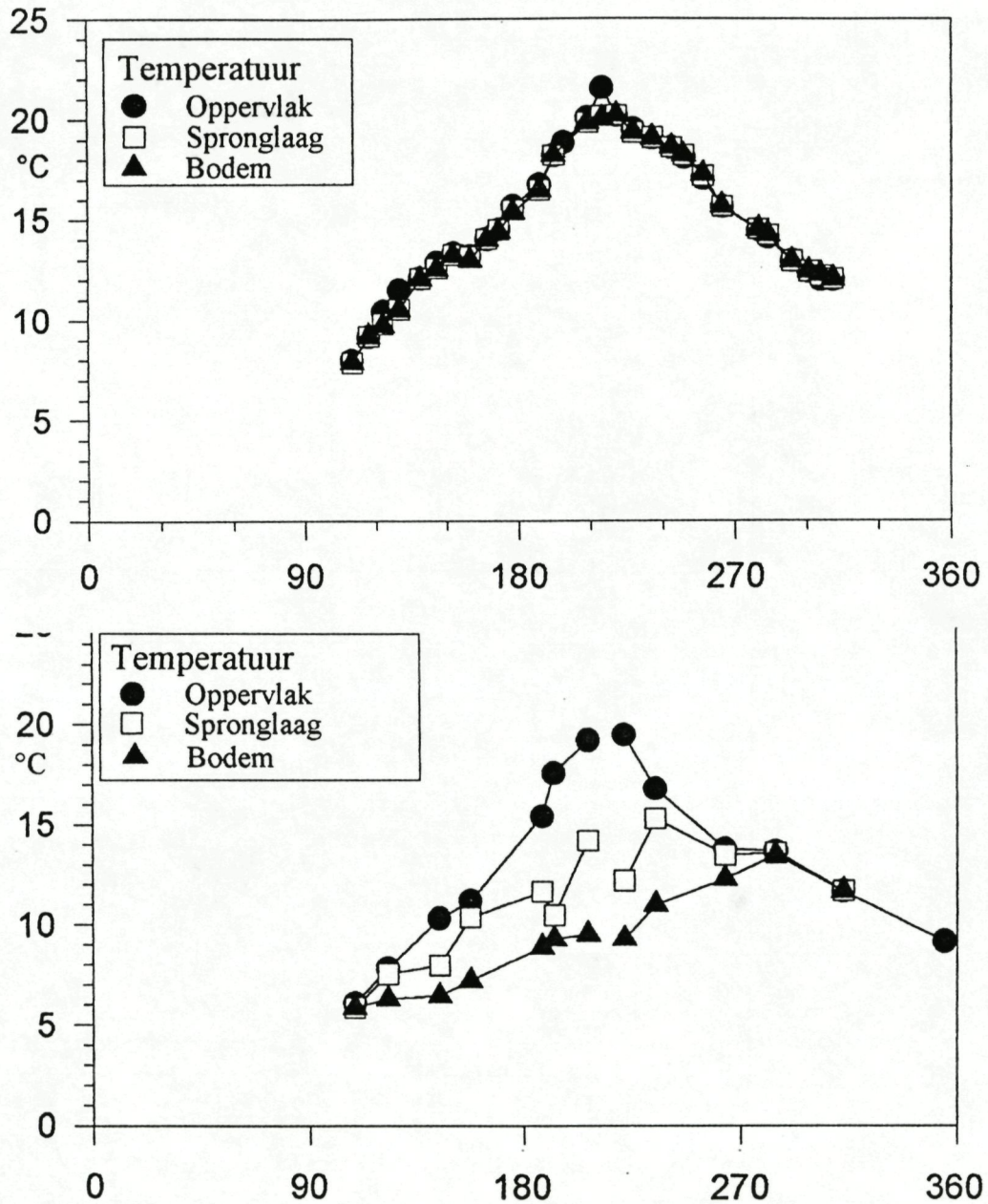
Omdat de bovenlaag in de zomer door voortdurende opwarming groter wordt, en de spronglaag steeds dieper, verkleint de gemiddelde hoeveelheid licht in de onderlaag. Uiteindelijk groeit er geen fytoplankton meer, en stopt de zuurstofproduktie. Dit draagt bij aan een netto verlaging van de zuurstofconcentratie. Plankton in de spronglaag ondervindt niet alleen weinig last van turbulentie, het bevindt zich ook op een positie tussen de waterlagen met relatief veel licht (bovenlaag) en relatief veel nutriënten (onderlaag).

7.2. Fysische variabelen

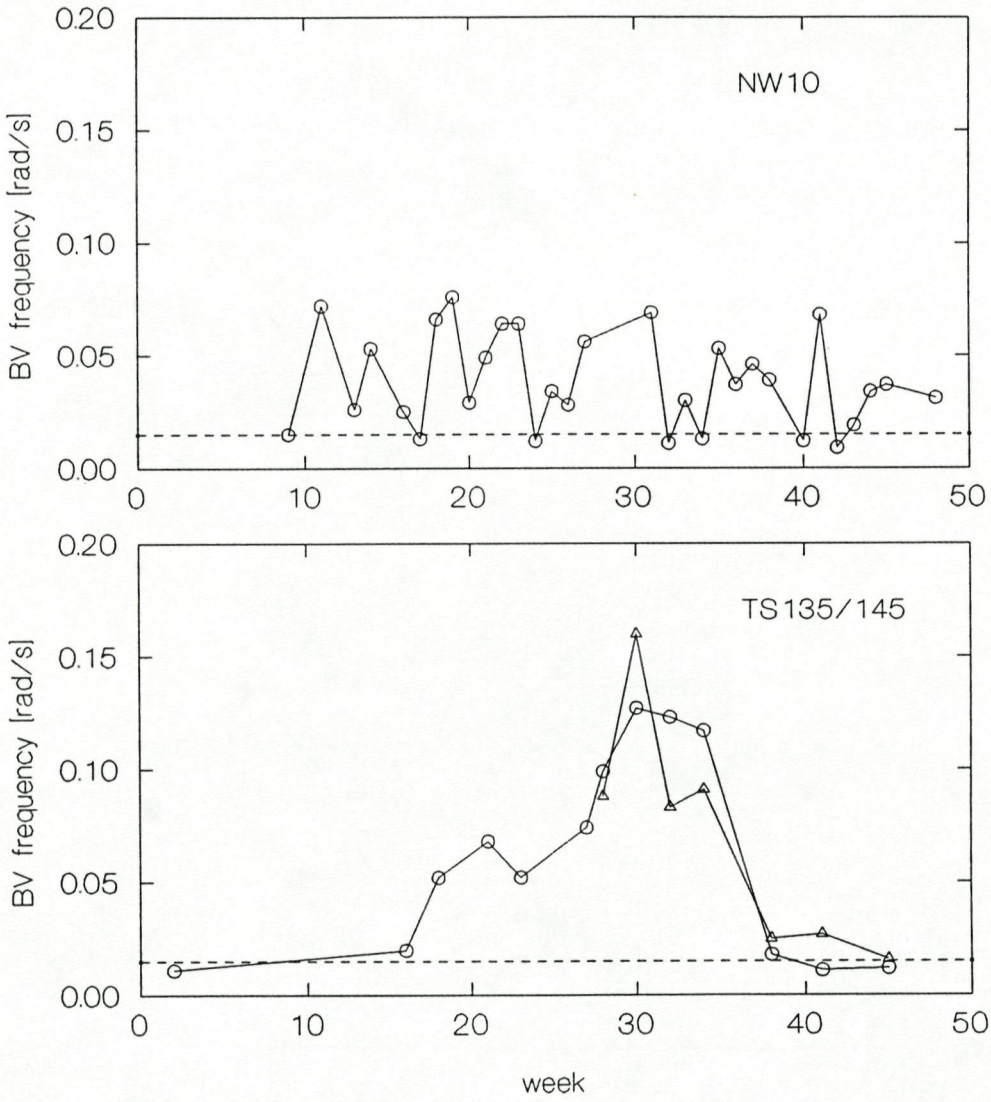
In de Figuren 7.1 - 7.4 staan saliniteit, temperatuur, Brunt-Väsälä frequenties en de spronglaagdieptes weergegeven. De gebruikte gegevens zijn afkomstig uit de meetrapporten van de "Holland" van de directie Noordzee van RWS.



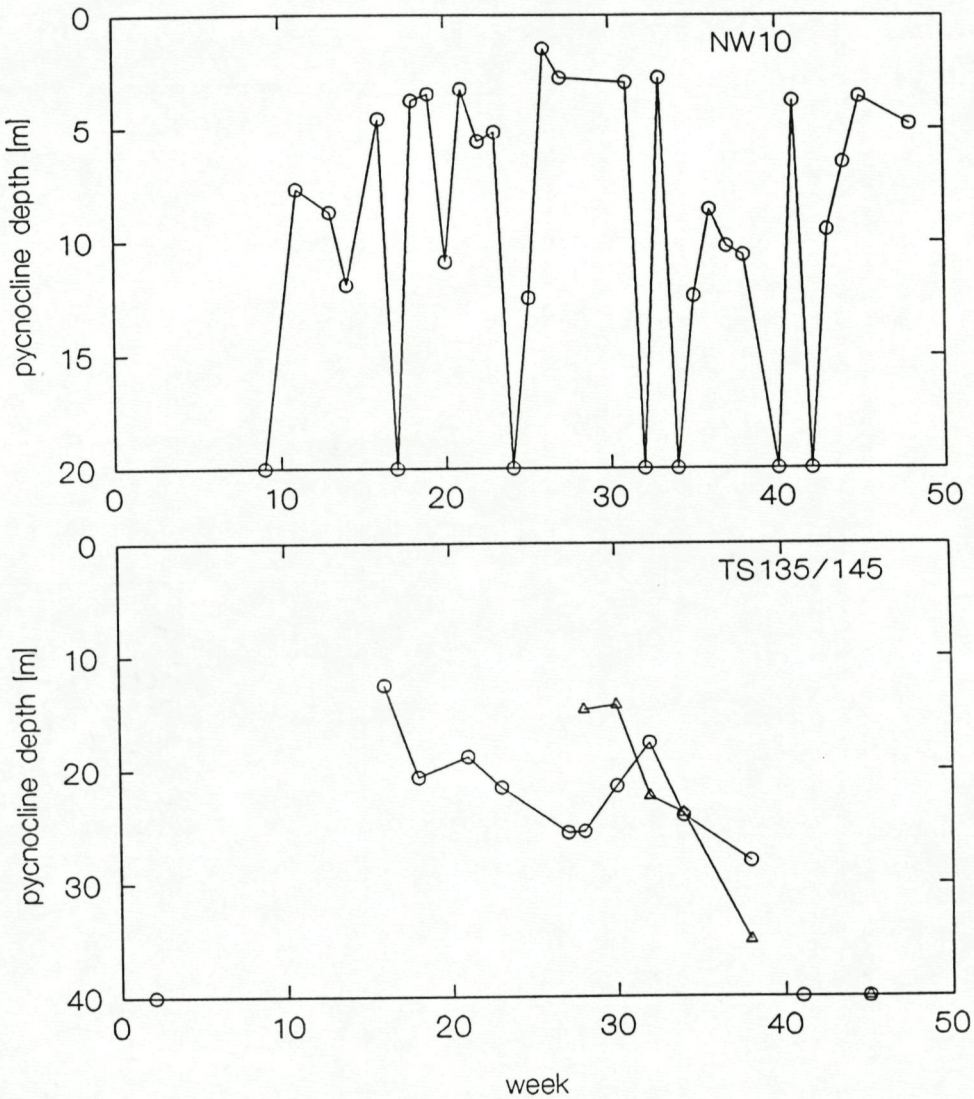
Figuur 7.1. Verloop van de saliniteit (dimensieloos) op NW10 (boven) en TS135 (onder) in 1994.



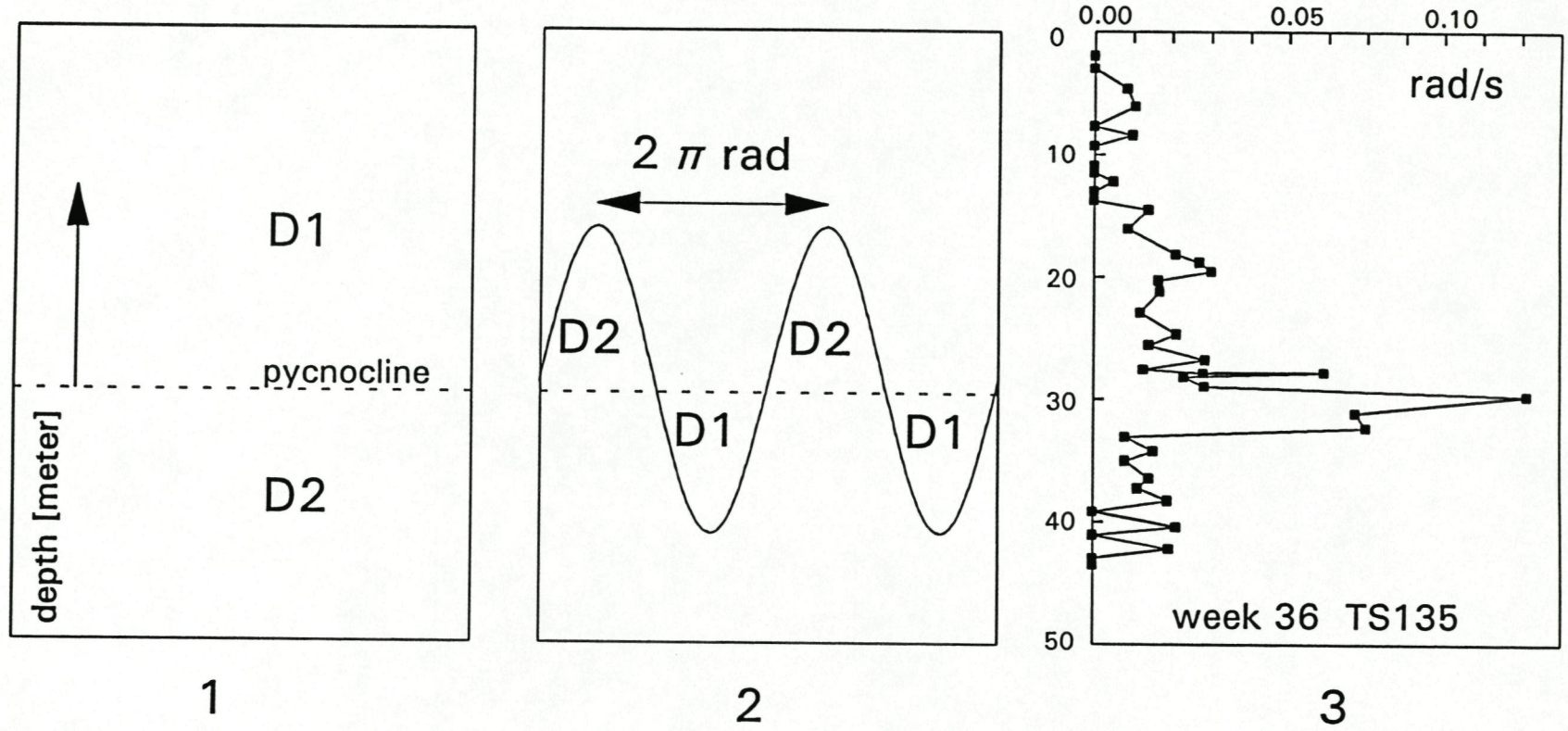
Figuur 7.2. Verloop van de temperatuur (°C) op NW10 (boven) en TS135 (onder) in 1994.



Figuur 7.3. Verloop van de Brunt-Väsälä frequenties (rad.s^{-1}) op NW10 (○, boven) en TS135 (○, onder) in 1994. Omdat in week 32 de mooring is verplaatst naar TS145, zijn vanaf week 28 op dat punt (▲) ook vertikaalmatingen uitgevoerd. BV frequenties =< 0.015 (stippellijn) kunnen worden verwaarloosd; de waterkolom wordt dan als gemengd beschouwd. De methode van berekening van BV frequenties wordt uitgelegd in intermezzo 2 (pag. 46).



Figuur 7.4. Verloop van de spronglaag-(pycnocline)-diepte (meter) op NW10 (boven, o) en TS135/145 (onder) in 1994. Op NW10 wordt stratificatie voornamelijk veroorzaakt door via de Nieuwe Waterweg aangevoerd zoet water; hierdoor is de stratifikatie instabiel en is de spronglaagdiepte erg variabel (van 1,5 - 12,7 meter tot gemengd: -20 meter). Op TS135 (o) en TS145 (▲) wordt de stratifikatie veroorzaakt door de seizoensgebonden opwarming van het water door zonnestraling. Deze stratifikatie is stabieler; de spronglaagdiepte gaat van 12, 5 naar 28,0 meter op TS135. De totale diepte op deze punten is 45 meter.



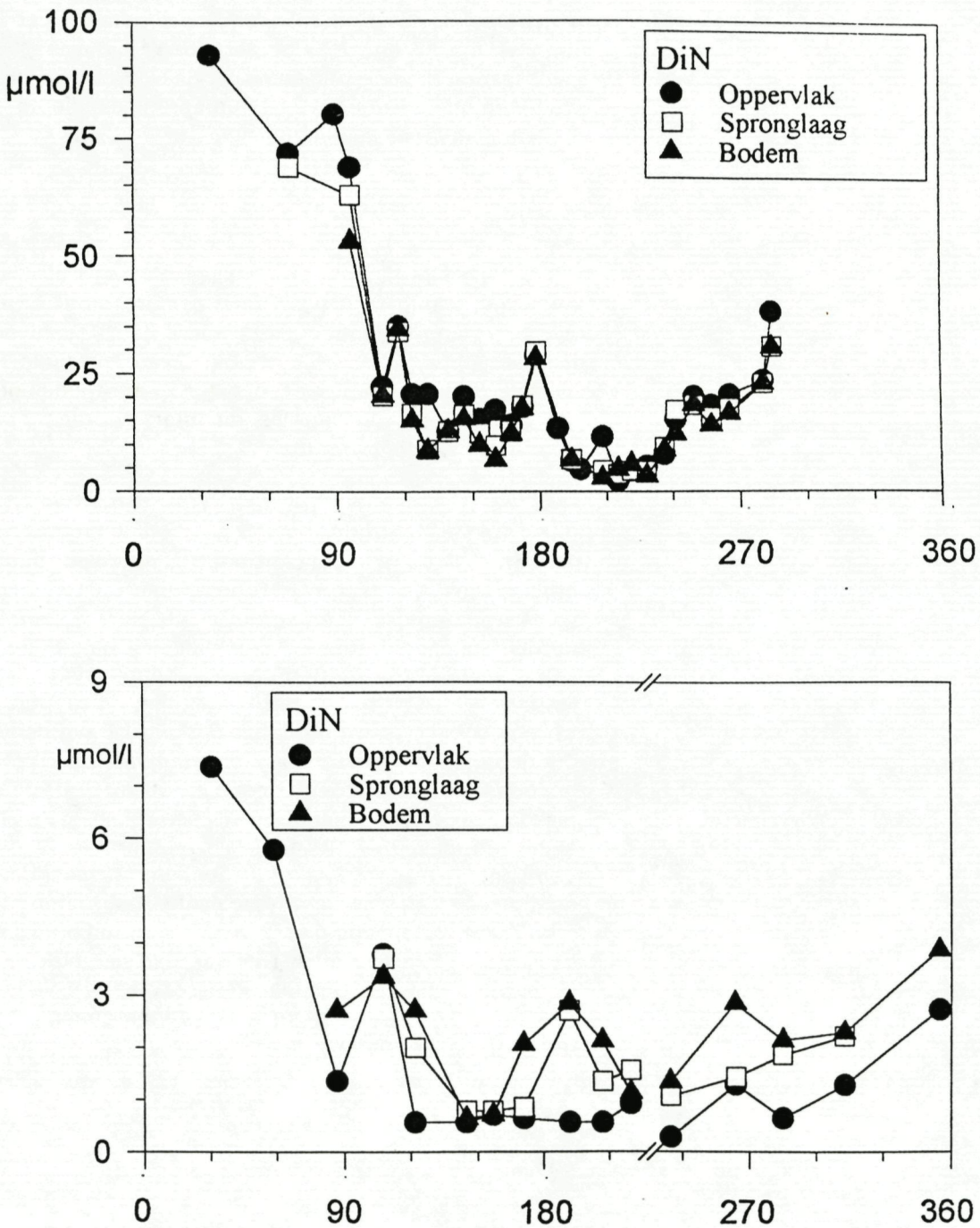
Intermezzo 2. De Brunt-Väsälä frequentie.

De Brunt-Väsälä frequentie wordt gebruikt als maat voor de sterkte van de stratifikatie.

In figuur 1 is schematisch een gestratificeerde waterkolom weergegeven. De spronglaag of pycnocline ligt op 30 meter onder het oppervlak. In de bovenlaag heeft het water een dichtheid D1. De dichtheid van het water in de onderlaag heeft een hogere dichtheid: D2.
Stel nu dat de spronglaag als een gitaarsnaar omhooggetrokken, en weer losgelaten wordt. Water met dichtheid D2 bevindt zich dan in het water met de lagere dichtheid D1, en het zal daarom naar beneden zakken. Door de traagheid schiet het water door, en er komt water met de lage dichtheid D1 onder de spronglaag. Dit water ondervindt een opwaartse kracht, en het wordt naar boven de spronglaag verplaatst. Zo ontstaat er een trilling: figuur 2. De frequentie van deze trilling, de Brunt-Väsälä frequentie, wordt berekend met de formule:

$$BV\text{-}f = \sqrt{((9{,}8 * (D2-D1) / (1026 * (Z2-Z1))}$$

Waarbij Z1 en Z2 de dieptes zijn waarop het water een dichtheid heeft van respektievelijk D2 en D1. De zwaartekrachtversnelling is 9,8 $m.s^{-2}$, de gemiddelde dichtheid van Noordzeewater is 1026 $kg.m^{-3}$. Omdat in de praktijk boven- en onderlaag niet helemaal homogeen zijn wordt de frequentie in de gehele waterkolom berekend.
In figuur 3 staan de berekende Brunt-Väsälä frequenties voor week 36 (in 1991) van de waterkolom van TS135. De maximale frequentie wordt gevonden op 30 meter, de spronglaagdiepte.



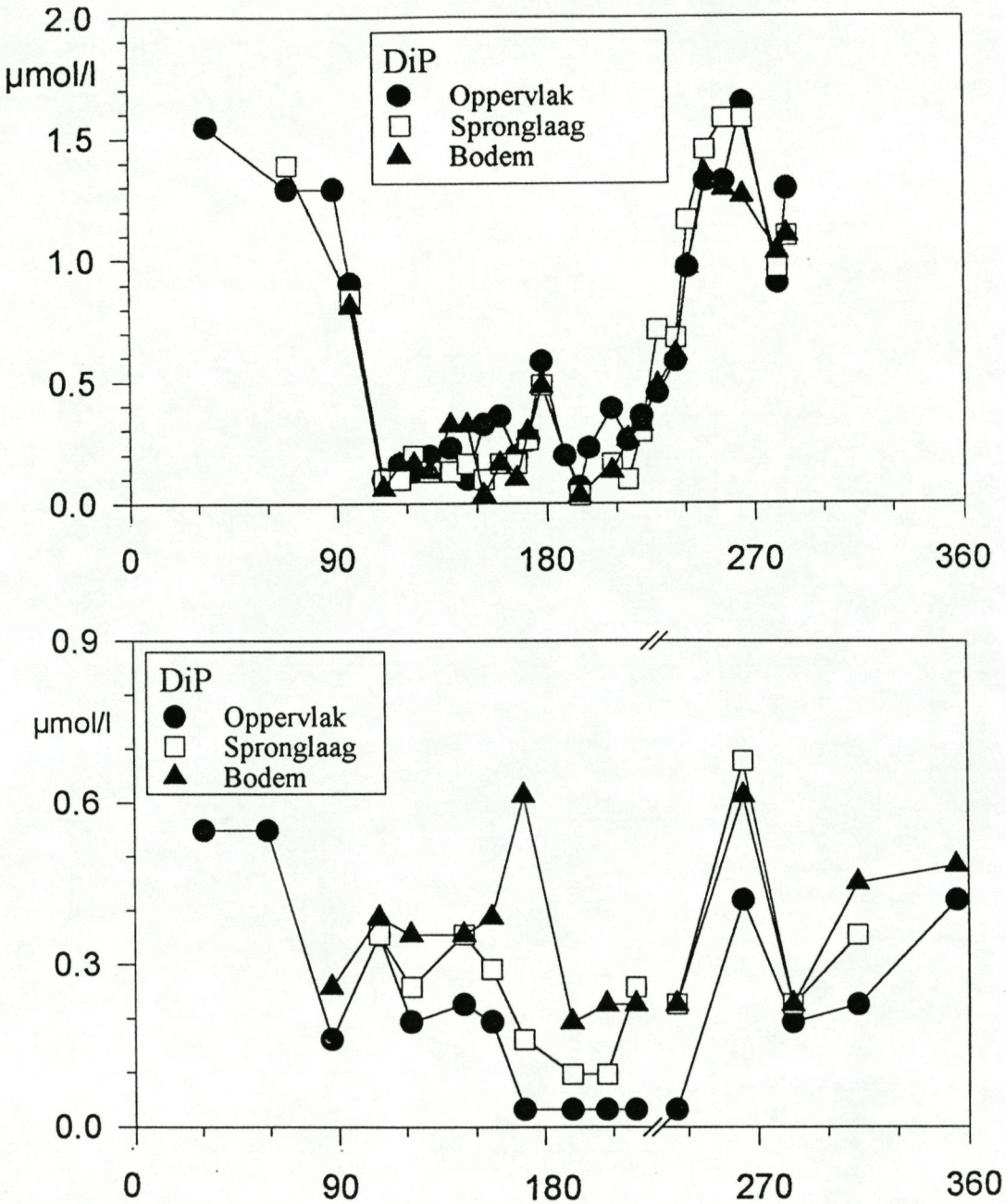
Figuur 7.5. Verloop van de concentratie Dissolved Inorganic Nitrogen (DIN in μM) op NW10 (boven) en TS135/145 (onder) in 1994.

De saliniteit op NW10 is variabel, en er zijn regelmatig verschillen tussen oppervlak en bodem. Dit uit zich in een variabele BV frequentie (zie Intermezzo 2) en een variabele spronglaagdiepte (Figuur 7.3 en 7.4). Op TS135 is de saliniteit vrij constant, hier vindt in de loop van het voorjaar en de zomer een langzame opbouw van een temperatuurverschil tussen oppervlak en bodem plaats. Hierdoor neemt de BV frequentie toe, evenals de spronglaagdiepte. In week 38 raakt de waterkolom weer gemengd.

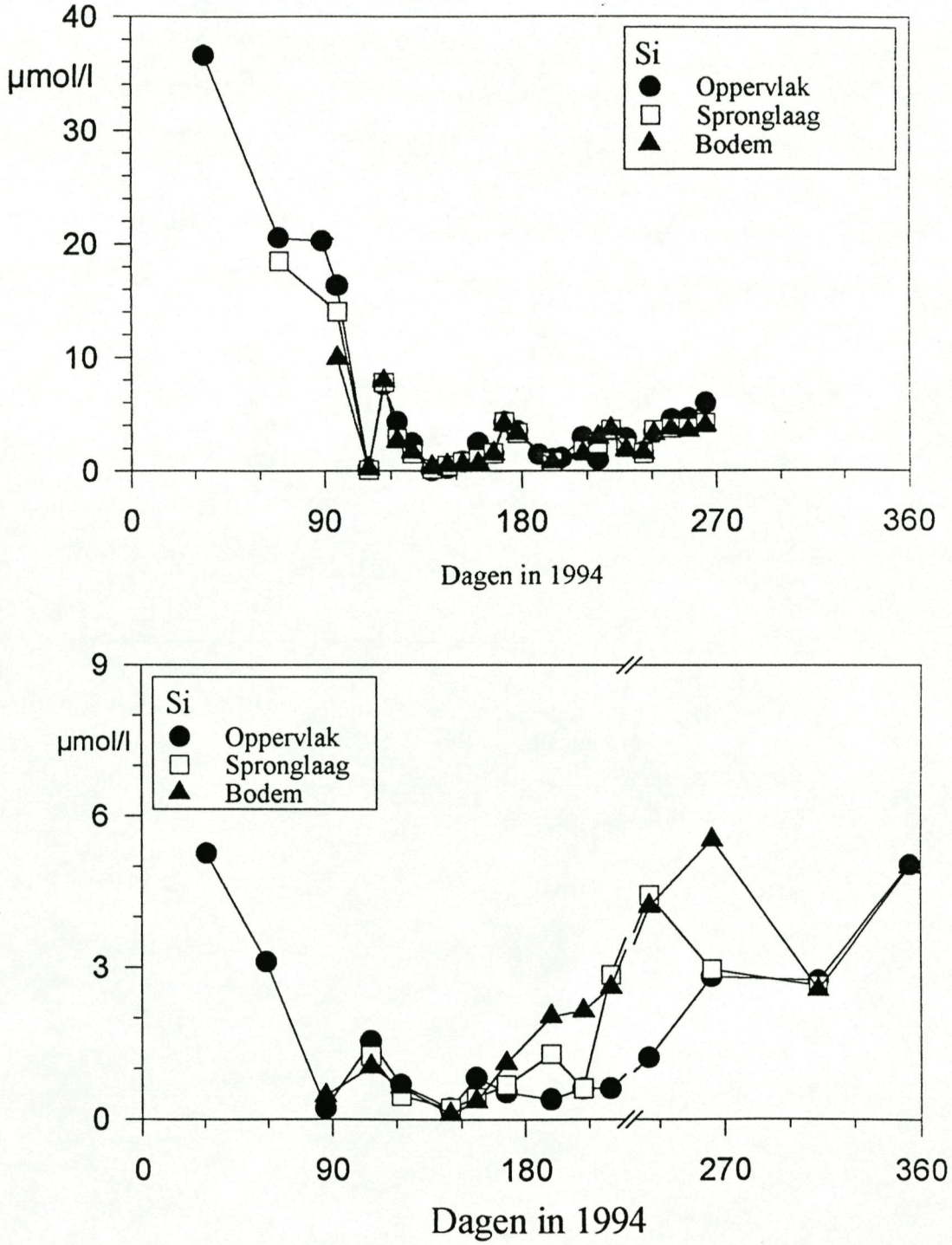
7.3. Chemische variabelen

De invloed van de Rijn op de saliniteit werd al duidelijk uit Figuur 7.1. Het zoete water heeft bovendien een veel hogere nutriëntenconcentratie dan het zoute zeewater. Deze nutriënten, Dissolved Inorganic Nitrogen (DIN = Σ (NO_3^- NO_2^- NH_4^+), Dissolved Inorganic Phosphorus (DIP) en silicaat (Si) worden door het RIKZ in Middelburg gemeten volgens standaard voorschriften. De monsters worden op zee ingevroren, en voor analyses weer ontdooid.

Het effect van het nutriëntenrijke Rijnwater op de nutriëntenconcentraties van NW10 blijkt uit alle figuren (Figuren 7.5, 7.6 en 7.7). Deze concentraties zijn, zeker buiten het fytoplankton groeiseizoen, een factor 3-10 hoger dan op TS135. Wel is het zo dat op beide punten in het groeiseizoen, in voorjaar en zomer, de nutriëntenconcentraties de detektielimiet halen. De mogelijkheid bestaat dan dat één of meerdere nutriënten op dat moment de fytoplanktongroei limiteert. Het valt buiten het bestek van dit rapport om hier verder op in te gaan. Wel zal in hoofdstuk 8 duidelijk worden dat de bloei van de giftige dinoflagellaat *Dinophysis acuminata* op NW10 plaats vond in een periode van lage nutriëntenconcentraties. Het voorkomen van dit soort plaagalgen wordt overigens al een bloei genoemd als een, in het algemeen lage, grenswaarde is overschreden (Peperzak 1994). Bij het voorkomen van PSP of ASP veroorzakende dinoflagellaten en diatomeeën, en van ichthyotoxische flagellaten als *Chrysochromulina* (zie Tabel 2.1, pag. 14) kan de verhouding DIN:DIP of DIN:Si van belang zijn. Een overmaat DIN kan dan namelijk leiden tot een toename in de produktie van toxinen (Peperzak 1994). Omdat er tot nu toe, dus ook in 1995, geen PSP of ASP is waargenomen zijn in dit hoofdstuk deze ratio's niet berekend.



Figuur 7.6. Verloop van de concentratie Dissolved Inorganic Phosphorus (DIP in μM) op NW10 (boven) en TS135/145 (onder) in 1994.



Figuur 7.7. Verloop van de concentratie opgelost silicium (Si in μM) op NW10 (boven) en TS135/145 (onder) in 1994.

7.4. Biologische variabelen

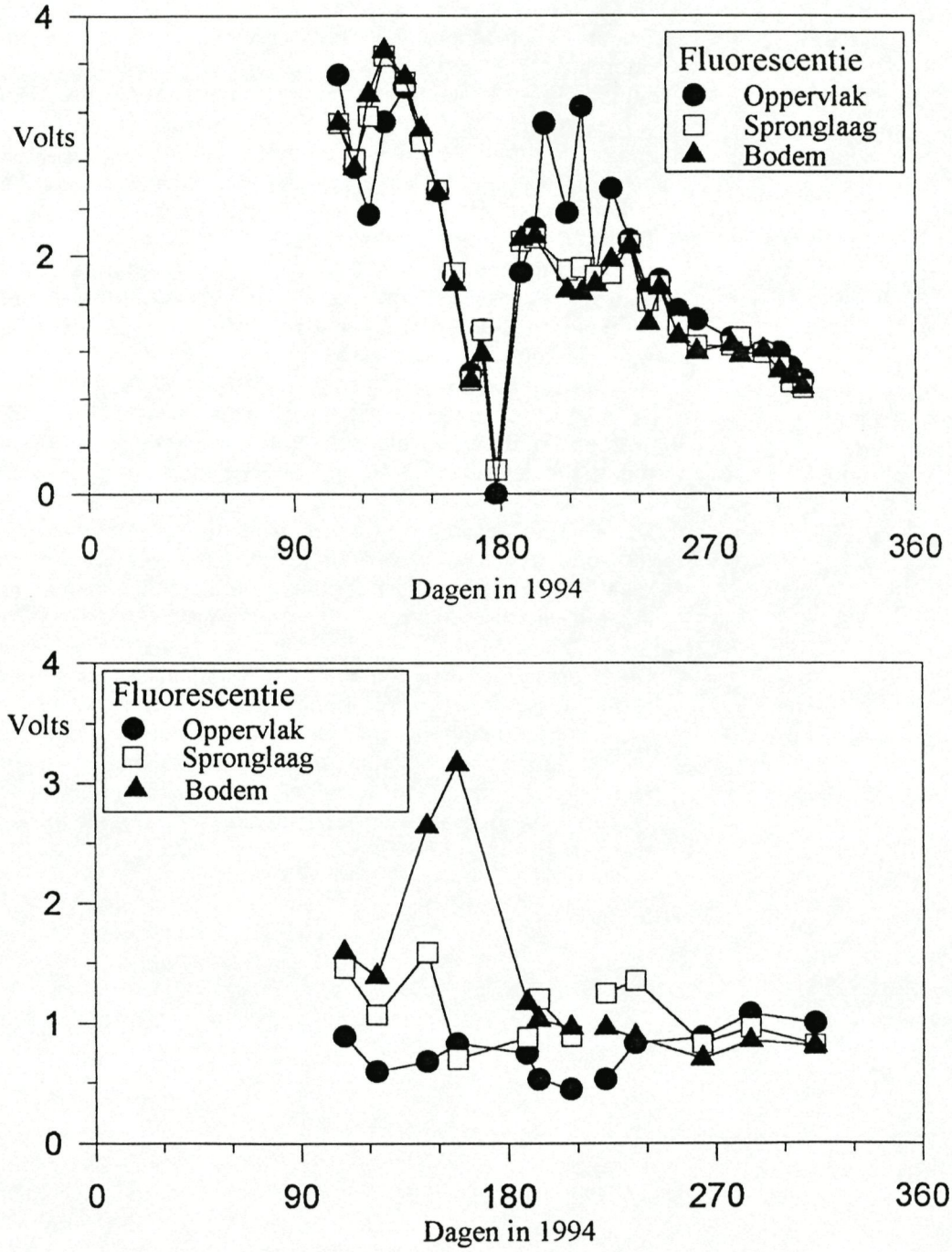
Onder biologische variabelen wordt hier alleen verstaan de in vivo fluorescentie, een maat voor de hoeveelheid chlorofyl in het fytoplankton, zoals deze is gemeten aan boord van de Holland.

Aan deze variabele kleven een aantal bezwaren. De relatie fluorescentie en chlorofyl-concentratie is niet éénduidig. De fluorescentie wordt daarom ook weergegeven in de afleeseenheid van de meetapparatuur (Volt). De in vivo fluorescentie kan afhankelijk zijn van de aanwezige fytoplanktonsoorten, en de licht- en nutriëntengeschiedenis van deze soorten. Verder is de meting aspecifiek, d.w.z. dat ook andere fytoplanktonpigmenten, en zelfs niet fytoplanktonpigmenten, de fluorescentie intensiteit verhogen.

Toch is dit de enige variabele waarmee snel een inzicht verkregen kan worden in de verdeling van het fytoplankton in de waterkolom. De meetgegevens van NW10 en TS135 zijn daarom uitgezet in Figuur 7.8.

Op NW10 vindt in het voorjaar een fytoplanktonbloei plaats (Figuur 7.8) die rond dag 180 is verdwenen. Daarna vindt weer een bloei plaats, waarbij opvalt dat de oppervlakte fluorescentie beduidend hoger is dan lager in de waterkolom.

De fluorescentiewaarden op TS135 zijn in het algemeen lager dan op NW10 (Figuur 7.8). In de bodemlaag komen in het voorjaar de hoogste fytoplanktongehalten, althans in vivo fluorescentiewaarden, voor. Dit hangt waarschijnlijk samen met het uitzakken van de diatomeeënbloei (zie § 7.1). Verder wordt duidelijk dat in de zomer de laagste waarden worden gemeten aan het oppervlak, en de hoogste in de spronglaag: zie hiervoor ook § 7.1.



Figuur 7.8. Verloop van de in vivo fluorescentie (aflezing in V) op NW10 (boven) en TS135/145 (onder) in 1994.

8 Extra metingen: *Dinophysis*-bloei Hollandse kust

8.1. Inleiding

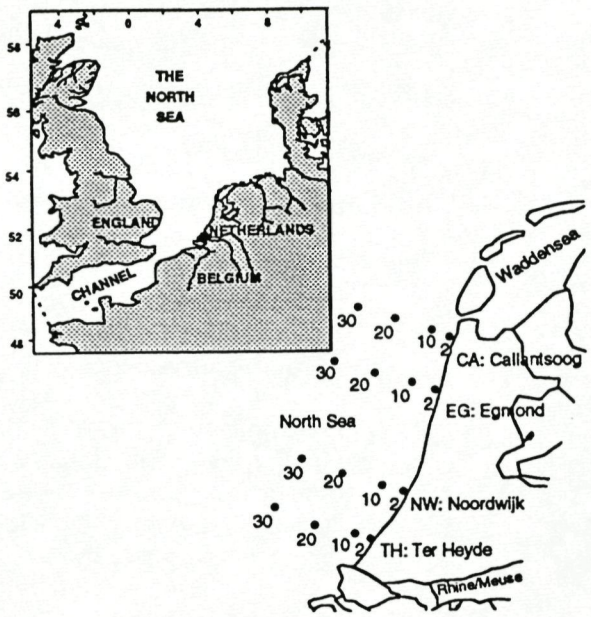
In het OTAB-projectplan was rekening gehouden met de mogelijkheid om extra monsters te nemen bij het optreden van bloeien op andere punten dan NW10 en TS135. Deze bloeien zouden bijvoorbeeld gevonden kunnen worden in meetprogramma's van de directie Noordzee, zoals van het project "TOXALG", of in de zogenaamde "airborne surveillance".

De zomer van 1994 kenmerkte zich door een lange periode van windarm en zonnig weer in geheel west Europa. Gevallen van DSP deden zich voor in Zweden, Denemarken, Frankrijk en Portugal. In Nederland kwamen eind juli (week 30) 15-20 DSP gevallen voor door het eten van wilde mosselen uit de Grevelingen. In week 31 (augustus) meldde M. Rademakers van bureau TRIPOS dat er in TOXALG-monsters van directie Noordzee 100-200 *Dinophysis acuminata* cellen per liter voorkwamen, en in NW2 en NW10 monsters respectievelijk 700 en 600 cellen per liter. In week 33 was het aantal *D. acuminata*-cellen op NW10 toegenomen tot ca. 10.000 per liter (gegevens TRIPOS en RIKZ). Deze gegevens werden via de "algenfax" verspreid om alle instituten te waarschuwen. Dr. G.C. Cadée van het NIOZ leverde daarop *Dinophysis spp.* gegevens uit het Marsdiep. In overleg met de directie Noordzee werd besloten tot extra bemonsteringen in de kustzône.

Deze extra bemonsteringen hadden een tweeledig doel. In de eerste plaats kon informatie verzameld worden over de ruimtelijke verspreiding van *D. acuminata* in relatie met fysische on-line gegevens. Deze gegevens kunnen worden gebruikt naast die van NW10, die een beeld opleveren van de ontwikkeling in de tijd op één lokatie.
Ten tweede was het van belang de uitgestrektheid van de bloei te bepalen vanwege de bedreiging van de mosselkweekgebieden in de Waddenzee. De reststroom in het Hollandse kustgebied is namelijk noordoost, van NW10 in de richting van Texel/Terschelling. De extra bemonsteringen zijn een aantal weken uitgevoerd om de mogelijke verplaatsing van de bloei in kaart te kunnen brengen. De resultaten worden gepresenteerd op het 7e toxische algencongres in Sendai (Japan, 1995).

8.2. Methoden

De monsterlocaties staan vermeld in Figuur 8.1. (TS10: zie Figuur 2.1.). Monsters werden genomen in de weken 34, 35 (alleen TH10, NW10, EG10 en CA10), 36 (TH10, NW10, EG10, CA10 en TS10, niet alleen oppervlak maar ook spronglaag en bodem+3 meter) en week 37. Fixatie vond plaats met formaline.

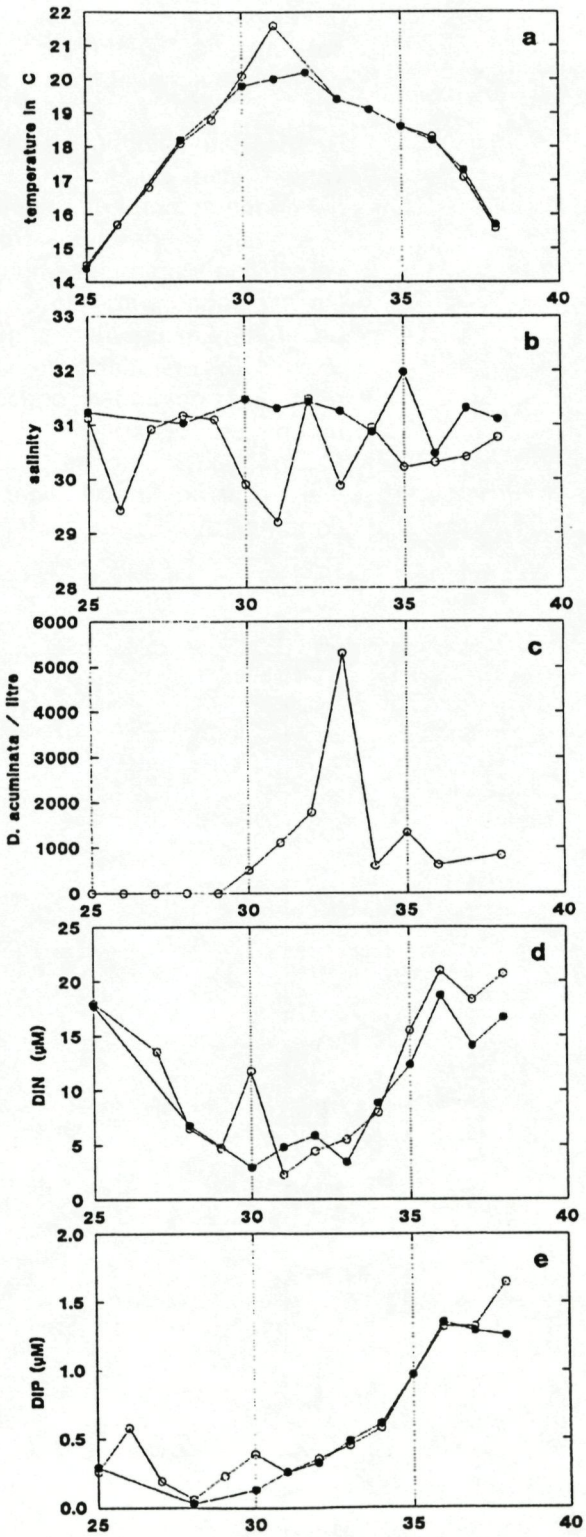


Figuur 8.1. Monsterlokaties Hollandse kust t.b.v. de extra *Dinophysis*-bemonsteringen.

Omdat in eerdere monsters een kleinere *D. acuminata*-vorm was waargenomen, zijn na telling de monsters bewaard om t.z.t. de lengte- en breedte-ontwikkeling van de cellen te meten. Tevens kan dan het aantal dode *Dinophysis* cellen, lege cellen of losse "schaaltjes", geteld worden. Deze informatie kan inzicht geven in de toename van de sterfte tijdens de ontwikkeling van een *Dinophysis* bloei.

8.3. Resultaten

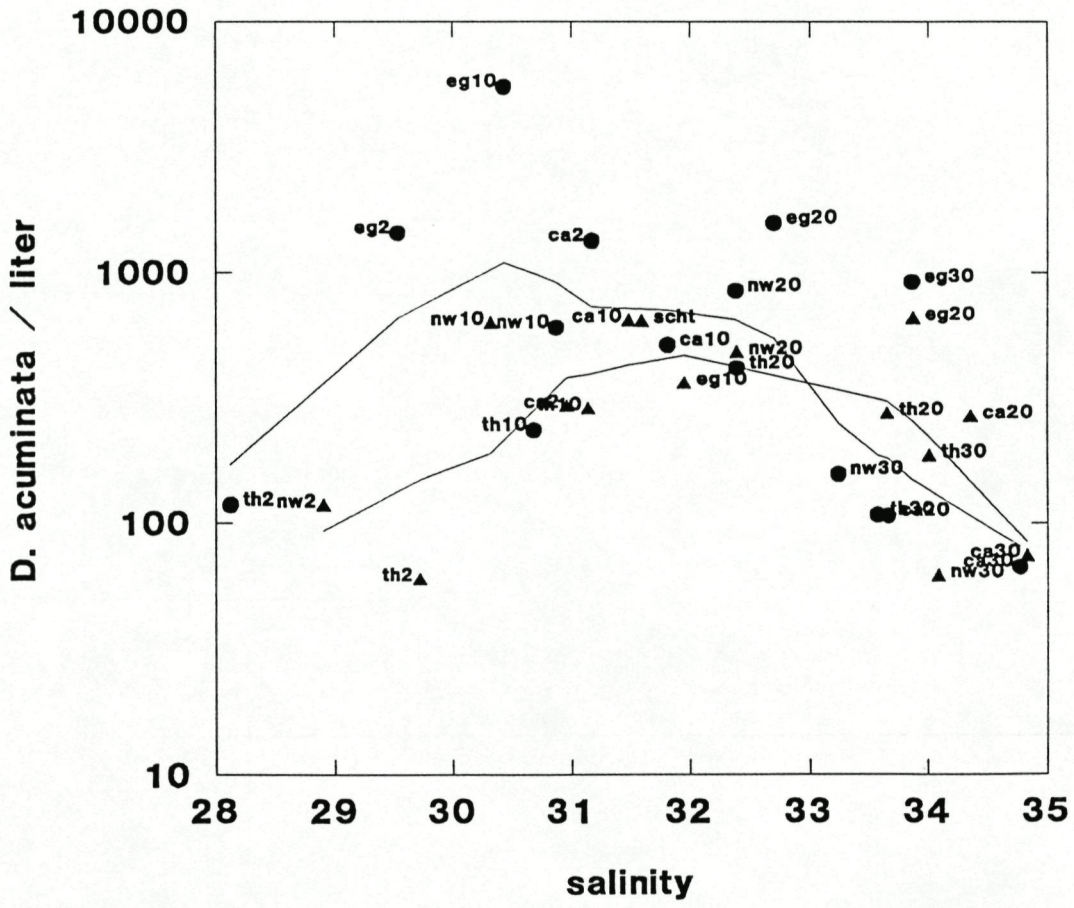
Vóór week 30 nam de temperatuur van het zeewater op NW10 met ca. 1°C per week toe (Figuur 8.2.a). De nutriëntenconcentraties waren laag (figuur 8.2. d+e) en de stratikatie was minimaal: in de weken 27-29 was er weinig tot geen verschil in saliniteit tussen oppervlak en bodem (Figuur 8.2.b). In week 30 veroorzaakte een daling in de saliniteit en een gelijktijdige stijging van de oppervlaktetemperatuur t.o.v. de bodem, voor een sterke stratifikatie (zie ook § 7.2). In week 31 werd de oppervlaktetemperatuur 21,5°C, dat is 3°C boven het normale jaarmaximum.
In week 30 begon *Dinophysis acuminata* te bloeien. In week 33 werden de hoogste celconcentraties op NW10 (5000/liter) gemeten. Meer naar het noorden, op EG10 werd de hoogste concentratie (ook 5000/liter) in week later gevonden. Verder naar het noorden, in het Marsdiep werd de hoogste concentratie gemeten in week 32: 600/liter (Cadée, pers.



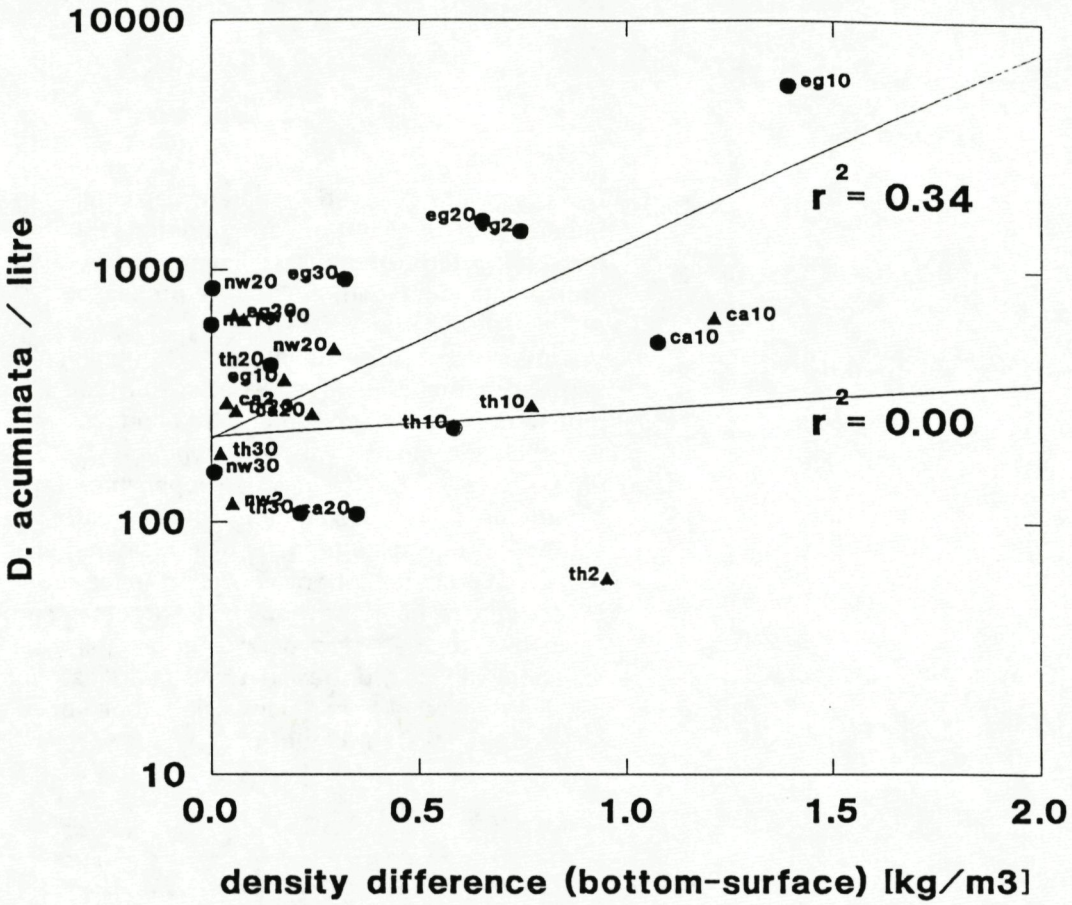
Figuur 8.2. Verloop van de temperatuur (a), saliniteit (b), *D. acuminata* concentratie (c), DIN (d) en DIP (e), op NW10, zomer 1994.

med.). Ook in de westelijke Waddenzee werden verhoogde *Dinophysis*-concentraties gemeten, waardoor uit voorzorg de mosselvisserij gedurende een week werd stilgelegd (Dijkema, ongepubliceerd).

De hoogste *Dinophysis*-concentraties werden gemeten bij een grote variatie aan saliniteiten, tussen 29 en 34 (Figuur 8.3). Gemiddeld bevonden er zich in de oppervlaktemonsters 2 maal zoveel *D. acuminata* cellen als in de monsters van halve diepte of bodem, maar deze verschillen waren niet signifikant (Mann Whitney U-test, $P > 0,05$).
Op het hoogtepunt van de bloei (week 34) werd een significante ($P < 0,05$) log-lineaire relatie gevonden tussen celaantallen en stratificatie (Figuur 8.4). Tijdens de afname van de bloei (week 36) werd deze relatie niet gevonden, ongeacht een toename in stratificatie (Figuur 8.2. b) en een toename in de nutriëntenconcentraties (Figuur 8.2. d+e). M.i.v week 33, op het hoogtepunt van de bloei op NW10 en daarna, werden er ook kleine *Dinophysis*-cellen gevonden. Dit vond plaats toen de temperatuur weer zakte onder de 20°C (Figuur 8.2.a).



Figuur 8.3. *Dinophysis acuminata* concentratie (cellen/liter) in de weken 34 en 36 (1994) in de Hollandse kustzône als functie van de saliniteit. Monsterpunten: zie Figuur 8.1



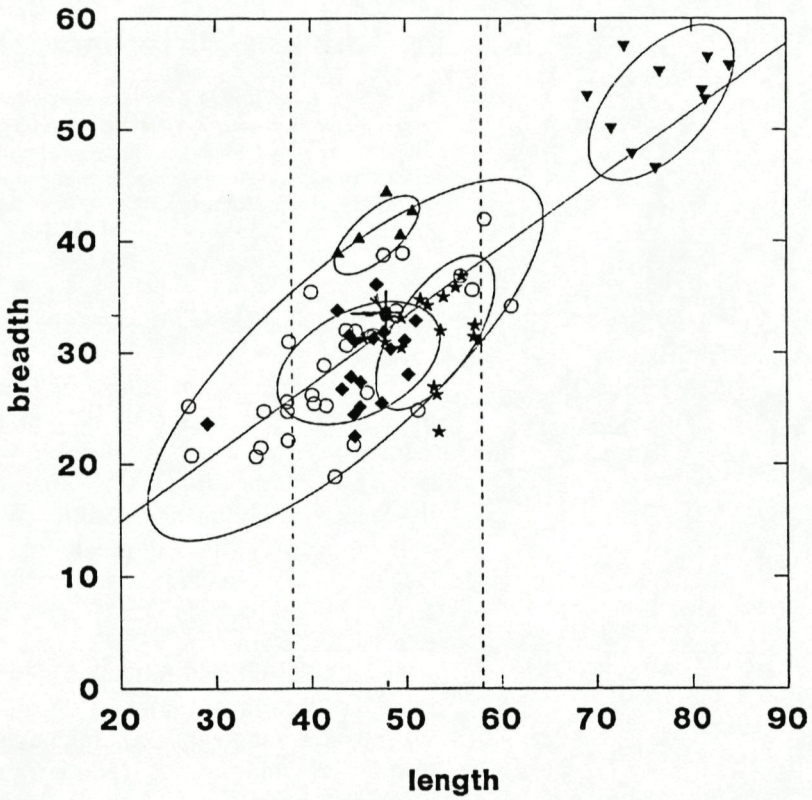
Figuur 8.4. *Dinophysis acuminata* concentratie (cellen/liter) in de weken 34 en 36 (1994) in de Hollandse kustzône als functie van de stratificatie, uitgedrukt als het verschil in dichtheid tussen bodem en oppervlak ($kg.m^{-3}$). Monsterpunten: zie Figuur 8.1. De lijnen zijn lineaire regressies van log celconcentratie op het dichtheidsverschil. In week 34 was de regressie signifikant ($r^2 = 0.34$, $P < 0,05$): d.w.z. dat de (log-) celconcentraties voor 34% verklaard kunnen worden uit het dichtheidsverschil.

8.4. Discussie

In het verleden zijn bij het onderzoek naar *D. acuminata* in de Noordzee de oppervlakte variabelen temperatuur en saliniteit benadrukt (zie voor referenties Peperzak *et al* 1995b). In dit OTAB-onderzoek wordt het belang van de stabiliteit van de waterkolom door zoutstratifikatie duidelijk. Een hoge stabiliteit, d.w.z. een lage turbulentie, is al langer bekend als een belangrijke factor in de groei van dinoflagellaten. Het Hollandse kustgebied wordt echter beschouwd als goed gemengd, turbulent, en i.t.t. de Oestergronden niet geschikt voor de bloei van dit soort fytoplankton. Zoals in hoofdstuk 7 al is gebleken, is zoutstratifikatie een regelmatig fenomeen op NW10. Indien er weinig wind is zal de turbulentie in de bovenlaag van de gestratificeerde waterkolom laag zijn. Gecombineerd met de juiste temperatuur, en hoge nutriëntenconcentraties (water met een lagere saliniteit heeft in het algemeen hogere concentraties dan het water in de onderlaag), leidt dit tot de voorwaarden voor een massale algenbloei. In de zomer van 1994 waren de nutriëntenconcentraties laag, evenals de *Dinophysis* concentraties. Deze kwalitatieve plaagalg hoeft echter geen hoge biomassa te bereiken om tot negatieve effecten te leiden (Peperzak 1994). De gemeten dichtheidsverschillen verklaren overigens de celconcentraties voor maar 34%. Dit houdt in dat ook andere faktoren een belangrijke rol spelen. Het is echter onduidelijk welke dit zijn.

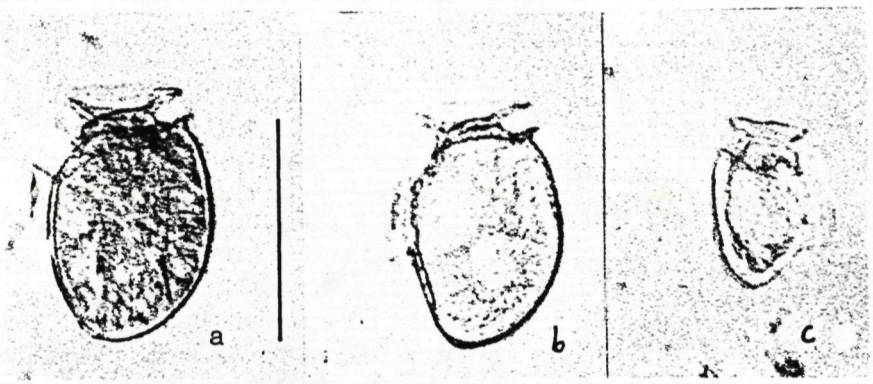
D. acuminata cellen variëren aanzienlijk in vorm en grootte (zie Peperzak *et al.* 1995b voor referenties). Twee mechanismen kunnen hier aan ten grondslag liggen: atrofiëring door verslechterende groeiomstandigheden, en sexuele processen.

In Figuur 8.5 zijn de resultaten weergegeven van de lengte en breedte van een aantal *Dinophysis*-soorten, en van *D. acuminata* in een aantal monsters van verschillende herkomst. *D. acuta* vormt een duidelijk verschillende cluster van *D. acuminata*. De waarden van *D. acuminata* uit Portugal en de Grevelingen lopen niet ver uiteen, en vallen redelijk binnen de literatuurwaarden. *D. acuminata* uit de Noordzee vertoont echter een duidelijke tendens naar kleinere cellen (Figuur 8.6). Dit wordt mogelijk veroorzaakt door verslechterende groei-omstandigheden.
D. acuminata heeft bovendien de grootste spreiding, en 'kleine' cellen lijken niet tot een afzonderlijke groep (bijv. gameten) te behoren. Een splitsing van celgroottes in twee periodes (t/m week 32, en na week 32), lijkt echter wel een aanwijzing voor het bestaan van twee groepen cellen op te leveren (Figuur 8.7).

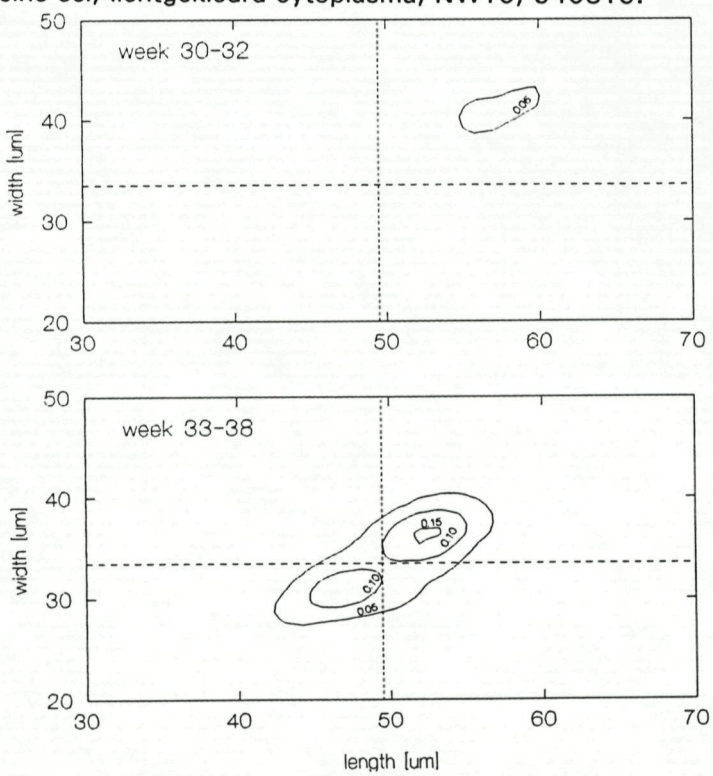


Figuur 8.5. Lengte (x-as) en breedte (y-as) in μm van verschillende *Dinophysis*-soorten van verschillende locaties. De vertikale stippellijnen geven de minimum- en maximum lengte aan voor *D. acuminata* uit de literatuur (Dodge, 1985). De ellipsen zijn een maat voor de spreiding.
○ *D. acuminata* Noordzee 940815 en 940824; ◆ *D. acuminata* Grevelingen 940808; x *D. acuminata* Aveiro-Portugal 940727; ▲ *D. rotundata* idem; ▼ *D. acuta* idem.

Uit Figuur 8.5 wordt verder duidelijk dat netbemonstering, bijvoorbeeld met 25 μm planktongaas, tot een onderschatting van de celconcentratie kan leiden. Stel dat een cel het net in de lengterichting nadert, de celbreedte is dan bepalend of de cel op het net blijft, of dóór het net gaat. De maximale maaswijdte van een 25 μm net = $\sqrt{(25^2+25^2)}$ = 35 μm. Cellen met een breedte kleiner dan 35 μm hebben dus een grote kans niet in het planktonmonster terecht te komen. In Figuur 8.5 gaat het om 80% van het totaal aantal *D. acuminata* cellen van 15 en 24 augustus 1995 uit de Noordzee.



Figuur 8.6. *Dinophysis acuminata*. Opnamen 400x, interferentiekontrast.
a. normale cel; NW10 940815,
b. iets kleinere cel, cytoplasma wat lichter; Grevelingen 940808,
c. kleine cel, lichtgekleurd cytoplasma; NW10, 940815.



Figuur 8.7. Lengte en breedte van *D. acuminata* gemeten in de weken 30 t/m 32 en 33 t/m 38 in monsters van NW10. De lijnen zijn niet-parametrische dichtheidscontouren

Aanwijzingen voor sexuele processen in *D. acuminata* bestaan uit waarnemingen van planozygoten (fusieprodukt van 2 gameten). Anisogame gameten, gameten van ongelijke grootte, zijn beschreven voor *D. tripos* en *D. acuta*. Het is daarom niet onwaarschijnlijk dat anisogame gameten ook bij *D. acuminata* voorkomen. Echter, bij de vorming van anisogame gameten zouden 2 duidelijk verschillende grootteklassen verwacht worden, en dat schijnt niet het geval (Figuur 8.7). Het bleker worden van de *D. acuminata* cellen lijkt er ook op te wijzen dat verslechterende groeiomstandigheden, bijvoorbeeld de daling in temperatuur en het ontbreken van stratificatie, een rol speelden. De cellen kunnen dan stoppen met groeien, en gaan langzaam te gronde. Dit proces wordt bijvoorbeeld ook waargenomen in batch kultures van fytoplankton waarin de nutriënten verbruikt zijn.

Een interessante waarneming vormt de paring van 2 *Dinophysis rotundata* cellen: Figuur 8.8. Deze cellen zijn gelijk van vorm maar ongelijk van grootte en zouden dus, indien hier inderdaad sprake is van een sexueel proces, anisogame gameten kunnen zijn. Beide cellen zien er gezond uit, d.w.z. er is geen sprake van een zekere atrofiëring zoals bij *D. acuminata* (Figuur 8.6). *D. rotundata* is heterotroof, heeft dus geen chlorofyl en voor wat dat betreft is er geen vergelijking met *D. acuminata* mogelijk. Het produkt van de fusie van twee gameten, de planozygote, dit zou een *D. rotundata*-achtige cel met 2 flagellen op de rug ('trailing flagellae') moeten zijn, is noch hier waargenomen, noch in de literatuur beschreven.

Figuur 8.8. Paarvorming (sexuele fusie) bij *Dinophysis rotundata*. Foto: Reinoud Koeman (Haren).

9 Conclusies en aanbevelingen

M.b.t. de monstername en de monsterverwerking:

Het nemen van watermonsters met een Niskinfles introduceert een relatief kleine fout van ca. 10% in de concentratie van een grote, in lage hoeveelheden aanwezige fytoplanktonsoort. Het subsampelen uit een Niskinfles lijkt overbodig.

Het aantal cellen per liter van een fytoplanktonsoort is pas dan betrouwbaar te meten als de concentratie 10x of meer de ondergrens van de telmethode (in praktijk ca. 100 cellen/liter) bedraagt. Bij lagere concentraties, en indien er minder dan 200 cellen mikroskopisch geteld worden, dient de telling minstens in duplo te gebeuren.

Bij de monstername uit zee hebben zowel de Niskinfles als het planktonnet als nadeel dat partikulair materiaal, detritus/slib of ander plankton, het mikroskoopbeeld "vervuilen" en de tellingen bemoeilijken. De netmethode heeft als voordeel dat een lagere detektielimiet **in theorie** mogelijk is (1 cel/60 liter vs. 1 cel/liter **in theorie**). Er zal dan wel onomstotelijk moeten worden vastgesteld of de te tellen alg niet door de mazen van het net kan glippen. In de praktijk blijkt dit met een net van 25 μm maaswijdte, zelfs voor relatief grote fytoplanktonsoorten het geval te zijn.

Om de planktonmonsters te fixeren wordt bij voorkeur gebruik gemaakt van methanal (formaldehyde). Dit geldt m.n. indien er immunochemische labelling moet worden toegepast. In de OTAB interkalibratie kon geen signifikant verschil in celconcentraties gevonden worden, in monsters gefixeerd met Lugol of methanal. Wel werden in de Lugol-monsters gemiddeld lagere celconcentraties geconstateerd. Voorgesteld wordt om dit experiment met kultures van verschillende fytoplanktonsoorten te herhalen.

Op NW10 werden slechts twee soorten toxisch fytoplankton regelmatig waargenomen: *Dinophysis acuminata* en *D. rotundata*. Op TS135 kwam naast *D. acuminata en D. rotundata*, ook *D. norvegica* en *Gyrodinium aureolum* voor. Op beide locaties kwamen zeer regelmatig *Pseudonitzschia spp.* voor. M.b.v. de immunochemische techniek kon worden aangetoond dat het hierbij niet ging om de potentieël toxische *P. pungens f. multiseries*.

Vergelijking van de fysische, chemische en biologische variabelen op beide monsterlocaties bracht een aantal verrassende overeenkomsten aan het licht. Zo zijn de oppervlaktetemperaturen niet veel van elkaar verschillend. Onverwacht blijkt ook NW10 een groot gedeelte van het jaar gestratificeerd te zijn.
Saliniteit, en daarmee de concentraties opgeloste nutriënten, zijn duidelijk verschillend tussen NW10 en TS135. Dit heeft ook zijn weerslag op de *in vivo* fluorescentie, een maat voor de chlorofyl *a*

concentratie, en daarmee voor de totale hoeveelheid fytoplankton. Op NW10, met zijn lagere saliniteit en hogere nutriëntenconcentraties, zijn de fytoplanktonconcentraties hoger. Dit staat echter los van bloeien van bepaalde toxische fytoplanktonsoorten, zoals *Dinophysis acuminata*. Meteorologische en hydrologische (fysische) factoren lijken t.a.v. deze soort een grotere rol te spelen dan chemische factoren. De bloei van *D. acuminata* op NW10 kon m.b.v. wekelijkse monsternames redelijk goed in de tijd worden gevolgd. Dit zal waarschijnlijk ook gelden voor andere toxische soorten. Een uitzondering kan TS135 zijn, waar t.g.v. fysische verstoringen van de stratificatie snelle "chlorofyl"-bloeien zijn waargenomen. Het nog uit te brengen INP-mooring rapport moet uitwijzen of wekelijkse monsternames voor dit soort meetlocaties voldoende is.

M.b.t. de doelstellingen van het project wordt het volgende geconcludeerd:

1. Potentieël toxische algen zijn in lage concentraties te meten vóórdat een bloei optreedt. Van groot belang is hierbij dat de monsterfrequentie hoog genoeg is, d.w.z. minimaal 1x per week.
Het monsteren met een planktonnet verlaagt weliswaar de detektielimiet, maar het heeft ook tot gevolg dat er celverlies optreedt. Als fixatief is methanal (formaldehyde) te prefereren boven Lugol's jodiumoplossing.

2. De immunochemische labelling van toxische algen is een snelle methode voor de identificatie van toxisch fytoplankton. Er zijn echter geen immunolabels voor alle in de Noordzee voorkomende toxische soorten. Meer onderzoek is nodig om te komen tot een routinematig gebruik van deze labels in de monitoring.

3. Wekelijkse bemonsteringen van fytoplankton, en van chemische en fysische variabelen in de waterkolom, lijken voldoende om een eerste indruk te krijgen van die factoren die een rol spelen bij het begin van een potentieël toxische algenbloei. De *Dinophysis*-bloei voor de Hollandse kust bijvoorbeeld, kon gerelateerd worden aan de veranderingen in de watertemperatuur en de waterkolom-stratificatie.

Bovenstaande conclusies leiden er toe voor te stellen de monitoring van plaagalgen te concentreren op een aantal karakteristieke locaties in de Noordzee, de Waddenzee en de estuaria, om deze locaties met een hoge frequentie te bemonsteren, en om de monsterverwerking en rapportage te versnellen. Op het ogenblik (zomer 1995) duurt het 5 weken voor fysische on-line metingen zijn gerapporteerd door DNZ. De chemische variabelen (EXP.WKM) zijn pas na 8-12 weken beschikbaar, en de fytoplankton gegevens (EXP.BMN) na 8 maanden (RIKZ). Alleen in het geval dat er levende monsters (EXP.BMN) worden geanalyseerd, vindt de rapportage over (potentieël toxische) plaagalgen binnen 1 week plaats (TRIPOS-Aquasense). Ook het RIVO-DLO is in staat fytoplanktonmonsters zo snel te verwerken.
Snelle verwerking, én snelle rapportage van fysische, chemische en biologische gegevens bij een centrale instantie, bijvoorbeeld het RIKZ, moet er toe leiden dat risicovolle situaties direct onder de aandacht van

bijvoorbeeld de waterbeheerder gebracht kunnen worden.

Ten slotte. Naast de veldmetingen is er meer gericht onderzoek nodig naar de factoren die bepalen of een potentieël toxische alg ook daadwerkelijk toxinen produceert. Voor de beleidsgerichte modellering is o.a. meer autecologisch onderzoek gewenst.

10 Referenties

Peperzak, L. 1994. Plaagalgen in de Noordzee. Rapport DGW-93.053. Rijksinstituut voor Kust en Zee/RIKZ.

Peperzak, L., J.F. Lawrence en P. Hagel. 1995. *Mytilus edulis* as a biomonitor for the potentially toxic dinoflagellates *Alexandrium spp., Dinophysis spp.* and *Gyrodinium aureolum* in the central North Sea. In: Harmful Marine Algal Blooms. P. Lassus, G. Arzul, E. Erard, P. Gentien & C. Marcaillou (eds.) Lavoisier, Parijs: 809-814.

Peperzak, L., Snoeijer, G.J., Dijkema, R., Gieskes, W.W.C., Joordens, J., Peeters, J.C.H., Schol, C., Vrieling, E.G. en Zevenboom, W. Development of a *Dinophysis* bloom in the river Rhine plume (North Sea), submitted to the 7th International Conference on Toxic Phytoplankton, Sendai.

Peperzak, L., Verreussel, R., Zonneveld, K.A.F., Dijkema, R., en Zevenboom, W. Spatial and temporal distribution of flagellate cysts in the North Sea with emphasis on *Alexandrium spp.* and *Gymnodinium catenatum*, submitted to the 7th International Conference on Toxic Phytoplankton, Sendai.

Vrieling, E.G., W.W.C. Gieskes, T.W.M. Rademaker, G. Vriezekolk, L. Peperzak en M. Veenhuis. 1995. Flow cytometric identification of the ichthyotoxic dinoflagellate *Gyrodinium aureolum* in the central North Sea. In: Harmful Marine Algal Blooms. P. Lassus, G. Arzul, E. Erard, P. Gentien & C. Marcaillou (eds.) Lavoisier, Parijs: 743-748.

Bijlage 1. Methode bepaling fout mikroskooptelling

1. bepaal de saliniteit van gefiltreerd zeewater en verdun zonodig tot 33;
2. pipetteer 5 x 1,0 ml van een kultuur in telkamers;
3. tel per telkamer minimaal 200 cellen;
4. bereken de gemiddelde celconcentratie;
5. maak een verdunningsreeks in gefiltreerd zeewater m.b.v. maatkolven: concentraties 10^5, 10^4, 10^3, 10^2 en 10^1 cellen per liter;
6. behandel de verdunningen als veldmonsters, d.w.z. concentreer door sedimentatie tot 100-200 ml;
7. tel van ieder sediment 5 x 2 ml;
8. concentreer bij $< 10^2$ cellen/liter het sediment over een 10 μm planktongaasje en tel het gehele concentraat, bewaar het filtraat voor controle;
9. voor deze procedure uit met cellen van verschillende groottes:
   grotere cellen: *G. aureolum, A. tamarense*,
   middelgrote cellen: *Pseudonitzschia spp.*,
   kleinere cellen: *Chrysochromulina spp.*

Bijlage 2. Methode immunochemische detectie

1. concentreer 1 liter monster door sedimentatie tot ca. 100 ml;
2. neem van het sediment 5 ml;
3. zuig dit af op een Irgalan zwart, 2,5mm ϕ, 8 μm membraanfilter;
4. was 2x met PBS*;
5. block 5 minuten met 0,5% BSA in PBS;
6. breng 1:50 verdund (met PBS) primair antilichaam op, en wacht > 1 uur;
7. was 3x met PBS;
8. breng 1:250 verdund secundair antilichaam op (anti muis-FITC), en wacht > 30 minuten;
9. was 2x met PBS;
10. breng het filter op een objectglas;
11. breng 1 druppel 50% verdunde (met PBS) glycerol op het filter;
12. bedek de druppel met een dekglas;
13. kit het preparaat dicht met nagellak;
14. tel het preparaat m.b.v. een fluorecentiemikroskoop bij een vergroting van 100x (instellingen zie: Vrieling *et al.* 1995).

*PBS:

Los op in 1 liter water:

8,00 gram NaCl
0,20 ,, KCl
1,44 ,, $Na_2HPO_4.2H_2O$
0,23 ,, $NaH_2PO_4.2H_2O$
0,20 ,, NaN_3

Informatie BEON

Programma Bureau BEON
p/a Directoraat-Generaal Rijkswaterstaat
Rijksinstituut voor Kust en Zee
Kortenaerkade 1
Postbus 20907
2500 EX Den Haag
Tel.: 070-3114.259/257/258/260
Telefax: 070-3114321

e-mail: beon@rikz.rws.minvenw.nl