

Rapportage geschiktheid grondwater Kustlab

Studie naar de mogelijkheden van grondwatergebruik t.b.v.
aquacultuur in het Kustlaboratorium



Bron: www.kustlaboratorium.nl

Stichting Het Zeeuwse Landschap

19 maart 2012

Definitieve rapportage, versie 2.0

| | |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Documenttitel | Rapportage toepasbaarheid grondwater Kustlab Studie naar de mogelijkheden en effecten van grondwatergebruik t.b.v. aquacultuur in het Kustlaboratorium |
| Status | Concept rapportage |
| Datum | 19 maart 2012 |
| Projectnaam | Kustlaboratorium |
| Auteur(s) | Jouke Heringa (Onderzoeksgroep Aquacultuur HZ), Jorik Creemers (Onderzoeksgroep Aquacultuur HZ), Tony van der Hiele (Onderzoeksgroep Aquacultuur HZ), Pim van Dalen (Onderzoeksgroep Aquacultuur HZ), Marco Dubbeldam (Stichting Zeeschelp). |
| Opdrachtgever | Stichting Het Zeeuwse Landschap |

Hogeschool Zeeland

Edisonweg 4
4382 NW Vlissingen

Postadres

Postbus 364
4380 AJ Vlissingen

Telefoon

Tel. 0118 - 489473
Fax 0118 - 489200

Inhoudsopgave

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Introductie | 1 |
| 1.1 Achtergronden | 1 |
| 1.2 Projectdoel en resultaat..... | 2 |
| 1.3 Onderzoeksvragen | 2 |
| 2. Aanpak op hoofdlijnen..... | 3 |
| 3. Grondwaterkarakteristieken..... | 5 |
| 3.1 Bemonstering..... | 5 |
| 3.2 Fysische en chemische parameters | 5 |
| 3.3 Overige kenmerken..... | 6 |
| 4. Alg (<i>Skeletonema costatum</i>) | 7 |
| 4.1 Beschrijving testorganisme | 7 |
| 4.2 Methode alg..... | 7 |
| 4.3 Resultaten algentest | 9 |
| 4.4 Conclusie alg | 12 |
| 4.5 Discussie alg | 12 |
| 4.6. Alg (<i>Skeletonema costatum</i>) Ecofide | 13 |
| 5. Mosselen en Tapijtschelpen (<i>Mytilus edulis en Tapes philippinarum</i>) | 15 |
| 5.1 Beschrijving testorganismen..... | 15 |
| 5.2 Methode | 15 |
| 5.3 Resultaten groeiproef | 17 |
| 5.4 Resultaten filtratieproef..... | 20 |
| 5.5 Conclusie mossel en tapijtschelp | 20 |
| 6. Zager (<i>Nereis virens</i>) | 22 |
| 6.1 Beschrijving testorganisme | 22 |
| 6.2 Methode zager groeiproef..... | 22 |
| 6.3 Resultaten zager | 24 |
| 6.4 Conclusie zager | 25 |
| 7. Tong (<i>Solea solea</i>) | 26 |
| 8. Conclusie | 27 |

| | |
|--------------------------------------------|----|
| 8.1 Fysische en chemische parameters | 27 |
| 8.2 Reactie kweekorganismen | 27 |
| 8.2 Voorbehandeling..... | 28 |
| 8.3 Overige bevindingen | 28 |
| 9. Discussie..... | 29 |
| 10. Aanbevelingen | 30 |
| Literatuur | 32 |
| Bijlagen..... | 33 |

1. Introductie

Het Kustlaboratorium van Het Zeeuwse Landschap brengt drie belangrijke elementen samen in één plan: kustveiligheid, duurzame voedselvoorziening (aquacultuur) en landschaps- en natuurontwikkeling. De locatie van het Kustlaboratorium is gepland bij Burghsluis, op Schouwen-Duiveland.

Voor aquacultuur is aanvoer van zoutwater nodig. Voor de geplande zilte aquacultuur kan hiertoe gebruik gemaakt worden het lokaal aanwezige Oosterscheldewater, maar een andere mogelijkheid is om gebruik te maken van het aanwezige zoute grondwater.

De stichting Het Zeeuwse Landschap overweegt om in het Kustlaboratorium van grondwater gebruik te maken en wil daarom graag weten of er kwalitatief geschikt grondwater beschikbaar is voor de toepassing in aquacultuur activiteiten.

Een eerste analyse op basis van gegevens van TNO-NITG (Dino loket) over ondiepe en diepe ondergrond ter plaatse van het kustlaboratorium laat zien dat er drie watervoerende pakketten aanwezig zijn (wvp 1a, wvp 1b, wvp2) met twee scheidende lagen op circa 42 meter en 92 meter. In 1997 gemeten chloride gehalten in watervoerende pakket 1a (<42 meter) en 1b (42-92 meter) laten zien dat in beide lagen het zoutgehalte gelijk is aan dat van zeewater.

Op de dijk ter hoogte van Kustlaboratorium staat een mantelbuis ((B42G0096) met daarin vier grondwaterstandsbuizen met filters op dieptes van resp. 5, 22, 35 en 45 meter -NAP.

1.1 Achtergronden

Water is het kweekmedium voor aquacultuur. Bij de kweek van zoutwateralgen, wieren, schelpdieren, zagers, kreeftachtigen en vis is de beschikbaarheid van kwalitatief goed zout water essentieel. Zeventig procent van de aquacultuurbedrijven in Zeeland gebruikt zout oppervlaktewater, voornamelijk uit de Oosterschelde. De praktijk wijst uit dat aan het gebruik van zout oppervlaktewater een aantal bezwaren zitten. Het geeft een beperking in keuze van locatie, het bedrijf moet immers dichtbij een zeedijk gevestigd zijn; het kost veel inspanning om ongewenste organismen, zoals algen, larven van pokken, krabben of schelpdieren uit het water te filteren, het ingenomen water heeft een wisselende kwaliteit en temperatuur en het is vaak nutriëntenarm. In aquacultuur toepassingen waarin verschillende teelten worden gecombineerd (IMTA, Integrated Multi Trophic Aquaculture), vormt de eerste stap in de kweek vaak de gecontroleerde productie van algen en wieren. Dit geproduceerde plantaardig materiaal vormt vervolgens het voedsel voor bijvoorbeeld schelpdieren, die de algen uit het water filteren.

Het inkomende oppervlaktewater bevat vaak weinig nutriënten. Daarom is het noodzakelijk om water te bemesten door toevoeging van voedingsstoffen om een zo hoog mogelijke productie van algen te krijgen. Bemesting brengt in de regel aanzienlijke kosten met zich mee. Grondwater daarentegen is vaak rijk aan nutriënten (stikstof en fosfaat) en bevat de benodigde spore-elementen voor algen/wierenkweek. Daarnaast is het constanter van samenstelling en temperatuur en steriel, dat wil zeggen dat er geen levende organismen in zitten die schadelijk voor de kweek zijn. Er is in Zeeland overal zout grondwater aanwezig. Wel is het zo dat geschikt zout grondwater (1e of 2e watervoerende pakket) op de ene locatie, bijvoorbeeld Tholen dieper zit dan op de andere locatie, bijvoorbeeld Schouwen-Duiveland. De diepte van het zoute grondwater is afhankelijk van de plaatselijk geologische opbouw. Een nadeel van grondwater is dat de samenstelling op de verschillende locaties en diepte varieert en dat grondwater mogelijk niet op iedere locatie en diepte geschikt is voor alle kweken. Zo is de ervaring dat dieper grondwater in een aantal gevallen relatief veel opgelost ijzer (tot 16 mg/l) bevat. Wanneer dit grondwater opgepompt wordt en met zuurstof in contact komt, slaat het ijzer neer en kan dan leidingen verstoppen en/of ongewenste effecten op bijvoorbeeld de kieuwen van vis hebben. In veel praktijkgevallen wordt daarom het grondwater ontijzerd met een zandfilter.

Tabel 1.1. Grondwatergebruik voor Aquacultuur op locaties in Zeeland

| Naam | Kweek | Locatie | opmerkingen |
|---------------------------------|------------------------------------------|-----------------|--------------------------------------------------------------|
| Grovisco | Tarbot, Yellowtail Kingfish, zeegroenten | Tholen | Positieve ervaringen |
| Seafarm | Tarbot (en mesheften) | Kamperland | Positieve ervaringen |
| K. Maatschap Wilhelminapolder | Algen en mosselen | Wilhelminadorp | Positieve ervaringen |
| La Solitude | Algen en mosselen | St. Philipsland | Wisselende ervaringen (slechte filtratie bij mosselen) |
| Roem van Yerseke (Hatchery) | Algen en schelpdieren | Yerseke | Positieve ervaringen |
| Heerlijkheid van Wolphaartsdijk | Zeekraal, lamsoor en zagers | Wolphaartsdijk | Grondwater wordt naast Veerse Meer oppervlaktewater gebruikt |
| Familie Bolier | Kreeft | Scherpenisse | Positieve ervaringen |
| SEA Lab | Algen, schelpdieren, kreeft, zagers | Vlissingen | Positieve ervaringen |

Op een negental plaatsen in Zeeland wordt in natuurgebieden gebruik gemaakt van zogenaamde kwelbuizen. Deze buizen (met een binnenmantel diameter van 25 – 30 cm) staan in de buurt van het buitenwater en hebben een filter in een van de watervoerende pakketten. Onder invloed van de waterdruk (zonder dat er gepompt wordt) van het buitenwater (al dan niet met getij) geven deze buizen een debiet.

1.2 Projectdoel en resultaat

Het doel van het project is: Inzicht geven in de kwalitatieve bruikbaarheid van het aanwezige grondwater voor aquacultuur toepassing op de locatie van het Kustlaboratorium.

Het resultaat van het project is: Inzicht in de toepassing van het grondwater (onbehandeld en voorbehandeld) uit het eerste en tweede watervoerende pakket voor aquacultuur toepassingen op basis van bioassays met 5 verschillende voor Zeeland relevante aquacultuur organismen..

1.3 Onderzoeksvragen

In hoeverre is het grondwater ter plaatse van het Kustlab vanuit het 1e en 2e watervoerende pakket (wvp 1a en 1b) geschikt voor de kweek van aquacultuurorganismen?

- a. Geeft het aanwezige grondwater in het Kustlab een ongewenste (toxische) reactie bij 5 typen kweekorganismen?
- b. Hoe verandert deze reactie bij voorbehandeling door middel van beluchting en filtratie?
- c. Wat is de kwaliteit van het grondwater in termen van chloride, anorganisch stikstof, fosfor en ijzer concentraties?

2. Aanpak op hoofdlijnen

Het onderzoek naar de geschiktheid van plaatselijk beschikbare grondwater heeft het karakter van een ‘quick scan’, waarop op basis van fysische- en chemische metingen en een aantal bioassay’s de kansrijkheid van grondwater voor aquacultuur toepassingen is onderzocht. Hierbij is het gedrag of andere parameters van 5 testorganismen in het te onderzoeken water gemonitord. De organismen die in Zeeland ‘gangbaar’ zijn voor toepassing in de aquacultuur zijn hierbij in beschouwing genomen. Hogeschool Zeeland en Stichting Zeeschelp hebben nodige ervaring op het gebied van bioassays met lagere organismen (algen, wieren, schelpdieren en zagers). IMARES heeft de ervaring en benodigde vergunningen om bioassays met gewervelden (vissen) uit te voeren.

Van de fysische waterkwaliteitsparameters, van invloed op aquatisch leven, is saliniteit en pH gemeten. Om de aanwezige nutriënten in het grondwater, bruikbaar voor algen en wieren, vast te stellen is orthofosfaat, ammonium, nitraat en silicaar gemeten. Bij de voorbehandeling van het grondwater, dient rekening gehouden te worden met de aanwezigheid van ijzer in het water, hiervan is tevens de concentratie gemeten.

De geselecteerde organismen voor de bioassays zijn gangbaar voor toepassing in de aquacultuur in Zeeland en bevinden zich op verschillende trofische niveaus, tevens bestaat er een verschil in gevoeligheid van de organismen voor verschillende substanties. Hierdoor kan met deze bioassays voor een breed scala aan organismen een eerste indicatie van de geschiktheid gegeven worden.

Tabel 2.1 Testorganismen in de bioassays geschiktheidsonderzoek grondwater kustlaboratorium

| Trofische niveaus | Taxonomische groep | Indicatorsoort | Levensstadium | Indicator | Duur |
|------------------------|--------------------|---------------------------------------------|-----------------------|------------------------------------------------------------------|-----------|
| Primaire producenten | Algen | <i>Skeletonema costatum</i> | Gehele cyclus | Groei / toename chlorofyl | 2-3 dagen |
| Primaire consumenten | Schelpdieren | Mossel (<i>Mytilus edulis</i>) | Broed | Groei | 28 dagen |
| | | Tapijtschelp (<i>Tapes philippinarum</i>) | Broed | Groei | 28 dagen |
| | | Mossel (<i>Mytilus edulis</i>) | Halfwas mossel* | Mate van filtreren/ Clearance rate (afname algendichtheid) | 5 dagen |
| | | Tapijtschelp (<i>Tapes philippinarum</i>) | Halfwas tapijtschelp | Mate van filtreren/ Clearance rate (afname algendichtheid) | 5 dagen |
| Omnivoren (herbivoren) | Wormen | Zager (<i>Nereis virens</i>) | ‘juveniel’ (0,3 gram) | Groei (biomassa) | 28 dagen |
| Consument | Vissen | Tong (<i>Solea Solea</i>) | Hatching / larve | Ontwikkeling | 9 dagen |

*Gezien ervaringen van Hogeschool Zeeland en Stichting Zeeschelp waar halfwas mosselen niet filterden in grondwater, in tegenstelling tot mosselbroed, is de mossel tevens in halfwas levensstadium toegepast.

Voordat de bioassays met het grondwater uitgevoerd zijn, heeft bij een deel van de testen een voorbehandeling plaatsgevonden, bestaande uit ontijzering middels beluchting en filtratie. Dit is representatief voor de voorbehandeling zoals deze daadwerkelijk in het veld ingezet wordt bij toepassing van grondwater in de aquacultuur. Met het ondiepere grondwater is voor alle organismen parallel een behandeling uitgevoerd zonder voorbehandeling van het water.

De testen zijn uitgevoerd op 3 typen water:

- Ondiep grondwater (22m -NAP) onbehandeld
- Ondiep grondwater (22m -NAP) belucht en ontijzerd middels een kaarsfilter
- Diep grondwater (45m-NAP) belucht en ontijzerd middels een kaarsfilter

De volgende protocollen zijn gebruikt bij het uitvoeren van de bioassays:

Tabel 2.2 Bioassay protocollen

| Indicatorsoort | Protocol |
|---------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Diatomee (<i>Skeletonema costatum</i>) | NEN-EN-ISO 10253:2006 |
| Mossel (<i>Mytilus edulis</i>) | Protocol HZ i.s.m. Stichting Zeeschelp |
| Tapijtschelp (<i>Tapes philippinarum</i>) | Protocol HZ i.s.m. Stichting Zeeschelp |
| Zager (<i>Nereis virens</i>) | Protocol RIKZ-BCI |
| Tong (<i>Solea Solea</i>) | OECD guideline 212: Fish, short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages |

3. Grondwaterkarakteristieken

3.1 Bemonstering

Op de dijk ter hoogte van Kustlaboratorium staat een mantelbuis ((B42G0096) met daarin vier grondwaterstandsbuizen met filters op dieptes van resp. 5, 22, 35 en 45 meter -NAP. Deze grondwaterstandsbuizen, in eigendom van de Provincie Zeeland, zijn gebruikt om grondwater op te pompen. Op figuur 3.1 is hiervan een afbeelding weergegeven. Grondwater van een diepte van 22m –NAP en 45m – NAP is opgepompt. Het grondwater dat na voorbehandeling (beluchting en filtratie) gebruikt wordt voor de bioassays is in een 500 liter vat vervoerd naar het SEA Lab. Het grondwater dat zonder voorbehandeling in de bioassays toegepast wordt is in afgesloten jerrycans vervoerd om contact met de lucht te minimaliseren.



Figuur 3.1 Bemonstering van het grondwater

Op twee momenten is grondwater opgepompt en vervoerd naar het SEA Lab; op 16 november 2011 en op 11 januari 2012.

Het grondwater dat niet voorbehandeld diende te worden, is in dezelfde jerrycans bewaard als waar het mee is vervoerd. Het grondwater dat wel voorbehandeld is, is gedurende 24 uur belucht, vervolgens met een kaarsfilter gefilterd en opgeslagen in 500 liter bakken. De gebruikte filtergrootte van het kaarsfilter waren achtereenvolgens 20 μ m, 5 μ m en 2 μ m.

3.2 Fysische en chemische parameters

Met een standaard saliniteitsmeter en pH meter zijn de fysische parameters van het grondwater gemeten. De concentraties aan ijzer, nitriet, orthofosfaat, ammonium en silica zijn met de HACH kit (type LASA 20) methode bepaald. Om de concentratie aan nitraat te meten is gebruik gemaakt van UV spectrometrie (Perkin Elmer Spectrophotometer).

Tabel 3.1 Fysische en chemische parameters van de verschillende diepten grondwater, voorbehandeld en niet voorbehandeld.

| Diepte | Sal g/l | pH | Fe mg/l | NO ₂ ⁻ mg/l | NO ₃ ⁻ mg/l | ortho PO ₄ ³⁻ mg/l | NH ₄ mg/l | SiO ₂ mg/l |
|-----------|---------|------|---------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------|----------------------|-----------------------|
| KL -22 NV | 32,5 | 7,43 | 4,50 | 0,00 | 0,89 | 7,69 | 3,52 | 20,00 |
| KL -22 V | 32,5 | 7,43 | 0,49* | 0,00 | 1,35 | 4,80 | 3,62 | 16,35 |
| KL-45 NV | 31,4 | 7,10 | 7,10 | 0,00 | 0,13 | 3,32 | 13,40 | 16,20 |
| KL -45 V | 31,4 | 7,10 | 4,30 | 0,00 | 0,12 | 2,17 | 14,17 | 14,97 |

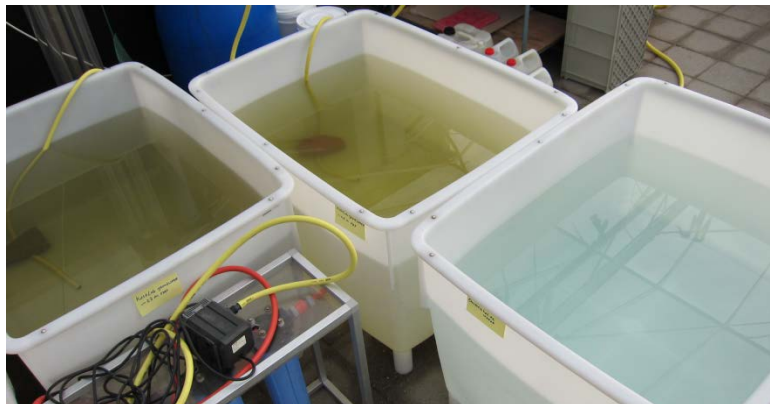
*Meting mogelijk afwijkend, door verschil in gebruikte chemicaliën.

Bij voorbehandeling (beluchting en filtratie) treedt een verschil in chemische parameters op bij met name ijzer en orthofosfaat, en in mindere mate bij silica.

3.3 Overige kenmerken

Opvallend aan het grondwater van 22m – NAP is dat er een sterke waterstofsulfide (H₂S) geur aanwezig is, direct nadat het opgepompt is. Met beluchting van het grondwater is de ‘rotte eieren lucht’ na een aantal uren verdwenen. Aan het grondwater van 45 m-NAP is geen waterstofsulfide geur waargenomen.

De kleur van het grondwater van beide diepten is anders dan de kleur van het Oosterscheldewater. Wanneer het grondwater ter voorbehandeling belucht wordt, krijgt het een bruine kleur en wordt het troebel door de aanwezige hoeveelheid (inmiddels geoxideerd) ijzer in het grondwater. Ook na filtratie, als het ijzer dat in suspensie is uit het grondwater verwijderd is, heeft het grondwater van beide diepten een wat donkerdere kleur dan het Oosterscheldewater, het is dan echter niet meer troebel. In figuur 3.2 is de kleur van het grondwater in vergelijking met Oosterscheldewater te zien.



Figuur 3.2 Kleur van grondwater na voorbehandeling (links 22m – NAP, midden (achter) 45m – NAP rechts Oosterscheldewater)

4. Alg (*Skeletonema costatum*)

4.1 Beschrijving testorganisme

De algensoort die is gebruikt tijdens de bioassay is *Skeletonema costatum*. Deze soort behoort tot de kiezelalgen en karakteristiek voor deze soort is de ketens van cellen die worden gevormd. Algen zijn plantaardige organismen die aan water geboden zijn en aan de basis staan van de voedselketen in zout en zoet water. Net als landplanten nemen ze CO₂ op en met behulp van licht maken ze nieuw celmateriaal. De groei wordt onder andere bepaald door de beschikbaarheid van stikstof, fosfaat en voor sommige algen ook silicaat (kiezelalgen). *Skeletonema* wordt binnen de Zeeuwse aquacultuur gekweekt als voer voor schelpdieren zoals de mossel, oester en tapijtscHELP.

4.2 Methode alg

De bioassay voor algen is uitgevoerd conform het protocol 'Water Quality - Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricornutum*' (NEN-EN-ISO 10253, 2006).

Met een *Skeletonema costatum* ent afkomstig van de hatchery van het Roem van Yerseke is een stockcultuur in Oosterscheldewater opgezet. Vervolgens is de stockcultuur een keer overgeënt naar een nieuwe stock. De volgende stap is het aanmaken van een verdunningsreeks volgens onderstaande tabel.

Tabel 4.1 De gebruikte verdunningsreeks bij de algenbioassay.

| | Oosterscheldewater | Grondwater |
|------------|--------------------|------------|
| Blanco | 100% | 0% |
| 90-10 | 90% | 10% |
| 50-50 | 50% | 50% |
| 0-100 | 0% | 100% |
| 0-100 Onv. | 0% | 100% |

Om het water te steriliseren is het blanco test water (Oosterscheldewater) voor gebruik geautoclaveerd. Voor het grondwater is dit niet gedaan om te voorkomen dat de samenstelling van het water mogelijk verandert. Het grondwater is gefiltreerd door een 0,45 µm kaarsfilter. Alle gebruikte materialen, zoals erlenmeyers, luchtslangen en glazen pipetten zijn voor gebruik geautoclaveerd om besmettingen te voorkomen.

Het water met de menging 0-100 Onv. is niet verrijkt met een medium. In het grondwater zitten van nature voor algengroei benodigde nutriënten als stikstof, fosfor en silicium (zie hoofdstuk 3 grondwaterkarakteristieken). Door het water bij deze test niet te verrijken kan worden getest of er genoeg nutriënten aanwezig zijn om een goede groei van algen te realiseren. Alle andere mengingen (inclusief 100% grondwater) in de verdunningsreeks zijn verrijkt met het Walne medium. Dit medium I is een regulier medium bij de kweek van zoutwateralgen.

Nadat alle erlenmeyers zijn gevuld met 100 ml water volgens de verdunningsreeks zijn ze geënt met algen. Hiervoor is eerst de stockcultuur geteld om de juiste hoeveelheid algen toe te kunnen voegen aan de erlenmeyers. De algentest is 2x uitgevoerd. De eerste keer met grondwater van -45 m en de tweede keer met -22 meter. Beide keren is Oosterschelde water als blanco gebruikt. Bij de eerste test met -45 meter water, zijn twee blanco's met verschillende beginconcentraties gebruikt, resp. 10.000 en 100.000 cellen per ml. Alle andere behandelingen hadden een startconcentratie van 10.000 cellen per ml. De twee verschillende blanco's zijn gebruikt om na te gaan of er een verschil optreedt in specifieke groeisnelheid afhankelijk van de beginconcentratie aan algen. Het tellen van lage dichtheden aan algen (10.000 cellen per ml) is methodisch bewerkelijker dan bij hogere dichtheden. Om bij lage dichtheden aan algen, de dichtheden betrouwbaar te kunnen bepalen in microscopische telkamers moet het monster ingedikt (gecentrifugeerd) worden. Uit de resultaten van blanco's met verschillende startalgendichtheden bleek er geen verschil te zijn in specifieke groeisnelheid. Er is daarom gekozen om in alle vervolgtesten te beginnen met een startconcentratie van 100.000 cellen per ml.

Iedere erlenmeyer is belucht met behulp van een glazen pipet en de erlenmeyers zijn afgesloten met behulp van watten en aluminiumfolie. De enting met algen in de erlenmeyers is het startmoment van de tests. De erlenmeyers zijn in een incubator geplaatst met continue belichting en een constante temperatuur van 20°C. Duur van de tests was 72 uur en iedere 24 uur is de algendichtheid geteld. Met behulp van deze tellingen kan de specifieke groeisnelheid worden berekend en kan vervolgens ook de remming van de algengroei worden berekend.

Voor het berekenen van de specifieke groeisnelheid, μ , is de volgende formule gebruikt:

$$\mu = \frac{\ln N_L - \ln N_0}{t_L - t_0}$$

Waarbij:

t_0 = Tijd bij het begin van de proef

t_L = Tijd bij het beëindigen van de proef

N_0 = De algconcentratie bij het begin van de proef

N_L = De algconcentratie bij het beëindigen van de proef

Het percentage groeiremming is berekend middels de formule:

$$I_{\mu_i} = \frac{\bar{\mu}_c - \mu_i}{\bar{\mu}_c} \times 100$$

Waarbij:

I_{μ_i} = Percentage groeiremming

μ_i = Specifieke groeisnelheid van behandeling i

μ_c = Specifieke groeisnelheid van de blanco

De test wordt als valide beschouwd wanneer voldaan wordt aan de volgende voorwaarde:

- De specifieke groeisnelheid van de blanco is minimaal 0,9 per dag.
- Het verschil tussen de replica's van de blanco is niet meer dan 7%.

Tabel 4.2 Karakteristieken van de algen test

| | |
|----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Test organisme | <i>Skeletonema costatum</i> |
| Leverancier test organisme | Hatchery Roem van Yerseke |
| Levensfase test organisme | Exponentiele groei |
| Test water | Grondwater Kustlab 22m – NAP voorbehandeld Grondwater Kustlab 22m – NAP niet voorbehandeld Grondwater Kustlab 45m – NAP voorbehandeld |
| Blanco | Oosterscheldewater |
| Testduur | 72 uur |
| Test opzet | 300ml erlenmeyers |
| Volume test oplossing | 100 ml |
| Aantal organismen per bekersglas | Beginconcentratie 0,1*10 ⁶ cellen/ml |
| Replica's | 3x, blanco 6x |
| Doel | Groei en groeiremming |
| Test temperatuur | 20°C |
| Verdunningswater | Oosterscheldewater |
| Licht periode | Continu (24 uur per etmaal) |
| Luchtoevoer | Beluchting middels glazen pipet |
| Testprotocol | NEN EN ISO 10253:2006 Water Quality - Marine algal growth inhibition test with <i>Skeletonema costatum</i> and <i>Phaeodactylum tricornutum</i> . |

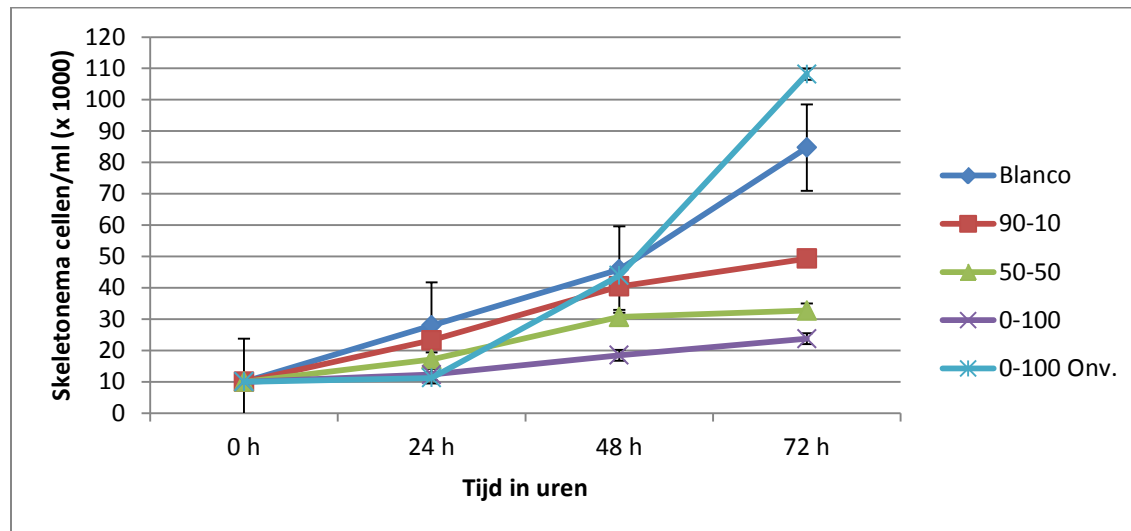
4.3 Resultaten algentest

De resultaten van de validiteit van de tests met algen zijn weergegeven in tabel 4.3.

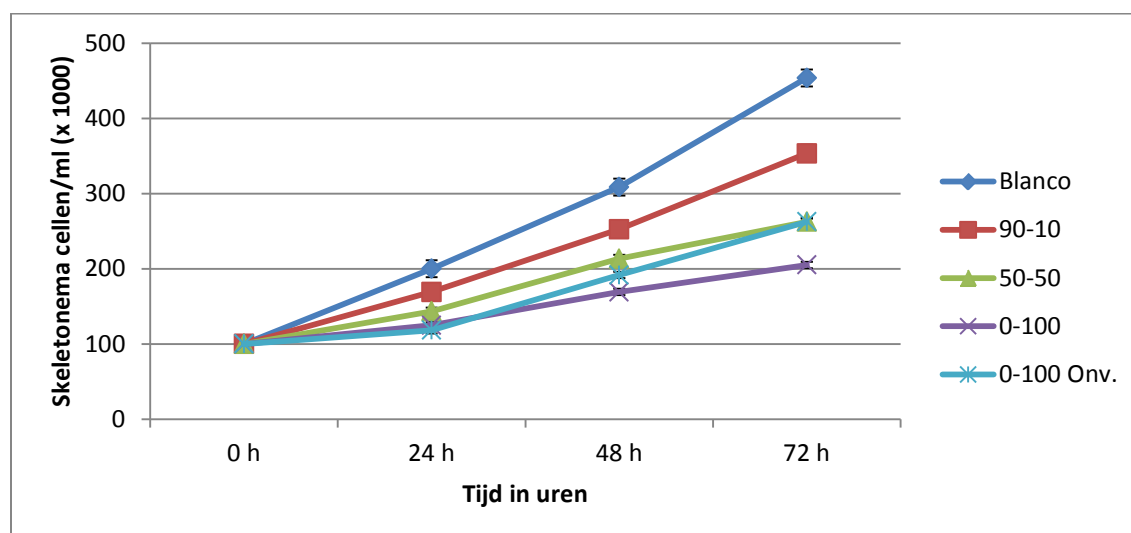
Tabel 4.3 De validiteit van de algentest

| | Eis | Behaald |
|--------------------------|-----|---------|
| Specifieke groeisnelheid | 0,9 | 0,71 |
| Afwijking blanco | 7% | 6,6% |

De vereiste specifieke groeisnelheid van 0,9 % per dag is niet behaald. Een mogelijke oorzaak voor die lagere groeisnelheid kan liggen in de duur van de proef. De algencultuur kwam langzaam op gang en dat resulteert in een lagere gemiddelde specifieke groeisnelheid. De verwachting is dat wanneer de proef langer had doorlopen de specifieke groeisnelheid wel op de vereiste 0,9% /dag was uitgekomen.

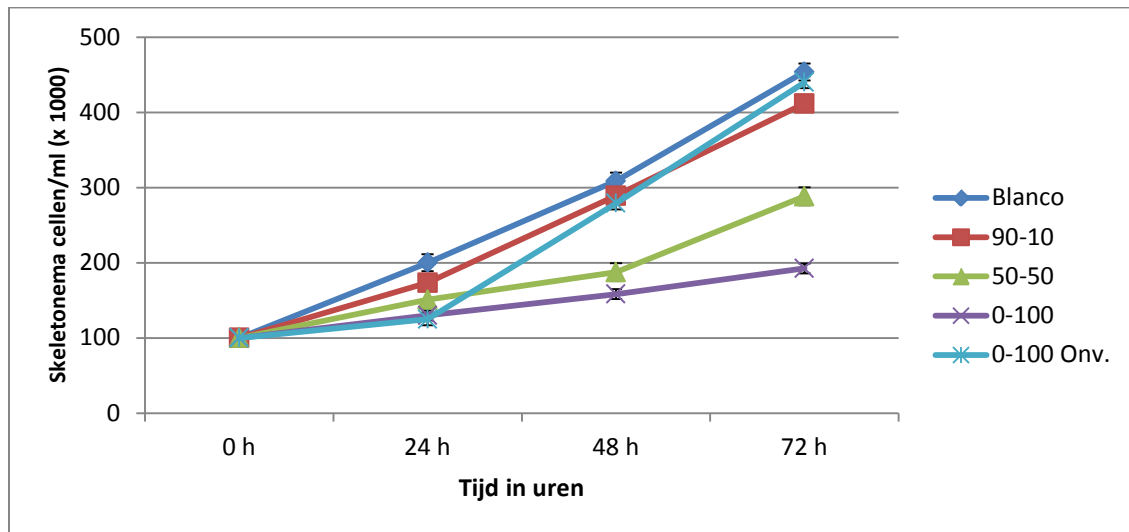


Figuur 4.1 Concentratie van *Skeletonema* op voorbehandeld grondwater Kustlab van 45m – NAP, waarbij de blanco Oosterscheldewater is. De codering in de legenda betekent het volgende; het eerste getal staat voor het percentage Oosterscheldewater in de behandeling, het tweede getal is het percentage grondwater. Onv. staat voor onverrijkt.



Figuur 4.2 Concentratie van *Skeletonema* op voorbehandeld grondwater Kustlab van 22m – NAP, waarbij de blanco Oosterscheldewater is. De codering in de legenda betekent het volgende; het eerste getal staat

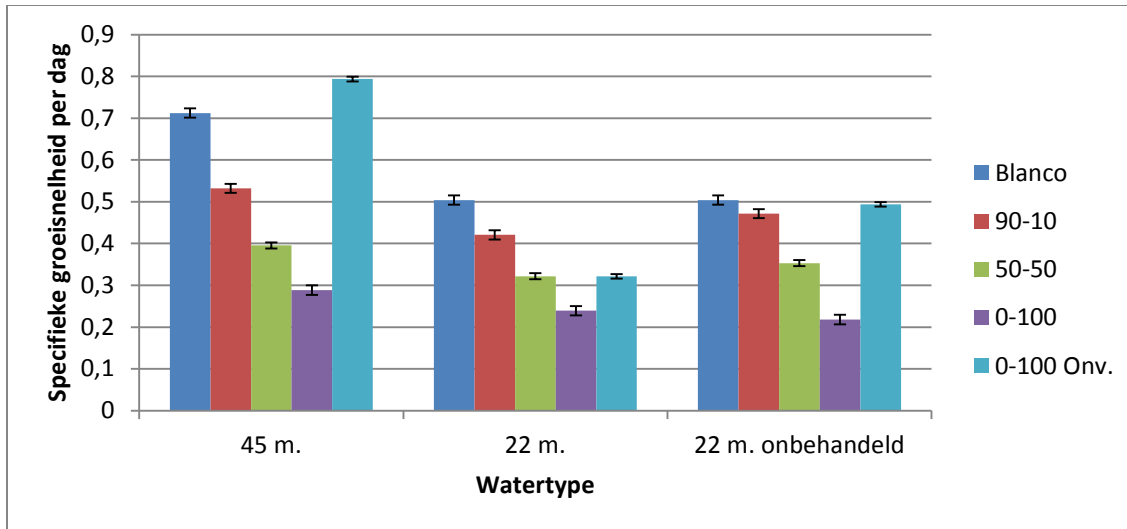
voor het percentage Oosterscheldewater in de behandeling, het tweede getal is het percentage grondwater. Onv. staat voor onverrijkt.



Figuur 4.3 Concentratie van Skeletonema op onbehandeld grondwater Kustlab van 22m – NAP, waarbij de blanco Oosterscheldewater is. De codering in de legenda betekent het volgende; het eerste getal staat voor het percentage Oosterscheldewater in de behandeling, het tweede getal is het percentage grondwater. Onv. staat voor onverrijkt.

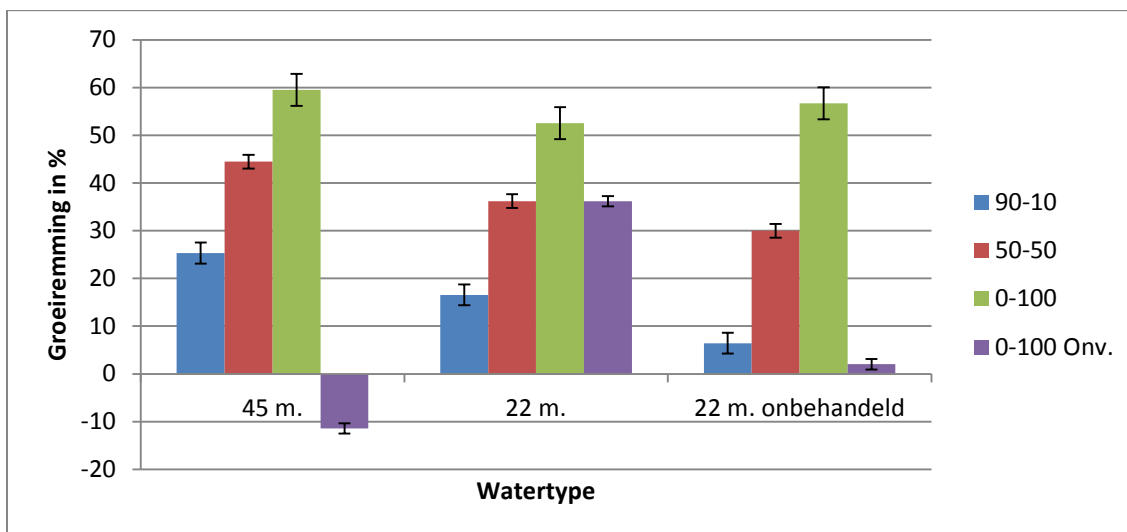
De figuren 4.1 – 4.3 laten zien dat de algen in iedere behandeling groei vertonen. Het lijkt er op dat niet in alle behandelingen de algencultuur de exponentiele fase heeft bereikt. De behandelingen met een groter aandeel grondwater bereiken over het algemeen een lagere concentratie algen na 3 dagen. Uitzondering hierop is de onverrijkte cultuur met 100% grondwater. De algencultuur in grondwater van -45 m. bereikt hogere dichtheden dan de blanco. De onverrijkte cultuur in onbehandeld water van -22 m. is vrijwel gelijk aan die in de blanco. Wat verder opvalt is de ontwikkeling van de algenlijn van behandeling 0-100 Onv. een ander patroon heeft. De cultuur lijkt later in de exponentiele fase te komen dan de blanco.

Nadat de concentraties iedere 24 uur zijn bepaald is het mogelijk om de specifieke groeisnelheid te berekenen. De specifieke groeisnelheid is weergegeven in figuur 4.4.



Figuur 4.4 De specifieke groeisnelheid van *Skeletonema* per watertype en behandeling met als blanco Oosterscheldewater. De codering in de legenda betekent het volgende; het eerste getal staat voor het percentage Oosterscheldewater in de behandeling, het tweede getal is het percentage grondwater. Onv. staat voor onverrijkt.

Wat opvalt in figuur 4.4. is het verschil in specifieke groeisnelheid bij de blanco's in de test met -45 meter en de daaropvolgende test met -22 meter water. De algen groeien in het algemeen beter in de test met het grondwater van -45 m. Dit is niet alleen te zien bij de blanco, maar bij alle behandelingen. De test met het grondwater van -45 m. heeft een week eerder plaatsgevonden dan de test met grondwater van -22 m. De testen met grondwater van -22 m. onbehandeld en wel behandeld hebben tegelijkertijd plaatsgevonden. Een tweede punt dat opvalt bij de specifieke groeisnelheid is dat de hoogste groeisnelheid is gemeten op de behandeling 0-100 Onv. met grondwater van -45 m. Het derde dat opvalt is het verschil in specifieke groeisnelheid tussen -22 m. onbehandeld en wel behandeld. Verwacht was dat de behandeling de groei zou bevorderen, maar dit blijkt niet het geval.



Figuur 4.5 De remming van de groei in percentage weergegeven ten opzichte van de blanco. De codering in de legenda betekent het volgende; het eerste getal staat voor het percentage Oosterscheldewater in de behandeling, het tweede getal is het percentage grondwater. Onv. staat voor onverrijkt.

In figuur 4.5 wordt het % groeiremming in de verschillende behandelingen t.o.v. de blanco Oosterscheldewater weergegeven. Wat direct opvalt, is dat er geen groeiremming is bij de behandeling 0-100 Onv. met -45 m. grondwater. Wat ook opvalt is dat de groeiremming toeneemt als het percentage grondwater toeneemt. Dit geldt

echter niet wanneer de behandeling niet verrijkt wordt, bij deze behandelingen is de groeiremming minder of niet opgetreden. Een ander opvallend punt is het verschil in groeiremming tussen het grondwater van -22m. voorbehandeld en niet voorbehandeld bij de behandeling van 100% grondwater dat niet is verrijkt.

4.4 Conclusie alg

Bij iedere behandeling is er groei van algen opgetreden. Er is wel een groot verschil in de specifieke groeisnelheid tussen de verschillende behandelingen waargenomen. De berekende specifieke groeisnelheden liggen tussen 0,2 en 0,8 % per dag. Zowel het grondwater van -45m. en -22m. lijkt geschikt voor de kweek van algen. De specifieke groeisnelheid van de algen gekweekt op grondwater van -45m. voorbehandeld en niet verrijkt is 0,8. Dit is hoger dan de blanco. De algen gekweekt op grondwater van -22m. niet voorbehandeld en niet verrijkt laat een specifieke groeisnelheid zien van 0,49. Dit is vrijwel gelijk aan de specifieke groeisnelheid van 0,5 van de blanco. Ook hier is geen groeiremming te zien.

Er is wel een duidelijk verschil waarneembaar tussen het grondwater van -22m dat is voorbehandeld en dat niet is voorbehandeld. De groeiremming van het voorbehandelde grondwater bedraagt 36% ten opzichte van de blanco. Bij niet voorbehandelde grondwater treedt nauwelijks groeiremming op.

4.5 Discussie alg

Er is een verschil opgetreden tussen groei in de blanco van de test met grondwater van 45m -NAP en groei in de blanco van de test met grondwater van 22m -NAP. In beide gevallen betreft het gebruikte water Oosterscheldewater en was de startconcentratie gelijk met 100.000 cellen per ml. Ook andere factoren zoals lichtintensiteit, temperatuur en gebruikte medium waren gelijk bij de behandelingen. Toch is er een aanzienlijk verschil te zien tussen de twee blanco's. De oorzaak van dit verschil moet liggen in het gebruikte water of in de gebruikte algenstock. Het Oosterscheldewater tijdens de tweede test (-22m.) was een week ouder dan tijdens de eerste test (-45 m.). Dit kan mogelijk invloed hebben gehad op de samenstelling van het Oosterscheldewater. Ook de algenstock was een week ouder tijdens de tweede test. De algenstock is tussen de eerste en tweede test nog wel een keer overgeënt om de cultuur in de in de exponentiele fase te houden.. Aan het begin van de twee testen had de stockcultuur een vergelijkbare concentratie van rond de $6,5 \cdot 10^6$ cellen/ml. Aan het eind van de testen is de stockcultuur ingestort, dit kan aanwijzing zijn voor verschil in conditie van de algen bij aanvang van de bioassays.

Er is een verschil in groei waargenomen tussen het wél en niet voorbehandelde grondwater van 22m –NAP. De algen groeiden beter op het onbehandelde grondwater. De oorzaak van dit verschil ligt waarschijnlijk in de samenstelling van het water. De concentraties Fe, PO_4^{3-} en SiO_2 zijn hoger bij het onbehandelde grondwater. Deze drie elementen zijn essentieel voor de groei van algen.

Het verschil tussen de behandelingen met grondwater die verrijkt zijn en niet verrijkt zijn kan ook veroorzaakt zijn door een verschil in watersamenstelling. De nutriënten die al van oorsprong aanwezig zijn in het grondwater zijn waarschijnlijk al voldoende voor optimale groei van algen. Wanneer dit water wordt verrijkt met het Walne medium is de specifieke groeisnelheid aanzienlijk lager. Mogelijk heeft de verrijking een overvloed aan nutriënten veroorzaakt, waardoor de overgang van de algencellen van relatief voedselarm naar voedselrijk medium een stress reactie bij de algen heeft gegeven in de vorm van een tijdelijke vertraging van de groeisnelheid, Het is goed mogelijk dat de de groeisnelheid weer bijtrekt maar dit is niet waargenomen in deze test met een duur van 72 uur.

Skeletonema laat in alle grondwatermonsters een goede groei zien gedurende 72 uur, de verwachting is dat deze groei ook in de periode na 72 uur blijft bestaan. Met deze test kan wel een uitspraak gedaan worden over de eventuele negatieve effecten van grondwater, maar echter geen voorspelling gegeven worden van de maximale algenproductie in onbehandeld en onverrijkt grondwater. Een vervolgttest met als doel de productiecapaciteit kan hierin inzicht geven.

4.6. Alg (*Skeletonema costatum*) Ecofide

Door Ecofide is een groeiproef met de verschillende typen water uitgevoerd met *Skeletonema costatum* middels een andere methode. De proefopzet, resultaten en uitkomsten van het onderzoek, uitgevoerd door Ecofide zijn uitgebreider gerapporteerd in een separate rapportage van Ecofide (zie bijlage 3 voor de volledige rapportage). De belangrijkste zaken uit die rapportage worden hieronder samengevat.

Een groeiproef met algen is uitgevoerd middels 96-wells platen. De drie grondwatermonsters (22m-NAP voorbehandeld, 22m-NAP niet voorbehandeld en 45m-NAP voorbehandeld) en Oosterscheldewater zijn zowel met als zonder toevoeging van nutriënten getest in een verdunningsreeks. Voor de testen waarbij nutriënten zijn toegevoegd is een additionele verdunningsreeks gemaakt.

Tabel 4.4 Uitkomst groeiproef *Skeletonema costatum*, door Ecofide (specifieke groeisnelheid per dag)

| | Zonder toevoeging van nutriënten | | Met toevoeging van nutriënten | |
|------------------|----------------------------------|-------|-------------------------------|-------|
| | Gemiddelde | Stdev | Gemiddelde | Stdev |
| Blanco zeewater | 0,00 | 0,000 | 1,50 | 0,080 |
| -22m | | | | |
| 5 vol% | 0,59 | 0,054 | 1,44 | 0,066 |
| 6.25 vol% | - | | 1,51 | 0,031 |
| 10 vol% | 0,71 | 0,231 | 1,47 | 0,050 |
| 12,5 vol% | - | | 1,50 | 0,027 |
| 20 vol% | 1,02 | 0,033 | 1,50 | 0,071 |
| 25 vol% | - | | 1,44 | 0,062 |
| 40 vol% | 1,11 | 0,113 | 1,43 | 0,108 |
| 50 vol% | - | | 1,41 | 0,060 |
| 80 vol% | 1,36 | 0,027 | 1,34 | 0,049 |
| 100 vol% | - | | 1,24 | 0,099 |
| -22m onbehandeld | | | | |
| 5 vol% | 0,76 | 0,108 | 1,37 | 0,095 |
| 6.25 vol% | - | | 1,48 | 0,056 |
| 10 vol% | 1,01 | 0,031 | 1,36 | 0,017 |
| 12,5 vol% | - | | 1,43 | 0,027 |
| 20 vol% | 1,11 | 0,033 | 1,37 | 0,086 |
| 25 vol% | - | | 1,34 | 0,055 |
| 40 vol% | 1,28 | 0,082 | 1,32 | 0,043 |
| 50 vol% | - | | 1,37 | 0,086 |
| 80 vol% | 1,44 | 0,049 | 1,15 | 0,021 |
| 100 vol% | - | | 1,06 | 0,053 |
| -45m | | | | |
| 5 vol% | 0,05 | 0,12 | 1,48 | 0,049 |
| 6.25 vol% | - | | 1,45 | 0,052 |
| 10 vol% | 0,10 | 0,11 | 1,44 | 0,034 |
| 12,5 vol% | - | | 1,47 | 0,024 |
| 20 vol% | 0,00 | 0,00 | 1,49 | 0,087 |
| 25 vol% | - | | 1,44 | 0,110 |
| 40 vol% | 0,00 | 0,00 | 1,35 | 0,187 |
| 50 vol% | - | | 1,13 | 0,069 |
| 80 vol% | 0,00 | 0,00 | 0,70 | 0,190 |
| 100 vol% | - | | 0,26 | 0,227 |

Zonder toevoeging van nutriënten

In de blanco (Oosterscheldewater) zonder toevoeging van nutriënten is geen groei van de alg waargenomen door gebrek aan nutriënten. De beide grondwatermonsters van 22m-NAP lijken het gebrek aan nutriënten op te heffen. In dit grondwater (zonder toevoeging van nutriënten) neemt de groeisnelheid namelijk toe met een toenemende concentratie grondwater. De hoogst geteste concentratie (80%) komt redelijk in de buurt van de (met nutriënten verrijkte) controle groei op Oosterschelde water. In het grondwater van 45m-NAP vindt dit effect niet plaats, bij een toenemende concentratie grondwater van 45m –NAP neemt de groeisnelheid af. Bij een concentratie van 20% en hoger, treedt geheel geen groei op.

Met toevoeging van nutriënten

Met de toevoeging van nutriënten vertoont de alg een goede groei in Oosterscheldewater en de verdunningen met lage concentraties aan grondwater. Bij een hogere concentratie grondwater treedt groeiremming op, in grondwater van 22m-NAP tot een maximum van ca. 30% groeiremming. In grondwater van 45m-NAP is de groeiremming meer dan 80%.

Vergelijk uitkomsten onderzoek Ecofide en HZ

Voor het grondwater van 22m-NAP komen de uitkomsten van beide onderzoeken op hoofdlijnen overeen. Uit beide onderzoeken komt naar voren dat het grondwater van 22m-NAP (onverdund en niet verrijkt met nutriënten) geschikt is voor het kweken van algen. Voor het grondwater van 45m-NAP is er echter een verschil in uitkomst tussen de twee onderzoeken. Op basis van het onderzoek van de HZ lijkt het grondwater van 45m-NAP geschikt voor algenkweek, op basis het onderzoek van Ecofide lijkt het grondwater van 45m-NAP niet geschikt voor het kweken van algen.

5. Mosselen en Tapijtschelpen (*Mytilus edulis* en *Tapes philippinarum*)

5.1 Beschrijving testorganismen

Twee soorten schelpdieren, *Mytilus edulis* en *Tapes philippinarum*, zijn ingezet als testsoorten voor bioassays voor het testen van de grondwatergeschiktheid voor de kweek in het project Kustlaboratorium. Beide soorten zijn weekdieren, behorend tot de klasse tweekleppigen en beide soorten zijn filter feeders, dat wil zeggen dat ze hun voedsel, met name algen, uit het water filtreren. Daardoor behoren ze tot de primaire consumenten. *Mytilus edulis*, de blauwe mossel, is een welbekende soort in de Zeeuwse aquacultuur. *Tapes philippinarum*, de tapijtschelp, is relatief nieuw, maar wordt al bij verschillende bedrijven gekweekt als een economisch interessant alternatief voor de kokkel.

5.2 Methode

De bioassay voor deze schelpdieren is opgesplitst in twee delen: een 28 daagse groeiproef met schelpdierbroed en een 5 daagse filtratieproef met halfwas dieren.

Groeiproef

Twee dagen voorafgaand aan de inzet van de bioassays zijn mosselzaad (± 12 mm), afkomstig van hangcultuur kwekerij Neeltje Jans en tapijtschelpenbroed (± 3 mm), afkomstig uit hatchery Roem van Yerseke, in Oosterscheldewater op de juiste temperatuur geacclimatiseerd: 16°C voor het mosselzaad en 20°C voor tapijtschelpenbroed.

Op dag 0 (21 nov 2011) is een triplo van ieder 3,0 ($\pm 0,1$) gram schelpdieren in 1 liter emmers in het te testen grondwater gedaan, met een blanco triplo op Oosterschelde water. Alle behandelingen zijn belucht.

Het water werd 3x per week verversd en de schelpdieren zijn 2x daags (m.u.v. de weekenden) gevoerd met een mengsel van *Cheatoceros muelleri* en *Isochrysis galbana*, volgens een voedingsratio van 0.04 op basis van de berekening in Helm et al., 2004.

Bij de bioassays met mosselzaad is de mortaliteit bijgehouden en zijn dode individuen uit de opstelling verwijderd. Wekelijks (op dag 7, 14, 21 en 28) is het uitgelekt natgewicht gemeten. Mortaliteit, pH, saliniteit, temperatuur en zuurstofgehalte zijn 2x per week gemonitord ter controle.

De specifieke groeisnelheid (SGR) in percentage natgewicht per dag werd bepaald door de formule:

$$SGR = \frac{\ln\left(\frac{W_0}{W_t}\right)}{t} \times 100\%$$

waarin W het totaal nat gewicht is (incl. schelp) op dag 0 en dag t en t de tijdsduur in dagen.

De groeiproef moet aan de volgende randvoorwaarden voldoen om als valide aangemerkt te worden: saliniteit tussen 30 en 35 g/l, pH tussen 7,8 en 8,5, zuurstof > 60% verzadiging en temperatuur niet meer dan +/- 1°C afwijken ten opzichte van de ingestelde waarde.

Filtratieproef

Halfwas mosselen afkomstig uit een doorstroomsysteem van Stichting Zeeschelp en halfwas tapijtschelpen afkomstig uit de vijvers van Zeeland Aquacultuur zijn op respectievelijk 16 °C en op 13°C geacclimatiseerd in Oosterscheldewater. De filtratie proeven van mosselen en tapijtschelpen zijn niet parallel uitgevoerd.

Op dag 0 (16 jan 2012 voor mosselen en 30 jan 2012 voor tapijtschelpen) is een triplo van ieder 10 mosselen en respectievelijk 11 tapijtschelpen (totaal natgewicht mosselen incl. schelp 79,3 \pm 3,9 gram) en totaal natgewicht tapijtschelpen incl. schelp (29,9 \pm 0,7 gram) in 5 liter emmers in het te testen grondwater ingezet, met een blanco triplo op Oosterscheldewater.

Alle behandelingen zijn belucht en stonden in het donker om algengroei in de behandelingen te voorkomen. Het water is gedurende deze vijfdaagse test 1 maal verversd. Dagelijks zijn op tijdstip t=0 algen *Cheatoceros muelleri* toegevoegd tot een concentratie van 150.000 cellen/ml en geteld met de Z1 Coulter counter. Op t = 24 (t in uren) is de resterende concentratie algen gemeten.

Tabel 5.1 Karakteristieken van de schelpdiergroei-test

| | |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Test organisme | <i>Mytilus edulis en Tapes philippinarum</i> |
| Leverancier test organisme | Zeeuwse Mossel hangcultuur en Hatchery Roem van Yerseke |
| Levensfase test organisme | Mosselzaad en tapijtschelpenbroed |
| Test water | Grondwater Kustlab 22m – NAP voorbehandeld Grondwater Kustlab 22m – NAP niet voorbehandeld Grondwater Kustlab 45m – NAP voorbehandeld |
| Blanco | Oosterscheldewater |
| Testduur | 28 dagen |
| Test opzet | 1 liter emmers |
| Volume test oplossing | 1 liter |
| Aantal organismen per behandeling | 3 gram voor mosselzaad (12-13 ind) en 3 gram tapijtschelpenbroed (ong.270 ind) |
| Replica's | 3 |
| Doel | Groei en mortaliteit |
| Test temperatuur | 16°C voor mosselzaad en 20°C voor tapijtschelpenbroed |
| Verdunningswater | n.v.t. |
| Licht periode | Continu voor groei-proef |
| Luchttoevoer | Beluchting middels glazen pipetten |
| Test protocol | Ontwikkeld door HZ i.s.m. Stichting Zeeschelp |

Tabel 5.2 Karakteristieken van de schelpdierfiltratietest

| | |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Test organisme | <i>Mytilus edulis en Tapes philippinarum</i> |
| Leverancier test organisme | Stichting Zeeschelp en Zeeland Aquacultuur |
| Levensfase test organisme | Halfwas mosselen en tapijtschelpen voor filtratieproef |
| Test water | Grondwater Kustlab 22m – NAP voorbehandeld Grondwater Kustlab 22m – NAP niet voorbehandeld Grondwater Kustlab 45m – NAP voorbehandeld |
| Blanco | Oosterscheldewater |
| Testduur | 5 dagen, waarvan 4 filtratie metingen |
| Test opzet | 5 liter emmers |
| Volume test oplossing | 5 liter |
| Aantal organismen per behandeling | 10 halfwasmosselen en 11 halfwastapijtschelpen |
| Replica's | 3 |
| Doel | filtratiemeting |
| Test temperatuur | 16°C voor halfwasmosselen 13°C voor halfwas tapijtschelpen |
| Verdunningswater | n.v.t. |
| Licht periode | Geen lichtperiode |
| Luchttoevoer | Beluchting middels bruisballen |
| Test protocol | Ontwikkeld door HZ i.s.m. Stichting Zeeschelp |

5.3 Resultaten groeiproef

De gemeten waarden van de gestelde waterkwaliteitsparameters (zie tabel 5.3) geven aan dat ze binnen de gestelde range vallen, wat wil zeggen dat de test goed verlopen is.

Tabel 5.3 Monitoring waterkwaliteit tijdens groeiproef

| Parameter | Grenzen | Gemeten minimum | Gemeten maximum |
|-------------------------------|-----------|----------------------|-----------------|
| Saliniteit g/l | 30-35 | OS: 33,8 KL: 32,8 | 34,0 32,9 |
| Zuurstofgehalte % verzadiging | >60% | 82 | 86 |
| pH | 7.8 - 8.5 | 7.9 | 8.3 |
| Temperatuur mosselzaad °C | 15 - 17 | 16,2 | 16,9 |
| Temperatuur tapijtschelpen °C | 19 - 21 | 20,3 | 21 |

Direct na de start van de groeiproeven vond er verminderde tot vrijwel geen filtratie plaats in de behandelingen met grondwater van -45m, voor zowel mosselen als tapijtschelpen, zie figuur 5.1. Binnen een week na de start van de proeven waren vrijwel alle individuen in deze behandeling dood (zie ook tabel 5.4) en zijn dientengevolge niet meegenomen in de groeiresultaten.

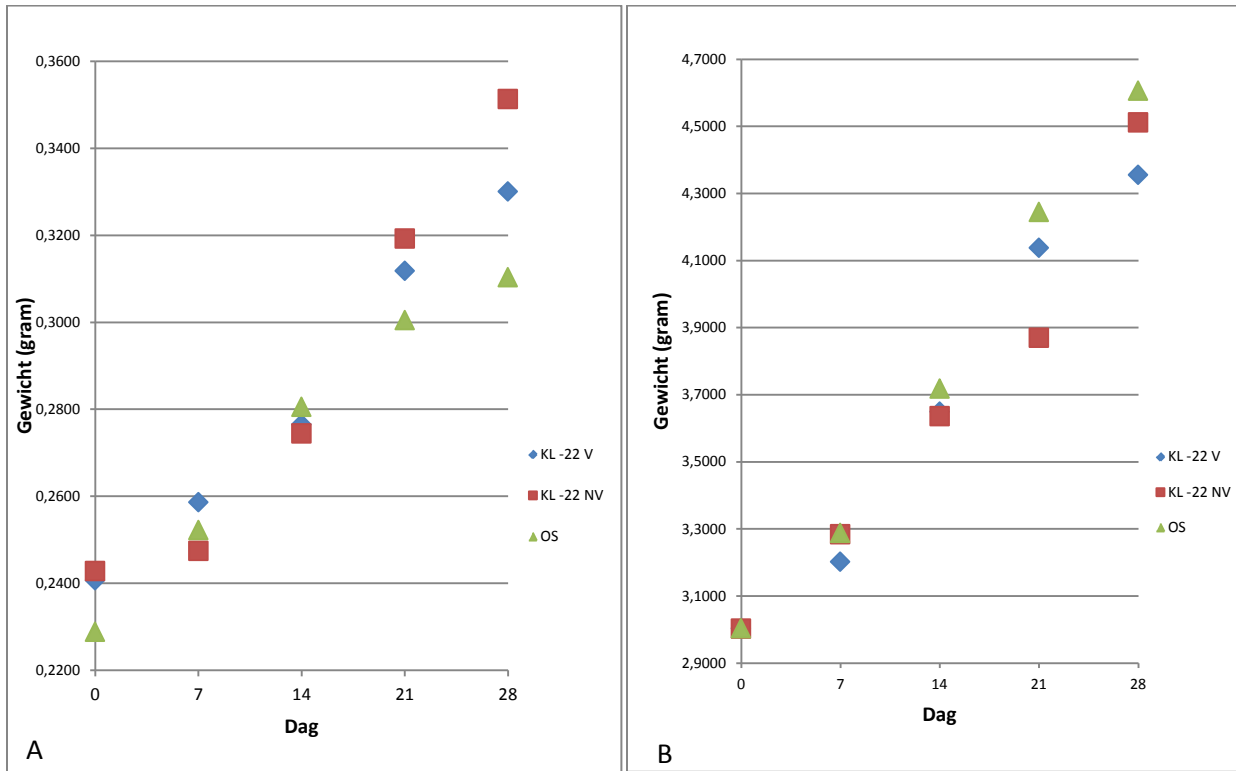


Figuur 5.1 Opstelling groeiproef tapijtschelpenbroed. Van links naar rechts: triplo -22mV, triplo -22mNV, triplo -45mV (de donkere kleur in deze behandelingen komt door niet gefiltreerde algen door het tapijtschelpenbroed) en triplo Oosterscheldewater als blanco.

Tabel 5.4 Het gemiddelde aantal levende individuen in de triplo behandelingen van de groeiproef met mosselzaad op dag 0, 7, 14, 21 en 28.

| Behandeling | Start (n) | Overleving (n) | | | | Totale mortaliteit |
|-------------|-----------|----------------|--------|--------|--------|--------------------|
| | dag 0 | dag 7 | dag 14 | dag 21 | dag 28 | % |
| OS | 39 | 36 | 36 | 36 | 33 | 15 |
| KL -22 NV | 36 | 33 | 30 | 30 | 9 | 25 |
| KL -22 V | 39 | 36 | 36 | 33 | 9 | 31 |
| KL -45 V | 36 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |

De mortaliteit in deze test is aan de hoge kant. Andere praktijkresultaten geven een maximale uitval van 10%. In deze testen ligt de mortaliteit ook in de blanco boven dit percentage.

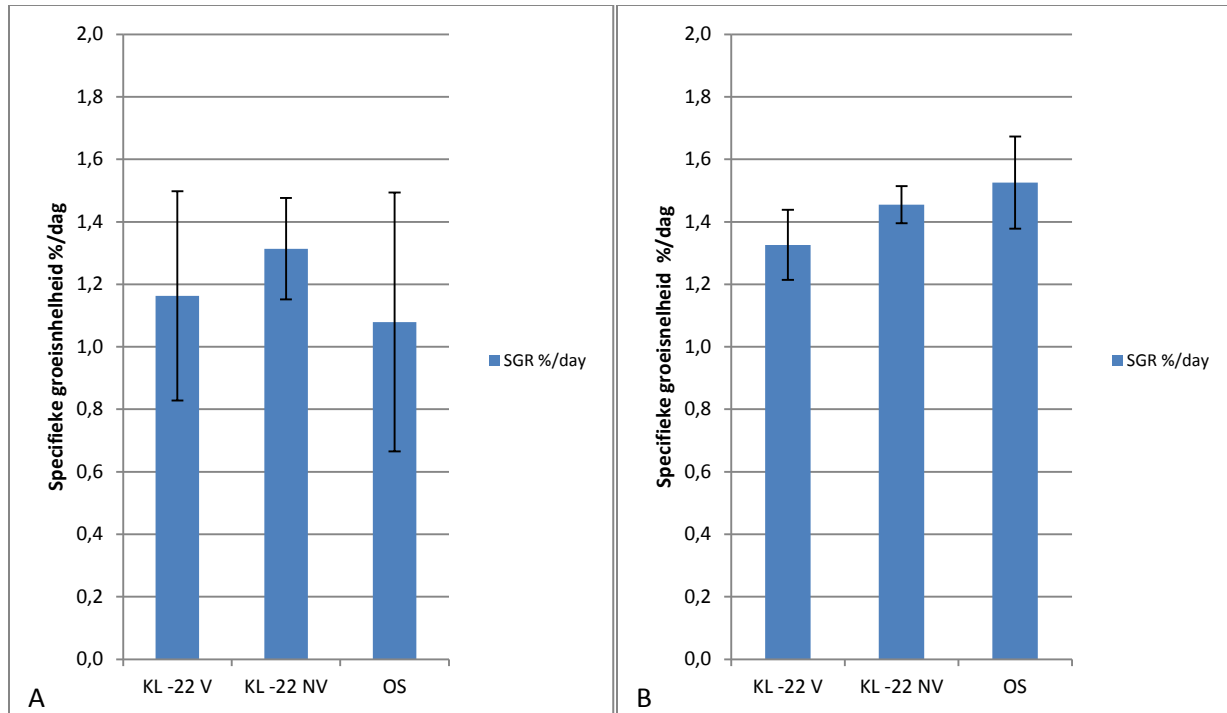


Figuur 4.2A en B.

A) Gewichtstoename van het mosselzaad over 28 dagen, gecorrigeerd voor mortaliteit, n=3.

B) Gemiddelde totale gewichtstoename over 28 dagen van tapijtschelpenbroed per behandeling, n=3

Beide grafieken van mosselzaad en tapijtschelpenbroed tonen een constante en vergelijkbare groei van zowel -22m als van de blanco in Oosterscheldewater, beide tot anderhalf keer gewichtstoename over 28 dagen. De groei op grondwater van -45m, is nul.



Figuur 5.3A en B Specifieke groeisnelheid van respectievelijk mosselzaad en tapijtschelpenbroed uitgedrukt in percentage natgewicht inclusief schelp per dag, n=3 .

Tussen de behandelingen van mosselzaad onderling en van tapijtschelpenbroed onderling zijn geen duidelijke verschillen te zien in specifieke groeisnelheid (zie overlappende standaarddeviaties) Het mosselzaad heeft een gemiddelde SGR van 1,1 tot 1,3 %/dag en het tapijtschelpenbroed heeft een iets hogere SGR van 1,3 tot 1,5 %/dag. Deze laatste zou mogelijk nog hoger kunnen liggen omdat er bij het tapijtschelpenbroed niet gecorrigeerd is voor mortaliteit.

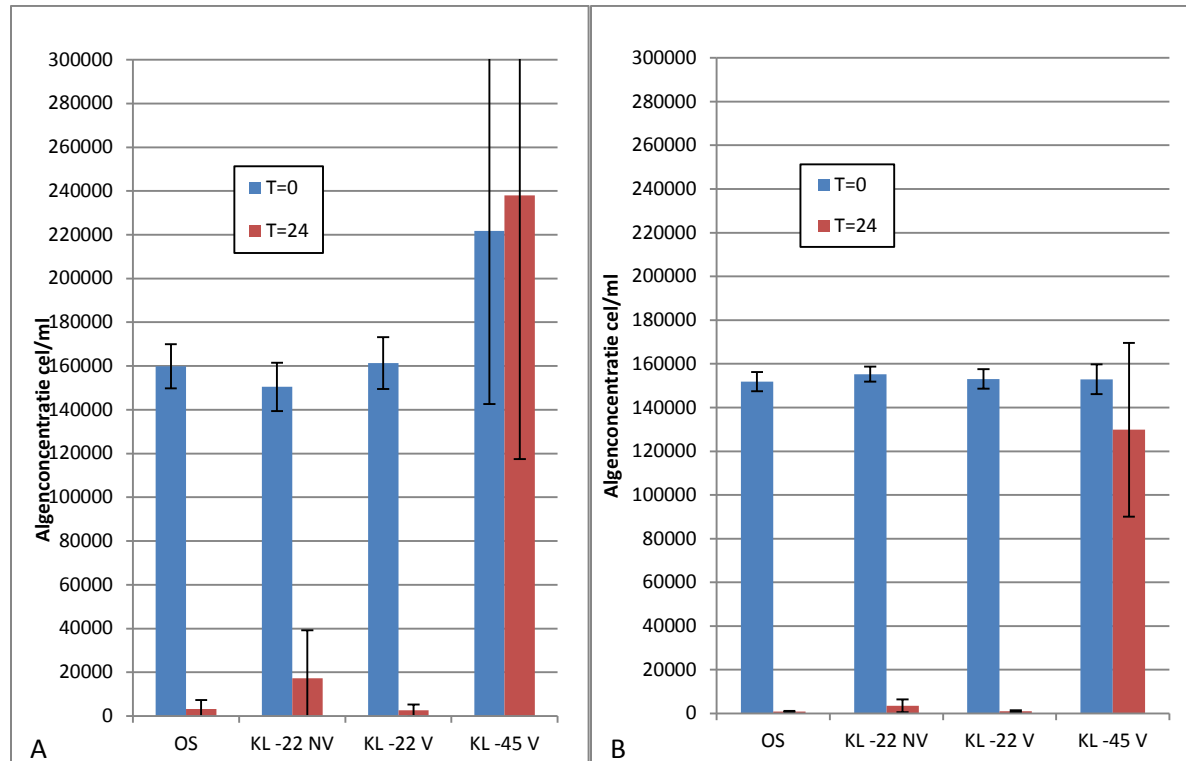
Onderstaand figuur (5.4) geeft nog een bijkomend resultaat van de groeiproef weer. De tapijtschelpen in grondwater van 22 meter diepte (voorbehandeld en niet-voorbehandeld water) zijn binnen 28 dagen duidelijk donkerder van kleur geworden.



Figuur 5.4. Kleur van tapijtschelpenbroed in grondwater van 22m diep van locatie Kustlaboratorium na 28 dagen (rechts op de foto). Links de natuurlijke kleur van de tapijtschelpen uit Oosterscheldewater.

5.4 Resultaten filtratieproef

De filtratieproeven zijn gedaan over een tijdsperiode van 5 dagen, waarin 4 metingen zijn uitgevoerd. Onderstaande grafieken geven de gemiddelde startconcentraties (t=0) en de gemiddelde eindconcentraties aan algen weer (t=24) over deze 4 metingen.



Figuur 5.5 A en B. De algenconcentratie op t=0 (startwaarden tussen de 150- en 160.000 cel/ml) en op t=24 uur, en de daaruit volgende hoeveelheid gefiltreerde algen in de verschillende behandelingen van respectievelijk halfwas mosselen (grafiek A) en halfwas tapijtschelpen (grafiek B). De waarden zijn gemiddelden van 4 replica's in triplo op achtereenvolgende dagen.

Gedurende de filtratietesten is geen mortaliteit waargenomen. In zowel Oosterscheldewater als in voorbehandeld en niet voorbehandeld grondwater op locatie Kustlaboratorium van 22 meter diepte hebben zowel de halfwas mosselen als de halfwas tapijtschelpen vrijwel alle algen uit het water gefiltreerd. De schelpdieren lijken in voorbehandeld grondwater van 22 meter iets beter te filtreren dan in niet-voorbehandeld grondwater. Er zijn vrijwel geen algen afgefilterd door schelpdieren in grondwater van 45 meter diepte.

Opmerkelijk zijn de verhoogde concentraties van deeltjes op t=0 en t=24 bij -45m. De deeltjes die de Coulter counter heeft geteld heeft zijn in dit geval geen algen maar spermacellen van de mosselen geweest. Het water was melkachtig wit geworden en onder de microscoop zijn spermacellen waargenomen. Dit zogenaamde paaien kan duiden op een stressreactie bij de mosselen. Daarnaast was er nog wel in enige mate van filtratie van algen, wat de grote spreiding verklaart.

5.5 Conclusie mossel en tapijtschelp

Het water van 22 meter diepte is geschikt gebleken: de schelpdieren mosselen en tapijtschelpen filtreren en groeien op grondwater van 22 meter (I voorbehandeld en niet-voorbehandeld). Een punt van aandacht is de opgetreden verkleuring van de tapijtschelpen en ook de mate van uitval in de groeioproef met mosselzaad. Dit laatste kan verschillende mogelijke oorzaken hebben: de gebruikte methode of de gezondheid van de testdieren.

Grondwater van 45 meter lijkt ongeschikt voor mosselen en tapijtschelpen. De schelpdieren filtreren niet en binnen 7 dagen waren vrijwel alle schelpdieren dood.

6. Zager (*Nereis virens*)

6.1 Beschrijving testorganisme

De zager behoort tot de borstelwormen en leeft in de zilte bodem in kustgebieden. Het voedsel van de zager bestaat onder andere uit ongewervelden waaronder andere wormsoorten, kleine schelpdieren, detritus en zelfs bepaalde algen- en wiersoorten. Het voedsel waarin de zager geïnteresseerd is, is mede afhankelijk van het levensstadium. De zager heeft dus een divers dieet en is omnivoor/detrivoor/herbivoor. De zager is een bekend product in de Zeeuwse aquacultuur en wordt gebruikt als onder andere visaas voor de zeevisserij en voer voor de teelt van vissen en garnalen. Het zagermateriaal kan worden gebruikt als vervangend materiaal voor vismeel afkomstig uit zeeën, dat wordt gebruikt voor de productie van visvoer.

6.2 Methode zager groeiproef

De bioassay met zagers is uitgevoerd conform het protocol 'Standaardvoorschrift BCI *Nereis virens* sediment in-vivo Bioassay, opgesteld door het RIKZ (Kater *et. al.*, 2000).

De zagers zijn gedurende 28 dagen blootgesteld aan de drie typen grondwater. De toxiciteit van het grondwater is vastgesteld op basis van de mortaliteit en op basis van de groeifactor (op basis van natgewicht). De bioassay is uitgevoerd in vijfvoud.

Om de validiteit van de proef te waarborgen dient aan een aantal eisen te worden voldaan. Er dient te worden voldaan aan eisen met betrekking tot de LC50 van de zagers voor ammonium, maximale mortaliteit in de blanco, minimale groeisnelheid en ranges in temperatuur en saliniteit, om de bioassay geldig te mogen verklaren.

- De kwaliteit van de testorganismen is vastgesteld met ammonium als referentie toxicant. Middels verschillende concentraties aan ammonium is de 96h-LC50 (lethale concentratie voor 50% van de organismen na 96 uur) bepaald. Hiermee is vastgesteld of de zagers in goede conditie verkeren. De LC50 van de testorganismen dient binnen de range van 280 - 1150 mg NH₄⁺ /l te liggen om de test geldig te mogen verklaren.
- De mortaliteit in de blanco moet kleiner dan 5% zijn
- De specifieke groeisnelheid moet groter dan 1,6% per dag zijn.
- De temperatuur van het water gedurende de bioassay dient 15°C te zijn met een maximale afwijking van 2°C. De saliniteit van het water moet tussen 15 en 35 gram per liter liggen. .

De test met het referentietoxicant is een waterfasetest. Bij de groeiproef is een laag sediment toegevoegd in de bekeerglazen zodat de zagers zich kunnen ingraven. Als sediment, is gezeefd (0,5mm) strandzand toegepast. Per replica zijn vijf organismen gebruikt. De groei en mortaliteit van de zagers in grondwater is gerelateerd aan de groei en mortaliteit van de zagers in Oosterscheldewater. Zie figuur 5.1 voor een weergave van de testopzet.

In de test is hetzelfde voer gebruikt als dat in de professionele zager kwekerijen gebruikt wordt (droge pallets, forellenvoer). Drie maal per week is een voer gift gedaan. Per bekeerglas van 5 zagers wordt 50 mg per gift gegeven. Dit is ongeveer 4 tot 5% van het lichaamsgewicht per week. Naarmate de test vordert en de zagers groeien is de hoeveelheid voer opgevoerd. Elke testreeks heeft dezelfde behandeling en dezelfde hoeveelheid voer gekregen. Het water is twee maal per week ververs.

De waterkwaliteit (o saliniteit, zuurstofgehalte, pH en temperatuur) is twee maal per week gemeten. De specifieke groeisnelheid is berekend met de volgende formule:

$$\mu = \ln\left(\frac{W_1}{W_0}\right) * t^{-1}$$

W₀ en W₁ is het gemiddeld individueel natgewicht op respectievelijk het startmoment en het beëindigingsmoment van de test (28 dagen), t is de totale duur van het experiment (in dagen).

Tabel 6.1 Karakteristieken van de zagertest

| | |
|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Test organisme | <i>Nereis virens</i> |
| Leverancier test organisme | Topsy Baits, Wilhelminadorp |
| Levensfase test organisme | Bentisch, tussen 0,5 en 0,9 gram natgewicht |
| Test water | Grondwater Kustlab 22m – NAP voorbehandeld Grondwater Kustlab 22m – NAP niet voorbehandeld Grondwater Kustlab 45m – NAP voorbehandeld Oosterscheldewater |
| Blanco | |
| Testduur | 28 dagen |
| Test opzet | 1l bekeerglazen |
| Volume test oplossing | 0,6 l testmedium, 0,4 l sediment (4 cm) |
| Aantal organismen per bekeerglas | 5 |
| Replica's | 5x |
| Doel | Groei en mortaliteit |
| Test temperatuur | 15°C |
| Verdunningswater | n.v.t. |
| Licht periode | Continu (24 uur per etmaal) |
| Luchttoevoer | Beluchting middels glazen pipettips |
| Testprotocol | Standaardvoorschrift BCI <i>Nereis virens</i> sediment in-vivio Bioassay, 1 dec. 2000, RIKZ, B. Kater, A. Hannewijk, C.A. Schipper en J. Bakker. |



Figuur 6.2 Weergave proefopstelling zager groeioproef.

Tien bekeerglazen bevatten Oosterscheldewater en 15 bekeerglazen zijn met de drie typen grondwater gevuld. De bekeerglazen staan in een waterbad dat op 15°C wordt gehouden.

6.3 Resultaten zager

Validiteit van de test

Om de validiteit van de proef te waarborgen dient aan een aantal eisen te worden voldaan zoals beschreven in de methode. In onderstaande tabel zijn de geldende normen en uitkomst van deze test per parameter weergegeven.

Tabel 6.2 validiteit van de zagertest

| Validiteit parameter | Norm | Uitkomst test |
|-----------------------------------------------|--------------------|-----------------------------------------------|
| LC50 (96h-LC50 NH ₄ ⁺) | 280mg/l – 1150mg/l | 592 mg/l (95% betr. int. 522mg/l – 672 mg/l)* |
| Mortaliteit blanco | <5% | 0% |
| Specifieke groeisnelheid | >1,6%/dag | 4,4 %/dag |
| Temperatuur | 15°C +/- 2°C | 16,2°C – 16,9°C |
| Saliniteit | 15g/l – 35 g/l | 30,8g/l – 34,6g/l |

*In bijlage 1 is nadere informatie opgenomen over uitkomst van de test met de referentietoxicant en de bepaling van LC50 middels de Trimmed Spearman-Kärber methode.

Op basis van bovenstaande kan de zager bioassay als valide worden beschouwd.

Observaties

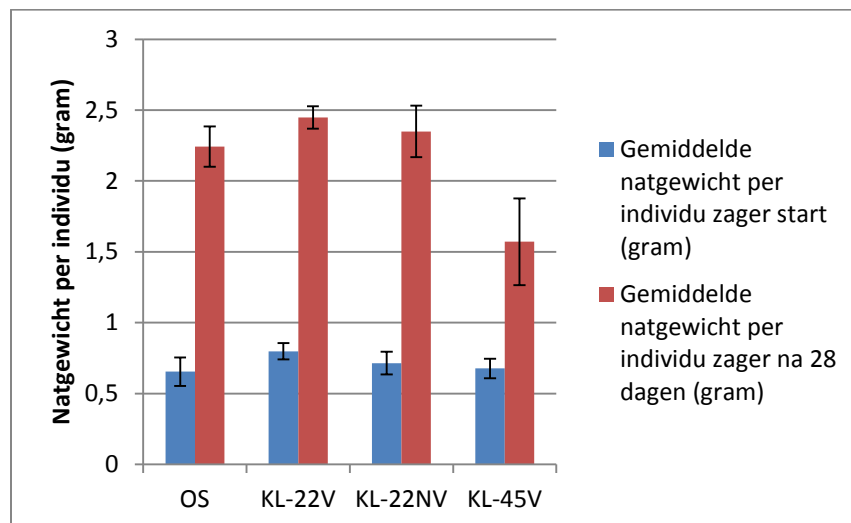
De zagers in het grondwater van 45m –NAP aten het voer niet volledig op in de eerste tweeëneenhalve week. Daarna werd bij drie van de vijf replica's met grondwater van 45m – NAP wel al het voer opgegeten. Bij alle overige behandelingen (grondwater van 22m – NAP, voorbehandeld en niet voorbehandeld en Oosterschelde water) was het voer binnen 30 minuten geheel opgegeten door de zagers. Dit bleef zo gedurende de gehele test waarbij de hoeveelheid voer per voer gift geleidelijk is opgevoerd (tot 90 mg).

Mortaliteit

Bij geen van de behandelingen is mortaliteit van de zagers opgetreden.

Groei

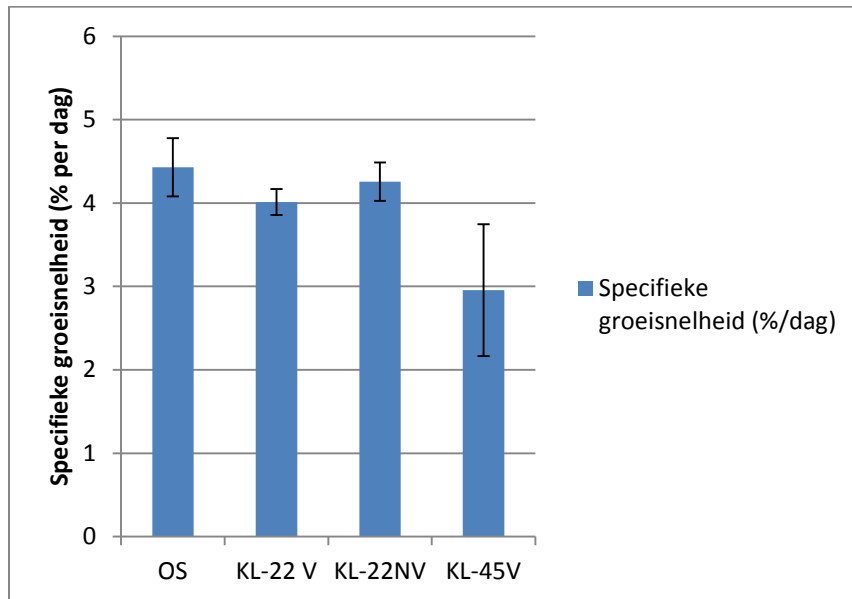
In onderstaande grafiek is het gemiddelde startgewicht en eindgewicht (natgewicht) van de zagers weergegeven.



Figuur 6.3 Start- en eindgewicht groeiproef zagers (n=5)

Het gewicht van de zagers aan de start van de groeiproef varieert tussen de 0,6 en 0,8 gram. Het eindgewicht van de zagers varieert tussen de verschillende behandelingen tussen de 1,5 en 2,5 gram. Het gemiddelde gewicht van de zagers in het grondwater van 45m –NAP na 28 dagen is aanzienlijk lager dan dat van de andere behandelingen.

In onderstaande grafiek is de specifieke groeisnelheid van de zagers weergegeven.



Figuur 6.4 Specifieke groeisnelheid zagers uitgedrukt in percentage natgewicht per dag (n=5)

De specifieke groeisnelheid van de zagers in grondwater van 45m –NAP is 2,9. Voor de overige behandelingen is de specifieke groeisnelheid tussen de 4 en de 4,3.

De waterkwaliteitsparameters, gemeten gedurende de groeiproef, zijn binnen de volgende ranges gebleven bij alle behandelingen:

Tabel 6.6 Gemeten waterkwaliteit in zager bioassay

| Parameter | Grenzen | Laagst gemeten waarde | Hoogst gemeten waarde |
|-----------------|-----------|-----------------------|-----------------------|
| Saliniteit | 15-35 g/l | 30,8 g/l | 34,6 g/l |
| Zuurstofgehalte | >50% | 92% | 98% |
| pH | 7-9 | 7,9 | 8,5 |
| Temperatuur | 13-17°C | 16,2°C | 16,9°C |

6.4 Conclusie zager

Er is bij geen van de behandelingen sterfte opgetreden. In mortaliteit is er dus geen onderscheid waarneembaar tussen de verschillende typen grondwater.

In specifieke groeisnelheid is een verschil waarneembaar tussen de testorganismen in grondwater van 45m –NAP en de testorganismen in de overige behandelingen. Er is beduidend minder groei opgetreden in de behandeling met grondwater van 45m –NAP. De groeisnelheid van de testorganismen in grondwater van 22m –NAP, zowel voorbehandeld als niet voorbehandeld, is vergelijkbaar met de groeisnelheid van de testorganismen in de blanco (Oosterscheldewater).

7. Tong (*Solea solea*)

De proefopzet, resultaten en uitkomsten zijn uitgebreider gerapporteerd in een separate rapportage van IMARES (zie bijlage 2 voor de volledige rapportage). De belangrijkste zaken uit die rapportage worden hieronder samengevat.

Methode

IMARES heeft een ecotoxicologische beoordeling uitgevoerd op drie verschillende soorten grondwater:

1. -22m NAP, onbehandeld
2. -22m NAP, behandeld (belucht en ontijzerd)
3. -45m NAP, behandeld (belucht en ontijzerd)

De beoordeling werd uitgevoerd met behulp van een fish early life stage test met tong (*Solea solea*), waarbij achtereenvolgens het uitkomst (hatching) percentage en de overleving van de uitgekomen larven tot het eind van het dooierzak stadium werd bepaald. Als controle op overplaatsen van de eieren werd water uit de Oosterschelde gebruikt. Het kweekwater zelf diende als referentie voor de ontwikkeling.

Resultaten

In het grondwater bleek succesvolle hatching van de tong eieren niet mogelijk, terwijl in het Oosterschelde water de eieren en larven zich normaal ontwikkelden.

De oorzaak voor het niet uitkomen van de eieren in het grondwater is niet onderzocht, maar hangt mogelijk samen met relatief hoge ammonium gehalten. Het zuurstofgehalte van het monster '-22 m NAP, onbehandeld' was sowieso te laag om overleving van vissen(eieren) mogelijk te maken. Maar na beluchting werd nog steeds volledige sterfte van de eieren geconstateerd.

8. Conclusie

Middels fysische- en chemische bepalingen en bioassays is getracht antwoord te geven op onderstaande vragen:

In hoeverre is het grondwater ter plaatse van het Kustlab vanuit het 1e en 2e watervoerende pakket (wvp 1a en 1b) geschikt voor de kweek van aquacultuurorganismen?

- Geeft het aanwezige grondwater in het Kustlab een ongewenste (toxische) reactie bij 5 typen kweekorganismen?
- Hoe verandert deze reactie bij voorbehandeling door middel van beluchting en filtratie?
- Wat is de kwaliteit van het grondwater in termen van chloride, anorganisch stikstof, fosfor en ijzer concentraties?

8.1 Fysische en chemische parameters

Op basis van de onderzochte fysische en chemische parameters lijkt het grondwater van zowel 22m –NAP als dat van 45m –NAP in eerste instantie geschikt voor toepassing in de aquacultuur.

8.2 Reactie kweekorganismen

In onderstaande tabel is weergegeven of een ‘gewenste’, ‘neutrale’ of ‘ongewenste’ reactie is opgetreden.

Tabel 8.1 gewenste, neutrale of ongewenste reactie van kweekorganismen

| Testorganisme | Indicator | 22m –NAP NV | 22m –NAP V | 45m – NAP NV |
|---------------|-------------|-------------|------------|---------------------|
| Alg | Groei | Gewenst | Neutraal | Gewenst / Neutraal* |
| Mossel | Groei | Gewenst | Gewenst | Ongewenst |
| | Filtratie | Gewenst | Gewenst | Ongewenst |
| Tapijtschelp | Groei | Gewenst | Gewenst | Ongewenst |
| | Filtratie | Gewenst | Gewenst | Ongewenst |
| Zager | Groei | Gewenst | Gewenst | Neutraal |
| Tonglarve | Mortaliteit | Ongewenst | Ongewenst | Ongewenst |

*Twee vergelijkbare onderzoeken laten een verschil in uitkomsten zien voor de groei van algen op grondwater van 45m -NAP.

Toelichting ‘gewenste’, ‘neutrale’ en ‘ongewenste’ reactie.

| | |
|--------------------|---------------------------------------------|
| Gewenste reactie | Gelijk aan blanco |
| Neutrale reactie | Achterblijven t.o.v. blanco, wel activiteit |
| Ongewenste reactie | Volledige uitval / geen activiteit |

Er bestaat een verschil in gevoeligheid tussen de verschillende testorganismen die zijn gebruikt, waarbij de tonglarven in de regel de meest gevoelige organismen zijn en de zagers de meest robuuste organismen. Dit wijzen de resultaten ook uit.

In een aantal gevallen is een ongewenste reactie bij de kweekorganismen waargenomen. In grondwater van 45m – NAP treedt grootschalige mortaliteit op van de mosselen en tapijtschelpen. De zagertest laten een achterstand in groei zien in dit zelfde grondwater. Hiermee lijkt het grondwater uit het tweede watervoerende pakket ter plaatse van het Kustlaboratorium niet geschikt als medium voor toepassing in de aquacultuur.

In het grondwater van 22m –NAP treedt bovenstaande reactie niet op. De groei en mortaliteit van de mosselen en tapijtschelpen is in grondwater van 22m –NAP niet afwijkend van die in de blanco (Oosterscheldewater). Ook groei van de zagers wijkt niet af van die in de blanco. De alg *Skeletonema* vertoont in het niet voorbehandelde grondwater van 22m –NAP eenzelfde groei als in de blanco. Het grondwater uit het eerste watervoerende pakket

ter plaatse van het Kustlab lijkt op basis van uitgevoerde testen met algen, mosselen, tapijtschelpen en zagers geschikt voor toepassing in de aquacultuur.

De bioassay met de Tonglarven laten voor alle typen grondwater een ongewenste reactie zien, het niet hatchen van de Tonglarven is vermoedelijk het gevolg van een verhoogde ammonium concentratie.

8.2 Voorbehandeling

Er is een verschil in groei van de alg (*Skeletonema costatum*) waargenomen tussen het voorbehandelde en niet voorbehandelde grondwater van 22m –NAP. In het voorbehandelde grondwater is groeiremming opgetreden, in het niet voorbehandelde grondwater was de groei gelijk aan die van de blanco. Hiermee lijkt het verstandig om in eerste instantie het grondwater niet voor te behandelen voor de kweek van algen.

Voor de overige toegepaste organismen lijkt het al dan niet voorbehandelen van het grondwater middels beluchting en filtratie geen effect te hebben op de reactie van deze organismen. Er is geen verschil waargenomen tussen voorbehandeld en niet-voorbehandeld water bij de onderzochte indicatoren (mosselen, tapijtschelpen, zagers en tong) .

8.3 Overige bevindingen

Er is een verkleuring van de tapijtschelpen in grondwater van 22m-NAP waargenomen. Het schelpenbroed is binnen 28 dagen donkerder van kleur geworden (zie figuur 5.4). Of dit een irreversibele verkleuring is, is niet verder onderzocht.

9. Discussie

De test met de Tonglarven is de meest gevoelige test in termen van gevoeligheid van het testorganisme. Op basis van deze test kan geconcludeerd worden dat het grondwater van zowel 45m-NAP als dat van 22m –NAP na opname uit de bodem niet direct geschikt is voor toepassing in een Tong hatchery. Het lijkt erop dat het aanwezige ammonium in het grondwater een toxisch effect heeft op deze organismen. In Kuslaboratorium wordt gestreefd naar een schakeling van teelten volgens het IMTA (Integrated Multi-trophic Aquaculture) concept , waarbij het kweekproces begint bij producenten (veelal algen) die o.a. stikstof als bron nodig hebben om te kunnen groeien. In zo'n geval is het aanwezige stikstof in ammonium een noodzakelijkheid en een van de grote voordelen van het gebruik van grondwater. Bij de kweek van algen in het IMTA proces zal door opname van het ammonium door de algen en omzetting door nitrificerende bacteriën naar nitraat, de concentratie ammonium sterk afnemen. Wanneer filter feeders (veelal schelpdieren) worden gevoed met de algen, waarbij de algen uit het water gefiltreerd worden, blijft mogelijk een geschikt medium over voor de kweek van vissen (eventueel na additionele zuiveringsstappen).

In het grondwater van 22m –NAP is een verschil in kleur van de schelp van de tapijtschelp opgetreden. De tapijtschelpen in het grondwater zijn donkerder gekleurd, zoals te zien is op figuur 5.4. Volgens literatuur zou dit een gevolg kunnen zijn van de aanwezigheid van H_2S in het water (Chen, 1990). Zoals in hoofdstuk 3 vermeld, kwam bij het oppompen en beluchten van het grondwater van 22m –NAP een sterke H_2S geur vrij. De verwachting is echter dat met voorbehandeling van het grondwater, de H_2S grotendeels verdwijnt. Zo bleek ook uit het verdwijnen van de H_2S geur. In zowel het niet voorbehandelde als het voorbehandelde grondwater trad echter een vergelijkbare verkleuring op. Mogelijk heeft zwavel in andere verbindingen ook effect op verkleuring van tapijtschelpen. Of het verschil in kleur van invloed is op de mogelijkheden voor afzet van geproduceerde tapijtschelpen is onbekend.

10. Aanbevelingen

1. Op basis van de uitgevoerde bioassays lijkt het niet verstandig om het grondwater uit het tweede watervoerende pakket (45m - NAP) te gebruiken voor toepassing in de aquacultuur. Het grondwater uit het eerste watervoerende pakket (22m - NAP) lijkt hiervoor wel geschikt.
2. Maximale algendichtheid
Bij de groeiproef met de algen is bepaald of de snelheid van de algengroei in grondwater gelijk is aan de groeisnelheid van algen in Oosterscheldewater. Een belangrijk aspect bij de kweek van algen als voedsel voor schelpdieren is de maximale algen dichtheid die in een cultuur behaald kan worden. Een andere belangrijke parameter is de productiviteit van algenculturen (opbrengst in gram droge stof per ha per jaar. Of in grondwater een vergelijkbare dichtheid aan algen of productiviteit behaald kan worden als in verrijkt Oosterscheldewater is in deze kort durende groeitest niet onderzocht. Het kan waardevol zijn om langdurige algen testen uit te voeren om beter inzicht in de mogelijke algenproductiviteit n op het grondwater uit het eerste watervoerende pakket te krijgen.
3. Kleurverandering tapijtschelpen.
Zoals bij de groeiproef met de tapijtschelpen bleek, treedt er kleurverandering van de schelp van tapijtschelpen op bij het houden van deze organismen in grondwater. Mogelijk kan deze verkleuring middels verwatering of middels andere methoden ongedaan worden gemaakt. Een verschil in smaak van de tapijtschelpen of andere schelpdieren zou kunnen optreden in grondwater. Middels het opgroeien van een kleine hoeveelheid schelpdieren in grondwater en het testen op smaak kan hierover een eerste indicatie afgegeven worden. Middels een driehoekstest ('wie van de drie') kan een eventueel verschil in smaak aangetoond worden.
4. Pootvis tong i.p.v. tong larven.
Zoals uit de bioassay met tonglarven bleek, is het grondwater direct na oppompen en voorbehandelen niet geschikt voor het hatchen van tonglarven. Mogelijk is het grondwater wel geschikt voor het opgroeien van pootvis (tong van ca. 50g). Om dit eventueel te onderzoeken is een getrapte aanpak aan te raden. Een eerste stap zou kunnen zijn om op basis van literatuuronderzoek vast te stellen of tong hogere concentraties ammonium (zoals aanwezig in het grondwater) kan verdragen. Een vervolgstap kan zijn om een bioassay met pootvis uit te voeren. Een andere aanpak kan zijn om eerst de ammoniumgehalten van het grondwater te verlagen alvorens hier bioassays mee uit te voeren (zie volgende punt).
5. Kwaliteitsveranderingen bij IMTA.
Wanneer grondwater als medium wordt gebruikt binnen IMTA (Integrated Multi-trophic Aquaculture), zal verandering van de waterkwaliteit optreden gedurende de verschillende stappen in dit proces. Zo zal door de groei van algen de nutriënten concentratie van het water omlaag gebracht worden. Schelpdieren filteren vervolgens algen uit het water. De samenstelling van het resterende water is afhankelijk van de efficiëntie van voorgaande stappen en relevant voor de vervolgstappen. Of recirculatie naar de schelpdieren mogelijk is of toepassing voor viskweek al dan niet met toepassing van een algenfilter is nog niet duidelijk. Om te verkennen wat de mogelijkheden zijn met het grondwater binnen IMTA kan het waardevol zijn om een aantal stappen van dit proces op kleinere schaal na te bootsen en de kwaliteit en mogelijkheden van het water in verschillende stadia te onderzoeken.
6. Gecombineerd gebruik grondwater en Oosterscheldewater.
Een combinatie van grondwater en Oosterscheldewater zou mogelijkheden kunnen bieden voor toepassing in aquacultuur. Het grondwater bevat nutriënten voor de kweek van algen zoals ammonium en fosfaat. In Oosterscheldewater zijn de concentraties van deze stoffen aanzienlijk lager. Het gebruik van een combinatie van zout grondwater en Oosterscheldewater (in een mix) zou aan de ene kant kunnen zorgen voor voldoende natuurlijke voeding aan nutriënten voor primaire productie en er aan de andere kant voor kunnen zorgen dat met name ammonium concentraties niet zo hoog worden dat deze

schadelijk is voor bijvoorbeeld de teelt van tong. Nader onderzoek naar de beste mengverhouding van zout grondwater en Oosterscheldewater is hiervoor gewenst.

7. Ruimtelijk verschil in grondwaterkwaliteit.

Bij de uitgevoerde bioassays is gebruik gemaakt van grondwater afkomstig uit de grondwaterpeilbuis op de waterkering langs de Oosterschelde ter plaatse van het Kustlab. Of de grondwaterkwaliteit in het gehele gebied dat het Kustlab bestrijkt gelijk is aan de grondwaterkwaliteit ter plaatse van de gebruikte grondwaterpeilbuis is onbekend. Het is niet bekend of de waterkwaliteit in de watervoerende pakketten over de diepte homogeen is. Zo zou de waterkwaliteit in het eerste watervoerende pakket, bijvoorbeeld ondieper dan 22m –NAP anders van kwaliteit kunnen zijn. Het kan waardevol zijn om onderzoek te doen naar de kwaliteitsverschillen van grondwater in ruimtelijk zin.

Literatuur

Chen, L.C. (1990) Aquaculture in Taiwan. 288 pp Fishing New Books.

Kater, B., Hannewijk, A., Schipper, C.A., Bakker, J., 2000. Standaardvoorschrift BCI *Nereis virens* sediment in-vivio Bioassay, 1 dec. 2000, RIKZ.

NEN-EN-ISO 10253., 2006. Water Quality - Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricornutum*.

Bijlagen

Bijlage 1: Ragworm growth inhibition-Overleving

Bijlage 2: Ecotoxicologische beoordeling van grondwater met behulp van een *Solea solea* bioassay, E.I. Koelemij & E.M. Foekema, IMARES

Bijlage 3: Datasheet acute toxiciteit voor algen *Skeletonema costatum*, Ecofide

Ragworm growth inhibition-Overleving

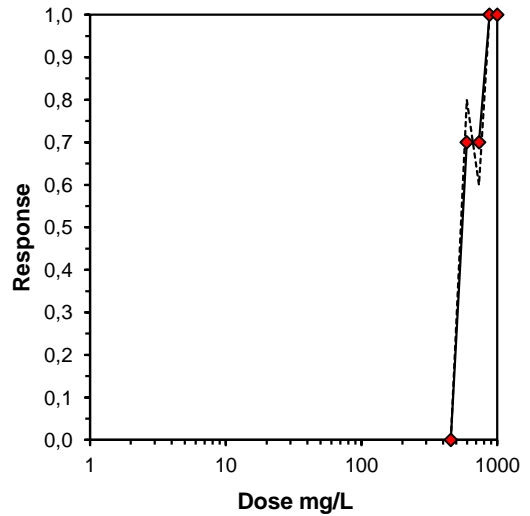
Start Date: Test ID: nv-1 Sample ID: REF-Ref Toxicant
 End Date: Lab ID: ZS-Zeeschelp Sample Type: TNH3-Ammonia-total
 Sample Date: Protocol: RIKZ-BCI Nereis virens in vivo s Test Species: NVI-Nereis virens
 Comments:

| Conc-mg/L | 1 |
|-----------|--------|
| D-Control | 1,0000 |
| 455 | 1,0000 |
| 595 | 0,2000 |
| 735 | 0,4000 |
| 875 | 0,0000 |
| 1000 | 0,0000 |

| Conc-mg/L | Mean | N-Mean | Transform: Arcsin Square Root | | | | | N | Number Resp | Total Number |
|-----------|--------|--------|-------------------------------|--------|--------|-------|---|---|-------------|--------------|
| | | | Mean | Min | Max | CV% | | | | |
| D-Control | 1,0000 | 1,0000 | 1,3453 | 1,3453 | 1,3453 | 0,000 | 1 | 0 | 5 | |
| 455 | 1,0000 | 1,0000 | 1,3453 | 1,3453 | 1,3453 | 0,000 | 1 | 0 | 5 | |
| 595 | 0,2000 | 0,2000 | 0,4636 | 0,4636 | 0,4636 | 0,000 | 1 | 4 | 5 | |
| 735 | 0,4000 | 0,4000 | 0,6847 | 0,6847 | 0,6847 | 0,000 | 1 | 3 | 5 | |
| 875 | 0,0000 | 0,0000 | 0,2255 | 0,2255 | 0,2255 | 0,000 | 1 | 5 | 5 | |
| 1000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,2255 | 0,2255 | 0,2255 | 0,000 | 1 | 5 | 5 | |

| Auxiliary Tests | Statistic | Critical | Skew | Kurt |
|-----------------------------------------------|-----------|----------|------|------|
| Normality of the data set cannot be confirmed | | | | |
| Equality of variance cannot be confirmed | | | | |

| Trimmed Spearman-Kärber | | | |
|-------------------------|--------|--------|--------|
| Trim Level | EC50 | 95% CL | |
| 0,0% | 592,42 | 522,22 | 672,05 |
| 5,0% | 588,45 | 511,98 | 676,33 |
| 10,0% | 583,88 | 500,80 | 680,73 |
| 20,0% | 571,80 | 473,58 | 690,38 |
| Auto-0,0% | 592,42 | 522,22 | 672,05 |



Ecotoxicologische beoordeling van grondwater met behulp van een *Solea solea* bioassay

E.I. Koelemij & E.M. Foekema

Rapportnummer C013/12



IMARES Wageningen UR

Institute for Marine Resources & Ecosystem Studies

Oprichtgever:

HZ University of Applied Sciences
T.a.v. H.M. Creemers MSc.
Edisonweg 4
4382 NW Vlissingen

Publicatiedatum:

6 februari 2012

IMARES is:

- een onafhankelijk, objectief en gezaghebbend instituut dat kennis levert die noodzakelijk is voor integrale duurzame bescherming, exploitatie en ruimtelijk gebruik van de zee en kustzones;
- een instituut dat de benodigde kennis levert voor een geïntegreerde duurzame bescherming, exploitatie en ruimtelijk gebruik van zee en kustzones;
- een belangrijke, proactieve speler in nationale en internationale mariene onderzoeksnetwerken (zoals ICES en EFARO).

P.O. Box 68

1970 AB IJmuiden

Phone: +31 (0)317 48 09 00

Fax: +31 (0)317 48 73 26

E-Mail: imares@wur.nl

www.imares.wur.nl

P.O. Box 77

4400 AB Yerseke

Phone: +31 (0)317 48 09 00

Fax: +31 (0)317 48 73 59

E-Mail: imares@wur.nl

www.imares.wur.nl

P.O. Box 57

1780 AB Den Helder

Phone: +31 (0)317 48 09 00

Fax: +31 (0)223 63 06 87

E-Mail: imares@wur.nl

www.imares.wur.nl

P.O. Box 167

1790 AD Den Burg Texel

Phone: +31 (0)317 48 09 00

Fax: +31 (0)317 48 73 62

E-Mail: imares@wur.nl

www.imares.wur.nl

© 2012 IMARES Wageningen UR

IMARES is onderdeel van Stichting DLO
KvK nr. 09098104,
IMARES BTW nr. NL 8113.83.696.B16

De Directie van IMARES is niet aansprakelijk voor gevolgschade, noch voor schade welke voortvloeit uit toepassingen van de resultaten van werkzaamheden of andere gegevens verkregen van IMARES; opdrachtgever vrijwaart IMARES van aanspraken van derden in verband met deze toepassing.

Dit rapport is vervaardigd op verzoek van de opdrachtgever hierboven aangegeven en is zijn eigendom. Niets uit dit rapport mag weergegeven en/of gepubliceerd worden, gefotokopieerd of op enige andere manier gebruikt worden zonder schriftelijke toestemming van de opdrachtgever.

A_4_3_1-V12

Samenvatting

In opdracht van HZ University of Applied Sciences heeft IMARES een ecotoxicologische beoordeling uitgevoerd op drie verschillende soorten grondwater:

1. -22m NAP, onbehandeld
2. -22m NAP, behandeld (belucht en ontijzerd)
3. -45m NAP, behandeld (belucht en ontijzerd)

De beoordeling werd uitgevoerd met behulp van een *fish early life stage* test met tong (*Solea solea*), waarbij achtereenvolgens het uitkomst (hatching) percentage en de overleving van de uitgekomen larven tot het eind van het dooierzak stadium werd bepaald. Als controle op overplaatsen van de eieren werd water uit de Oosterschelde gebruikt. Het kweekwater zelf diende als referentie voor de ontwikkeling.

In het grondwater bleek succesvolle hatching van de tong eieren niet mogelijk, terwijl in het Oosterschelde water de eieren en larven zich normaal ontwikkelden.

De oorzaak voor het niet uitkomen van de eieren in het grondwater is niet onderzocht, maar hangt mogelijk samen met relatief hoge ammonium gehalten. Het zuurstofgehalte van het monster '-22 m NAP, onbehandeld' was sowieso te laag om overleving van vissen(eieren) mogelijk te maken. Maar na beluchting werd nog steeds volledige sterfte van de eieren geconstateerd.

Inhoudsopgave

| | |
|---------------------------------------|----|
| Samenvatting | 3 |
| 1 Inleiding | 5 |
| 2 Materiaal & Methoden | 6 |
| 2.1 Behandeling monsters | 6 |
| 2.2 Bioassay | 6 |
| 3 Resultaten | 8 |
| 3.1 Waterkwaliteitsparameters | 8 |
| 3.2 <i>Solea solea</i> bioassay | 9 |
| 4 Conclusie | 10 |
| 5 Kwaliteitsborging | 11 |
| Verantwoording | 12 |

1 Inleiding

In opdracht van HZ University of Applied Sciences heeft IMARES een ecotoxicologische beoordeling uitgevoerd op drie verschillende soorten grondwater met behulp van *fish early life stage test* met tong (*Solea solea*). De test is gebaseerd op OECD guideline 212.

De door de opdrachtgever aangeleverde monsters waren als volgt gelabeld:

1. -22m NAP, onbehandeld
2. -22m NAP, behandeld (belucht en ontijzerd)
3. -45m NAP, behandeld (belucht en ontijzerd)

Tevens werd een monster Oosterschelde water aangeleverd, dat als referentiewater werd getest.

2 Materiaal & Methoden

2.1 Behandeling monsters

De monsters zijn op 13 januari 2012 onder verantwoording van de opdrachtgever aangeboden aan het laboratorium van IMARES te IJmuiden . Elk grondwatermonster en het monster Oosterschelde water was afzonderlijk verpakt in een 10L jerrycan.

Voor het inzetten in de bioassay is met behulp van een HACH Lange HQ40d multimeter de zuurgraad (pH), saliniteit, geleidend vermogen (EGV) en het zuurstofgehalte (O₂) in de monsters gemeten. In een later stadium is het ammoniumgehalte bepaald met behulp van een WTW fotometer met testkit.

2.2 Bioassay

De Solea bioassay is gebaseerd op OECD guideline 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages.

De test bestaat uit 2 delen. In het eerste deel werden op dezelfde dag bevruchte eieren van de mariene platvis Tong (*Solea solea*) blootgesteld aan het te onderzoeken monster, totdat de eieren na 5 dagen uitkwamen. De test is in 4-voud ingezet in bekers die 200ml van de te testen oplossing bevatten. Hier zijn 50 *Solea solea* eieren aan toegevoegd. Dagelijks werden de eieren bekeken en dode eieren verwijderd. Na 5 dagen is bepaald hoeveel eieren waren uitgekomen.

Het tweede deel van de test gaat verder met de uitgekomen tonglarven. Deze test is in 4-voud ingezet in bekers die 20ml van de testoplossingen bevatten. Hierin werden 5 tonglarven overgebracht uit de bovenbeschreven 200 ml bekers. In totaal werden zo dus per monster 4x5=20 larven ingezet. Deze test heeft 5 dagen geduurd. Gedurende deze tijd zijn de larven beoordeeld op leven en dood.

De gehele test werd uitgevoerd in een testruimte met een 16 uur dag – 8 uur nacht ritme bij 15°C . De bekers waren afgedekt om verdamping te voorkomen.

De test is ingezet met de onverdunde monsters zoals aangeleverd, als referentie is het zeewater waarin de tong eieren geproduceerd zijn gebruikt, hierna aangeduid als kweekwater. Het water uit de Oosterschelde diende als controle voor overplaatsen van de eieren vanuit het kweekwater.

Tabel 1 karakteristieken van de tongtest

| | |
|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Test organisme | <i>Solea solea</i> |
| Leverancier test organisme | IMARES, Netherlands |
| Levensfase test organisme | eieren en yolk-sac larven |
| Testduur | 2x 5 dagen |
| Test opzet | 250 mL bekersglazen voor de eieren test 30 ml bekersglazen voor de larven test |
| Volume test oplossing | 200 mL voor de eieren test 20 ml voor de larven test |
| Aantal organismen per bekersglas | 50 bij de eieren test 5 bij de larven test |
| Replica's | 4 |
| Doel | Overleving (leven/dood) |
| Test temperatuur | 15°C |
| Verdunningswater | n.v.t. |
| Licht periode | 16 uur licht/8 uur donker |
| Luchtoevoer | Geen |
| Test protocol | OECD 212 (1998) |

3 Resultaten

3.1 Waterkwaliteitsparameters

Een overzicht van de waterparameters gemeten in de grondwatermonsters, het Oosterschelde water en het kweekwater is weergegeven in Tabel 2.

In alle drie de grondwatermonsters wordt NH_4^+ gemeten, terwijl dit in het kweekwater en het Oosterschelde water niet het geval is.

Het zuurstofgehalte van het monster '-22m NAP, onbehandeld' was te laag voor het gebruik in de bioassay. De testvloeistoffen moeten tenminste 60% zuurstof bevatten (OECD 212, 1998). Daarom is dit monster belucht voordat de test werd ingezet.

Tabel 2 Resultaatoverzicht van de waterkwaliteitsparameters gemeten voor blootstelling in de Solea test.

| Waterkwaliteitsparameters van monsters | | | | | | | |
|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------|---------------------------|------------------------|-------------------|-------------------|----------------------------------------------|
| Monster | Zuurstof O_2 (mg/l) | Zuurstof O_2 (%) | Saliniteit (‰) | EGV (mS/cm) | pH (-) | T (°C) | NH_4^+ (mg/L) |
| -22m NAP, onbehandeld | 2.40 | 22.8 | 32.0 | 38.5 | 7.67 | 13.4 | 3 |
| -22m NAP, behandeld | 10.20 | 96.3 | 31.9 | 37.9 | 8.28 | 13.2 | 2 |
| -45m NAP, behandeld | 10.75 | 101.0 | 30.9 | 36.7 | 8.40 | 12.9 | 7 |
| Oosterschelde water | 10.15 | 96.2 | 30.8 | 36.8 | 8.02 | 13.3 | 0 |
| Solea water | 10.09 | 98.8 | 33.3 | 41.1 | 8.48 | 14.8 | 0 |
| Na beluchting: -22m NAP, onbehandeld | 8.69 | 92.8 | | | | 15.0 | |

3.2 Solea solea bioassay

In de grondwatermonsters zijn geen eieren uitgekomen. In het kweekwater is 62% van de eieren uitgekomen; in het Oosterschelde water ongeveer een derde(34%) (Tabel 3).

In de bekgelzen met monster '-45m NAP, behandeld' ontstond na 1 dag een roodbruine neerslag, die de bodem van de testbeker en de eieren bedekte.

Tabel 3 Overzicht resultaten van de eierentest In de tabel wordt aangegeven hoeveel eieren er uitgekomen zijn.

| Monster | Datum | Replica | | | | Gemiddeld | STDEV | % Uitgekomen |
|-----------------------|------------|---------|----|----|----|-----------|-------|--------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | | | |
| -22m NAP, onbehandeld | 18-01-2012 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| -22m NAP, behandeld | 18-01-2012 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| -45m NAP, behandeld | 18-01-2012 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Oosterschelde water | 18-01-2012 | 13 | 17 | 8 | 30 | 17 | 9 | 34 |
| kweekwater | 18-01-2012 | 25 | 35 | 32 | 31 | 31 | 4 | 62 |

De larvale overleving kon alleen getest worden voor Oosterschelde water en het kweekwater, omdat in de grondwatermonsters geen larven waren uitgekomen. Het overlevingspercentage van de tonglarven in het kweekwater was na 2 dagen 70% en nam verder af tot 45% na 5 dagen. In het Oosterschelde water was na 5 dagen slechts 1 individu dood van de in 4-voud ingezette test, waardoor het overlevingspercentage op 95% uitkomt.

Tabel 4 Overlevingspercentage van de tonglarventest. De gegeven percentages zijn de gemiddelde waarden van de in 4-voud ingezette test.

| Monster | Overleving na 2 dagen | Overleving na 5 dagen |
|---------------------|-----------------------|-----------------------|
| Oosterschelde water | 100% | 95% |
| kweekwater | 70% | 45% |

Wanneer hatching succes en larvale overleving worden gecombineerd is het percentage van de eieren dat succesvol ontwikkelde tot het eind van het dooierzak stadium 28 en 32 % in respectievelijk het kweekwater en het Oosterschelde water. In de grondwatermonsters was dit 0%.

| Monster | % hatching | % larvale overleving | Totaal |
|-----------------------|------------|----------------------|--------|
| -22m NAP, onbehandeld | 0 | | 0 % |
| -22m NAP, behandeld | 0 | | 0 % |
| -45m NAP, behandeld | 0 | | 0 % |
| Oosterschelde | 34 | 95 | 32% |
| kweekwater | 62 | 45 | 28% |

4 Conclusie

In het grondwater bleek succesvolle hatching van de tong eieren niet mogelijk, terwijl in het Oosterschelde water de eieren en larven zich normaal ontwikkelden.

De oorzaak voor het niet uitkomen van de eieren in het grondwater is niet onderzocht, maar hangt mogelijk samen met relatief hoge ammonium gehalten. Het kan ook (mede) zijn veroorzaakt door andere eigenschappen van het grondwater die niet bij IMARES bekend zijn. Om de werkelijke oorzaak vast te stellen is gericht vervolgonderzoek nodig. Het zuurstofgehalte van het monster '-22 m NAP, onbehandeld' was sowieso te laag om overleving van vissen(eieren) mogelijk te maken. Maar ook na beluchting werd volledige sterfte van de eieren geconstateerd.

5 Kwaliteitsborging

IMARES beschikt over een ISO 9001:2008 gecertificeerd kwaliteitsmanagementsysteem (certificaatnummer: 57846-2009-AQ-NLD-RvA). Dit certificaat is geldig tot 15 december 2012. De organisatie is gecertificeerd sinds 27 februari 2001. De certificering is uitgevoerd door DNV Certification B.V. Daarnaast beschikt het chemisch laboratorium van de afdeling Milieu over een NEN-EN-ISO/IEC 17025:2005 accreditatie voor testlaboratoria met nummer L097. Deze accreditatie is geldig tot 27 maart 2013 en is voor het eerst verleend op 27 maart 1997; deze accreditatie is verleend door de Raad voor Accreditatie.


Verantwoording

Rapport C013/12
Projectnummer 430.40000.04

Dit rapport is met grote zorgvuldigheid tot stand gekomen. De wetenschappelijke kwaliteit is intern getoetst door een collega-onderzoeker en het betreffende afdelingshoofd van IMARES.

Akkoord: Ir. H.W. van der Mheen
Interim Afdelingshoofd Experimentele Ecologie

Handtekening:



Datum: 6 februari 2012

Akkoord: Dr. N.H.B.M. Kaag
Onderzoeker

Handtekening:



Datum: 6 februari 2012

Datasheet acute toxiciteit voor algen *Skeletonema costatum*



Algemene informatie

| | |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Monsters: | Drie grondwater monsters, als volgt gecodeerd: -22m -22m onbehandeld -45m Als controle is gebruik gemaakt van Oosterschelde water, aangeleverd door St. Zeeschelp |
| Opdrachtgever: | Hogeschool van Zeeland i.s.m. St. Zeeschelp |
| Protocol: | ISO 10253 |
| Tijdsduur: | 72 uur |
| Start datum: | 9 maart 2012 |
| Eind datum: | 12 maart 2012 |

Materiaal en methoden

De geteste grondwater monsters, het gebruikte Oosterschelde water en de toe te voegen stock oplossingen met nutriënten zijn aangeleverd door Hogeschool van Zeeland en Stichting Zeeschelp. Ook de gebruikte ent van *Skeletonema costatum* is door St. Zeeschelp aangeleverd. De toxiciteitstesten zijn uitgevoerd conform de ISO 10253 richtlijn door gebruik te maken van 96-wells platen. De drie monsters werden zowel met als zonder de toevoeging van nutriënten getest. Daarnaast is er voor de testen waar nutriënten aan werden toegevoegd van twee verschillende concentratie reeksen gebruik gemaakt (1: 100-50-25-12,5-6,25vol% en 2: 80-40-20-10-5 vol%) en werden de testen op meerdere platen uitgevoerd.

De dichtheid van de algen is iedere 24u geanalyseerd, waarna de specifieke groeisnelheid per replica is berekend. Door het ontbreken van significante verschillen in de controle groei tussen de platen, zijn alle verschillende concentraties van één monster gezamenlijk beoordeeld.

De ISO 10253 richtlijn specificeert de volgende geldigheidscriteria:

- a) Een minimale groeisnelheid van $0,9d^{-1}$
Behaald tijdens de test: $1,40 - 1,56 d^{-1}$
- b) Een maximale variatie coëfficiënt van 7%
Behaald tijdens de test: $1,9 - 4,2$

Resultaten

De gemiddelde groeisnelheid in de verschillende monsters en concentraties is opgenomen in onderstaand overzicht.

Datasheet acute toxiciteit voor algen *Skeletonema costatum*



| | | Zonder toevoeging van nutriënten | | Met toevoeging van nutriënten | |
|------------------|-----------|----------------------------------|-------|-------------------------------|-------|
| | | Gemiddelde | Stdev | Gemiddelde | Stdev |
| Blanco zeewater | | 0,00 | 0,000 | 1,50 | 0,080 |
| -22m | 5 vol% | 0,59 | 0,054 | 1,44 | 0,066 |
| | 6.25 vol% | - | | 1,51 | 0,031 |
| | 10 vol% | 0,71 | 0,231 | 1,47 | 0,050 |
| | 12,5 vol% | - | | 1,50 | 0,027 |
| | 20 vol% | 1,02 | 0,033 | 1,50 | 0,071 |
| | 25 vol% | - | | 1,44 | 0,062 |
| | 40 vol% | 1,11 | 0,113 | 1,43 | 0,108 |
| | 50 vol% | - | | 1,41 | 0,060 |
| | 80 vol% | 1,36 | 0,027 | 1,34 | 0,049 |
| | 100 vol% | - | | 1,24 | 0,099 |
| -22m onbehandeld | 5 vol% | 0,76 | 0,108 | 1,37 | 0,095 |
| | 6.25 vol% | - | | 1,48 | 0,056 |
| | 10 vol% | 1,01 | 0,031 | 1,36 | 0,017 |
| | 12,5 vol% | - | | 1,43 | 0,027 |
| | 20 vol% | 1,11 | 0,033 | 1,37 | 0,086 |
| | 25 vol% | - | | 1,34 | 0,055 |
| | 40 vol% | 1,28 | 0,082 | 1,32 | 0,043 |
| | 50 vol% | - | | 1,37 | 0,086 |
| | 80 vol% | 1,44 | 0,049 | 1,15 | 0,021 |
| | 100 vol% | - | | 1,06 | 0,053 |
| -45m | 5 vol% | 0,05 | 0,12 | 1,48 | 0,049 |
| | 6.25 vol% | - | | 1,45 | 0,052 |
| | 10 vol% | 0,10 | 0,11 | 1,44 | 0,034 |
| | 12,5 vol% | - | | 1,47 | 0,024 |
| | 20 vol% | 0,00 | 0,00 | 1,49 | 0,087 |
| | 25 vol% | - | | 1,44 | 0,110 |
| | 40 vol% | 0,00 | 0,00 | 1,35 | 0,187 |
| | 50 vol% | - | | 1,13 | 0,069 |
| | 80 vol% | 0,00 | 0,00 | 0,70 | 0,190 |
| | 100 vol% | - | | 0,26 | 0,227 |

Algengroei zonder de toevoeging van nutriënten

Skeletonema wordt standaard gekweekt in een medium met nutriënten. Zonder deze nutriënten groeit de alg niet of nauwelijks. Ook in het huidige onderzoek werd geen groei van *Skeletonema* geconstateerd in het blanco Oosterschelde water. De grondwatermonsters van 22m diep lijken dit gebrek aan nutriënten op te kunnen heffen, want in beide gevallen (-22 en -22 onbehandeld) neemt de groeisnelheid toe met een toenemende concentratie grondwater, tot dat de groei in de hoogst geteste concentratie (80 vol%) redelijk in de buurt komt van de controle groei op Oosterschelde water mét nutriënten. Dit effect vindt niet plaats in het grondwater monster van 45 m diep. Dit kan te maken hebben met andere nutriënten concentraties maar ook met de aanwezigheid van een groeiremmende factor (zie testen met toevoeging van nutriënten).

Datasheet acute toxiciteit voor algen *Skeletonema costatum*



Algengroei met de toevoeging van nutriënten

Met de toevoeging van nutriënten vertoont *Skeletonema* een goede groei. Dit geldt voor het blanco Oosterschelde water maar ook voor alle lage concentraties grondwater. Alleen in de hoogste concentraties grondwater is er een significant effect op de groeisnelheid. Voor de twee grondwater monsters van 22m diep blijft dit remmende effect beperkt tot max. 30%. Het grondwater monster van 45m diep heeft echter een sterker effect en veroorzaakt meer dan 80% remming in het onverdunde monster.

De hiermee te berekenen NOEC, LOEC en EC₅₀-waarden zijn opgenomen in onderstaande tabel. De bijbehorende berekeningen met Toxcalc zijn op de volgende pagina's weergegeven.

Noot. De lage concentraties van het grondwater monster "-22m onbehandeld" veroorzaken soms wel en soms geen significant effect. De dosis-effect relatie is daardoor onderbroken. De mate van effect is echter gering (max. 10%). Vanaf 25 vol% zijn er significante effecten in alle concentraties en de 25 vol% is daarom als LOEC aangeduid. Evengoed blijft de mate van effect relatief beperkt. Pas bij de 80 vol% is de remming groter dan 20%.

| | -22 | -22 onbehandeld | -45 |
|-------------------------|-----------|-----------------|-----------------------|
| NOEC (µg/l) | 50 vol% | 12,5 vol% | 40 vol% |
| LOEC (µg/l) | 80 vol% | 25 vol% | 50 vol% |
| EC ₅₀ (µg/l) | >100 vol% | >100 vol% | 76,7 vol% |
| | | | (95% ci: 66,8 – 84,6) |

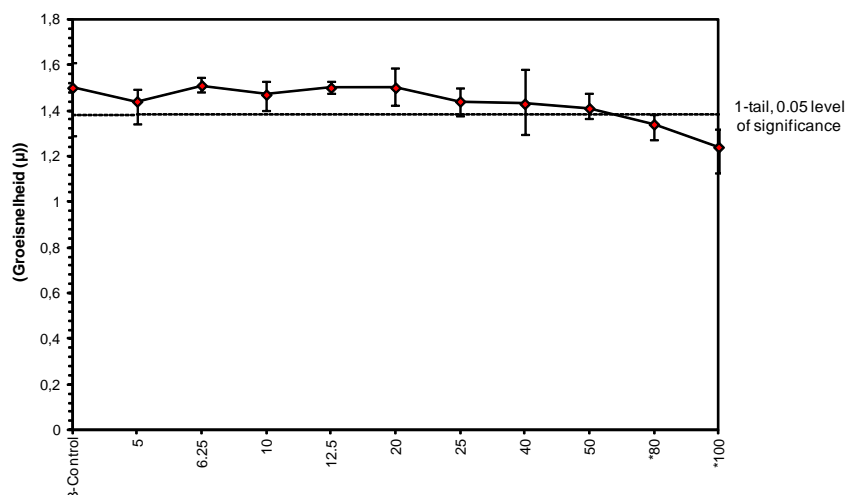
Datasheet acute toxiciteit voor algen *Skeletonema costatum*



Ruwe data en Toxcalc uitdraaien:

| Algen reproductie test-(Groeisnelheid (µ)) | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------------------------------------|----------|-----------|-----------|---------------|-----------------------------|--------|----------|-----------|-------------------|----------|----------|--------|
| Start Date: | 3/9/2012 | Test ID: | Algen-HvZ | Sample ID: | -22m | | | | | | | |
| End Date: | | Lab ID: | Ecofide | Sample Type: | Grondwater | | | | | | | |
| Sample Date: | | Protocol: | ISO 10253 | Test Species: | <i>Skeletonema costatum</i> | | | | | | | |
| Comments: | -22m | | | | | | | | | | | |
| Conc-% | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | |
| B-Control | 1,5665 | 1,4426 | 1,5555 | 1,5027 | 1,4849 | 1,4402 | 1,4909 | 1,2910 | 1,4077 | 1,3853 | | |
| B-Control | 1,4138 | 1,4076 | 1,4725 | 1,5499 | 1,5498 | 1,5868 | 1,5957 | 1,5623 | 1,5453 | 1,4990 | | |
| B-Control | 1,5580 | 1,6131 | 1,5639 | 1,5578 | | | | | | | | |
| 5 | 1,4868 | 1,3754 | 1,4867 | 1,4638 | 1,3431 | 1,4944 | | | | | | |
| 6,25 | 1,5391 | 1,4785 | 1,4987 | | | | | | | | | |
| 10 | 1,5206 | 1,5335 | 1,4475 | 1,4020 | 1,4871 | 1,4500 | | | | | | |
| 12,5 | 1,4910 | 1,4757 | 1,5279 | | | | | | | | | |
| 20 | 1,5678 | 1,4347 | 1,5268 | 1,5868 | 1,4563 | 1,4215 | | | | | | |
| 25 | 1,5005 | 1,3767 | 1,4451 | | | | | | | | | |
| 40 | 1,5782 | 1,4107 | 1,3548 | 1,5257 | 1,2908 | 1,3919 | | | | | | |
| 50 | 1,4775 | 1,3863 | 1,3632 | | | | | | | | | |
| 80 | 1,3798 | 1,2772 | 1,2846 | 1,3647 | 1,3642 | 1,3851 | | | | | | |
| 100 | 1,3221 | 1,2784 | 1,1332 | | | | | | | | | |
| Transform: Untransformed | | | | | | | | | | | | |
| Conc-% | Mean | N-Mean | Mean | Min | Max | CV% | N | t-Stat | 1-Tailed Critical | MSD | | |
| B-Control | 1,5018 | 1,0000 | 1,5018 | 1,2910 | 1,6131 | 5,340 | 24 | | | | | |
| 5 | 1,4417 | 0,9600 | 1,4417 | 1,3431 | 1,4944 | 4,543 | 6 | 1,788 | 2,663 | 0,0895 | | |
| 6,25 | 1,5054 | 1,0024 | 1,5054 | 1,4785 | 1,5391 | 2,051 | 3 | -0,081 | 2,663 | 0,1201 | | |
| 10 | 1,4734 | 0,9811 | 1,4734 | 1,4020 | 1,5335 | 3,373 | 6 | 0,843 | 2,663 | 0,0895 | | |
| 12,5 | 1,4982 | 0,9976 | 1,4982 | 1,4757 | 1,5279 | 1,790 | 3 | 0,080 | 2,663 | 0,1201 | | |
| 20 | 1,4990 | 0,9981 | 1,4990 | 1,4215 | 1,5868 | 4,735 | 6 | 0,083 | 2,663 | 0,0895 | | |
| 25 | 1,4408 | 0,9594 | 1,4408 | 1,3767 | 1,5005 | 4,305 | 3 | 1,354 | 2,663 | 0,1201 | | |
| 40 | 1,4254 | 0,9491 | 1,4254 | 1,2908 | 1,5782 | 7,547 | 6 | 2,274 | 2,663 | 0,0895 | | |
| 50 | 1,4090 | 0,9382 | 1,4090 | 1,3632 | 1,4775 | 4,290 | 3 | 2,058 | 2,663 | 0,1201 | | |
| *80 | 1,3426 | 0,8940 | 1,3426 | 1,2772 | 1,3851 | 3,615 | 6 | 4,736 | 2,663 | 0,0895 | | |
| *100 | 1,2446 | 0,8287 | 1,2446 | 1,1332 | 1,3221 | 7,947 | 3 | 5,705 | 2,663 | 0,1201 | | |
| Auxiliary Tests | | | | | | | | Statistic | Critical | Skew | Kurt | |
| Kolmogorov D Test indicates normal distribution (p > 0.01) | | | | | | | | 0,865335 | 1,035 | -0,4537 | 0,151057 | |
| Bartlett's Test indicates equal variances (p = 0.56) | | | | | | | | 8,705538 | 23,20925 | | | |
| Hypothesis Test (1-tail, 0.05) | | | NOEC | LOEC | ChV | TU | MSDu | MSDp | MSB | MSE | F-Prob | df |
| Bonferroni t Test | | | 50 | 80 | 63,24555 | 2 | 0,120086 | 0,079962 | 0,030132 | 0,005421 | 9,3E-06 | 10, 58 |

Dose-Response Plot

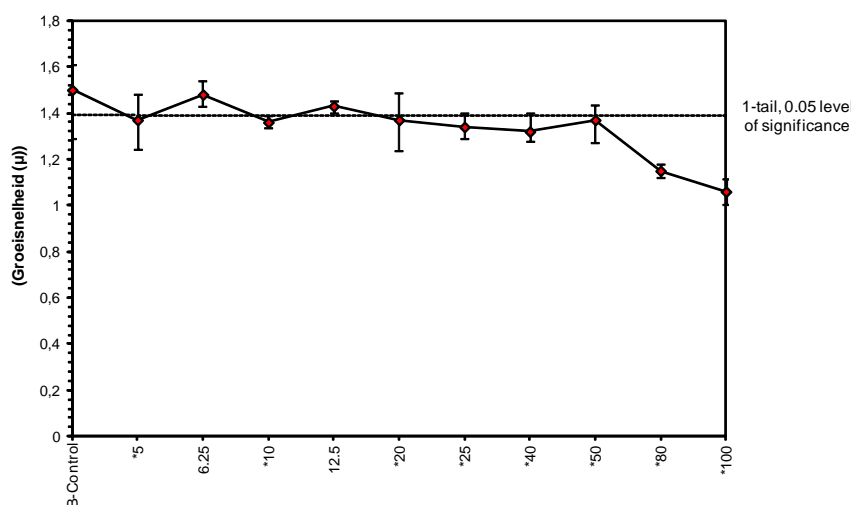


Datasheet acute toxiciteit voor algen *Skeletonema costatum*



| Algen reproductie test-(Groei snelheid (µ)) | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------------------------------------|------------------|-----------|--------------------------|---------------|-----------------------------|--------|---------|-----------|----------|----------|----------|--------|
| Start Date: | 3/9/2012 | Test ID: | Algen-HvZ | Sample ID: | -22m onbehandeld | | | | | | | |
| End Date: | | Lab ID: | Ecofide | Sample Type: | Grondwater | | | | | | | |
| Sample Date | | Protocol: | ISO 10253 | Test Species: | <i>Skeletonema costatum</i> | | | | | | | |
| Comments: | -22m onbehandeld | | | | | | | | | | | |
| Conc-% | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | |
| B-Control | 1,5665 | 1,4426 | 1,5555 | 1,5027 | 1,4849 | 1,4402 | 1,4909 | 1,2910 | 1,4077 | 1,3853 | | |
| B-Control | 1,4138 | 1,4076 | 1,4725 | 1,5499 | 1,5498 | 1,5868 | 1,5957 | 1,5623 | 1,5453 | 1,4990 | | |
| B-Control | 1,5580 | 1,6131 | 1,5639 | 1,5578 | | | | | | | | |
| 5 | 1,4096 | 1,4277 | 1,2374 | 1,2644 | 1,4785 | 1,3767 | | | | | | |
| 6,25 | 1,5367 | 1,4254 | 1,4734 | | | | | | | | | |
| 10 | 1,3624 | 1,3856 | 1,3507 | 1,3345 | 1,3567 | 1,3675 | | | | | | |
| 12,5 | 1,4035 | 1,4393 | 1,4560 | | | | | | | | | |
| 20 | 1,3195 | 1,3817 | 1,4276 | 1,3548 | 1,2347 | 1,4826 | | | | | | |
| 25 | 1,4031 | 1,3340 | 1,2942 | | | | | | | | | |
| 40 | 1,3096 | 1,3295 | 1,2936 | 1,3935 | 1,2756 | 1,2882 | | | | | | |
| 50 | 1,4349 | 1,4058 | 1,2740 | | | | | | | | | |
| 80 | 1,1207 | 1,1490 | 1,1813 | 1,1457 | 1,1401 | 1,1629 | | | | | | |
| 100 | 1,0621 | 1,1135 | 1,0076 | | | | | | | | | |
| Conc-% | Mean | N-Mean | Transform: Untransformed | | | | | 1-Tailed | | | | |
| | | | Mean | Min | Max | CV% | N | t-Stat | Critical | MSD | | |
| B-Control | 1,5018 | 1,0000 | 1,5018 | 1,2910 | 1,6131 | 5,340 | 24 | | | | | |
| *5 | 1,3657 | 0,9094 | 1,3657 | 1,2374 | 1,4785 | 6,973 | 6 | 4,312 | 2,663 | 0,0840 | | |
| 6,25 | 1,4785 | 0,9845 | 1,4785 | 1,4254 | 1,5367 | 3,777 | 3 | 0,550 | 2,663 | 0,1127 | | |
| *10 | 1,3596 | 0,9053 | 1,3596 | 1,3345 | 1,3856 | 1,258 | 6 | 4,507 | 2,663 | 0,0840 | | |
| 12,5 | 1,4329 | 0,9542 | 1,4329 | 1,4035 | 1,4560 | 1,874 | 3 | 1,626 | 2,663 | 0,1127 | | |
| *20 | 1,3668 | 0,9101 | 1,3668 | 1,2347 | 1,4826 | 6,309 | 6 | 4,277 | 2,663 | 0,0840 | | |
| *25 | 1,3438 | 0,8948 | 1,3438 | 1,2942 | 1,4031 | 4,101 | 3 | 3,732 | 2,663 | 0,1127 | | |
| *40 | 1,3150 | 0,8756 | 1,3150 | 1,2756 | 1,3935 | 3,248 | 6 | 5,919 | 2,663 | 0,0840 | | |
| *50 | 1,3716 | 0,9133 | 1,3716 | 1,2740 | 1,4349 | 6,251 | 3 | 3,076 | 2,663 | 0,1127 | | |
| *80 | 1,1500 | 0,7657 | 1,1500 | 1,1207 | 1,1813 | 1,791 | 6 | 11,150 | 2,663 | 0,0840 | | |
| *100 | 1,0611 | 0,7065 | 1,0611 | 1,0076 | 1,1135 | 4,988 | 3 | 10,410 | 2,663 | 0,1127 | | |
| Auxiliary Tests | | | | | | | | Statistic | Critical | Skew | Kurt | |
| Kolmogorov D Test indicates normal distribution (p > 0.01) | | | | | | | | 0,77215 | 1,035 | -0,67214 | 0,771206 | |
| Bartlett's Test indicates equal variances (p = 0.02) | | | | | | | | 21,83838 | 23,20925 | | | |
| Hypothesis Test (1-tail, 0.05) | | | NOEC | LOEC | ChV | TU | MSDu | MSDp | MSB | MSE | F-Prob | df |
| Bonferroni t Test | | | 12,5 | 20 | 15,81139 | 8 | 0,11275 | 0,075077 | 0,104961 | 0,004779 | 3,2E-16 | 10, 58 |

Dose-Response Plot



Datasheet acute toxiciteit voor algen *Skeletonema costatum*



Algen reproductie test-(Groei snelheid (µ))

| | | |
|----------------------|---------------------|-------------------------------------------|
| Start Date: 3/9/2012 | Test ID: Algen-HvZ | Sample ID: -45m |
| End Date: | Lab ID: Ecofide | Sample Type: Grondwater |
| Sample Da | Protocol: ISO 10253 | Test Species: <i>Skeletonema costatum</i> |
| Comments -45m | | |

| Conc-% | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| B-Control | 1,5665 | 1,4426 | 1,5555 | 1,5027 | 1,4849 | 1,4402 | 1,4909 | 1,2910 | 1,4077 | 1,3853 |
| B-Control | 1,4138 | 1,4076 | 1,4725 | 1,5499 | 1,5498 | 1,5868 | 1,5957 | 1,5623 | 1,5453 | 1,4990 |
| B-Control | 1,5580 | 1,6131 | 1,5639 | 1,5578 | | | | | | |
| 5 | 1,4458 | 1,4458 | 1,5190 | 1,4456 | 1,5461 | | | | | |
| 6,25 | 1,4092 | 1,4833 | | | | | | | | |
| 10 | 1,4113 | 1,4457 | 1,4252 | 1,4885 | | | | | | |
| 12,5 | 1,4948 | 1,4479 | 1,4816 | | | | | | | |
| 20 | 1,4593 | 1,3925 | 1,4378 | 1,6088 | 1,4734 | 1,5941 | | | | |
| 25 | 1,5552 | 1,4190 | 1,3365 | | | | | | | |
| 40 | 1,3780 | 1,3854 | 1,0192 | 1,3082 | 1,3875 | 1,5950 | | | | |
| 50 | 1,1443 | 1,1871 | 1,0518 | | | | | | | |
| 80 | 0,7499 | 0,3903 | 0,9656 | 0,7360 | 0,7673 | 0,6194 | | | | |
| 100 | 0,3872 | 0,0000 | 0,3977 | | | | | | | |

| Conc-% | Transform: Untransformed | | | | | | | Rank Sum | 1-Tailed Critical | Isotonic | |
|-----------|--------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|----|----------|-------------------|----------|--------|
| | Mean | N-Mean | Mean | Min | Max | CV% | N | | | Mean | N-Mean |
| B-Control | 1,5018 | 1,0000 | 1,5018 | 1,2910 | 1,6131 | 5,340 | 24 | | | 1,5018 | 1,0000 |
| 5 | 1,4805 | 0,9858 | 1,4805 | 1,4456 | 1,5461 | 3,278 | 5 | 61,00 | 31,00 | 1,4805 | 0,9858 |
| 6,25 | 1,4462 | 0,9630 | 1,4462 | 1,4092 | 1,4833 | 3,623 | 2 | | | 1,4645 | 0,9752 |
| 10 | 1,4427 | 0,9606 | 1,4427 | 1,4113 | 1,4885 | 2,333 | 4 | 35,00 | 19,00 | 1,4645 | 0,9752 |
| 12,5 | 1,4748 | 0,9820 | 1,4748 | 1,4479 | 1,4948 | 1,640 | 3 | 31,00 | 9,00 | 1,4645 | 0,9752 |
| 20 | 1,4943 | 0,9950 | 1,4943 | 1,3925 | 1,6088 | 5,855 | 6 | 88,00 | 44,00 | 1,4645 | 0,9752 |
| 25 | 1,4369 | 0,9568 | 1,4369 | 1,3365 | 1,5552 | 7,688 | 3 | 27,00 | 9,00 | 1,4369 | 0,9568 |
| 40 | 1,3456 | 0,8960 | 1,3456 | 1,0192 | 1,5950 | 13,886 | 6 | 49,00 | 44,00 | 1,3456 | 0,8960 |
| *50 | 1,1277 | 0,7509 | 1,1277 | 1,0518 | 1,1871 | 6,133 | 3 | 6,00 | 9,00 | 1,1277 | 0,7509 |
| *80 | 0,7048 | 0,4693 | 0,7048 | 0,3903 | 0,9656 | 27,007 | 6 | 21,00 | 44,00 | 0,7048 | 0,4693 |
| *100 | 0,2616 | 0,1742 | 0,2616 | 0,0000 | 0,3977 | 86,626 | 3 | 6,00 | 9,00 | 0,2616 | 0,1742 |

| Auxiliary Tests | Statistic | Critical | Skew | Kurt |
|------------------------------------------------------------|-----------|----------|----------|----------|
| Kolmogorov D Test indicates normal distribution (p > 0.01) | 0,995059 | 1,035 | -0,75689 | 2,335089 |
| Bartlett's Test indicates unequal variances (p = 6.60E-03) | 22,82661 | 21,66599 | | |

| Hypothesis Test (1-tail, 0.05) | NOEC | LOEC | ChV | TU |
|--------------------------------|------|------|----------|-----|
| Wilcoxon Rank Sum Test | 40 | 50 | 44,72136 | 2,5 |

| Linear Interpolation (200 Resamples) | | | | | |
|--------------------------------------|--------|-------|-------------|--------|---------|
| Point | % | SD | 95% CL(Exp) | | Skew |
| IC05 | 26,673 | 6,400 | 18,776 | 45,383 | 0,5753 |
| IC10 | 39,011 | 5,326 | 20,110 | 44,985 | -0,8481 |
| IC15 | 43,170 | 2,912 | 32,728 | 47,099 | -1,4275 |
| IC20 | 46,617 | 2,211 | 37,993 | 50,197 | -1,7442 |
| IC25 | 50,098 | 2,004 | 46,518 | 55,384 | 0,0138 |
| IC40 | 66,077 | 3,433 | 58,938 | 75,808 | 0,4163 |
| IC50 | 76,729 | 3,983 | 66,773 | 84,613 | -0,1939 |

