



Lifting the Veil. Impact of Contaminants on Coastal Phytoplankton
S.B. Sjollema

Kustwateren behoren tot de meest productieve ecosystemen op aarde. Microalgen, die juist in deze kustzones in grote dichtheden kunnen voorkomen, vormen de basis van de voedselketen in zee. Echter, veel van deze kustwateren zijn vervuild met een cocktail van verschillende gifstoffen. Deze stoffen spoelen af van het land en komen via de rivieren terecht in de kustzone. Ook de intensieve scheepvaart in de kustzone is een belangrijke bron van vervuiling, bijvoorbeeld door het gebruik van giftige aangroeiwerende scheepsverven. Al deze stoffen tezamen vormen een mogelijk gevaar voor de aanwezige microalgen. Wanneer er door effecten van deze gifstoffen verschuivingen optreden in de soortssamenstelling van de algengemeenschap (doordat gevoelige soorten eerder verdwijnen dan tolerante soorten) kan uiteindelijk de hele draagkracht van het ecosysteem worden aangetast. Echter, zowel de precieze samenstelling van dit complexe mengsel van gifstoffen als het effect hiervan op de microalgen in de kustzone is op dit moment nog niet bekend.

Het onderzoek dat beschreven is in dit proefschrift heeft daarom als doel om de stoffen die mogelijk een schadelijk effect hebben op microalgen (de zogenoemde fytotoxische stoffen) te identificeren, om vervolgens deze schadelijke effecten nader te kunnen bestuderen.

Dit onderzoek is uitgevoerd in de Nederlandse kustwateren en estuaria. Deze wateren zijn voor dit onderzoek uitermate geschikt door de relatief hoge mate van verontreiniging als gevolg van de geografische ligging aan de monding van een aantal Europese rivieren. Het doel is:

- I. Het ontwikkelen van een methode voor de identificatie van fytotoxische stoffen.
- II. Het bepalen van de schadelijkheid en risico's van deze geïdentificeerde stoffen onder zowel laboratorium als milieu-relevante omstandigheden voor individuele algensoorten en algengemeenschappen.
- III. Het onderzoeken of de huidige milieukwaliteitsnormen voor deze stoffen voldoende bescherming bieden voor mariene microalgen.

Fotosynthese, een belangrijke functie van microalgen, is gebruikt als meetlat voor de toxiciteit. Om effecten van gifstoffen op de fotosynthese efficiëntie te kunnen bepalen is een biologische test ontwikkeld waarbij gebruik gemaakt wordt van 'Pulse Amplitude Modulation' (PAM) fluorometrie. Deze test vraagt weinig tijd en er is slechts een heel klein monstervolume nodig om de test te kunnen uitvoeren. Hierdoor zijn we in staat om de schadelijke effecten van geconcentreerde watermonsters op de fotosynthese vast te stellen (**Hoofdstuk 2**).

De ontwikkelde PAM-test is vervolgens ingezet in een zogeheten "Effect-Directed Analysis"(EDA) om zo de belangrijkste toxische stoffen in de Nederlandse kustwateren en estuaria te identificeren (**Hoofdstuk 3**). Geconcentreerde watermonsters werden met behulp van speciale technieken opgedeeld in verschillende fracties, en de toxiciteit van die verschillende fracties werd bepaald met de PAM-test. Ter wille van de standaardisatie werden deze tests uitgevoerd met één enkele algensoort (*Dunaliella tertiolecta*). Alleen die fracties die een schadelijk effect hadden op de alg zijn vervolgens verder onderzocht (o.a. met behulp van massa spectrometrie) om te kijken welke gifstoffen in die fractie aanwezig waren. Met deze EDA studie hebben we aangetoond dat van de vele onbekende stoffen die versluierd aanwezig zijn in de Nederlandse wateren, de herbiciden atrazine, diuron, irgarol, isoproturon, terbutryn en terbutylazine de belangrijkste bijdragen leveren aan de waargenomen toxische effecten op *D. tertiolecta*.

Om meer inzicht te krijgen in de schadelijkheid en risico's van de gevonden herbiciden, hebben we de toxiciteit van een selectie van herbiciden (atrazine, diuron, irgarol, isoproturon) vastgesteld voor drie mariene microalgensoorten (*Thalassiosira pseudonana*, *Phaeodactylum tricorutum* en *D. tertiolecta*) (**Hoofdstuk 4**). Hieruit bleek dat niet alle herbiciden even giftig zijn. Ook is gebleken dat de verschillende algensoorten niet allemaal even gevoelig zijn. Doordat gevoelige soorten eerder verdwijnen dan tolerante soorten als die blootgesteld worden aan deze cocktail van stoffen, zouden er inderdaad veranderingen kunnen optreden in de soortensamenstelling van de fytoplanktongemeenschap. Verder is duidelijk geworden dat deze vier herbiciden samen een versterkend toxisch effect hebben op microalgen waardoor de risico's onderschat kunnen worden. Uit dezelfde studie is gebleken dat de geldende veiligheidsnorm, de maximaal aanvaardbare concentraties (MAC-EQS), voor diuron en isoproturon onvoldoende beschermend is voor microalgen. Hierdoor kan het voorkomen dat bij een concentratie die is toegestaan bij wet toch schadelijke effecten kunnen optreden.

De hierboven beschreven resultaten zijn allemaal gebaseerd op laboratoriumexperimenten. Echter, omgevingsfactoren in het veld kunnen interacteren met de algen of de stoffen waardoor er een multi-stress situatie voor de algen ontstaat. De huidige studie heeft laten zien dat de lichtintensiteit de toxiciteit van de herbiciden in het veld beïnvloedt (**Hoofdstuk 5**). Omdat de lichtintensiteit met de seizoenen wisselt hebben we de toxiciteit van een tweetal herbiciden (diuron en irgarol) gemeten onder lichtomstandigheden die de situatie in het voorjaar en in het najaar nabootsen. Hieruit bleek dat de toxiciteit van deze stoffen hoger is in het voorjaar dan in het najaar. Dit verschil geeft aan dat het bepalen van toxiciteit onder standaard lichtomstandigheden (zoals meestal gebeurt bij laboratoriumtesten) kan leiden tot een onder- of overschatting van de toxiciteit in het veld. Hierdoor ontstaat er een extra onzekerheid bij het vertalen van laboratoriumgegevens naar het veld.

Tot slot is het effect van één van de herbiciden (diuron) op een natuurlijke marine fytoplankton gemeenschap getest in een veld experiment (**Hoofdstuk 6**). Hiervoor werd de algengemeenschap gedurende drie dagen blootgesteld aan zowel de hoogst gemeten veldconcentratie als aan de maximaal aanvaardbare concentratie volgens de geldende milieukwaliteitsnorm. Met behulp van microscopie en flowcytometrie hebben we vervolgens gekeken of de blootstelling een effect had op de samenstelling van de algengemeenschap. Met de PAM-test hebben we ook de effecten op de fotosynthese efficiëntie van de algengemeenschap gemeten. De uitkomst van dit experiment laat (net als de laboratorium studie) zien dat de hoogste veldconcentratie van diuron geen direct effect heeft op de algen, maar de veilig geachte normconcentratie wel. Hieruit kan worden geconcludeerd dat de huidige Europese wetgeving marien fytoplankton niet voldoende beschermd tegen het risico van blootstelling aan diuron. Om voldoende bescherming te bieden zou deze kwaliteitsnorm daarom aangepast moeten worden.

De aanwezigheid van de grote hoeveelheid aan verschillende stoffen ligt als een 'sluier' van vervuiling over onze kustsystemen heen. Deze studie heeft deze sluier opgelicht door aan te tonen dat de belangrijkste bijdrage aan de toxische druk op microalgen wordt veroorzaakt door zes herbiciden (atrazine, diuron, irgarol, isoproturon, terbutylazine, terbutryn). Hoewel de concentraties van deze stoffen in het veld momenteel laag zijn in vergelijking met de vastgestelde toxiciteit voor fytoplankton, hebben concentraties in het verleden waarschijnlijk wel schadelijke effecten gehad. Dit suggereert dat de aanwezigheid van herbiciden mogelijk kan hebben bijgedragen aan eerder waargenomen veranderingen in de fytoplanktonsamenvatting. Tot nu werden dit soort veranderingen alleen toegeschreven aan veranderingen in de concentraties van nutriënten. En ondanks dat er geen directe schadelijke effecten meer te verwachten zijn van de individuele stoffen bij de huidige

concentraties, toont deze studie aan dat mengseltoxiciteit en multi-stress leidt tot een mate van onzekerheid in de risicoschatting van deze stoffen die in acht genomen moet worden bij het opstellen van milieukwaliteitsnormen. Tot slot hebben we met de gebruikte methoden laten zien dat een meer effect-gerichte aanpak, waarin ecotoxicologische en chemische monitoring van de kustwateren geïntegreerd is, de bescherming van de vitale functies van marine ecosystemen kan verbeteren.