

Werkdocument

Ministerie van Verkeer en Waterstaat
Directoraat-Generaal Rijkswaterstaat
Rijksinstituut voor Kust en Zee / RIKZ

Aan
drs. N. Houtekamer
directie Zeeland

Van
Louis Peperzak
Datum
10 oktober 1997
Nummer
RIKZ/OS97.863X
Onderwerp
oestersterfte Grevelingen

Doorkiesnummer
0118 - 672 332
Bijlage(n)
-
Project
ADVIEST*IT

Sterfte van oesters en het voorkomen van een nieuwe plaagalg in het Grevelingenmeer in de jaren 1996 en 1997

Louis Peperzak
Albert Holland

RIKZ Middelburg
Postbus 8039
4330 EA Middelburg

Samenvatting

Na de koude winter van 1995-1996 vond sterfte plaats van Zeeuwse platte oesters in het Grevelingenmeer. Naar aanleiding daarvan werden er in de winter van 1997 watermonsters genomen om te onderzoeken welke factoren de conditie van de oesters kunnen verslechteren. Een slechte conditie maakt deze schelpdieren namelijk bevattelijk voor de dodelijke besmetting met *Hexamita* (putziekte). De sterfte zou ook te wijten kunnen zijn aan een algehele zuurstofloosheid van het water. Verder was er op een biomonitoringpunt van Rijkswaterstaat een onbekende, mogelijk schadelijke alg, waargenomen.

Er werden twee hypothesen getoetst: de sterfte houdt verband met:

1. zuurstofgebrek/zuurstofloosheid,
2. het voorkomen van een plaagalg.

Uit metingen op lokatie PG3 in de eveneens strenge winter van 1997 bleek dat de zuurstofconcentraties zowel aan het oppervlak als bij de bodem nooit lager waren dan 9 mg/liter. Bij watertemperaturen lager dan 0 °C was de zuurstofconcentratie altijd hoger dan 14 mg/liter. Ook bij twee andere oesterpercelen werden nooit lagere waarden dan 9 mg/liter gemeten. Het is daarom niet waarschijnlijk dat zuurstofgebrek of zuurstofloosheid optrad in de winter van 1995-1996. Daarom is er ook geen verband tussen de zuurstofconcentratie en de slechte oesterconditie in 1996.

Voor de tweede hypothese, het voorkomen van een plaagalg, zijn wel bewijzen gevonden. In 1997 werd op alle lokaties een onbekende soort alg van het geslacht *Chrysochromulina* waargenomen met een maximale concentratie van 1 miljoen cellen per liter op 27 februari. Verder bleek dat het deze alg was die in 1996 in een concentratie van maximaal acht miljoen cellen per liter in het Grevelingenmeer was voorgekomen. In het geslacht *Chrysochromulina* is een aantal soorten giftig voor vissen en bodemdieren. Directe sterfte van dieren treed op bij concentraties van 10 tot 100 miljoen cellen per liter. Het is daarom niet onaannemelijk dat het voorkomen van *Chrysochromulina* een negatief effect op de oesterconditie gehad heeft, met de uiteindelijk oestersterfte door *Hexamita* als gevolg.

Aanbevolen wordt om de monitoring in het Grevelingenmeer uit te breiden met een punt nabij één van de oesterpercelen (PG3). Verder is nader autecologisch en toxicologisch onderzoek nodig aan de gevonden *Chrysochromulina*-soort om toekomstige risico's in te schatten en om maatregelen te kunnen adviseren.

Inleiding.

aanleiding: oestersterfte

In 1996 vond in het Grevelingenmeer na een koude winter sterfte plaats van platte oesters. Door het RIVO werd als doodsoorzaak een besmetting met het ééncellige diertje *Hexamita sp.* vastgesteld. Deze besmetting vindt plaats als de oesters een slechte conditie hebben. Een bekende oorzaak is zuurstofgebrek zoals dat kan ontstaan als er teveel dieren in een oesterput liggen. Daarom wordt deze besmetting ook wel putziekte genoemd.

Volgens de oesterkwekers zouden de oesters in het Grevelingenmeer een slechte conditie hebben opgelopen door zuurstofgebrek tijdens de koude winter van 1996. Ook directe sterfte door het voorkomen van zuurstofarm water werd niet uitgesloten. Immers, het meer was bevroren waardoor zuurstofuitwisseling tussen water en lucht was onderbroken. Omdat de winter van 1996-1997 in december eveneens zeer koud was begonnen, werden maatregelen van Rijkswaterstaat directie Zeeland verlangd om zuurstofloosheid en uiteindelijk oestersterfte te voorkomen. Een mogelijkheid die door de oesterkwekers werd geopperd was het openzetten van de spuisluis in de Grevelingendam. Hierdoor zou een trek van west naar oost ontstaan en er zou meer zuurstofrijk Noordzeewater via de Brouwersdam het Grevelingenmeer binnenkomen.

een alternatieve hypothese

De door de oesterkwekers aangedragen hypothese klinkt in eerste instantie plausibel. Toch een aantal bedenkingen tegen in te brengen. In de eerste plaats is koud water meestal zuurstofrijk. Ten tweede hebben oesters bij lage temperaturen slechts zeer weinig zuurstof nodig. Een alternatieve hypothese werd gevonden in planktongegevens van het Rijksinstituut voor Kust en Zee/RIKZ. In een watermonster van lokatie Dreischor waren in maart 1996 maximaal ca. acht miljoen zogenaamde haptofyten waargenomen. Haptofyten zijn een groep van microscopisch kleine (1/100 millimeter) algen die, vanwege hun geringe grootte, vaak moeilijk zijn te determineren. In het Dreischormonster van 1996 was op dat moment nadere determinatie niet direct mogelijk. Wel is bekend dat een aantal schadelijke en zelfs zeer giftige soorten (plaagalgen) in deze groep thuis hoort. De hypothese voor de oestersterfte zou derhalve zijn: een verzwakking van de dieren door een plaagalg waarna besmetting met de *Hexamita* kon plaatsvinden.

onderzoek

Op voorstel van directie Zeeland is besloten om onderzoek te doen naar de oorzaak van de oestersterfte. Het toepassen van een beheersmaatregel, het openzetten van de spuisluis, die hydraulisch gezien weinig resultaat zou hebben werd vooralsnog achterwege gelaten. In dit werkdocument wordt verslag uitgebracht van het door het RIKZ uitgevoerde onderzoek.

Materiaal en Methodes

monsterlokaties en monsternamen

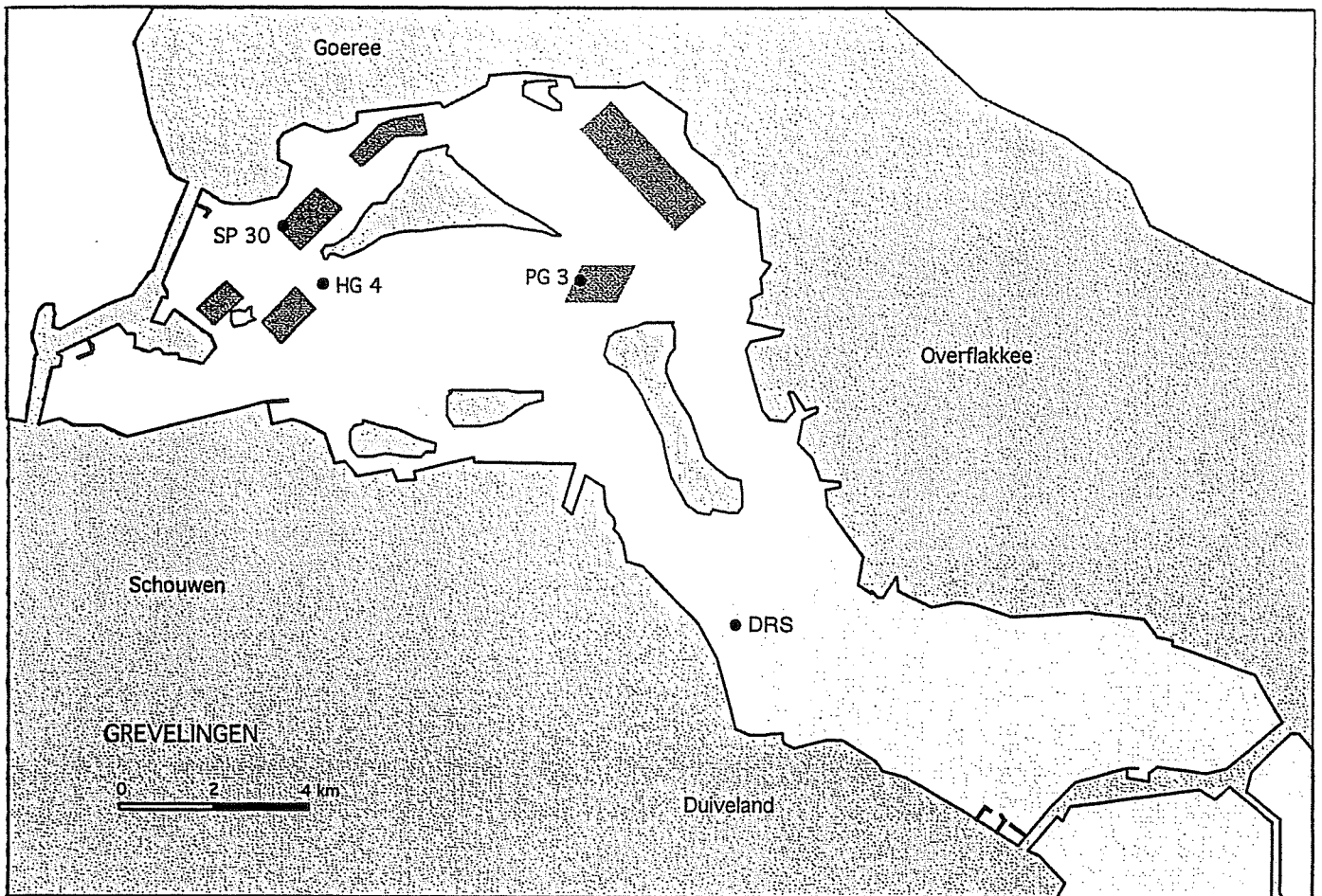
Monsternamen vond plaats op 4 lokaties in het Grevelingenmeer (Figuur 1). De karakteristieken van deze lokaties staan in Tabel I. Lokatie Dreischor is een routinemeetpunt van Rijkswaterstaat. De andere drie punten liggen aan de randen van oesterpercelen. De code van dit speciale project was ADVIES*IT.

lokatie	monsterdiepten		1/2 diepte	bodem
	diepte	oppervlak		
HG4	2.0	0.5	1.0	1.5
PG3	4.5	0.5	2.0	4.0
SP30	5.5	1.0	2.5	5.0
Dreischor	21.0	2.0	11.0	20.5

Tabel I. Monsterlokaties Grevelingenmeer 1997; waterkolom- en monsterdieptes in meters.

De eerste monsternamen vond plaats op 14 januari 1997 op PG3, alleen op halve diepte. Op 21 januari werd vanwege de dikte van het ijs m.b.v. een hovercraft bemonsterd. Vanaf deze datum werd wekelijks (op drie dieptes) vanaf schepen gemonsterd, tot 17 april 1997. Aan boord werden temperatuur, saliniteit en zuurstofconcentratie m.b.v. sensoren gemeten. Deze waarden zullen in de resultatenparagraaf worden gerapporteerd. Saliniteit en zuurstofconcentratie werden gecontroleerd met de chloride/saliniteit-titratie, resp. Winklertitratie van het RIKZ. Er bleken geen significante verschillen tussen de uitkomsten van beide methodes te bestaan.

Voor het verloop van de luchttemperatuur werd het driedaagse voortschrijdend gemiddelde berekend met gegevens van KNMI-station Vlissingen (KNMI).



Figuur 1. Grevelingenmeer met monsterlokaties Dreischor (DRS), PG3, HG4 en SP30. De laatste 3 lokaties liggen bij oesterpercelen (donkere vakken).

lichtenergie in de waterkolom

De hoeveelheid lichtenergie in de waterkolom van PG3 (in Watt-uur per m² per dag) werd berekend met instralingsgegevens van het KNMI station Vlissingen. De lichtverzwakkingscoëfficiënt K_d werd berekend m.b.v. saliniteit, zwevend stof- en chlorofyl a concentratie (Peperzak et al. 1997).

nutriënten

Opgeloste nutriënten, DIN (= nitraat + nitriet + ammonium), DIP (opgelost anorganisch fosfaat), Si (silicium) werden bepaald volgens standaard RWS voorschriften. Dit geldt ook voor de concentraties chlorofyl a, en de concentraties POC (particulair organisch koolstof) en DOC (opgelost organisch koolstof).

planktonmonsters

Zowel levende als gefixeerde planktonmonsters werden onderzocht. Er werden tellingen verricht en volumeschattingen (=biomassa) gedaan aan zowel fyto- als zooplankton. Uit levende monsters werd tevens getracht haptofyten te isoleren en op te kweken. Electronenmikroskopisch (EM-) onderzoek vond plaats in speciaal gefixeerde monsters.

Monsters voor fyto- en zooplanktontellingen (1 liter) werden gefixeerd met 4 ml Lugol. Monsterverwerking vond plaats door Tripos in Amsterdam; de toegepaste methoden zijn vermeld in Tripos (1997a). Alleen de monsters van PG3 (oppervlak en bodem) zijn geanalyseerd. Van een aantal veel voorkomende soorten zijn tevens de volumina d.m.v. mikroskopische metingen berekend. Aan de hand van deze volumina konden biomassa-schattingen (planktonkoolstof) worden gemaakt.

Ongefixeerde monsters werden door het RIKZ onderzocht m.b.v. een Zeiss omkeermikroskoop. Abundante fyto- en zooplanktonsoorten werden genoteerd. *Chrysochromulina* concentraties werden geschat door telling van het aantal (zwemmende) cellen in de waterkolom van het telkuvet. Monsters van 20 februari (dag 51) t/m 18 maart (dag 77) werden gefixeerd met 1% (eindconcentratie) glutaaraldehyde voor elektronenmikroskopisch (EM-) onderzoek.

Het EM-onderzoek vond plaats in monsters van alle 4 lokaties, alsmede een Dreischor monster van 27 maart 1996. Van de 1997-monsters werden alleen die van 27 februari (dag 58, oppervlak) verwerkt. De gebruikte methoden staan vermeld in Tripos (1997b).

Op dag 64 (5 maart) werden aan boord van meetschip Argus watermonsters genomen met de puts en met het blote oog beoordeeld op voorkomen van fyto- en zooplankton. Dit werd gedaan op 12 routinemeetpunten van directie Zeeland van de Grevelingendam tot de Brouwersdam (GTSO 1-5, 7-9, 11, 13 (≈ Dreischor), 15 en 16) en op de 4 meetpunten van Figuur 1. Op deze laatste meetpunten werd tevens met een bodemhapper sediment bemonsterd om te onderzoeken wat de toestand van de bodem was.

isolatie Chrysochromulina

Een techniek om een algensoort te isoleren en op te kweken bestaat er uit om het monster zodanig te verdunnen met kweekmedium dat er slechts één cel in een reageerbuis overblijft. Veldmonsters van 20 februari (dag 51) en 27 februari (dag 57) met *Chrysochromulina spec.* werden op dag 58 gefiltreerd door 20 µm planktongaas om grote planktoncellen te verwijderen. Gefiltreerd monster werd stapsgewijs doorverdund met kweekmedium PEP-Si. Het medium werd gemaakt met steriel Oosterscheldewater (saliniteit = 32,1 psu) van januari 1997 en was verrijkt met 40 µmol/liter NO₃, 6 µmol/liter PO₄, 1 ml sporemetalen en 1 ml vitaminen.

De verdunningen vonden plaats in buisjes met 5 ml medium, zodanig dat het (berekende) aantal cellen in de laatste buis ca. 1 was. De buisjes werden geïnkubeerd bij 262 W h m⁻² dag⁻¹, 12:12 licht:donker cyclus, en een temperatuur van 15° C. Op dag 65 werd de temperatuur verlaagd naar 10° C. In een tweede incubator werden in PEP-Si verdunde monsters bij 15°C en ca. 100 W h m⁻² dag⁻¹ geïnkubeerd. Controles op groei vonden plaats m.b.v. een Olympus microscoop met fase-contrast.

Nadat groei was geconstateerd, en er geen andere soorten waren waargenomen, werden diverse experimenten ingezet om o.a. heterotrofie en lichtgevoeligheid te bepalen.

organisatie

Monsternames vonden plaats door de meetdienst van directie Zeeland en door schepen van Staatsbosbeheer, na overleg met het RIKZ (afdeling ABD). Chemische analyses werden verricht door de afdeling IT van het RIKZ (project ADVIES*IT). De eerste planktonanalyses vonden plaats bij het RIKZ (project MONISNEL). Fyto- en zooplanktonanalyses in de Lugol-monsters werden gedaan door bureau Tripos (uitbesteding door dir. Zeeland). EM-analyses vonden eveneens plaats door Tripos, in overleg met het RIKZ (uitbesteding dir. Zeeland). Aanvullende volumemetingen aan plankton werden ook door Tripos uitgevoerd (uitbesteding RIKZ).

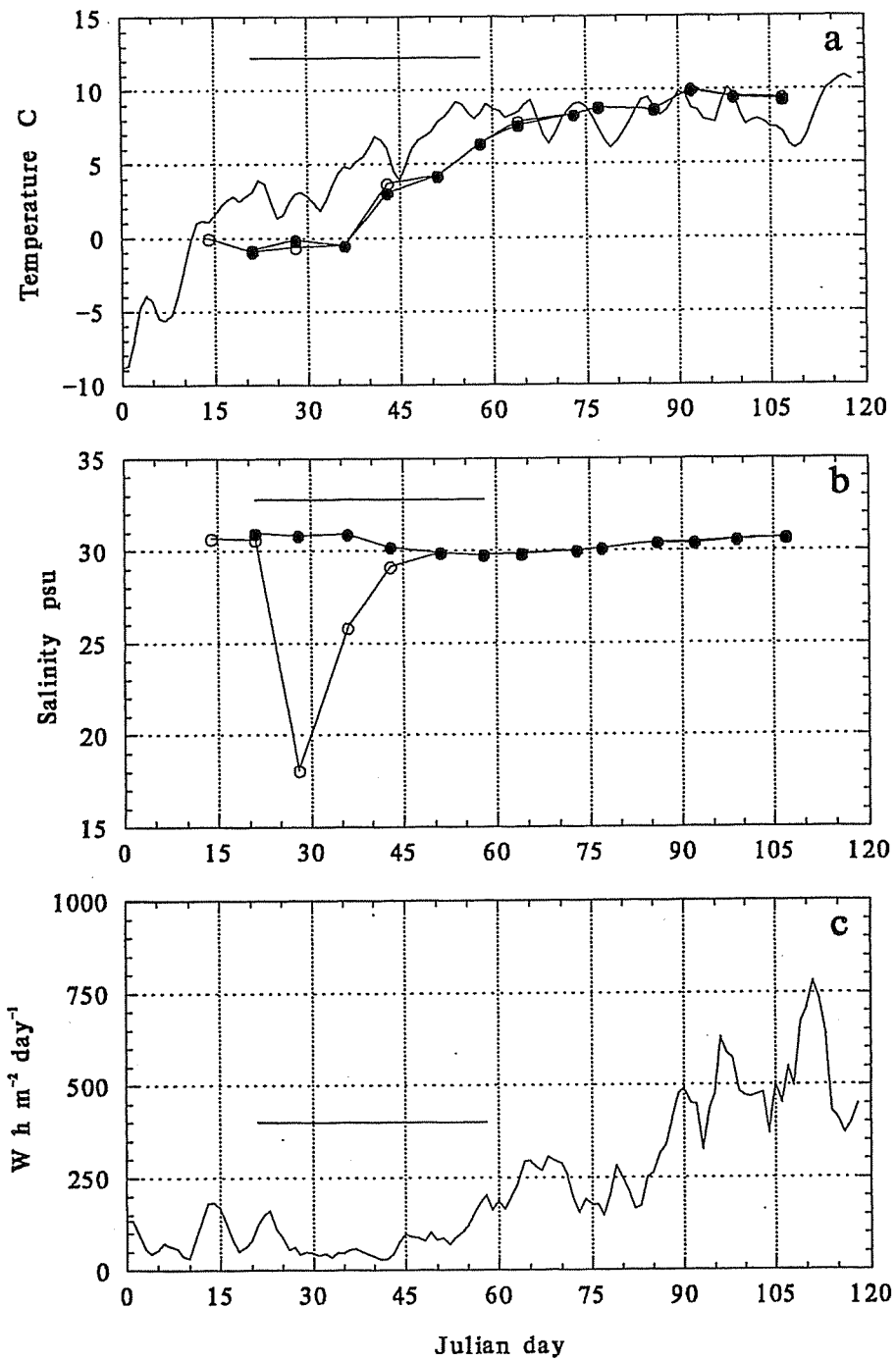
Resultaten

De resultaten van lokatie PG3 (Figuur 1) zullen in detail worden besproken. Van dit punt zijn uitgebreide planktonanalyses gedaan. De resultaten van de andere lokaties zullen worden behandeld bij de paragraaf over onderlinge verschillen tussen de monsterpunten en de monsterdieptes.

temperatuur, saliniteit en licht

In Figuur 2a is te zien dat na de jaarwisseling de luchttemperatuur nog bijna 2 weken onder de 0°C bleef. Op 4 januari werd de 15e elfstedentocht verreden. In deze periode koelde het water van het Grevelingenmeer verder af en werd het met ijs bedekt (de exacte periode van ijsbedekking is bij het RIKZ niet bekend). Het eerste monster werd genomen op 14 januari 1997. Het meer was op dat moment slechts bedekt met een dunne laag ijs. Op 21 januari was het ijs zo dik dat voor de monstername een hovercraft moest worden ingezet. Dit monster werd genomen op halve diepte, maar het zal als een oppervlaktemonster worden weergegeven in de navolgende figuren. Op 27 januari en op 5 februari was PG3 de enige lokatie die met een schip bereikbaar was. Op 5 februari (dag 36) meldde de meetleider nog dat door de harde wind van de voorgaande dag het ijs op de meetpunten zo dik was dat de zuurstof- en de pH-sensoren niet meer konden functioneren.

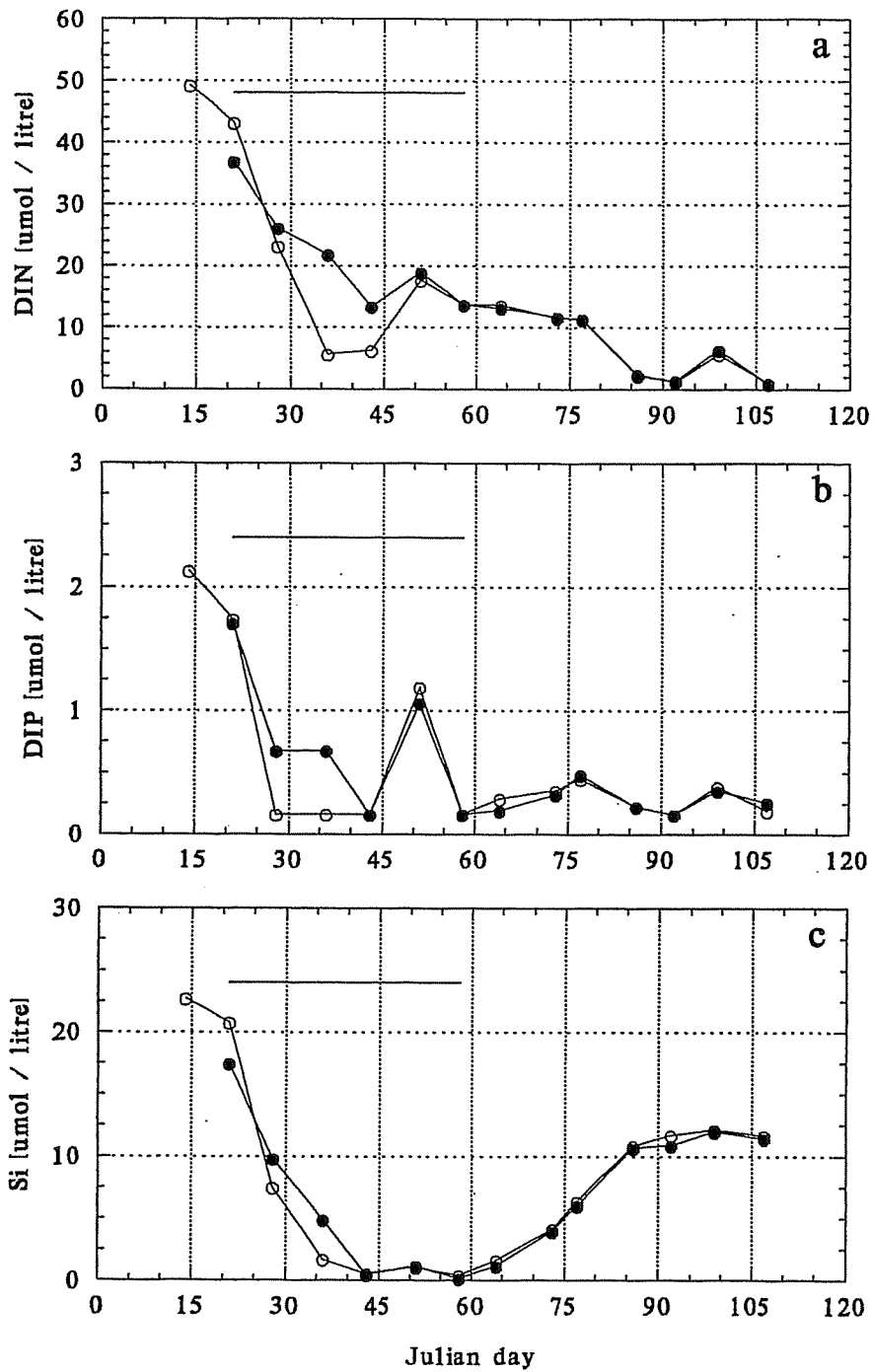
Pas na 5 februari (dag 36) kwamen oppervlakte- en bodemtemperatuur boven de 0°C uit. Gedurende de gehele monsterperiode (t/m 17 april, dag 107) bleef de watertemperatuur lager dan 10°C (Figuur 2a). De saliniteit op PG3 bedroeg 30-31 psu. Nadat de luchttemperatuur boven het vriespunt was gekomen ging er ijs smelten waardoor de saliniteit aan de oppervlakte afnam tot ca. 18 psu op dag 28 (Figuur 2b). Januari 1997 was erg zonnig met 81 uren zon (normaal 44 uren). Aan het eind van de 2e week is de hoeveelheid licht in de waterkolom al 150 W h m⁻² dag⁻¹ (Figuur 2c). Omdat PG3 een ondiep punt is (Tabel I) konden in maart en april zeer hoge lichtwaarden (> 250) bereikt worden.



PG3 Fys. and
 PG3S + Y
 METEO

Fij 3:3

Figuur 2. Ontwikkeling op PG3 van a. luchttemperatuur (ononderbroken lijn) en watertemperatuur, b. saliniteit en c. dagelijkse lichtenergie in de waterkolom. Open symbolen = oppervlak, gesloten symbolen = bodem.



Figuur 3. Ontwikkeling op PG3 van a. DIN (Dissolved Inorganic Nitrogen), b. DIP (Dissolved Inorganic Phosphorus) en c. Si (Silicium). Open symbolen = oppervlak, gesloten symbolen = bodem.

opgeloste nutriënten

Vanaf dag 14 vond er een sterke afname plaats van zowel DIN, DIP en Si (Figuur 3 a, b en c). Dit wijst op een bloei van (Si-verbruikende) diatomeën. De afname aan het oppervlak was sneller dan aan de bodem. Lage concentraties DIP en Si werden gemeten op 12 februari (dag 43). Deze nutriënten waren toen waarschijnlijk limiterend voor de diatomeën. Stikstof (DIN) is op dat moment met gemiddeld 10 $\mu\text{mol/liter}$ nog geen groeilimiterende nutriënt. De resultaten van de andere meetpunten in deze periode geven hetzelfde beeld, zie de betreffende paragraaf.

plankton en zuurstof

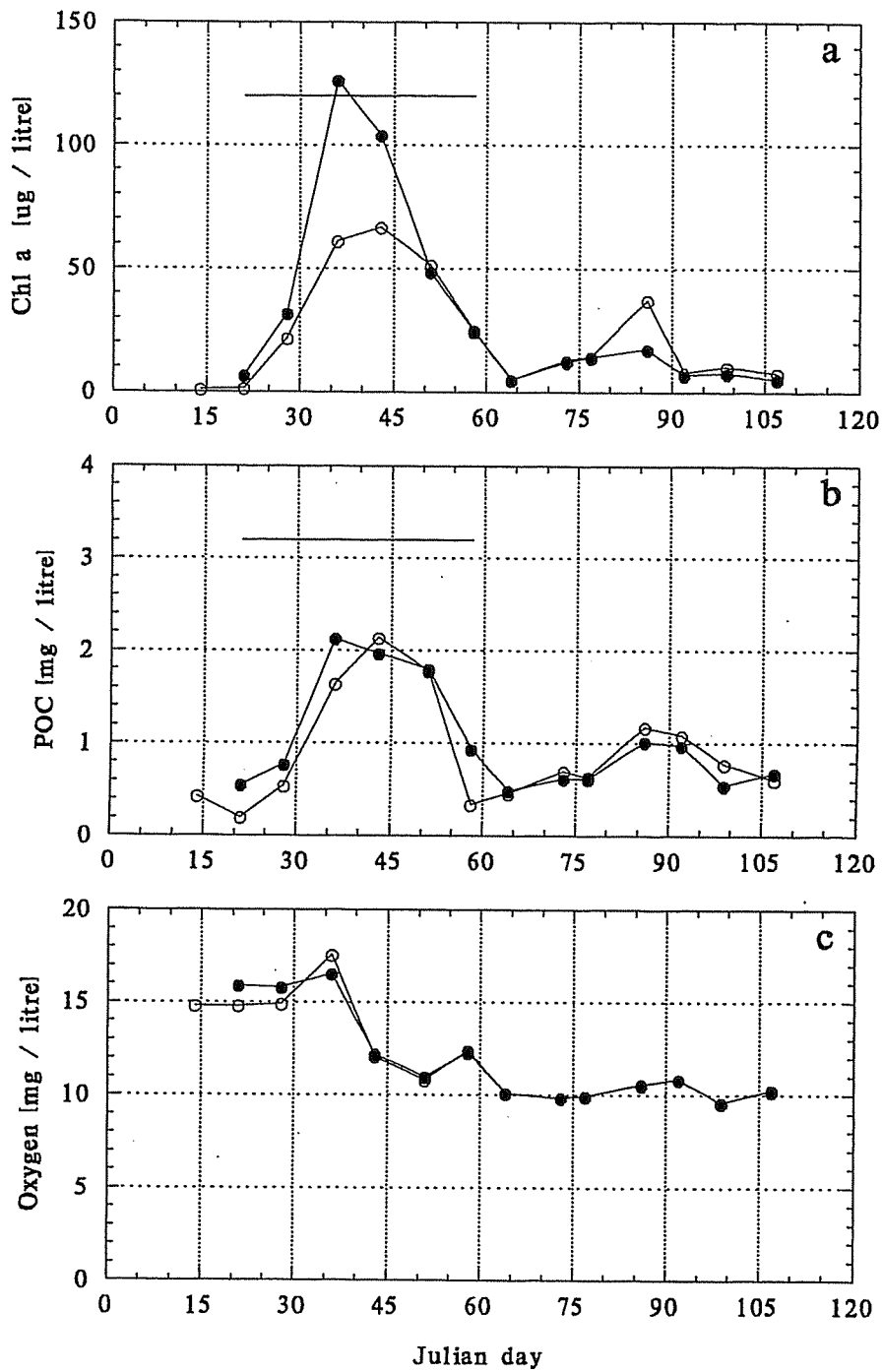
De afname van de nutriëntenconcentraties vanaf dag 14 is het gevolg van een fytoplanktonbloei die een hoogtepunt bereikte op 5 en 12 februari (dag 36-43). De chlorofyl-concentraties waren zeer hoog en liepen uiteen van 67 tot 126 $\mu\text{g/liter}$ (Figuur 4 a). De hogere concentratie bij de bodem is waarschijnlijk te wijten aan sedimentatie van de diatomeën. De twee meest talrijke soorten waren *Detonula confervacea* en *Thalassiosira nordenskiöldii*. De planktongegevens in biomassa-eenheden ($\mu\text{g C/liter}$) zijn nog niet uitgewerkt.

De hoge planktonconcentraties worden weerspiegeld in de hoge POC waarden die in deze periode ca. 2 mg/liter waren (Figuur 4 b). Dit betekent dat de C:Chl ratio 16-30 bedroeg, een vrij normale waarde voor voorjaarsplankton.

Een concentratie POC van 2 mg/liter heeft 5.3 mg zuurstof/liter nodig om te worden omgezet in CO_2 . De zuurstofconcentratie op PG3 daalde van ca. 17 mg/liter op dag 36 naar 11 mg/liter op dag 51 (Figuur 4 c) maar de POC concentratie daalde in die periode minder snel. Een belangrijke factor hierbij is dat tegelijkertijd de oplosbaarheid van zuurstof verminderde door een toename van de watertemperatuur van ca. 5°C. Al met al bleef de zuurstofconcentratie gedurende de gehele meetperiode boven de 9 mg/liter en was daarmee altijd vrijwel verzadigd (percentages O_2 95-110%).

Uit de vergelijking met de andere lokaties (verderop in deze notitie) zal blijken dat de stations HG4 en SP30 qua zuurstof niet significant afwaken van PG3.

In de op 5 maart (dag 64) tijdens een vaartocht op het Grevelingenmeer genomen watermonsters werd weinig fytoplankton aangetroffen. In het algemeen was het water helder en dit komt overeen met de chlorofylwaarden die werden gemeten (Figuur 4a). Wel werden vrij veel copepoden waargenomen. Hun aantal, geschat in een bekerglas van 100 ml was 10-20 individuen (100-200 copepoden per liter). In de bodemonsters van nabij de oesterpercelen (HG4, SP30 en PG3) werden levende dieren waargenomen (zaggers, krabbetjes, schelpdieren). Alleen het bodemonster van Drijschor, een diepe put die niet gebruikt wordt voor de oesterteelt, was anaëroob (zwart, H_2S lucht) en bevatte geen levende dieren.



PG35 . sys
 ↳ sys
 b . sys
 PG30RG . cmd

Fig 3.1.

c:\ALG\MOONISPEL
 FIG 31. cmd
 PG35. sys
 PG3b. sys

Figuur 4. Ontwikkeling op PG3 van a. Chlorophyl a, b. POC (Particulate Organic Carbon) en c. Oxygen (Zuurstof). Open symbolen = oppervlak, gesloten symbolen = bodem.

Chrysochromulina

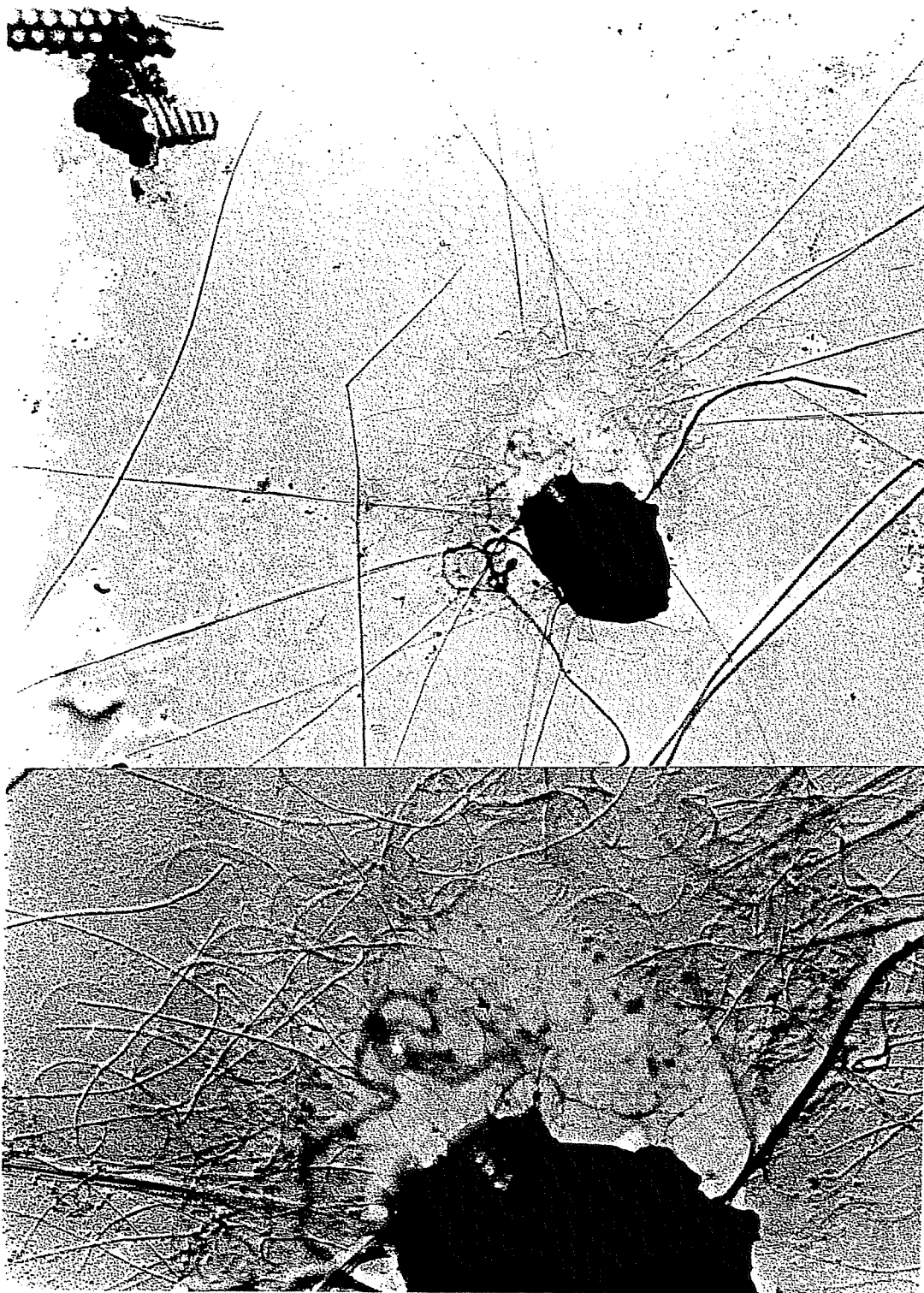
In de levende monsters van alle lokaties van dag 51 (20 februari) werden haptofyten waargenomen die duidelijk behoorden tot het geslacht *Chrysochromulina*. Naast de twee lange flagellen was duidelijk een haptonema waarneembaar. De grootte van de cel werd geschat op 7-10 μm lengte, die van de flagellen op ca. 30 μm , en die van de haptonema op 10-15 μm . De achterzijde van de cellen liep vaak wat breed, zij het slecht zichtbaar uit ("raar kontje"). Deze cellen werden eveneens gezien in alle monsters van dag 58 (27 februari). Op dag 64 werden ze niet meer gezien in de monsters van PG3, en was de determinatie in de monsters van de andere lokaties onzeker.

Schattingen van de aantallen liepen van 0,2 tot 0,5 miljoen cellen/liter. In levende monsters is, vanwege de beweeglijkheid van de cellen, een betrouwbare telling niet mogelijk. Een vergelijking tussen de schattingen op PG3 en de getelde aantallen in de Lugolmonsters (Tripos 1997a) laat een redelijke overeenkomst zien (Tabel II). In de Lugolmonsters werden de eerste *Chrysochromulina*'s waargenomen op dag 21 in lage concentraties (< 10.000 per liter).

dag	diepte	levend	Lugol
51	o	0,5	0,5
	b	0,5	0,4
58	o	0,5	1,0
	b	0,5	1,7

Tabel II. Vergelijking tussen celtellingen in levende en Lugol-gefixeerde monsters van PG3. o=oppervlak, b=bodem. Aantallen in miljoenen per liter. Concentraties lager dan 0,1 konden in levende monsters niet worden geschat.

In glutaaraldehyde gefixeerde oppervlakte monsters werden m.b.v. de elektronenmicroscopie onderzocht (Tripos 1997b). Op alle lokaties kwam dezelfde soort *Chrysochromulina* voor. Uit voorlopige metingen blijkt dat de gefixeerde cellen ongeveer 4-5 μm lang zijn en ca. 3 μm breed. Ze bezitten twee soorten schaaltsjes (Figuur 4). Eén van deze schaaltsjes bezit een 12 μm lange stekel die een doorsnede heeft van 0,2 μm . Per cel komen 8-10, en soms veelvoud van 8, van deze stekels voor. Het tweede schaaltsje is 0,7x0,9 μm groot en heeft aan één zijde een spaakstructuur. De cellen tonen een gelijkenis met de reeds eerder in de literatuur beschreven *Chrysochromulina ericina* (Parke et al. 1956). Grote verschillen zijn echter de ongelijke flagellen (één van 20 en één van 30 μm ; *C. ericina*: 2 van 20 μm) en de kleine haptonema van 8 μm (*C. ericina*: 36 μm).



3406-1

3406-2

Fij 3.2

Figuur 5. EM-foto's van *Chrysochromulina spec.* Boven: gehele cel omgeven door de karakteristieke stekels; zichtbaar zijn ook de 2 flagellen en de haptonema. Onder: deel van een cel waarnaast een groot aantal schaaltes te zien zijn; de meeste schaaltes bezitten geen stekel (monster Dreischor).

Ter verhoging van het contrast is in het monster van Dreischor ook de zogenaamde shadow-cast techniek toegepast (Tripos 1997b). Enkele resultaten staan vermeld in Figuur 5.

Het Dreischormonster van 27 maart 1996 waarin 8 miljoen haptofyten per liter was geteld was bewaard gebleven. Daarom kon dit monster alsnog met de EM worden geanalyseerd. De aangetroffen *Chrysochromulina's* behoorden tot dezelfde (onbekende) soort als die van 1997 (Tripos 1997b).

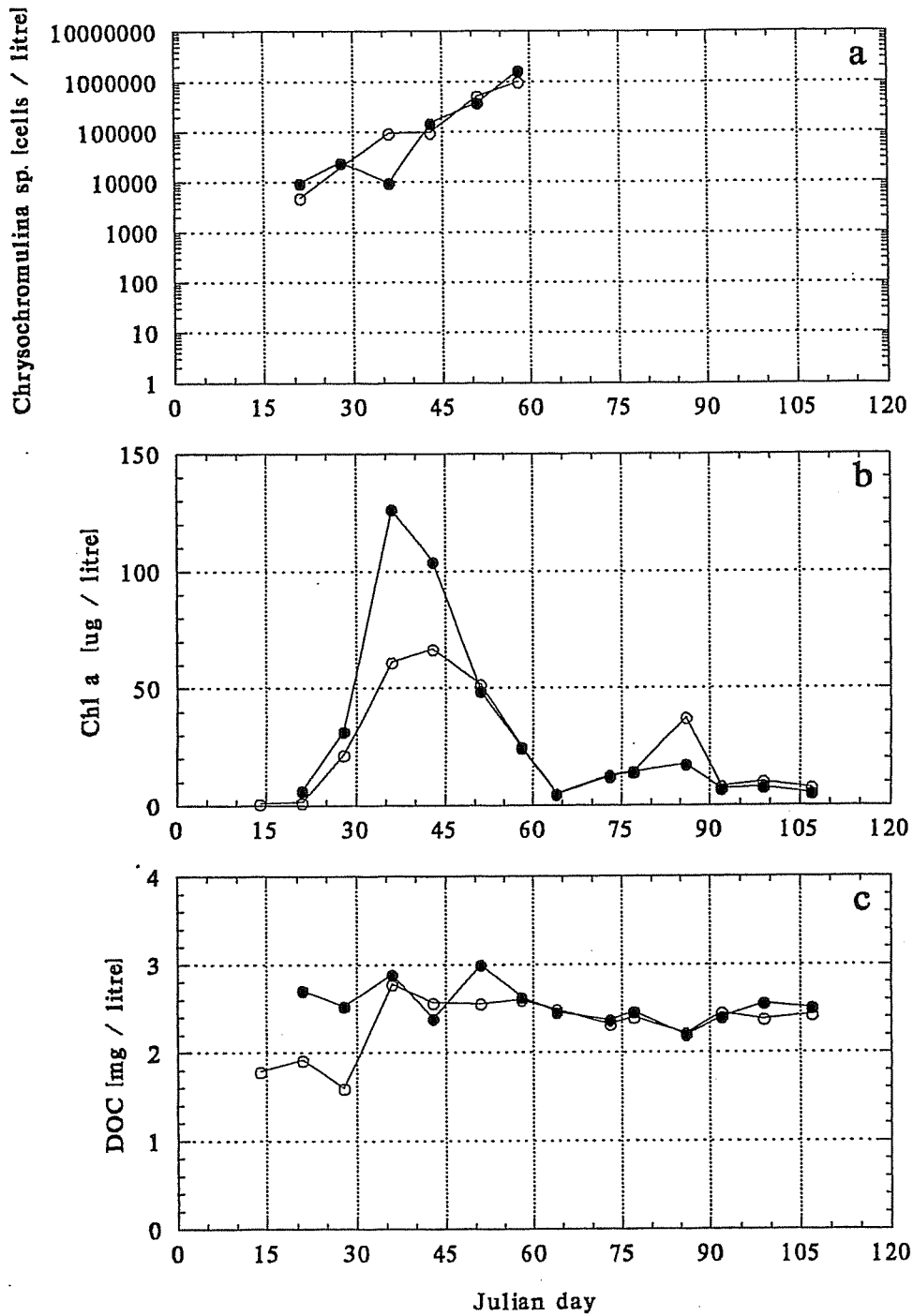
De aantallen *Chrysochromulina* zijn uitgezet in Figuur 6, tezamen met chlorofyl a en DOC (opgelost koolstof) concentraties omdat veel *Chrysochromulina's* ook kleine algen en organisch koolstof kunnen benutten voor groei (Parke et al. 1956). Hieruit blijkt dat de *Chrysochromulina's* vanaf het begin van de fytoplanktonbloei (dag 21) aanwezig waren (Figuur 6c). Opmerkelijk is dat ze vanaf dat moment exponentieel groeien t/m dag 58, als de "normale" fytoplanktonbloei al tot een eind is gekomen. De groeisnelheid bedraagt in deze periode 0,20 delingen per dag voor zowel oppervlak als bodem. In Tabel III wordt berekend wat de concentraties zouden zijn bij een gelijkblijvende toenamesnelheid ná dag 58. De nutriënten voor deze flagellaten zijn na dag 58 immers nog steeds niet uitgeput (Figuur 3a, 3b en 6c).

dag	datum	cellen/liter	opmerkingen
58	27 feb	1 miljoen	einde bloei 1997
74	13 mrt	8 miljoen	= na 14 dagen (= max. aantal 1996)
85	26 mrt	50 miljoen	= na 27 dagen
90	31 mrt	100 miljoen	= na 32 dagen

Tabel III. Hypothetische *Chrysochromulina* concentraties indien na 27 februari 1997 de populatie constant met een snelheid van 0,2 delingen per dag was blijven groeien. Het maximale aantal werd in 1996 bereikt op 17 april. Concentraties tussen 10 en 100 miljoen *Chrysochromulina polylepis* per liter veroorzaken sterfte van vissen en bodemdieren.

isolatie van Chrysochromulina

In de aanvankelijk regelmatig uitgevoerde mikroskoopcontroles werden weinig *Chrysochromulina* cellen aangetroffen. Slechts in verdunningscultures van HG4 (dag 51) bleken levende cellen aanwezig. Levende cellen werden ook aangetroffen in de meest verdunde monsters (met ca. 1 cel per buis). Maar omdat het bij deze techniek nooit geheel zeker is dat een cultuur uit 1 cel is voortgekomen (kloon) zal de aanduiding stam worden gebruikt. Na verloop van twee maanden werden geen *Chrysochromulina's* meer in de cultures bij 15°C aangetroffen, wel in die bij 10°C.



Figuur 6. Ontwikkeling op PG3 van a. *Chrysochromulina spec.*, b. Chlorofyl a en c. DOC (Dissolved Organic Carbon). Open symbolen = oppervlak, gesloten symbolen = bodem.

Met fase-contrast waren stekels op de cellen te zien, en aanvankelijk bestond het vermoeden dat het hier ging om *Chrysochromulina ericina*. De EM-analyses waren toen nog niet uitgevoerd. In nog weinig verdunde kultures werden de *Chrysochromulina*'s soms gezien aan resten van *Chaetoceros*-cellen. De cultures waren niet bacterievrij en soms leek de haptonema gebruikt te worden bij het verzamelen van bacteriën. De cultures van HG4 werden verder verdund en pas na ca. 2 maanden weer microscopisch onderzocht. In een aantal was groei opgetreden van *Chrysochromulina*, zonder dat dit aan een groenkleuring van het medium was opgemerkt. Omdat de cellen nog vrij actief waren is voor de derde maal een verdunningscultuur opgezet. De resultaten hiervan zijn nog niet bekend.

De aanduiding van de *Chrysochromulina* stam is HG4-97.

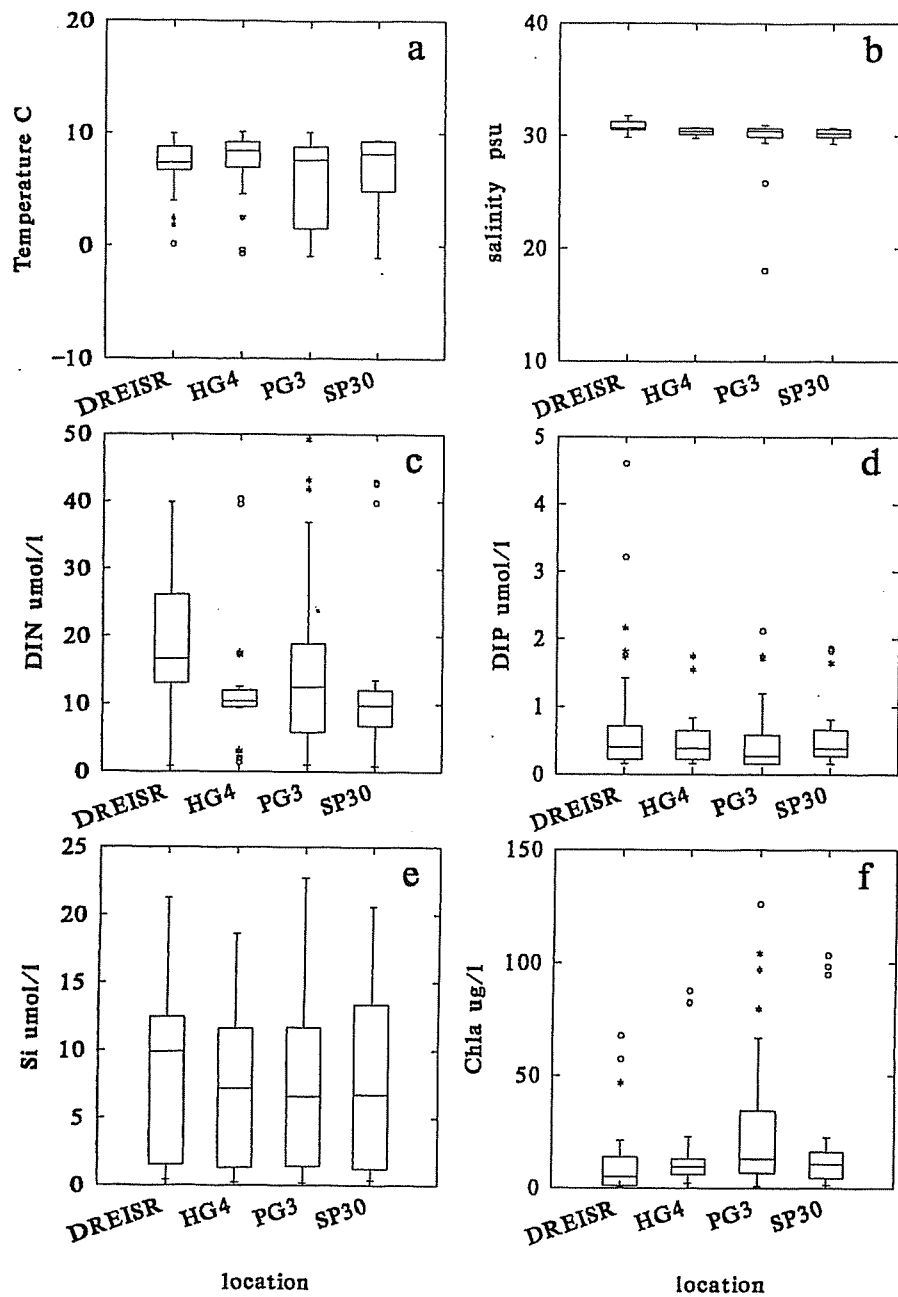
Omdat de celaantallen in de cultures laag waren werd een bioassay ingezet om te meten of een micronutriënt (selenium), organisch materiaal (glucose+ureum+ gistextract, of een geautoclaveerde diatomeënkultuur) een hogere opbrengst zou opleveren. Tevens werd een cultuur ingezet bij een lagere dagelijkse hoeveelheid lichtenergie ($50 \text{ W h m}^{-2} \text{ d}^{-1}$). Deze experimenten zijn nog niet beëindigd.

vergelijking van monsterlocaties

Om te komen tot een rationele monsternamestrategie zijn de vier lokaties in het Grevelingenmeer (Figuur 1, Tabel I) voor een aantal fysische, chemische en biologische variabelen met elkaar vergeleken. Uit figuur 7 blijkt de gemiddelden onderling niet veel verschillen. Slechts HG4 en SP30 hebben een lagere mediane DIN-concentratie dan Dreischor (Figuur 7c). Dit wordt bevestigd in een ANOVA (ANalysis Of Variance), waarin tevens de zuurstofconcentratie is meegenomen (Tabel IV).

variabelè	4 lokaties		3 lokaties	
	F	P	F	P
saliniteit	2.4	n.s.		
DIN	3.0	< 0.05	0.95	n.s.
DIP	1.6	n.s.		
Si	0.2	n.s.		
Chla	2.0	n.s.		
O2	8.5	< 0.001	3.3	< 0.05

Tabel IV. ANOVA-tabel voor een aantal variabelen per 4 of 3 lokaties. F geeft de grootte van het verschil aan, P is de kans dat een verschil niet op toeval berust. n.s. = niet significant, d.w.z. er bestaat geen onderling verschil tussen de lokaties (3 lokaties: zonder Dreischor).



Figuur 7. Box en whisker plots van a. temperatuur, b. saliniteit, c. DIN, d. DIP, e. Si en f. Chlorofyl a op de vier monsterlokaties in de eerste 107 dagen van 1997. De horizontale lijn in iedere "box" geeft de mediaan (het midden van de verdeling) aan. De hoogte van de box en de stokjes (whiskers) zijn een maat voor de spreiding. De asterisks en bolletjes geven uitbijters aan.

Uit Tabel IV blijkt dat de drie lokaties bij de oesterpercelen (PG3, HG4 en SP30) onderling niet significant verschillen voor een aantal belangrijke variabelen. Lokatie Dreischor, onderdeel van het meetnet van directie Zeeland, is veel dieper (Tabel I) en is voor de oesterteelt niet van belang.

Belangrijk is wel dat de zuurstofconcentraties op de oesterlokaties van elkaar lijken te verschillen. Om dit verder te onderzoeken zijn deze concentraties per lokatie uitgezet in Figuur 8. Uit deze figuur blijkt dat er tijdens de "zuurstofpiek" op PG3 (dag 28-36) geen meetwaarden beschikbaar zijn voor HG4 en SP30. Indien deze "piek" uit de gegevens wordt weggelaten dan blijkt er geen onderling verschil meer te zijn tussen deze drie lokaties ($F = 0,4$; n.s.).

vergelijking van monsterdieptes

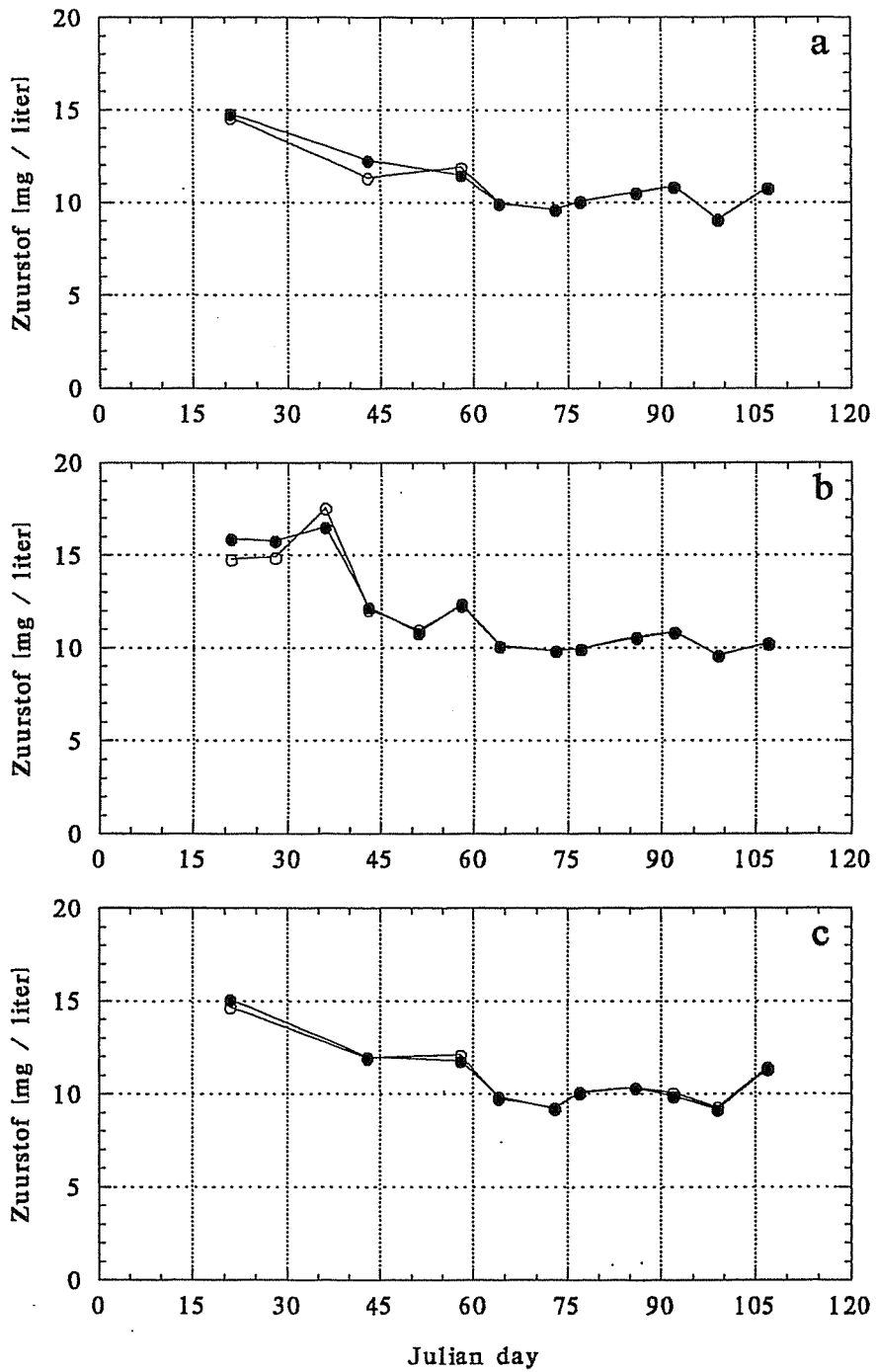
Uit de meetresultaten van PG3 v.w.b. fysische en chemische variabelen bleek al dat er weinig verschillen bestaan tussen oppervlak en bodem (Figuur 2, 3 en 4). Slechts tijdens de chlorofyl a piek van dag 36-43 (Figuur 4a) is er sprake van een verschil.

Om te zien of monsternamen beperkt kan blijven tot één diepte zijn voor de belangrijkste variabelen (zie ook Tabel IV) ANOVA's uitgevoerd, waarvan de resultaten staan vermeld in Tabel V.

variabele	Dreischor	PG3	HG4	SP30
saliniteit	P < 0,005	n.s.	n.s.	n.s.
temperatuur	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
DIN	P < 0,001	n.s.	n.s.	n.s.
DIP	P < 0,050	n.s.	n.s.	n.s.
Si	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Chla	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
zuurstof	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tabel V. ANOVA-tabel voor een aantal variabelen per monsterdiepte, en per lokatie. n.s. = niet significant, d.w.z. er is voor de variabele geen significant verschil tussen oppervlak, halve diepte of bodem. Periode januari-april 1997.

De enige significante verschillen per diepte zijn er op lokatie Dreischor voor stikstof, fosfaat en saliniteit (Tabel V). Uit box-plots van de variabelen (niet bijgevoegd) blijkt dat op dit meetpunt de oppervlaktesaliniteit lager is dan bij de bodem. Zoals eerder vermeld is Dreischor niet van belang voor de oesterkwekerij.



Figuur 8. Ontwikkeling van de zuurstofconcentraties op a. HG4, b. PG3 en c. SP30. Open symbolen = oppervlak, gesloten symbolen = bodem.

Diskussie

oestersterfte en zuurstofloosheid

De winter van 1997 was, net als die in het voorgaande jaar, erg koud waardoor het Grevelingenmeer met ijs bedekt raakte (Figuur 2a). In zee vindt turbulente menging van de waterkolom plaats door wrijving over de bodem t.g.v. de getijdebeweging en door menging t.g.v. wind aan het oppervlak. In het stagnante Grevelingenmeer zal daarom de turbulentie na bedekking met ijs minimaal zijn.

In een niet-turbulente waterkolom zullen deeltjes met een hogere dichtheid dan zeewater uitzakken. Dit veroorzaakt helder water, en gecombineerd met zonnig weer leidde dit in 1997, ondanks het ijs, tot een relatief hoge hoeveelheid lichtenergie (Figuur 2c). Hierdoor begon reeds in januari een fytoplanktonbloei (Figuur 4a) die uiteindelijk leidde tot zeer lage fosfaat en silicium concentraties (Figuur 3a en b).

De fytoplanktonbloei, voor het merendeel onschadelijke diatomeën, kwam eveneens tot uiting in hoge particulier koolstof gehalten (Figuur 4b). Tijdens het hoogtepunt van de bloei zakte een deel van het fytoplankton uit naar het onderste gedeelte van de waterkolom (Figuur 4a). Het was niet het fytoplankton bij de bodem dat een hogere groeisnelheid had dan aan het oppervlak en daardoor hogere chlorofyl a concentraties veroorzaakte. Dit valt af te lezen uit Figuur 3a-c: aan het oppervlak nemen de nutriëntenconcentraties sneller af dan aan de bodem.

De vrees dat afsluiting van het meer door ijs zou leiden tot sterk verlaagde zuurstofconcentraties kan niet door de meetgegevens worden bevestigd. Op 14 januari 1997 werd, toen de ijsbedekking nog intact was, bij de oesterpercelen ca. 15 mg zuurstof per liter gemeten (Figuur 4c). De theoretische zuurstofvraag van het door de planktonbloei geproduceerde organische materiaal bedroeg hooguit 5,3 mg/liter. Verder is er nog een zuurstofvraag van de bodem (ca. 0.25 mg per m² per dag. In de gehele meetperiode (t/m 17 april) werden geen zuurstofconcentraties lager dan 9 mg per liter gemeten (Figuur 4c). Dit gold voor alle lokaties (PG3, HG4 en SP30) bij de oesterpercelen en alle dieptes (Tabel V, Figuur 8). Met andere woorden, het water was in 1997 steeds voor meer dan 95% met zuurstof verzadigd.

In 1996 zijn er geen monsters op overeenkomstige lokaties genomen. Er is echter geen reden om aan te nemen dat de situatie met betrekking tot de zuurstofconcentraties op de oesterpercelen wezenlijk anders was dan in 1997. Op de routinemeetpunten (GTSO) van directie Zeeland was in 1996 het zuurstofgehalte tussen 9,5 en 10 mg per liter (verslag "Overleg toestand Grevelingenmeer", dir. Zeeland nummer 97.0004). De veronderstelling dat zuurstofgebrek in 1996 heeft geleid tot putziekte van de oesters in het Grevelingenmeer is daarom ongegrond. Een andere mogelijkheid zou zijn dat de oesters t.g.v. een langdurige

koudeperiode zodanig verzwakken dat ze bevattelijk worden voor besmetting met *Hexamita*, de veroorzaker van putziekte. Echter, volgens dr. P. van Banning (RIVO) is de platte Nederlandse oester winterhard en is koude op zich geen probleem. (verslag "Overleg toestand Grevelingenmeer", dir. Zeeland nummer 97.0004).

de plaagalg *Chrysochromulina* HG4-97

Opmerkelijk is de vondst van een, mogelijk nieuwe, *Chrysochromulina*-soort. Zo'n vijftig soorten zijn tot nu toe in de literatuur beschreven (Moestrup 1994) maar tot op heden is het niet gelukt *Chrysochromulina* HG4-97 hierin te vinden. Vier van de zes geteste *Chrysochromulina* soorten zijn giftig, en dan met name oude kultures (Moestrup 1994), m.a.w. kultures met hoge celaantallen die waarschijnlijk groei gelimiteerd zijn door één of meer nutriënten. In de natuur zijn giftige bloeien opgetreden van *C. polylepis* en *C. leadbeateri* (Peperzak 1994). Fosfaatlimitatie lijkt de toxineproductie te stimuleren en in dit verband is het van belang dat tijdens de groei van *Chrysochromulina* in de Grevelingen de fosfaatconcentraties zeer laag werden of waren (Tabel VI). In het algemeen wordt het Grevelingenmeer namelijk beschouwd als een stikstof-gelimiteerd systeem.

variabele	1997 dag 20-58	1997 > dag 58	1996 dag 73-108	> dag 108
temperatuur	-1° - +6,4°	> 7°	2 - 8	> 9
saliniteit	18* - 31	30	30 - 32	
lichtenergie	40 - 200	>200	60 -170	> 200
DIN	6 - 40	< 14	1,5 - 7,6	
DIP	0,1 - 1,75	> 0,2	0,1 - 0,3	
DOC	2 - 3	> 2		

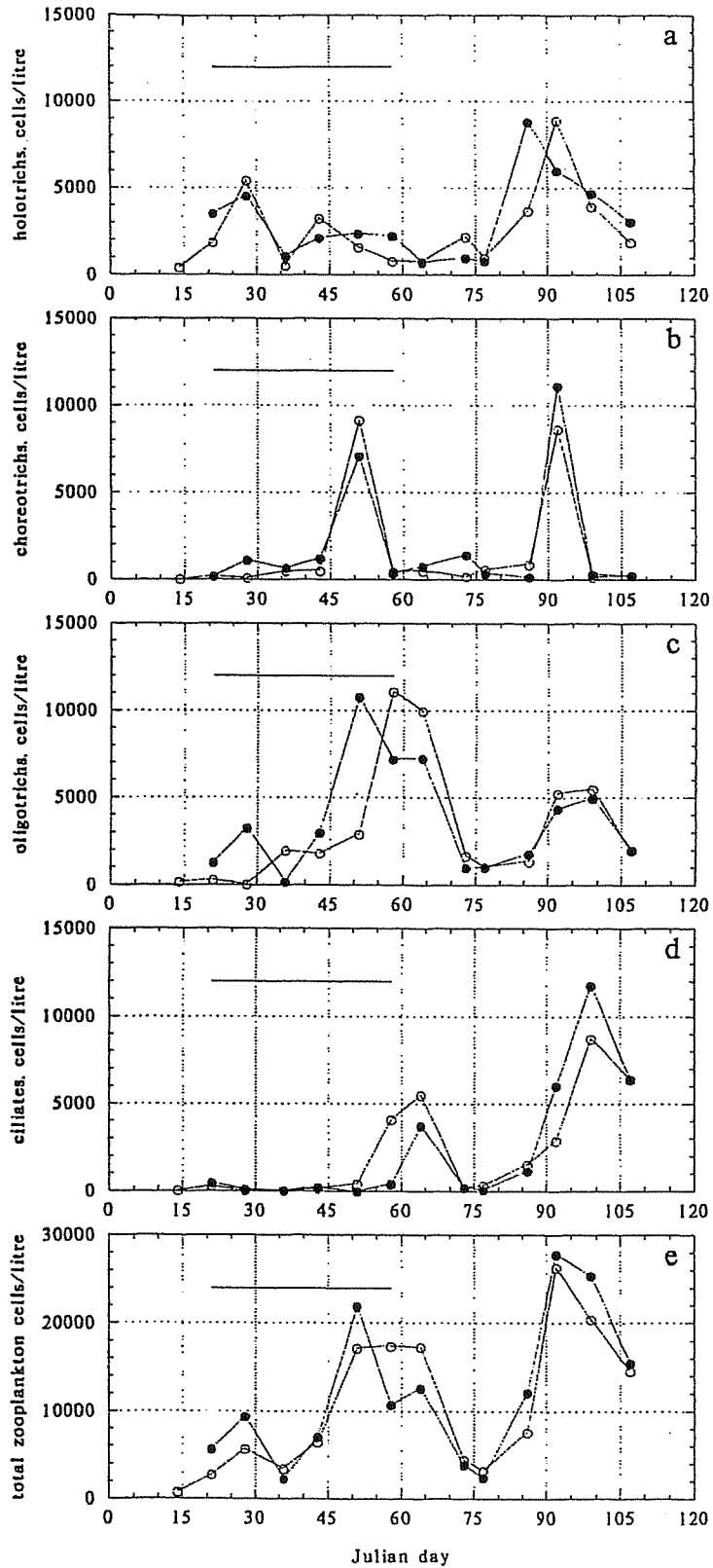
Tabel VI. Variabelen tijdens de periode van constante groeisnelheid van *Chrysochromulina* in 1997 ($k = 0.20$; PG3, dag 20-58), na dag 58 (PG3), tijdens en de bloei in 1996 ($k = 0.12$; Dreischor, dag 73-108).
*bij sal = 18 geen cellen waargenomen.

Uit Tabel VI blijkt ook dat de *Chrysochromulina* in zowel 1996 als 1997 bij temperaturen lager dan 10°C voorkwam. De saliniteit was in het algemeen ca. 31 psu, en opmerkelijk is dat bij de zeer lage saliniteit op dag 28 aan het oppervlak van PG3 (Figuur 2b) als gevolg van smeltend ijs, geen cellen zijn waargenomen.

De combinatie van lage temperatuur ($< 10^{\circ}\text{C}$) en een voor de tijd van het jaar grote hoeveelheid lichtenergie ($50-200 \text{ W h m}^{-2} \text{ dag}^{-1}$) zijn mogelijk de redenen dat juist in koude winters *Chrysochromulina* in het Grevelin- genmeer tot bloei komt.

Een factor die bij de bloei van plaagalgen eveneens van belang is, is de snelheid waarmee de algen gegeten worden (begrasd) door ander plankton (zooplankton) of door bodemdieren. Om een indruk te krijgen van de graasdruk in 1997 op PG3 zijn zooplanktonconcentraties uitgezet in Figuur 9. Van het totaal aan getelde zooplanktonsoorten zijn 4 groepen van zogenaamde ciliaten (Figuur 9 a,b,c en d) geselecteerd. Gemiddeld behoorde 93% van het zooplankton tot deze vier (Tripos 1997a). Ciliaten zijn verder belangrijke grazers van het micro- en nanoplankton, het fytoplankton waartoe *Chrysochromulina* behoort. Uit Figuur 9 blijkt dat er vier zooplankton-"pieken" voorkwamen tijdens de *Chrysochromulina*-bloei: op dag 28, dag 51, dag 58 en dag 64. Uit analyse van de soortensamenstelling en de soortgrootte in deze gehele periode blijkt dat deze ciliaten vrij klein waren. Als aangenomen wordt dat de breedte (diameter) van het beest een maat is voor de maximale grootte van een prooi (een alg) dan kan worden vastgesteld dat *Chrysochromulina* HG4-97 door het meerendeel van deze ciliaten niet kon worden begrasd. De breedte van dit zooplankton was namelijk $\leq 22 \mu\text{m}$ (Figuur 8a,c,d), met uitzondering van de oligotriche ciliaten: $31-46 \mu\text{m}$ (Figuur 8b). Alhoewel de gevonden *Chrysochromulina* celdimensies van $5 \times 3 \mu\text{m}$ heeft, dienen hierbij de stekels aan weerszijde nog te worden opgeteld. Hierdoor wordt de cel 6-9 x groter, namelijk $27-29 \mu\text{m}$. De cellen zijn dan te groot voor het meerendeel van het zooplankton om te kunnen worden "gegeten". De grotere ciliaten (Figuur 8b) zouden mogelijk wel op *Chrysochromulina* kunnen grazen, maar klaarblijkelijk had dit dan weinig effect. Op het hoogtepunt van de *Chrysochromulina*-"bloei" waren de aantallen van deze ciliaten weer bijna nul (Figuur 8b). Het is niet mogelijk te verifiëren of toxineproductie door de plaalgalg hierbij een rol speelde.

In het laboratorium was de groei van *Chrysochromulina* matig. Mogelijk zijn de omstandigheden waaronder wordt gekweekt een verklaring hiervoor. De temperatuur van 10°C en een lichtenergie van $262 \text{ W h m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ zijn beide te hoog in vergelijking met de waarden in het veld (Tabel VI). Nader autecologisch onderzoek dient uitsluitel te geven over de voor *Chrysochromulina* optimale groei-omstandigheden. Aan de hand van de resultaten van dit onderzoek kan een inschatting gemaakt worden van de risico's op bloeien van deze plaalgalg, en van de eventueel te nemen voorzorgsmaatregelen.



Figuur 9. Microzooplankton concentraties op PG3 1997. a. holotriche ciliaten, b. choreotriche ciliaten, c. oligotriche ciliaten, d. Ciliophora spp. en e. totaal microzooplankton in cellen per liter.

Resultaten van autecologisch onderzoek kunnen ook inzicht verschaffen in de vraag waarom op een bepaald moment de *Chrysochromulina*-concentratie daalt van één of meerdere miljoenen cellen per liter tot onder de detectielimiet. Mogelijk is dat direct door een te hoge temperatuur (Tabel VI). Een alternatief is dat een zooplanktonsoort die *Chrysochromulina*'s begraasd pas bij een bepaalde temperatuur tot ontwikkeling komt (indirecte reden). Uitwerking van de zooplanktongegevens kan hier wellicht een aanknopingspunt geven.

Om vast te stellen of *Chrysochromulina* HG4-97 inderdaad een nieuwe soort is verdient het aanbeveling nader EM-onderzoek te verrichten aan gekweekte cellen.

Verder onderzoek wordt ook geadviseerd t.a.v. de giftigheid van *Chrysochromulina* HG4-97. De veronderstelling dat in 1996 de bloei van deze haptofyt leidde tot verslechterde oesterconditie, en daarmee indirect tot de *Hexamita*-besmetting, is slechts gebaseerd op gegevens uit de literatuur (giftige *Chrysochromulina*'s komen voor, hoge concentraties zijn nodig, P-limitatie stimuleert toxiciteit). Toxinen kunnen worden aangetoond m.b.v. toxicologische laboratoriumtests, of bijvoorbeeld door een experiment met platte oesters en gekweekte *Chrysochromulina*.

Ten slotte wordt aanbevolen om de monitoring in ieder geval in de komende winterperiode te vervolgen. Zoals in de resultaten paragraaf is vermeld is het voldoende om alleen op PG3, en alleen op 1 diepte te monstern om een representatief beeld te verkrijgen van de planktonsituatie.

Literatuur

Parke, M., Manton, I. en Clarke, B. (1956) Studies on marine flagellates. III. Three further species of *Chrysochromulina*. *J.mar.Ass.U.K.* 35, 387-414.

Peperzak, L. (1994) Plaagalgen in de Noordzee. Rapport DGW-93.053.

Peperzak, L., Colijn, F., Gieskes, W.W.C. and Peeters, J.C.H. (1997) Development of the diatom-*Phaeocystis* spring bloom in the Dutch coastal zone of the North Sea: the silicon depletion versus the daily irradiance threshold hypothesis. submitted to *J. Plankton Res.*

Tripes 1997a. Voorjaarsplankton uit de Grevelingen 1997. Onderzoek naar samenstelling en biomassa van fytoplankton en micro-/mesozoöplankton. In opdracht van: Rijkswaterstaat, Directie Zeeland. Rapportnummer: 97.0026.

Tripes 1997b. EM-onderzoek aan *Chrysochromulina* spec. uit de Grevelingen. In opdracht van: Rijkswaterstaat, Directie Zeeland. Rapportnummer: 97.T0025.