

I.C.W.B.

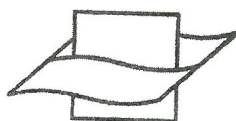
MATHEMATISCH MODEL VAN DE
POLLUTIE IN DE NOORDZEE.

TECHNICAL REPORT

1972/PHYSIOL.-SYNTHESE 03

222758

EXPERIMENTELE STUDIE VAN DE ACCUMULATIE IN DE VOEDSEL-
KETEN VAN DE POLLUANTEN AANWEZIG IN ZEEWATER EN SEDIMENT-
STALEN AFKOMSTIG VAN VERSCHILLENDE BEMONSTERINGSPLAATSEN.



Vlaams Instituut voor de Zee
Flanders Marine Institute

Interfacultair Centrum voor de Studie van Lucht-,
Bodem- en Waterverontreiniging. Rijksuniversiteit Gent.

G. Persoone & G. Uyttersprot.

Experimentele studie van de accumulatie in de voedselketen van de pollutanten aanwezig in zeewater en sedimentstalen afkomstig van verschillende bemonsteringsplaatsen.

De studie van de "rechtstreekse invloed" van pollutanten en toxische stoffen op organismen door korte of lange "in vitro" proeven is een techniek die sinds de jaren veertig een enorme uitbreiding heeft genomen.

Elk van de duizenden nieuwe produkten die door de scheikundige industrie worden gesynthetiseerd worden onderworpen aan toxicologische proeven de zgn. "bio-assays". Deze worden meestal uitgevoerd op warmbloedige vertebraten zoals ratten of muizen ten einde door extrapolatie de "gevaarlijke concentratie" te bepalen voor de mens.

Het aantal stoffen waarven men de toxiciteitsgraad ook heeft uitgetest op vertegenwoordigers van aquatische ecosystemen is echter maar een uiterst minieme fraktie van het totaal. Daarenboven komt nog dat deze testen praktisch uitsluitend uitgevoerd worden op adulte vissen hetgeen vooral te wijten is aan de zeer fragmentaire kennis van de kweekproblematiek van de andere componenten van de normale voedselketen : wieren, eencelligen en andere invertebraten.

Voor het marien milieu staan de zaken er nog veel slechter voor en uit de verslagen van het "FAO Technical Conference on Marine Pollution and its effects on living resources and fishing " (Rome 1970) blijkt duidelijk dat slechts een zeer gering aantal laboratoria fundamenteel bio-assay onderzoek met mariene wieren, invertebraten of vissen uitvoeren.

De synthese en voorstellen geformuleerd door Prof. M. Fontaine, Directeur des débats, van "het paneel":

"Effets des agents polluants sur la vie et le cycle biologique des organismes marins" bewijzen trouwens overduidelijk onze minieme kennis van dit aspect van het pollutieprobleem. BUTLER had trouwens in 1967 reeds zeer pertinent volgende vaststelling geformuleerd : "Its is relatively simple to determine the pollution levels that will cause acute toxic reactions for example the amount of a pesticide required to kill a particular species of animal in a given period of time. It is much more difficult

and (we realize now) much more important to determine the consequences of chronic low levels of pollution. A toxicant in the environment at sublethal concentration might interfere with growth or reproduction without ever being noticed or, at least, identified as the causal agent".

Ook HALSTEAD (1970) waarschuwt in dezelfde richting : "Unfortunately some of the most serious problems facing us in the marine ecosystem to-day are associated with chronic intoxications that are long term and have low level effects. The pathology may pass undetected until it is too late to correct or control the causative pollutants. This may result in massive destruction and an enormous build-up of toxic constituents in the environment long before they are detected".

Het is pas de laatste tien jaar dat men er zich rekenschap heeft van gegeven dat in de natuur de verschillende komponenten van de voedselketen niet alleen onderhevig zijn aan de gevolgen van "direkte toxiciteit" maar ook en vaak in veel erger mate de gevolgen ondergaan van "onrechtstreekse toxiciteit".

Een van de meest gevaarlijke vormen van "onrechtstreekse toxiciteit" is het verschijnsel van "biological magnification" ofté accumulatie van toxische stoffen in de voedselketen.

Tragisch doch typerend voorbeeld hiervan is de "Minamata-ziekte" die in Japan talrijke slachtoffers heeft gemaakt. Een tweede voorbeeld door iedereen gekend is de accumulatie van DDT langsheen de voedselketen tot in de moedermelk.

Technologische moeilijkheden bij het kweken van test-organismen hebben tot nog toe het aantal experimentele studies over "biological magnification" zeer sterk beperkt.

AUBERT et al (1969) zijn één der eersten geweest om langs een eenvoudige voedingsketen bestaande uit een primaire producent (het kiezelwier Asterionella japonica en het groenwier Di-genes sp.) een primaire consument (het pekelkreeftje : Artemia salina), een secundaire consument (de goudvis : Carassius auratus) en een tertiaire consument (de muis : Mus musculus), de accumulatie van toxische stoffen in de voedselketen te proberen volgen.

De experimentele procedure die zij hiervoor gebruikt hebben is de volgende :

"En un premier temps nous effectuons un test échelon par échelon et nous déterminons les seuils de toxicité du produit pour chacune des espèces. Nous choisissons alors une concentration en corps toxiques que nous conserverons pendant toute la durée de l'expérience. Cette concentration est choisie égale ou légèrement inférieure au seuil de toxicité le plus bas rencontré au long de la chaîne trophique de façon à ce que celle-ci ne puisse être interrompue à aucun moment.*

Les micro-algues sont alors mises en culture dans un milieu contenant le toxique à la dite concentration.

Après 4 jours, on obtient une culture très dense dans laquelle on introduit des Artemia salina fraîchement écloses.

Ces dernières se nourrissent pendant 4 jours de micro-algues et sont alors données comme nourriture aux poissons pendant 4 jours; l'eau contenant les poissons est-elle même polluée à la même concentration. Après les 4 jours d'alimentation polluée, les poissons sont retirés du milieu et donnés en nourriture pendant 6 jours aux souris de laboratoire qui sont surveillées encore pendant 15 jours après la fin de l'expérience.

... Les résultats sont généralement exprimés en pourcentage de mortalité des souris d'expérience".

We halen hierbij enkele resultaten aan die door deze auteurs vastgesteld werden :

<u>Rejets testés</u>	<u>Dilution</u>	<u>Souris mortes %</u>
Parfums synthétiques	1/8	80
Insecticides	1/32	30
Sels et oxydes métalliques	1/8	60
Ciment	1/32	60
Pâte à papier	1/4	75
Engrais chimiques	1/64	0
Pétrochimie	1/64	0

* In een latere publicatie (Aubert et al 1970) vermelden de auteurs dat zij uitgaan van een concentratie die de helft is van deze die het wegvallen van één der trappen in de voedingsketen veroorzaakt.

De conclusies van de schrijvers zijn dan ook zeer pertinent :
"Ces chiffres montrent combien peut-être trompeuse une mesure de toxicité directe; ainsi la plupart des corps qui avaient manifesté une toxicité faible ou nulle au niveau des êtres aquatiques se révèlent être d'une très grande nocivité pour des mammifères nourris à partir de cette chaîne alimentaire qui s'est développée dans les eaux polluées sans grand dommage apparent. De tels rejets représentent un danger indiscutable vis-à-vis de la consommation que l'on peut faire du poisson intoxiqué sans que cela soit visible."

Ofschoon we niet altijd akkoord gaan met de methodologie die door deze auteurs wordt aangewend is het onmiskenbaar dat ze baanbrekend werk hebben verricht wat de experimentele benadering van dit uiterst belangrijk probleem aangaat.

In het kader van het "mathematisch model van de Noordzee" hebben wij gepoogd de resultaten van onze rechtstreekse toxiciteits-onderzoekingen (zie partim A) aan te vullen met experimenten over accumulatie van pollutanten in de voedselketen.

Vier verschillende soorten proeven zijn thans aan de gang steeds uitgaande van water of sedimentstalen verzameld tijdens de croisières.

WATER 1) Accumulatie van pollutanten in de keten

Dunaliella salina - Artemia salina - Brachydanio rerio

2) Accumulatie van pollutanten in de keten

Phaeodactylum tricornutum - Macoma baltica -

Pomatoschistus minutus

SEDIMENT 1) Accumulatie van pollutanten in Macoma baltica

uitsluitend levend van gepollueerde sedimenten

2) Accumulatie van pollutanten in de korte keten - Dunaliella

salina - Artemia salina, met eerstgenoemde gekweekt op een schudextract: zeewater - sediment.

Volgens een recente mededeling
van de algotheek waarvan de enten
afkomstig zijn, zou de gebruikte
Dumaliella niet D. salina, maar
hoogstwaarschijnlijk D. vividis
TEODORESCO zijn.

W A T E R.

=====

1) Accumulatie van polluanten in de keten Dunaliella salina
Artemia salina - Brachydanio rerio.

Ofschoon deze proef op het eerste zicht een zekere analogie vertoont met de experimenten van AUBERT et al (op cit) verschilt hij er toch in sterke mate van enerzijds door de methodologie en ten tweede door de veel langere tijd waarin de secundaire konsumenten (de vissen) gekontamineerd voedsel ontvangen (30 dagen i.p.v. 4).

Principe : Een massakweek van wieren wordt opgezet uitgaande van 30 liter gepollueerd water. De wieren worden gecogst en de helft wordt onderworpen aan scheikundige analyse voor detectie van polluanten. De andere helft wordt als voedsel gebruikt voor een massakweek van larvale pekelkreeftjes (Artemia salina). De helft van de kreeftjes wordt opnieuw scheikundig onderzocht, de andere helft wordt als voedsel gebruikt voor zebravisjes (Brachydanio rerio). Na 30 dagen gevoederd te zijn met (gepollueerde) Artemia worden de visjes gedood en scheikundig onderzocht.

N.B. Vermelden we nu reeds dat in verschillende opstellingen sterfte optrad bij de vissen die gedurende een aantal dagen gekontamineerd voedsel hadden ontvangen.

Experimentel procedure.

1. Wierproduktie : Voor ieder te onderzoeken staal werd 40 liter oppervlaktewater genomen op één der punten van de "croisières" en koel bewaard (4 ° C) tot verwerking.

Het water wordt gefiltreerd op membraanfilter van 0,2 mikron. Indien de saliniteit van het staal beneden de 30 ‰ is (bv. water uit de estuaria) wordt het zoutgehalte aangepast tot 30 ‰ met artificieel zeewater van hogere saliniteit klaargemaakt volgens de formule van LYMAN en FLEMING.

Na op temperatuur van de kweekkamer te zijn gebracht wordt 30 liter van het staal in de verticale polyethyleenkweekkolommen gegoten (Fig. 1).

Ieder van deze kolommen (Fig. 2) bestaat uit 2 korte PVC cilindern A en B (diameter 16 cm) waartussen een 2 meter lange doorschijnende polyethyleencylinder van 0,2 mm dikte gespannen wordt met klemmen. Iedere kolom is opgehangen in een metalen kader. Cylinder B is voorzien van een bodem en bezit een adaptatiestuk 3 voor luchtdoorborreling en een aftapkraan 4.

Iedere kweekkolom wordt belicht links, rechts en achteraan door TL buizen van 60 Watt.

Dergelijke "units" die volledige voldoening schenken zijn niet alleen veel minder broos dan bv. glazen cilindern maar bovendien zeer goedkoop. Na gebruik kan de plastic cylinder hetzij uitgewassen worden, hetzij vervangen door een nieuwe.

Nadat het 30 liter staal in de kolom is overgebracht wordt een bepaald volume stock van een voedingsmilieu voor wieren toegevoegd tot de geschikte concentratie. Het gebruikte medium dat een uitstekende groei geeft voor de eencellige nannoplankton Dunaliella salina is het zgn. medium van VLASBLOM, een modificatie van het milieu van WALNE (1956).

Samenstelling :

Stock :	FeSO ₄ .7H ₂ O	:	0,278 g
	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	:	3,0 g
	NaNO ₃	:	30 g
	MnCl ₂ .4H ₂ O	:	0,470 g
	Glycine	:	50 g
	aq. dest tot		1 liter.

Per liter zeewater wordt 10 ml stock toegevoegd.

De kweekkolom met zeewater en voeding wordt vervolgens ingeënt met Dunaliella salina tot een concentratie van $0,2 \cdot 10^6$ cellen per ml.

De ent is afkomstig van stock-kulturen die in 1 liter-Baxter flessen worden gekweekt op artificieel zeewater en Vlasblom medium (Fig. 3).

De wieren die voor de ent gebruikt worden, worden steeds geoogst in de exponentiële fase.

De groeikurve van de stock-kulturen wordt gevolgd door dagelijks tellen van de wierconcentratie in de flessen met behulp van een elektronische partikelcounter (TOA-Microcellcounter of Coulter-counter).

Tijdens de proef wordt de wierconcentratie in de kweekkolom dagelijks geteld.

Wanneer de concentratie opgelopen is tot ongeveer $2,0 \cdot 10^6$ cellen/ml worden de wieren geoogst door centrifugatie.

In deze gevallen waar de groeikurve de $2,0 \cdot 10^6$ cellen/ml niet kan bereiken (bv. door afremming van de groei door te hoge concentratie aan toxikanten) worden de cellen afgecentrifugeerd nadat de plateaufase bereikt is.

Als blanco werd in analoge omstandigheden en op dezelfde manier een kweek opgezet van Dunaliella in artificiëel zee-water (bereid naar LYMAN en FLEMING). Alle kweekkolommen zijn opgesteld in een kamer gethermostatiseerd op 23 ° C.

De biomassa wieren afkomstig van de 30 liter cultuur wordt in gelijke hoeveelheden verdeeld over 3 recipiënten, 2 ervan worden onmiddellijk diepgevroren bij -16° C en zijn bestemd voor de scheikundige analyse (anorganische en organische detectie van pollutanten). De wieren van het 3de recipiënt worden geresuspendeerd in 400 ml artificiëel zeewater en deze suspensie onderverdeeld in 4 polytheen potjes van 100 ml. Deze suspensies worden dan diepgevroren en verder bewaard bij -16° C. Zij zullen dienen als voedsel voor de volgende trap : de Artemia kweek.

De coördinaten van de uitgevoerde proeven zijn in tabel 1 weergegeven.

2. Artemia-kweek.

Gedroogde Artemia-eieren (afkomstig van UTAH-USA) worden gehatcht in een speciaal ontworpen hatching and separator-box (Persoone en Sorgeloos 1972) (Fig. 4).

Na de separatie worden van de totale batch telkens 25.000 larven geïsoleerd in een beker, door elektronische telling met een speciaal ontworpen toestel voor het tellen van grotere organismen (VAN OUTRYVE en SORGeloos 1972) (Fig. 5).

25.000 larven worden vervolgens overgebracht in een glazen fles van 10 liter, gevuld met artificiëel zeewater (met saliniteit 34 ‰ - bereid volgens de formule van DIETRICH en KALLE 1963) gefiltreerd op membraanfilter van 0,2 μ . Vier analoge flessen (dus in totaal 100.000 larven) worden op die manier klaargemaakt en gesloten met een rubber stop, voorzien van glazen buisjes met PVC darmpjes.

De flessen worden omgekeerd gemonteerd in een metalen kader (Fig. 6) en overgebracht naar een kweekkamer gethermostatiseerd op 28 ° C.

2 maal per dag, gedurende 2 dagen, wordt aan iedere fles 25 ml van de ontdooide wiersuspensie toegevoegd. Om het half uur wordt langs een elektrische switch die een luchtpomp controleert, gedurende één minuut, lucht door de flessen geborreld om het water van de nodige zuurstof te voorzien en tevens het voedsel en de proefdieren homogeen over de watermassa te verdelen.

Preliminair experimenten (SORGELOOS 1972) hebben uitgewezen dat deze beschreven procedure uitstekende resultaten geeft voor de kweek van pekelkreeftjes en dat de gebruikte wierconcentratie de optimale voedselconcentratie benadert, voor deze experimentele omstandigheden. (Ieder Artemia-larve ontvangt in totaal 40.000 wiercellen als voedsel).

Als controle wordt een analoge 4 x 10 liter opstelling gevoederd met de wieren gekweekt op artificiëel zeewater.

Na 48 uur worden de larven van ieder 10 liter fles gerecupeerd op een planktongas en opnieuw gesuspenderd in artificiëel zeewater. Mikroskopisch onderzoek wees telkens uit dat de mortaliteit van de Artemia-larven (die zeer resistent zijn aan pollutie) steeds minder was dan 5 %

Met behulp van de elektronische counter worden de larven geteld. 2 x 12.500 larven worden in buisjes gebracht en diepgevroren. Ze dienen voor scheikundig onderzoek. De rest der larven wordt in kleine (4 ml) polytheenbuisjes gebracht à rato van 1000 larven per buisje, en diepgevroren (-16° C). Zij zullen als voedsel dienen voor de laatste trap : de vissen.

3. Viskweek.

Ofschoon het voor de hand lag voor de laatste trap in de voedingsketen een mariene vissoort te gebruiken hebben wij (zoals AUBERT et al) voor al onze proeven gebruik gemaakt van een zoetwater-vis : het zebravisje, Brachydanio rerio (HAMILTON) en dit voor verschillende redenen:

- 1° de meeste vissoorten van de Noordzee verdragen geen hoge temperaturen en het was ons materieel en technologisch onmogelijk op dat ogenblik een 3de kweekkamer bij lage temperatuur op te stellen (Sindsdien is dit probleem opgelost en beschikken wij over een "koude kweekkamer");
- 2° er bestaat ons insziens geen fundamenteel verschil in gevoeligheid t.o.v. toxikanten tussen zoetwater en mariene vissen die hetzelfde voedsel ontvangen. Daarenboven zijn alle resultaten onderling vergelijkbaar gezien steeds gebruik werd gemaakt van dezelfde soort proefdieren, met dezelfde experimentele omstandigheden.
- 3° de gebruikte zoetwatervis is een gemakkelijk te kweken soort. Hij is daarenboven klein (2,5-3cm) zodat de kwantiteit voedsel (zie verder) die hij gedurende 20 dagen ontvangt een belangrijke fractie is van zijn eigen biomassa (dit is absoluut niet het geval in de proeven van AUBERT et al (op cit) die goudvissen gebruiken, dus een relatief grote soort die slechts gedurende een beperkt aantal dagen gevoed worden met een zeer geringe kwantiteit Artemia-larven).

Volwassen exemplaren van het Zebra-visje worden in stock gehouden in grote aquaria en gevoederd met Tetracycl (Tetra). Twee exemplaren worden geïsoleerd en overgebracht in gescheiden kleine polyethyleen aquaria (10 liter) met air-water lift (Fig. 7), gevuld met 6 l. zoetwater bereid naar de formule van CAIRNS

	<u>mg/l</u>
CAIRNS soft water : KCl	20
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	20
NaHCO ₃	40
MgSO ₄ ·7H ₂ O	40
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	40

	mg/l
CaCO ₃	10
K ₂ HPO ₄	2
Fe(ferric citrate)	0,4
aq. dest.	1 liter

De aquaria staan in een lokaal geconditioneerd op 23 ° C.
De vissen worden gedurende 1 week niet gevoederd en krijgen nadien 2 x per dag (week-ends uitgezonderd), 1000 Artemia-larven (1 buisje ontdood), dit tot uitputting van de Artemia-stock (na ongeveer één maand).

Als controle worden 2 visjes gevoederd met "blanco" Artemia larven (gevoed met "niet-gepollueerde" wiertjes).
Op het einde van de proef worden de vissen gedood en diepgevroren. Zij worden dan toevertrouwd aan de scheikundigen voor onderzoek naar accumulatie van anorganische en organische pollutia.

Resultaten.

Op 1 oktober 1972 waren 23 stalen van 40 liter afkomstig van diverse CIPS punten in de Noordzee en de estuaria behandeld tot en met de massakweek van wieren (tabel 1).

Zoals blijkt uit het aantal dagen tussen inenten en afcentrifugeren is de groeisnelheid sterk beïnvloed geweest door de kwaliteit van het zeewater. In sommige stalen was na 3 dagen al een concentratie bereikt van $2,4 \cdot 10^6$ cellen/ml, in andere was de concentratie na een week nog maar $1,1 \cdot 10^6$ cellen/ml.

Voor 15 van deze stalen werd de proef reeds voortgezet, tot op het Artemia-stadium, vervolgens voor 9 tot op het vis-stadium (8 + 1 blanco).

Het betreft voor dit laatste stadium de punten 06, 1007, 1035, 1049, 1065, 1167, 1257, en boei 94.

Zoals reeds vermeld werd bij de Artemia-kweek geen mortaliteit vastgesteld.

Bij de vissen echter, en dit is uiterst belangrijk, werd in 6 van de 8 gevallen sterfte vastgesteld, vaak met typische symptomen van intoxicatie, zoals het voortdurend wentelen van het proefdier om zijn longitudinale (cranio-caudale) as. De intensiteit van dit verschijnsel neemt sterk toe met de tijd.

Na een 3-tal dagen begint de vis, steeds wentelend om zijn longitudinale as, in wijde kringen te zwemmen, kringen die met de tijd kleiner en kleiner worden; 48 uren later sterft de vis.

Daar het aantal proefdieren zeer beperkt was konden we geen histo-pathologisch onderzoek uitvoeren vermits de vissen bestemd zijn voor scheikundig onderzoek. De waargenomen symptomen wijzen alle op een verstoren van evenwichts- en coördinatiecentra, dus op een aantasting van de kleine hersenen (cerebellum) en het perifere zenuwstelsel.

De stalen waarbij sterfte optrad zijn de volgende :

1049 (sampling 120272) : 2 vissen dood na respectievelijk
18 en 20 dagen

1035 (sampling 130272) : 2 vissen dood na respectievelijk
14 en 28 dagen

06 (sampling febr. 72) : 1 vis dood na 21 dagen

1007 (sampling maart 72) : 1 vis dood na 15 dagen

1257 (sampling maart 72) : 2 vissen dood na respectievelijk
18 en 22 dagen

Boei 94 (sampling ?) : 1 vis dood na 21 dagen.

Aangezien deze accumulatieproeven een zeer lange tijd in beslag nemen (totale duur van 1 proef circa 6 weken) zijn de eerste stalen met wieren, Artemia's en vissen pas korte tijd geleden naar de scheikundigen (Prof. Elksens en Prof. Verducruysse) gestuurd.

De resultaten van het analytisch onderzoek op anorganische en organische pollutanten werden ons nog niet meegedeeld.

2) Accumulatie van pollutanten in de keten Phaeodactylum tricornutum
Macoma baltica - Pomatoschistus minutus.

Ofschoon de vorig beschreven accumulatieproef (groenwieren - Crustacee-vis) een zeer interessante methode is om de onrechtse toxiciteit van pollutanten langs de voedselketen op te sporen, blijven de resultaten en interpretatie beperkt tot het pelagiaal, vermits de 3 gebruikte test-organismen respectievelijk behoren tot het plankton en het pelagische nekton.

Ten einde ook de invloed na te gaan bij benthische organismen van onrechtstreekse toxiciteit door accumulatie in de voedselketen, hebben wij onlangs een tweede experimentele keten uitgewerkt bestaande uit een kiezelwier :

Phaeodactylum tricornutum BOHLIN, een bivalf : Macoma blatica (L) en een mariene kleine vissoort : Pomatoschistus minutus PALLAS.

De benadering van deze experimenten zijn dezelfde als voor eerstgenoemde keten, namelijk wieren kweken op een tamelijk groot volume gepollueerd zeewater, deze wieren voederen aan een twee-kleppige mollusk, en ten slotte het vlees van deze laatste als voedsel geven aan een "benthos feeder" (vis).

Vermits van deze long-term experimenten nog geen volledige resultaten beschikbaar zijn wordt de bespreking ervan verdaagd tot een volgend rapport.

S E D I M E N T.

=====

Zoals reeds vermeld in de inleiding is het aantal "in vitro" experimenten over accumulatie van toxische stoffen in de voedselketen uiterst gering. Bovendien is het opvallend dat aan de rol van de sedimenten als "adsorbers" van toxikanten en als dusdanig van "stockeerdere" van pollutantia praktisch nog geen aandacht werd besteed vooral als men zich realiseert welke verreikende gevolgen dit kan hebben op het ganse ecosysteem. NIMMO et al (1971) bv. beschrijven hoe PCB's in sterke mate door sedimenten geadsorbeerd worden. Fiddler crabs" (Uca minax) en garnalen (Penaeus sp.) , die voor een maand op dergelijke substraten met verschillende concentraties PCB werden geplaatst vertoonden na deze periode in hun weefsels concentraties aan PCB evenredig met de hoeveelheid pollutant in de sedimenten.

Ten einde naast de toxiciteit van het water (cf. partims 1 en 2) ook een inzicht te krijgen van de rol van de sedimenten in de pollutieproblematiek op biologisch vlak hebben wij volgende proeven in gang gezet :

- 1) Accumulatie van pollutanten in mollusken (Macoma baltica) uitsluitend levend van (gepollueerde)sedimenten.

Vermits tal van benthische makro-organismen de bovenste sedimentlaag hetzij totaal innemen als voedselbron (Oligochaeten) hetzij gedeeltelijk en tegelijkertijd met voedselpartikels (mikroflora en mikrofauna) die ze van het oppervlak van het sediment afzuigen of afgrazen (Mollusken), volgt logischerwijze hieruit dat de makrofauna, wanneer de sedimentlaag gepollueerd wordt, de nadelige invloed hiervan zal ondergaan.

Ten einde dit aan de werkelijkheid te toetsen werden een reeks proeven opgezet met Mollusca-Bivalvia als proeforganismen. Het is immers bekend dat mollusken in staat zijn zowel anorganische als organische pollutanten in belangrijke mate te concentreren.

De literatuurgegevens dienaangaande zijn zeer talrijk.

De opzet van de proef is de volgende : een molluskensoort (Macoma baltica (L.)) krijgt als enige voedsel dagelijks een bepaalde hoeveelheid sediment afkomstig van verschillende bemonsteringspunten, vooral van het Schelde-estuarium. Zoals in de vorige proeven, proberen we op deze manier na te gaan welke en hoeveel van de aanwezige pollutie in de weefsels van de mollusk geaccumuleerd worden en in welke mate ze al dan niet toxisch zijn voor het organisme (sterfte). De proef wordt voortgezet op vissen (Gobius) ten einde eveneens de verdere indirecte toxiciteit en accumulatie doorheen de voedselketen op te sporen.

Ook deze proeven zijn slechts zeer recent van start gegaan en de volledige beschrijving van de proeven en bespreking van de resultaten wordt derhalve verdaagd tot genoeg gegevens beschikbaar zijn.

- 2) Accumulatie van pollutanten in de korte keten Dunaliella salina Artemia salina, vertrekkende van een schudextract : (gepollueerd) sediment-artificieel zeewater.

In vorige proef hebben wij experimenteel pogen te benaderen in welke mate bentische organismen onderhevig zijn aan pollutie van de sedimenten. De sedimenten kunnen echter, wanneer de oorzaak van pollutie sinds lang verdwenen is, niet alleen het bentische deel van de fauna en flora nog lang blijven beïnvloeden maar tevens door de al dan niet trage "leaching out" of desorptie van de toxische stoffen, de bovenliggende watermassa kontinu en voor min of meer lange tijd blijven pollueren.

Er werd dan ook besloten volgende accumulatieproef uit te voeren : een bepaald volume sediment wordt voor een bepaalde tijd (6-8uur) geschud met een bepaald volume artificiëel zeewater.

Na sedimentatie en decantatie wordt het extract als waterig milieu gebruikt voor het kweken van eencellige wieren. Deze wieren worden dan als voedsel gebruikt voor de kweek van juveniele pekalkreeftjes. Na een aantal dagen het (gekontamineerd) voedsel te hebben ontvangen worden de Artemia-larven scheikundig onderzocht op accumulatie van anorganische en organische pollutanten.

Methodologie.

A. Extractie : Aangezien we in den beginne niet beschikten over grote sedimentmonsters afkomstig van de normale CIPS-croisières werden de proeven uitgevoerd op stalen afkomstig enerzijds van het programma Lombardzijde (punten Z 2, Z 3, Z 5, Z 8, Z 9) anderzijds op een bodemonster genomen in de haven van Oostende (H.O.).

Vermits de adsorptiegraad van pollutanten aan sedimenten volledig funktie is van de natuur van het sediment (zand, klei, modder) zijn wij, i.p.v. de extracties uit te voeren op identieke gewichten of volumes sediment van de verschillende stalen, steeds vertrokken van zelfde hoeveelheden organisch materiaal, als ruwe maatstaf voor de adsorberende capaciteit van het betrokken sediment.

Van ieder staal werd eerst langs een bepaling drooggewicht-asgewicht het % aan organisch materiaal bepaald (als verschil drooggewicht-asgewicht).

We hebben ons hiervoor gebaseerd op de bevindingen van FROELICH et al (1971) die het gehalte aan organische koolstof hebben bepaald in de sedimenten van de "continental rise" in North Carolina (USA). Deze auteurs schrijven immers :
"It is apparent that the highest concentrations of organic carbon are associated with the finest grain size sediments, probably as a function of grain surface area available for absorption...".
Hieruit berekenden wij de hoeveelheid sediment (als gewicht) die 5 g organisch materiaal bevat.

De betrokken gewichten sediment worden vervolgens overgebracht in Erlen-Meyers van 2 l, samen met 1 liter artificiëel zeewater (formule van DIETRICH en KALLE), en gedurende 6 uur op een schudtoestel geplaatst. Onmiddellijk na het schudden worden de suspensies gecentrifugeerd en het "supernatans" gefiltreerd op membraanfilter. Het wordt vervolgens bewaard in diepvries tot het ogenblik van gebruik.

a. Wierkweek.

2 Baxterflessen van 1 liter worden gevuld met het extract waaraan milieu van VLASBLOM (cf. hoger) als voedingsmilieu is toegediend. De flessen worden dan ingeënt met Dunaliella salina tot een startconcentratie van $0,2 \cdot 10^6$ cellen/ml .

De Baxters voorzien van rubber stoppen met darmpje, worden omgekeerd opgehangen aan kweekrekken, bij een konstante belichting van 2 x 40 Watt TL buizen en in een kweeklokaal gethermostatiseerd op 23 ° C (zie Fig. 3). De continue doorborreling met lucht houdt de wiersuspensie steeds in beweging zodat geen sedimentatie optreedt, en voorziet de kultuur van de nodige CO₂ voor de fotosynthese.

Ten einde verhoging van de saliniteit door verdamping tegen te gaan wordt om de 2 dagen aq. dest toegevoegd tot het oorspronkelijke peil.

De densiteit van de wierkultuur wordt dagelijks bepaald met de automatische cell-counter. Wanneer het aantal wiercellen opgelopen is tot ongeveer $4,0 \cdot 10^6$ cellen/ml wordt de inhoud van 1 Baxter-fles overgebracht in een polytheenpot en diepgevroren bij -16 ° C. Deze suspensie zal dienen als voedsel voor de Artemia-larven.

De inhoud van de 2e kweekfles wordt gecentrifugeerd en het centrifugaat verdeeld over 2 buisjes en vervolgens diepgevroren.

Deze wieren zijn bestemd voor scheikundig onderzoek.

b. Artemia-kweek.

Als kweekopstellingen werd gebruik gemaakt van Baxterflessen van 2 liter inhoud. 3 Baxterflessen ontvangen elk 5.000 juist gehatchte Artemia-larven gesuspendeerd in een kleine hoeveelheid artificiëel zeewater (DIETRICH en KALLE).

Na ontdooien wordt de wiersuspensie die als voedsel zal worden gebruikt gecentrifugeerd en het supernatans verdeeld over de 3 Artemia-kweekflessen.

De flessen worden hierna gevuld met artificiëel zeewater tot 2 liter. Het centrifugaat van de wieren wordt aangelengd met artificiëel zeewater tot 120 ml en vervolgens behandeld met Ultrason tot alle celwanden gebroken zijn. Recente experimenten op de kweek van Artemia hebben uitgewezen dat de verteerbaarheid van het voedsel hierdoor in belangrijke mate wordt vergemakkelijkt.

Gezien de voedingsproef van kortstondige aard is (3-4 dagen) kon deze suspensie in de frigo worden bewaard.

De Artemia-baxters worden omgekeerd opgehangen in een kweekkamer gethermostatiseerd op 27 ° C en krijgen luchtdoorborreling gedurende 3 minuten om het half uur.

Preliminair onderzoek heeft uitgewezen dat deze manier van handelen veel beter is dan kontinu luchtdoorborreling die de larven mechanisch stoort.

De larven krijgen een eerste maal tegen de avond 8 ml wiersuspensie per kweekfles, en de volgende 2 dagen dezelfde kwantiteit 's morgens en 's avonds.

De kortstondige luchtdoorborreling om het half uur brengt het neergeslagen voedsel telkens opnieuw homogeen in suspensie en voorziet het water tevens van de zuurstof nodig voor respiratie van de pekelkreeftjes.

Na 90 uren kweek wordt de inhoud van de flessen uitgegoten over een grofmazig planktongaas en worden de Artemia-larven gerecupereerd, verdeeld over 2 buisjes en diepgevroren voor later scheikundig onderzoek.

Aangezien de resultaten van het scheikundig onderzoek van deze 9 stalen nog niet medegedeeld worden kan nog geen interpretatie geformuleerd worden.

W I E R E N

volgnr.	identit. wieren	datum opzetten 0,2.10 ⁶	datum afcentr.	aantal dagen kweek	aantal bij afcentr.	aanpassing van saliniteit
1	1097120272	160272	220272	6	1,9	
2	1034130272	160272	210272	5	2,1	
3	1020130272	160272	190272	3	2,1	
4	1049120272	160272	230272	7	2,0	
5	1035130272	180272	250272	7	3,2	
6	1167170272	180272	240272	6	1,6	
7	1065120272	240272	280272	4	1,6	
8	1096120272	240272	280272	4	2,0	
9	06 feb. 72	280272	020372	3	1,6	
10	1251feb.72	280272	020372	3	2,2	
11	1007 ma'72	040372	080372	4	2,4	
12	1257 ma'72	040372	080372	4	2,2	
13	M55 ma' 72	060372	100372	4	1,9	
14	1275 ma'72	060372	100372	4	2,1	
15	1258 ma'72	130372	170372	4	2,0	
16	Loodswezen 200372	290372	050472	7	1,2	6% → 30%
17	Rupelmonde 210372	060472	100472	4	1,8	3% → 30%
18	Blanko 050472	050472	120472	7	1,6	AZWLF 34%
19	Boorenschans 2203	070472	140472	7	1,1	10% → 30%
20	Hansweert 2303(Boei 44)	110472	140472	3	2,4	22% → 30%
21	Boei 44	140472	190472	5	1,5	10% → 30%
22	Hansweert 2203(Boei 55)	190472	250472	6	1,7	21% → 30%
23	Doel rechter- oever 210372	190472	240472	5	1,7	14% → 30%

ARTEMIA

VISSEN

volgnr.	identit. wieren	datum v. opstellen	adaptatie vissen à milieu	1e voeder beurt	vissen ge- storven tij- dens proef (datum)	einde proef
3	1020130272	060972				
4	1049120272	140672	140672	190672	07/07+09/07	
5	1035130272	040772	050772	100772	24/07+07/08	
6	1167170272	100572	100572	150572		160672
7	1065120272	080372	060372	110372		040472
9	06 feb. 72	200372	100472	130472	04/05	130572
10	1251feb.72	041072				
11	1007 ma'72	300672	010772	050772	20/07	260772
12	1257 ma'72	130372	100472	130472	05/05+01/05	
13	M55 ma' 72	041072				
15	1258ma' 72	041072				
18	Blanko 050472	260472	100572	150572		160672
21	Boei 94	110672	140672	190672	10/07	110772
22	Hansweert 2203(Boei55)	181072				
23	Doel rechter- oever 210372	181072				

Literatuurlijst.

- AUBERT M; AUBERT J; GAMBAROTTA J.P.; DONNIER B; BARELLI M et DANIEL S - 1969 a - Etude générale des pollutions chimiques rejetées en mer. Inventaire et études de toxicité. Tome 1. Méthodologie.
Rev. Int. Océanogr. Méd. (supplément) 72 ppg.
- AUBERT M; CHARRA R; MALARA G - 1969 b - Etude de la toxicité des produits chimiques vis-à-vis de la chaîne biologique marine.
Rev. Int. Océanogr. Méd. Tome XIII-XIV, pp 45-72.
- AUBERT M; GAMBAROTTA J.P. - 1969 c - Etude de la biodégradabilité de produits chimiques toxiques vis-à-vis de la chaîne biologique marine.
Rev. Int. Océanogr. Méd, Tome XIII-XIV, pp. 73-106.
- AUBERT M; AUBERT J; DONNIER B et BARELLI M - Utilisation de la chaîne trophodynamique dans l'étude de la toxicité des rejets d'eaux chimiquement polluées.
Conf. Techn. de la FAO sur la pollution des mers et ses effets sur les ressources biologiques et la pêche. Rome, déc. 1970, FIR MP/70/E-50.
- BUTLER P - Pesticide residues in estuarine mollusks.
National Symposium on estuarine pollution, Stanford University August 1967.
- CAIRNS J - 1969 - Fish bioassays - Reproducibility and rating.
Revta. Biol. 7 (1-2), 7-12.
- DIETRICH G; KALLE K - General Oceanography Interscience. N.Y.
- FROELICH Ph; GOLDEN B; PILKEY O.H. - 1971 - Organic carbon in sediments of the North Carolina continental rise.
Southeastern Geology, 13 (2), 91-97.
- HALSTEAD B.W. - 1970 - Toxicity of marine organisms caused by pollutants. FAO Techn. Conf. on marine pollution and fishing.
Rome 1970, FIR MP/70/R-6.
- NIMMO DR; WILSON P.D.; BLACKMAN R.R.; WILSON A.J. - 1971 - Polychlorinated biphenyl absorbed from sediments by fiddler crabs and pink shrimp.
Nature, 231, (5297), 50-52.

PERSOONE G; SORGELOOS P - 1972 - An improved separator box for
Artemia nauplii and other phototactic invertebrates.

Helgoländer wiss. Meeresunters., 23, 243-247.

Rapport de la Conférence technique de la FAO sur la pollution
des mers et ses effets sur les ressources biologiques et la pêche,
Rome déc. 1970, Rapports sur les pêches, N° 99.

SORGELOOS P. - 1972 - High density culturing of the brine shrimp
Artemia salina.

Aquaculture (in druk).

VAN OUTRYVE E; SORGELOOS P - 1972 - An inexpensive automatic counter
for *Artemia*-, *Daphnia* and other small invertebrates.

J; du Cons. (in druk).

WALNE - 1956 - Experimental rearing of the larvae of *Ostrea edulis* L.
in the laboratory.

Fish. Invest. Lond. Ser. 2, 20 (9).

PERSOONE G; SORGELOOS P - 1972 - An improved separator box for
Artemia nauplii and other phototactic invertebrates.

Helgoländer wiss. Meeresunters., 23, 243-247.

Rapport de la Conférence technique de la FAO sur la pollution
des mers et ses effets sur les ressources biologiques et la pêche,
Rome déc. 1970, Rapports sur les pêches, N° 99.

SORGELOOS P. - 1972 - High density culturing of the brine shrimp
Artemia salina.

Aquaculture (in druk).

VAN OUTRYVE E; SORGELOOS P - 1972 - An inexpensive automatic counter
for *Artemia*-, *Daphnia* and other small invertebrates.

J; du Cons. (in druk).

WALNE - 1956 - Experimental rearing of the larvae of *Ostrea edulis* L.
in the laboratory.

Fish. Invest. Lond. Ser. 2, 20 (9).

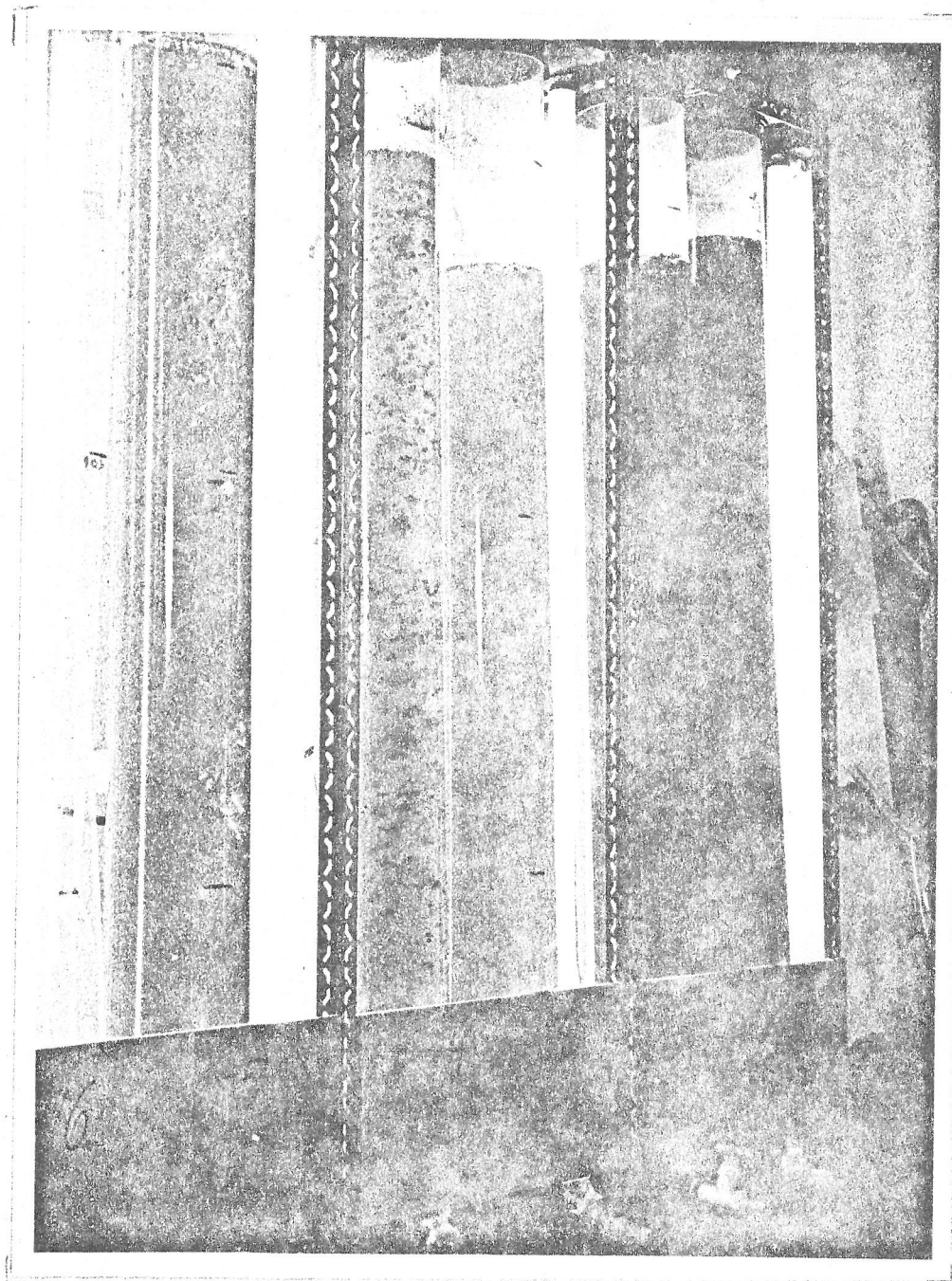


Fig.1. Kweekkolommen van 30 liter voor massakultuur van wieren.

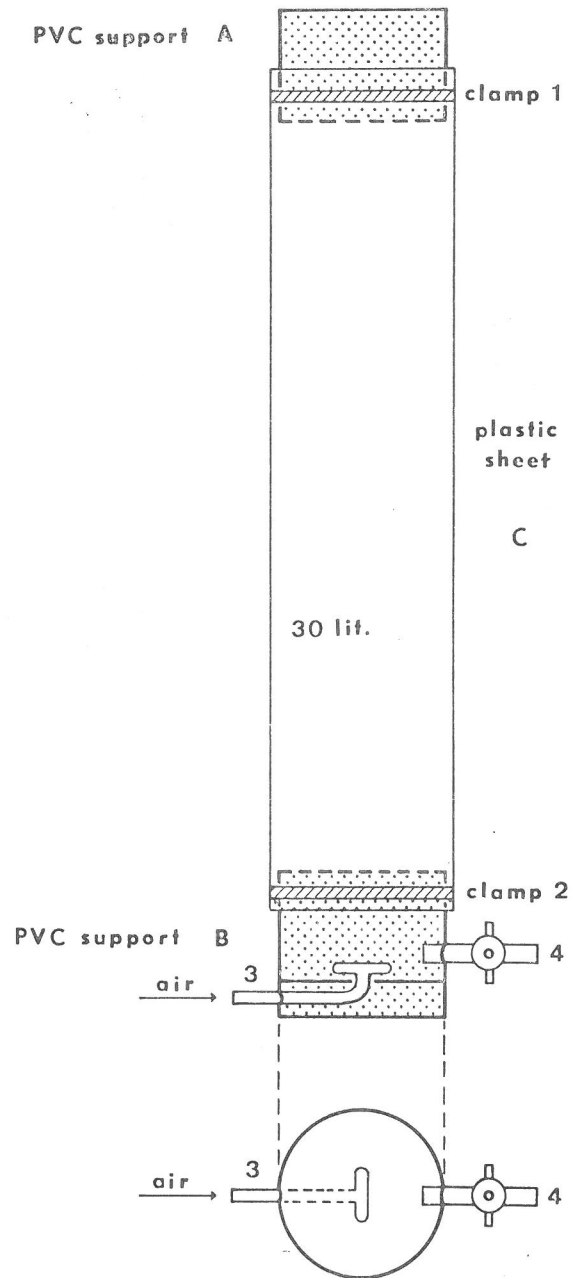


Fig.2. Schema van een kweekkolom voor wieren.

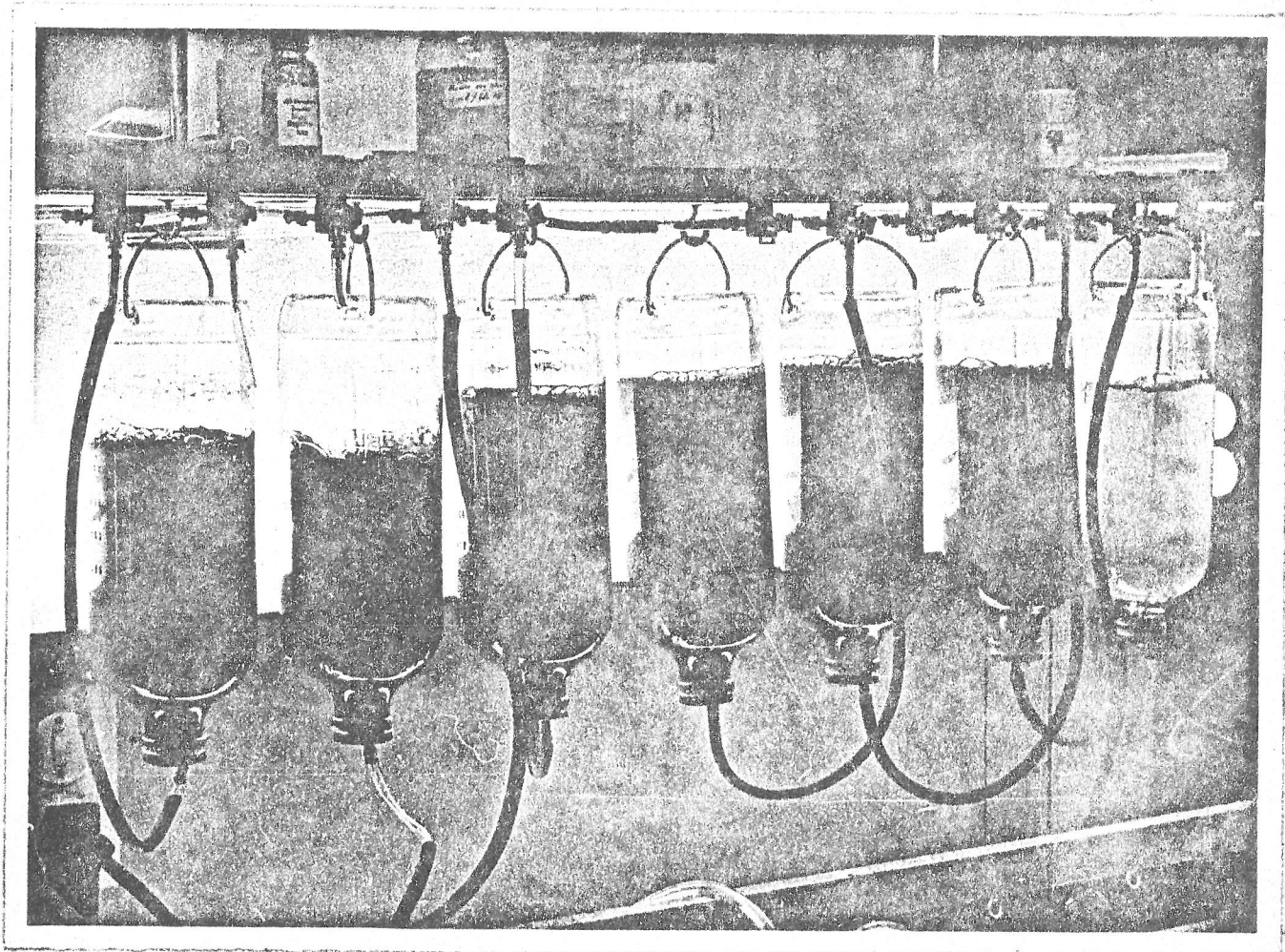
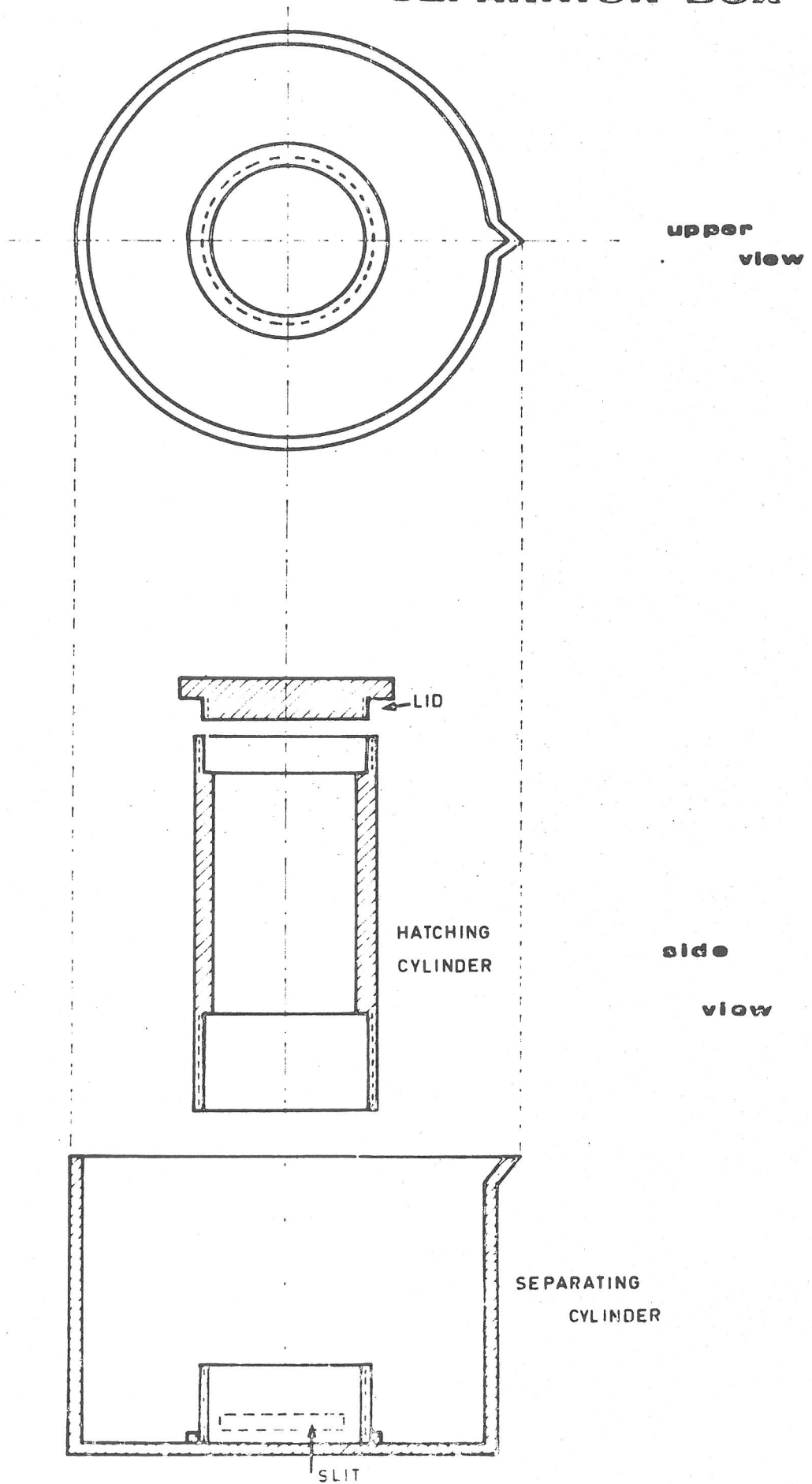


Fig. 3. Omgekeerde Baxterflessen als kweekrecipienten voor wierstocks.

Fig. 4.

ARTEMIA HATCHING and
SEPARATOR BOX



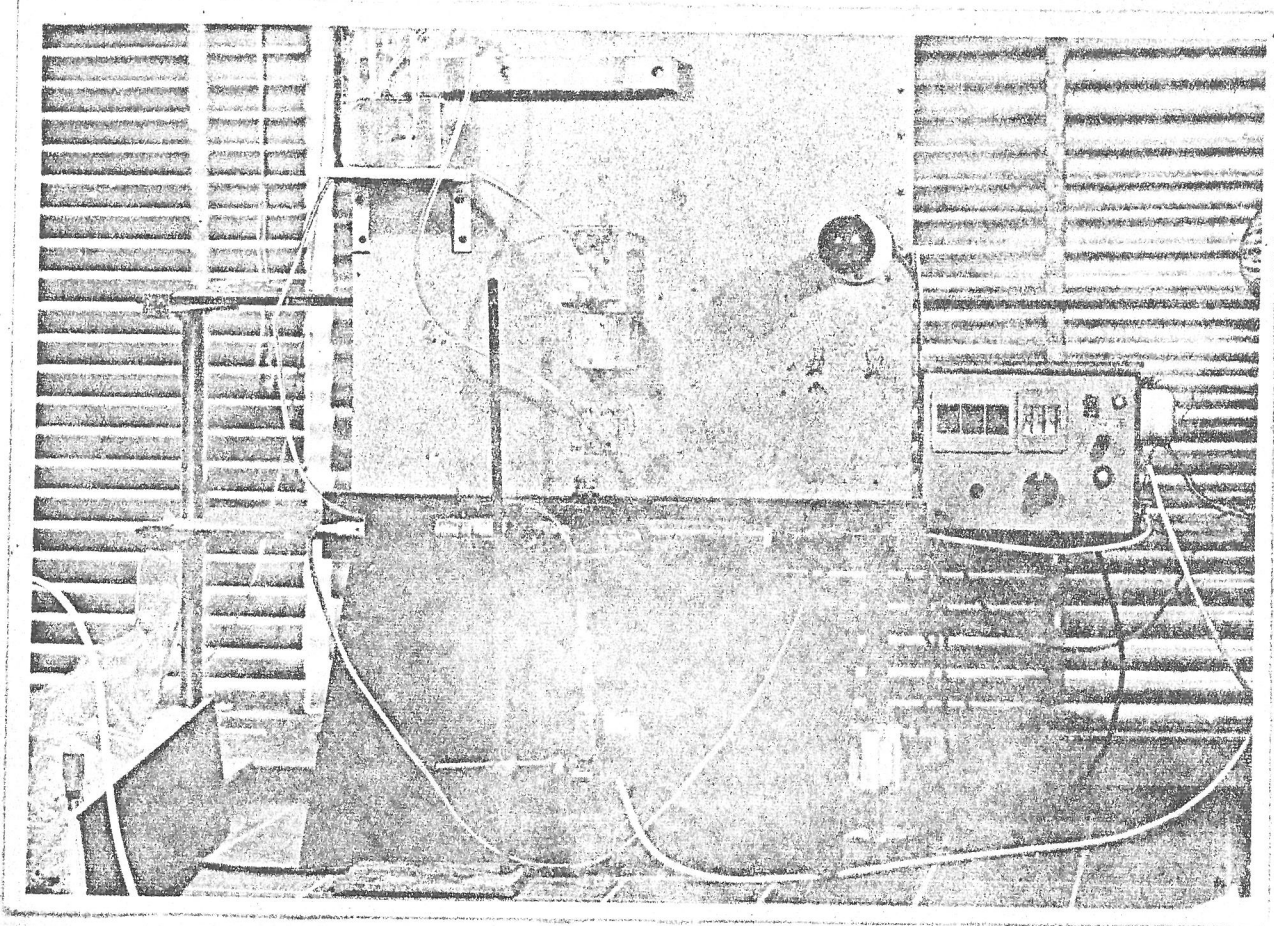


Fig. 5. Automatische teller voor invertebraten

1. Beker met organismen
2. Polytheendarpje (siphon) naar telcapillair
3. Capillair tussen lichtbundel en receptor
4. Lichtbron (gebundeld door objectief)
5. Lichtreceptor (objectief en fotogevoelig element)
6. Draineerkraan
7. Electromagnetisch ventiel
8. Electronische teller met preset.

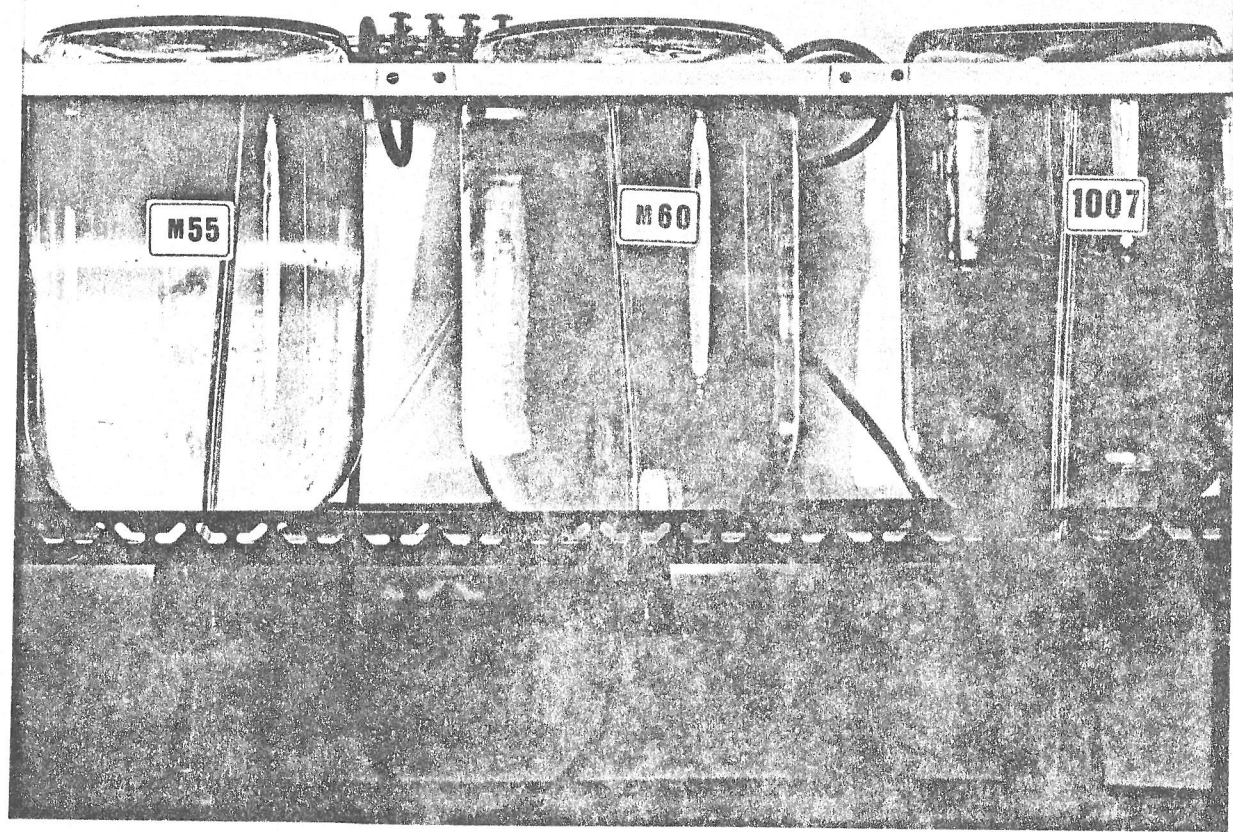


Fig. 6. Omgekeerde 10-liter flessen voor Artemia-kweek, met in- en uitlaat voor luchtdoorborreling.

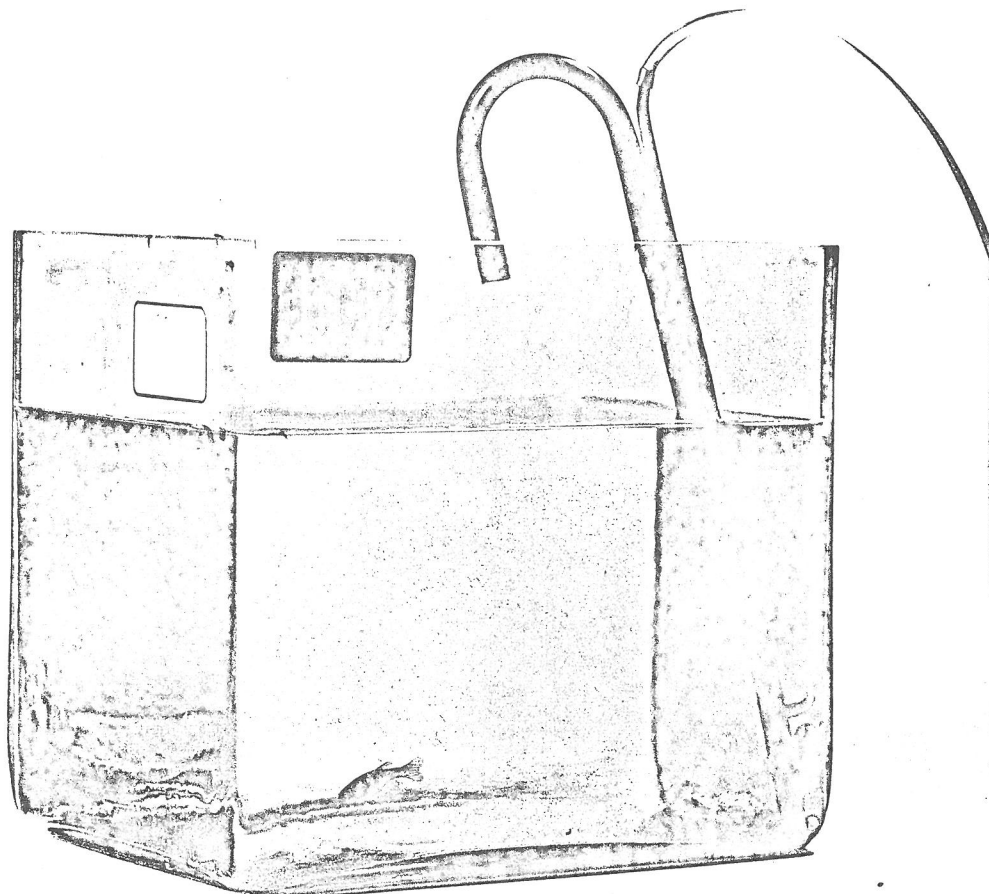


Fig. 7. Glazen aquarium met air-water lift voor de laatste trap in de accumulatieproef :

Dunaliella salina - Artemia salina - Brachydanio rerio