

**Impact of elevated  $p\text{CO}_2$  on the ecophysiology  
of *Mytilus edulis***

**Auswirkungen erhöhter  $p\text{CO}_2$  Werte auf die  
Ökophysiologie der Miesmuschel *Mytilus edulis***

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Dr. rer. nat.  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
vorgelegt von

**Jörn Thomsen**  
Kiel, 2012

Referent: Prof. Dr. Frank Melzner

Koreferent: Prof. Dr. Arne Körtzinger

Tag der mündlichen Prüfung: 25.05.2012

Zum Druck genehmigt am: 25.05.2012

## Summary

## Zusammenfassung

<b>1</b>	<b>Introduction</b>	<b>1</b>
1.1	Ocean acidification	1
1.2	Biological impacts of ocean acidification	4
1.3	Physiological response to elevated $p\text{CO}_2$	5
1.4	<i>Mytilus edulis</i>	6
1.5	Biomineralization	7
1.6	Ammonia excretion mechanisms	9
1.7	The Baltic Sea and Kiel Fjord	11
1.8	Questions and research hypothesis	12
<b>2</b>	<b>Material and Methods</b>	<b>15</b>
2.1	Biogeochemical analyses	15
2.1.1	Monitoring of Kiel Fjord seawater carbonate chemistry	15
2.1.2	Seawater analyses	16
2.2	Animals	17
2.3	Laboratory experiments	17
2.3.1	General experimental setup	17
2.3.2	$\text{CO}_2$ manipulation	18
2.3.3	Nutrition	18
2.4	Field experiments	19
2.4.1	Larval settlement	19
2.4.2	Mussel shell growth	19
2.5	Determination of whole animal performance	20
2.5.1	Growth and calcification	20
2.5.2	Determination of metabolic rates	20
2.5.3	Oxygen consumption	21

---

2.5.4	Ammonium excretion	21
2.5.5	Calculation of O:N ratio, metabolic energy turnover and energetic contents	22
2.6	Determination of extracellular acid-base status and ion concentrations	22
2.7	Biochemical and molecular work	24
2.7.1	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase and H <sup>+</sup> -ATPase activity	24
2.7.2	Tissue and haemolymph ammonia concentration	24
2.7.3	Molecular work	24
<b>3</b>	<b>Publications</b>	<b>27</b>
	Publication I: Calcifying invertebrates succeed in a naturally CO <sub>2</sub> enriched coastal habitat but are threatened by high levels of future acidification	29
	Publication II: Moderate seawater acidification does not elicit long-term metabolic depression in the blue mussel <i>Mytilus edulis</i>	59
	Publication III: Food availability outweighs ocean acidification effects in the mussel <i>Mytilus edulis</i>	81
<b>4</b>	<b>Discussion</b>	<b>115</b>
4.1	pCO <sub>2</sub> variability in the western Baltic Sea	115
4.2	Impact of elevated pCO <sub>2</sub> on <i>Mytilus edulis</i>	119
4.2.1	Calcification	119
4.2.2	Acid-base regulation	123
4.2.3	Metabolic rates, scope for growth and NH <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> excretion	125
4.3	<i>Mytilus</i> and the benthic community in a high pCO <sub>2</sub> ecosystem	130
<b>5</b>	<b>Conclusion and outlook</b>	<b>133</b>
<b>6</b>	<b>References</b>	<b>135</b>

## Summary

Increasing atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations equilibrate with the surface water of the oceans and thereby increase seawater pCO<sub>2</sub> and decrease [CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>] and pH. This process of ocean acidification is expected to cause a drastic change of marine ecosystem composition and a decrease in calcification ability of various benthic invertebrates. The studied area, Kiel Fjord, is characterized by high pCO<sub>2</sub> variability due to upwelling of O<sub>2</sub> depleted and CO<sub>2</sub> enriched bottom water. Within less than 50 years, eutrophication of the Baltic Sea has drastically increased the mean pCO<sub>2</sub> in the fjord. The observed increase and also the rate of this acidification process is much higher than it is expected for the global ocean as a consequence of increasing atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations. In contrast to other areas subjected to elevated pCO<sub>2</sub>, calcifying invertebrates inhabit Kiel fjord and the benthic community is dominated by the blue mussel *Mytilus edulis*. Mussel larvae settle in the period of the year when highest pCO<sub>2</sub> (800-2300 µatm) are encountered, which is, at the same time, the main growth period due to highest phytoplankton densities.

In laboratory experiments, calcification rates of *M. edulis* are maintained at elevated pCO<sub>2</sub> levels which are expected to occur by the year 2300. Only at high pCO<sub>2</sub> above 3000 µatm, calcification is significantly reduced. One possible reason for this tolerance is the fact that even under control conditions, the extracellular body fluids (haemolymph and extrapallial fluid, EPF) of *M. edulis* are characterized by low pH and [CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>] and high pCO<sub>2</sub>. Therefore, the EPF which is in direct contact with the shell is undersaturated with calcium carbonate also at current, low seawater pCO<sub>2</sub>. Under elevated pCO<sub>2</sub>, mussels do not buffer the extracellular acidosis by means of bicarbonate accumulation. Thus haemolymph pH and [CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>] are reduced even further. Calcification might not be affected by the extracellular acidosis, as an amorphous calcium carbonate (ACC) precursor is most probably formed in intracellular vesicles. Since mussels are able to efficiently regulate the intracellular pH, reduced extracellular pH might therefore have only little impact on the initial calcification process. On the other hand, the production of the organic shell components, e.g. the periostracum, consumes high amounts of energy. Especially in young thin shelled life stages with a higher organic shell content most of the energy allocated to growth is required for shell production.

Under elevated pCO<sub>2</sub>, mussels initially (two months acclimation) up - regulate their metabolic rates which may indicate higher energy demand for ion regulatory processes. Long-term acclimated animals (12 months acclimation) probably switch to an energetically less expensive compensation and do not exhibit elevated aerobic metabolism. However, long-term acclimated mussels are characterized by lower filtration rates. As consequence, after both intermediate and long-term exposure, the scope for growth is reduced in high pCO<sub>2</sub> acclimated animals. Additionally, after intermediate and also long-term acclimation to elevated pCO<sub>2</sub>, protein metabolism is increased, as indicated by an elevation of ammonia excretion rates. This mode of energy generation is less efficient than oxidation of lipid or carbohydrate and may contribute to lower energy availability for growth and calcification. Similar to other aquatic animals, ammonia excretion in mussels seems to be facilitated by NH<sub>3</sub> diffusion through

Rhesus (Rh) and ammonium transporter (Amt) protein channels and subsequent acid-trapping by separate proton excretion.

In order to test the importance of energy supply and elevated  $p\text{CO}_2$  on mussel calcification, juvenile *M. edulis* were exposed to a crossed experimental design for seven weeks. Higher food supply enables mussels to calcify also under highly elevated  $p\text{CO}_2$ . In general food supply is the most important factor which determines the growth rates of mussels whereas  $p\text{CO}_2$  has only a minor effect. In a simultaneous field study, mussels were transplanted to the energy rich high  $p\text{CO}_2$  inner fjord and to the outer parts of the fjord at lower  $p\text{CO}_2$  and particulated organic carbon concentrations. Similar to the laboratory experiment, mussels exhibit much higher growth rates in the high  $p\text{CO}_2$  inner fjord with its higher particulate organic carbon concentrations. This reveals the importance of energy availability impacting  $\text{CO}_2$  tolerance of *M. edulis*.

Mussels seem to be relatively tolerant to elevated  $p\text{CO}_2$  both in laboratory experiments and under current high  $p\text{CO}_2$  conditions in Kiel Fjord. The high energy availability present in the eutrophicated habitat may support the tolerance to elevated  $p\text{CO}_2$ . In the future, increasing atmospheric  $\text{CO}_2$  concentrations will drastically elevate  $p\text{CO}_2$  level in this habitat. The benthic life stages seem to be able to cope with the expected levels but planktonic larvae might be vulnerable. However, *M. edulis* exhibit a high adaptation potential to the rate of acidification in the recent past and might be able to adapt also to higher levels in future. In order to predict the success of *M. edulis* in future, also effects of elevated temperature and the response of their main predators to these conditions needs to be considered.

## Zusammenfassung

Die steigenden  $\text{CO}_2$  Konzentration der Atmosphäre und die folgende Äquilibration mit dem Oberflächenwasser der Ozeane führen zu erhöhten  $p\text{CO}_2$  und sinkenden Karbonationen Konzentrationen ( $[\text{CO}_3^{2-}]$ ) und pH Werten. Die sogenannte Ozeanversauerung hat vermutlich weitreichende Auswirkungen auf die marinen Ökosysteme und führt möglicherweise dazu, dass die Kalzifizierungsraten insbesondere benthischer Wirbelloser abnimmt. Das Untersuchungsgebiet der Kieler Förde weist, durch den Auftrieb bodennahen Wassers mit niedriger  $\text{O}_2$  Sättigung und hohen  $\text{CO}_2$  Konzentrationen, bereits heutzutage hohe und variable  $p\text{CO}_2$  Werte auf. Innerhalb der letzten 50 Jahre hat die Eutrophierung zu einer deutlichen Erhöhung der  $p\text{CO}_2$  Werte in der Förde geführt. Damit ist sowohl das Ausmaß als auch die Geschwindigkeit der Versauerung höher, als es für die weltweiten Ozeane im Zuge des zukünftigen  $\text{CO}_2$  Anstiegs zu erwarten ist. Im Gegensatz zu anderen Gebieten, die vergleichbar erhöhten  $p\text{CO}_2$  Werten ausgesetzt sind, leben zahlreiche kalzifizierende Wirbellose in der Förde und die Miesmuschel *Mytilus edulis* dominiert die benthische Gemeinschaft. Die Larven der Muscheln siedeln insbesondere in der Jahreszeit in der die höchsten  $p\text{CO}_2$  Werte (800-2300  $\mu\text{atm}$ ) auftreten. Aufgrund der hohen Phytoplanktonkonzentrationen ist dies ebenfalls die Zeit der höchsten Wachstumsraten.

In Laborversuchen ist *M. edulis* in Lage die Kalzifizierungsraten unter erhöhten  $p\text{CO}_2$  Werten, die für das Jahr 2300 erwartet werden, aufrechtzuerhalten. Extrazelluläre Flüssigkeiten (Hämolymphe und extrapalliale Flüssigkeit, EPF) weisen auch unter Kontrollbedingungen hohe  $p\text{CO}_2$  Werte und niedrige pH und  $[\text{CO}_3^{2-}]$  auf. Die EPF, die in direktem Kontakt zur Schale steht, ist demnach auch bei niedrigem Meerwasser  $p\text{CO}_2$  mit Kalziumkarbonat untersättigt. Bei erhöhtem Meerwasser  $p\text{CO}_2$  säuert sich die Hämolymphe an und wird nicht durch Bikarbonat gepuffert. Die Ansäuerung des extrazellulären Raumes hat vermutlich deshalb nur geringe Auswirkungen auf die Kalzifizierung, da ein amorpher Kalziumkarbonatvorläufer bereits in intrazellulären Vesikeln gebildet wird. Muscheln können den intrazellulären pH weitestgehend unabhängig vom Außenmedium regulieren, weshalb die extrazelluläre Ansäuerung die Schalenbildung nur geringfügig beeinflusst. Allerdings benötigt die Synthese der organischen Schalenbestandteile sehr viel Energie. Insbesondere in jungen, dünnchaligen Lebensstadien, die Schalen mit einem höheren Organikanteil aufweisen, wird der größte Teil der für das Wachstum benötigten Energie in die Schalenbildung investiert.

Unter erhöhtem  $p\text{CO}_2$ , weisen Muscheln zunächst höhere metabolische Raten auf, was möglicherweise auf einen erhöhten Energiebedarf für aktive Ionentransportprozesse hinweist. Nach langer Akklimation scheinen sie auf eine effizientere Regulation zu wechseln und der aerobe Stoffwechsel ist nicht mehr erhöht. Allerdings nimmt die Filtrationsleistung ab. In beiden Fällen ist demnach die Energie, die für das Wachstum zur Verfügung steht, reduziert. Außerdem ist nach mittlerer und Langzeit-Akklimierung der Proteinstoffwechsel erhöht, erkennbar an der höheren Ammoniumexkretion. Diese Art der Energiegewinnung ist weniger effizient als Lipid- und kohlenhydratstoffwechsel und könnte zu einer verminderten Energieverfügbarkeit beitragen. Wie auch in anderen aquatischen Tieren scheint die Ammoniumexkretion in Muscheln durch Rhesus (Rh) und

Ammoniumtransporter (Amt) Kanalproteine und eine anschließende Protonierung gefördert zu werden.

Die Bedeutung von Energieversorgung und erhöhtem  $p\text{CO}_2$  auf die Kalzifizierung ist in einem gekreuzten Versuchsansatz getestet worden. Höhere Futterzugabe ermöglicht den Muscheln die Kalzifizierung auch unter hohen  $p\text{CO}_2$ . Generell ist die Futterzufuhr von größerer Bedeutung für das Wachstums während  $p\text{CO}_2$  nur einen geringen Effekt hat. In einem zeitgleich durchgeführten Feldexperiment sind junge Muscheln in die Innenförde mit ihren hohen  $p\text{CO}_2$  und in die Außenförde mit niedrigeren  $p\text{CO}_2$  und partikulären organischen Kohlenstoffkonzentrationen verpflanzt worden. In Übereinstimmung mit dem Laborexperiment, weisen die Tiere in der inneren Förde trotz des höheren  $p\text{CO}_2$  deutlich höhere Wachstumsraten als die in der Außenförde auf. Dieses Ergebnis betont die Bedeutung der Energieverfügbarkeit für die Toleranz von *M. edulis* gegenüber der Ozeanversauerung.

Muscheln scheinen gegenüber erhöhten  $p\text{CO}_2$  Werten in Laborexperimenten aber auch innerhalb der Kieler Förde relativ tolerant zu sein. Die hohe Energieverfügbarkeit in dem eutrophierten Habitat der Kieler Förde könnte die Toleranz gegenüber hohen  $p\text{CO}_2$  Werten fördern. Allerdings werden die steigenden  $\text{CO}_2$  Konzentrationen der Atmosphäre die  $p\text{CO}_2$  Werte der Förde zukünftig deutlich erhöhen. Während die benthische Lebensphase gegenüber den erwarteten Werten tolerant zu sein scheint, könnten die planktischen Larven sensibler sein. Allerdings wies *M. edulis* eine hohe Anpassungsrate an die Versauerung der jüngeren Vergangenheit auf und könnte dementsprechend auch in der Lage sein, sich an zukünftige Bedingungen anzupassen. Um verlässlich vorherzusagen, ob *M. edulis* auch in Zukunft erfolgreich sein wird, ist es notwendig auch die Effekte erhöhter Temperaturen und die Auswirkungen solcher Bedingungen auf die Haupttrüberorganismen zu berücksichtigen.