

## Samenvatting

Er is toenemende bezorgdheid over de concentraties en de verschillende soorten contaminanten die aanwezig zijn in de Nederlandse kustwateren en estuaria en hun mogelijke effecten op pelagische microalgen, en daarmee op de primaire productie. De huidige regelgeving voor de bescherming van de Europese wateren is gebaseerd op de chemische analyse van een beperkte set contaminanten. In dit proefschrift zijn de belangrijkste contaminanten in de Nederlandse kustwateren en estuaria, die bijdragen aan de toxische druk op de efficiëntie van fotosysteem II ( $\Phi$ PSII) in microalgen, geïdentificeerd en is hun effect bevestigd. Om de mogelijke invloed van contaminanten op mariene microalgen te onderzoeken, is gebruik gemaakt van effectgerichte analyse (EDA). EDA is een procedure die technieken uit de analytische chemie combineert met bioassays om de belangrijkste bijdragen en mogelijke nieuwe stoffen die verantwoordelijk zijn voor de waargenomen effecten te identificeren. Als bioassay is Pulse Amplitude Modulation fluorometrie (PAM-assay) gebruikt, waarmee de toxiciteit op de  $\Phi$ PSII in microalgen is onderzocht. Daarnaast zijn de voor- en nadelen van passieve samplers en waterbemonstering om contaminanten uit brak en zout water te extraheren verkend. Ten slotte is het gebruik van metabolomics om de toxiciteit van contaminanten op de mariene algen te beoordelen geëvalueerd.

In hoofdstuk 2 zijn verschillende extractiemethoden geëvalueerd om contaminanten uit water te extraheren die een effect op de  $\Phi$ PSII van microalgen hebben. Om de voordelen van verschillende monsternamestrategieën te beoordelen en hun geschiktheid om remmers van de fotosysteem II activiteit op mariene microalgen te extraheren, werden vier gangbare extractiemethoden vergeleken: passieve bemonstering met siliconenrubber, polaire organische integratieve samplers (POCIS) en bemonstering van water met behulp van twee verschillende vastefase-extractie (SPE) cartridges. SPE is vooral geschikt voor kwantitatieve analyse, omdat de bemonsterde hoeveelheid water bekend is. De belangrijkste voordelen van een gezamenlijke toepassing van POCIS en siliconenrubber zijn de extractie van een breed scala aan contaminanten met verschillende polariteiten en de mogelijkheid om incidentele contaminanten te bemonsteren die gemist kunnen worden met actieve waterbemonstering. Voor passieve bemonstering is verder onderzoek vereist om concentraties van contaminanten te kunnen kwantificeren. Omdat het kwantitatieve aspect van minder groot belang was, is de combinatie van siliconenrubber en POCIS gebruikt voor de identificatie van contaminanten die invloed hebben op de  $\Phi$ PSII in microalgen (hoofdstuk 3).

Om de belangrijkste fotosyntheseremmers van pelagische microalgen in het water te identificeren, is een verbeterde EDA procedure ontwikkeld. Voor de fractionering van de extracten is gebruik gemaakt van een nieuwe aanpak, waarbij microfractionering in 96-well platen is gebruikt. Dit resulteerde in een veel groter aantal kleinere en daarom minder complexe fracties dan gebruikelijk in EDA studies. Hierdoor wordt de identificatie van biologisch actieve stoffen vereenvoudigd. Voor de identificatie is gebruik gemaakt van hoge resolutie Time of Flight (ToF) massaspectrometrie. Een andere innovatie is de toevoeging van een “keeper” in de 96-well platen om verdamping van stoffen tegen te gaan en de recovery te verhogen. Hoofdstuk 3 richt zich verder op de identificatie van contaminanten met behulp van accurate massa's en de analytische- en effectconfirmatie van de geïdentificeerde verbindingen. Zes herbiciden, namelijk atrazine, diuron, irgarol, isoproturon, terbutryn en terbutylazine, zijn geïdentificeerd en hun identiteit als de belangrijkste bijdragers aan het waargenomen effect op de  $\Phi$ PSII in microalgen is bevestigd. Behalve terbutylazine zijn alle andere herbiciden (atrazine, diuron, Irgarol, isoproturon en terbutryn) opgenomen in de lijst van prioritaire stoffen van de Europese Unie Kaderrichtlijn Water (KRW).

In hoofdstuk 4 zijn de resultaten beschreven van een metabolomics studie waarin de zoutwater microalg *D. tertiolecta* is blootgesteld aan diuron. Met behulp van complementaire analytische technieken zijn metaboliëten geïdentificeerd en de betrokken metabole routes in kaart gebracht. De resultaten van deze karakterisering van metaboliëten zijn gekoppeld aan de PAM-assay data en suggereren dat, naast het remmende effect op de  $\Phi$ PSII, het aminozuurmetabolisme en de citroenzuurcyclus in microalgen beïnvloed worden door blootstelling aan diuron. De toepassing van metabolomics voor de karakterisering van bekende en onbekende metaboliëten levert aanvullende informatie op over de vitaliteit van de algen ten opzichte van de PAM-assay. De toxische druk van de zes geïdentificeerde herbiciden, uitgedrukt in de effecten op de  $\Phi$ PSII in mariene microalgen, is onderzocht in hoofdstuk 5. Deze is in kaart gebracht met behulp van monitoringdata van concentraties van contaminanten in combinatie met de PAM-assay. In de periode 2003-2012 is de toxische druk op de  $\Phi$ PSII in microalgen met 55-82% gedaald. De hoogste toxische druk is waargenomen in de Westerschelde. Diuron en terbutylazine bleken de hoogste bijdrage te leveren aan de toxische druk op de  $\Phi$ PSII in microalgen. Effecten van herbiciden op de  $\Phi$ PSII in microalgen in de Nederlandse kustwateren en estuaria zijn niet direct te verwachten, maar het voorspelde effect komt in de buurt van het 10% effect niveau in de PAM-assay. Verder is de klassieke methode voor de controle van de waterkwaliteit, die gebaseerd is op het meten van concentraties van individuele stoffen, vergeleken met toxiciteitsdata van de PAM-assay. Hieruit bleek dat in de huidige wetgeving mariene microalgen

onvoldoende beschermd zijn. Deze informatie kan gebruikt worden in toekomstige monitoringprogramma's voor de beoordeling van de waterkwaliteit zodat rekening wordt gehouden met mengseleffecten en stoffen die niet zijn opgenomen in de reguliere monitoring. Geconcludeerd wordt dat EDA gebruikt kan worden in monitoringprogramma's om nieuwe verbindingen te identificeren als biologische effecten boven een bepaalde drempel komen en als effecten niet verklaard kunnen worden door kwantitatieve chemische analyse. Van de toepassing van metabolomics technieken voor de beoordeling van waterkwaliteit is momenteel nog geen sprake, omdat verder onderzoek nodig is naar de identificatie van biomarkers die gebruikt kunnen worden als indicator voor blootstelling van microalgen aan bepaalde (groepen) contaminanten. Terbutylazine moet worden beschouwd als een prioritaire stof en dient te worden opgenomen in monitoringprogramma's. Daarnaast moeten de huidige milieukwaliteitsnormen (EQS), zoals die zijn opgesteld door de Europese Commissie, voor de in deze studie geïdentificeerde herbiciden worden heroverwogen omdat ze mariene microalgen onvoldoende beschermen.