

Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen
NEDERLANDS INSTITUUT VOOR OECOLOGISCH ONDERZOEK
Centrum voor Estuariene en Mariene Oecologie

**BIOLOGISCHE EFFECTEN VAN VERONTREINIGD BIESBOSCH SEDIMENT OP DE DRIEHOEKS-
MOSSEL *DREISSENA POLYMORPHA* EN DE JAPANSE BIVALVE *CORBICULA FLUMINEA*.**

door

R.H.M. Eertman en P. Schout

(In opdracht van: Rijkswaterstaat, Directie Zuid-Holland)

INLEIDING

Sinds een aantal jaren zijn biologische toetsen in ontwikkeling, zowel voor het zoetwater als mariene milieu, die gebruikt worden voor de beoordeling van de toxiciteit van oppervlakte-/kustwateren en waterbodems. Een voorbeeld van een gevoelige biologische toets in het mariene milieu betreft de bepaling van de overlevingsduur bij droogstand in de zeemossel *Mytilus edulis* (Eertman *et al.*, 1993). Deze toets is gebaseerd op het natuurlijk vermogen van de mossel om perioden van zuurstofloosheid te overleven. Zuurstofloosheid (anoxia) kan ontstaan doordat mosselen in het intergetijdengebied tijdens eb droog komen te liggen waardoor zuurstof niet langer opgenomen kan worden, maar ook doordat bijvoorbeeld tijdens een algenbloei de zuurstofconcentratie in het water dramatisch daalt. Mosselen passen zich in beide situaties aan door hun energiebehoefte te verlagen en over te schakelen van een aëroob naar anaëroob metabolisme (Eertman & de Zwaan, 1994). De relatief geringe hoeveelheid energie die onder anaërobe omstandigheden wordt geproduceerd is voldoende voor de mossel om perioden van zuurstofloosheid te overleven. Veld- en laboratoriumonderzoek heeft aangetoond dat mosselen die aan contaminanten waren geëxposeerd minder goed in staat zijn om perioden van droogstand te overleven in vergelijking tot controle dieren (Eertman *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1992; Veldhuizen-Tsoerkan *et al.*, 1991).

Behalve de zeemossel *M. edulis* bezitten vele andere mollusken een soortgelijk mechanisme om perioden van zuurstofloosheid te overleven. Ook de in het Nederlandse zoetwatermilieu algemeen voorkomende driehoeksmossel *Dreissena polymorpha* (Bij de Vaate, 1991) en de in Nederland ingeburgerde japanse bivalve *Corbicula fluminea* (Bij de Vaate & Greijdanus-Klaas, 1990) zijn in staat om tijdens anoxia op anaërobe wijze energie te produceren (Kluytmans & Zandee, 1983; McMahon, 1988). Van deze organismen is echter nog niet bekend of, net als bij de zeemossel *M. edulis*, een aan het (anaërobe) metabolisme gerelateerde respons bruikbaar is voor het beoordelen van de toxiciteit van het oppervlaktewater dan wel de waterbodem.

In de huidige pilot-studie wordt onderzocht of expositie van *D. polymorpha* en *C. fluminea* aan vervuild sediment leidt tot een verhoogde mortaliteit, een verminderde activiteit (beide soorten) en een verstoord ingraafgedrag (alleen *C. fluminea*) nadat de dieren in het laboratorium aan lucht waren blootgesteld. Beide soorten worden gedurende 6 weken op een vervuilde lokatie in de Biesbosch en op een referentie lokatie in het Veluwemeer aan de lokale omstandigheden geëxposeerd. Tevens worden beide soorten in het laboratorium gedurende 2 weken onder gecontroleerde omstandigheden aan beide sedimenten geëxposeerd.

MATERIALEN EN METHODEN

Proefdieren

Dreissena polymorpha leeft aan substraat gehecht op de waterbodem, terwijl *Corbicula fluminea* ingegraven in de waterbodem leeft. Wanneer *C. fluminea* op een waterbodem geplaatst wordt zal deze zich in korte tijd ingegraven hebben. De proefdieren zijn kort voor de expositie-experimenten verzameld op het IJsselmeer (*D. polymorpha*) en op de Lek (*C. fluminea*). Aangezien de Lek niet als geheel schoon kan worden beschouwd werden de verzamelde exemplaren van *C. fluminea* voorafgaand aan de veld- en laboratoriumexposities gedurende 2 weken verwaterd in schoon water afkomstig uit het IJsselmeer. Een steekproef van 10 dieren van iedere soort wees uit dat de lengte van de gebruikte proefdieren 16.8 ± 1.8 mm (*D. polymorpha*) en 15.7 ± 0.9 mm (*C. fluminea*) bedroeg.

Veldexpositie

Zowel *D. polymorpha* als *C. fluminea* werden gedurende 6 weken geëxposeerd op een referentielokatie in het Veluwemeer (Wolderwijd) en nabij een saneringslokatie in de Biesbosch. Per lokatie werden enkele honderden exemplaren van de driehoeksmossel *D. polymorpha* in een korf geplaatst, die vervolgens aan een boei op de expositielokatie werd bevestigd. De driehoeksmosselen bevonden zich ongeveer 1 m onder het wateroppervlak. Aangezien het water op de saneringslokatie slechts geringe diepte heeft (± 2 m) bevonden de mosselen zich ongeveer 1 m boven de bodem. Per lokatie werden enkele honderden exemplaren van de japanse bivalve *C. fluminea* in een korf geplaatst, die vervolgens op de waterbodem in het Veluwemeer dan wel de Biesbosch werd geplaatst. Aangezien de korf door zijn zwaarte een weinig in de bodem kon zakken, waren de dieren in staat om zich in het sediment in te graven. Na afloop van de exposities werden de dieren in een emmer met water afkomstig van de expositielokatie overgebracht naar het veldlaboratorium van het Rijksinstituut voor Kust en Zee te Kamperland waar de dieren biologisch werden getest.

Expositie in het laboratorium

Naast expositie in het veld werden beide soorten proefdieren tevens in het laboratorium onder gecontroleerde omstandigheden gedurende twee weken aan sediment blootgesteld dat afkomstig was van de referentielokatie in het Veluwemeer (Wolderwijd) en de saneringslokatie in de Biesbosch. Schoon referentiewater dat tijdens de laboratoriumexperimenten werd gebruikt was afkomstig uit het IJsselmeer. De dieren werden geëxposeerd in expositievaten van 100 L, die met 60 L water zijn gevuld (Figuur 1). De expositie van beide diersoorten werd op verschillende wijze uitgevoerd.

Enkele honderden exemplaren van *D. polymorpha* werden in plastic netjes aan een sedimentsuspensie van 100 mg/L geëxposeerd. Ter voorbereiding van het expositie experiment werd allereerst de verhouding natgewicht : drooggewicht van de aangeleverde sedimenten bepaald door monsters (3 - 5 g natgewicht) van beide sedimenten in triplo gedurende 48 uur bij 60 °C te drogen. Vervolgens werd een hoeveelheid natgewicht van ieder sediment, overeenkomend met 6 g drooggewicht,

afgewogen en in een glazen pot van 1 L gedaan. Aan iedere pot werd 1 L IJsselmeerwater toegevoegd, waarna de potten gedurende 3 dagen op een rollenbank werden geplaatst zodat stabiele homogene sedimentsuspensies ontstaan. Vervolgens werd 1 L geconcentreerde sedimentsuspensie toegevoegd aan een vat met 59 L IJsselmeerwater, zodat na het mengen een sedimentsuspensie van 100 mg/L ontstond. Er werd gebruik gemaakt van een IKA RW 15/20 rotor, die op een minimaal aantal omwentelingen per minuut draaide, om het sediment homogeen in suspensie te houden.

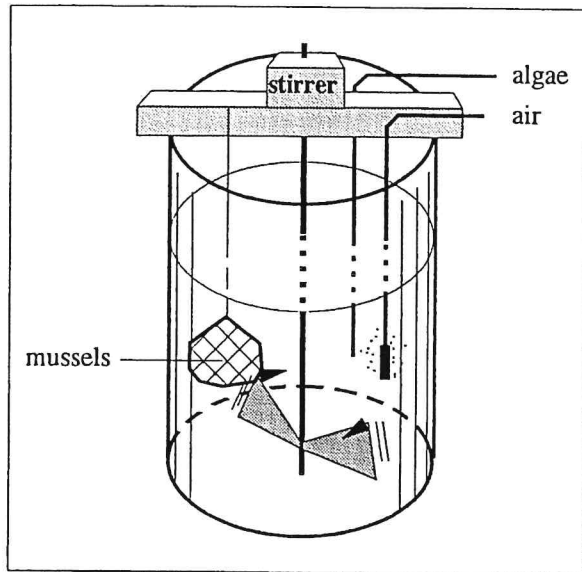


Figure 1: Schematic representation of mussel exposure system.

Voor aanvang van de expositie van *C. fluminea* werd een ± 10 cm dikke laag sediment afkomstig van de lokaties Wolderwijd en Biesbosch op de bodem van de expositievaten aangebracht. Boven deze laag sediment bevond zich 60 L water met sedimentsuspensie die op de hierboven beschreven wijze werd bereid. Enkele honderden exemplaren van *C. fluminea* werden vervolgens op de laag sediment geplaatst zodat de dieren in staat waren zich in te graven.

Biologische testen

Na afloop van de veld- en laboratoriumexposities werden de dieren in een klimaatkamer bij $15,0 \pm 0,5$ °C en een relatieve vochtigheid van 80 % gedurende 24 uur, 72 uur of meerdere dagen aan lucht geëxposeerd. Na afloop van de expositieperiode werden eventueel aanwezige dode dieren verwijderd en de in leven zijnde dieren van beide soorten werden teruggeplaatst in een bekersglas met vers IJsselmeerwater. Vervolgens werd bepaald hoeveel dieren binnen een periode van 15 minuten tekenen van activiteit vertoonden. Hieronder wordt verstaan het zich openen van de schelpen en het eventueel naar buiten steken van een sifon of de voet. Daarnaast werd een aantal exemplaren ($n = 15$ of 20) van *C.*

fluminea teruggeplaatst op een laag schoon Wolderwijd sediment, dat in een bekeerglas van 1 L was geplaatst, waarboven zich een laag water bevond. Vervolgens werd bepaald hoeveel dieren zich binnen een periode van 30 minuten hadden ingegraven.

Statistiek

Het berekende percentage dode (*D. polymorpha*), niet ingegraven (*C. fluminea*) en niet actieve (*D. polymorpha* en *C. fluminea*) dieren na expositie aan het gecontamineerde Biesbosch-sediment wordt met behulp van de formule van Abbott gecorrigeerd voor het aantal dode, niet ingegraven en niet actieve dieren in het referentie-sediment. Zodoende wordt het Percentage Netto Respons (PNR) verkregen.

$$PNR = \frac{\frac{100 \times (I - D_{test})}{I} - \frac{100 \times (I - D_{ref})}{I}}{100 - \frac{100 \times (I - D_{ref})}{I}} \times 100 \%$$

In deze formule is I het aantal ingezette dieren, D_{ref} en D_{test} het aantal ingegraven dan wel actieve dieren in respectievelijk de referentie- of testgroep. Als de PNR 0 is, dan is er geen effect gemeten ten opzichte van het referentiesediment, als de PNR 100 is dan is er een maximaal effect gemeten. Indien de testdieren beter presteren dan de referentiedieren dan is de PNR negatief.

RESULTATEN

Veldexpositie: *Dreissena polymorpha*

Na 24 en 72 uur droogstand werd de mortaliteit en de activiteit van *D. polymorpha* bepaald. De resultaten staan weergegeven in tabel 1. Na 24 uur droogstand was er nog geen sprake van mortaliteit in de twee experimentele groepen. Het aantal dieren dat na terugplaatsen in water binnen 15 minuten tekenen van activiteit vertonen was hoog en nagenoeg gelijk in beide groepen (PNR = 9.1 %)

Na 72 uur droogstand werden de testen in duplo uitgevoerd. Er is duidelijk sprake van een verhoogde mortaliteit in de aan Biesbosch-sediment geëxposeerde groep. De PNR-waarden voor de duplo metingen zijn respectievelijk 30.4 % en 45.8 %. Na het terugplaatsen van de nog in leven zijnde dieren in water is er bij de eerste test geen enkel verschil in activiteit tussen de twee groepen (PNR = 0.4 %). In de duplo test is het aantal dieren dat geen activiteit vertoont in de Biesbosch-groep groter dan in de Wolderwijd-groep (PNR = 24.0 %). Er dient te worden opgemerkt dat de resultaten van de activiteitstest afhankelijk zijn van de mortaliteitstest, aangezien deze test werd uitgevoerd met de overgebleven dieren uit de mortaliteitstest.

Tabel 1: Mortaliteit en activiteit van *D. polymorpha* na 24 en 72 uur droogstand.

	Inzet	Wolderwijd	Biesbosch	PNR
Mortaliteit na 24 h anoxia	25	0	0	0.0
Mortaliteit na 72 h anoxia (1)	25	2	9	30.4
Mortaliteit na 72 h anoxia (2)	25	1	12	45.8
Activiteit na 24 h anoxia	25	22	20	9.1
Activiteit na 72 h anoxia (1)	23 - 16	13	9	0.4
Activiteit na 72 h anoxia (2)	24 - 13	17	7	24.0

Veldexpositie: *Corbicula fluminea*

Na zowel 24 als 72 uur expositie aan lucht was ongeveer de helft van *C. fluminea* die werden geëxposeerd in de Biesbosch niet meer in staat om zich in schoon sediment in te graven (Tabel 2: PNR waarden respectievelijk 50.0 en 53.8 %). Wanneer de dieren werden beoordeeld op het vertonen van enige activiteit (openen van de schelpen), bleek er minder of geen verschil tussen de twee experimentele groepen te bestaan. Hieruit kan geconcludeerd worden dat aan gecontamineerd sediment geëxposeerde dieren weliswaar tekenen van activiteit kunnen vertonen, maar desalniettemin niet in staat zijn om zich in te graven.

Tabel 2: *Ingraafgedrag en activiteit van C. fluminea na 24 en 72 uur droogstand.*

	Inzet	Wolderwijd	Biesbosch	PNR
Ingegraven na 24 h anoxia	15	14	7	50.0
Ingegraven na 72 h anoxia	15	13	6	53.8
Activiteit na 24 h anoxia	20	19	14	26.3
Activiteit na 72 h anoxia	20	18	19	-5.5

Expositie in het laboratorium

Natgewicht - drooggewicht ratio

De natgewicht - drooggewicht verhouding van de gebruikte sedimenten staat in tabel 3 weergegeven. Uit de tabel blijkt dat het referentie sediment (Wolderwijd) natter is dan het sediment afkomstig uit de Biesbosch. Op natgewicht basis moet twee keer zoveel Wolderwijd-sediment in suspensie gebracht worden dan Biesbosch-sediment om voor beide sedimenten uit te komen op een uiteindelijke sedimentconcentratie in suspensie van 100 mg drooggewicht per liter water.

Tabel 3: *De verhouding natgewicht : drooggewicht van de onderzochte sedimenten.*

Lokatie	Natgewicht (g)	Drooggewicht (g)	Droge Stof (%)	WW (g) nodig voor 6 g DW
Wolderwijd 1	4.1461	1.2657	30.5	19.65
Wolderwijd 2	3.5330	1.0821	30.6	19.59
Wolderwijd 3	4.2120	1.2951	30.7	19.51
Gemiddelde			30.6	19.59
Biesbosch 1	4.1553	2.5171	60.6	9.90
Biesbosch 2	5.2273	3.1634	60.5	9.91
Biesbosch 3	4.2413	2.5806	60.8	9.86
Gemiddelde			60.6	9.89

Dreissena polymorpha

Na afloop van de twee weken durende expositie aan een sedimentsuspensie van 100 mg/L werden de dieren gedurende meerdere dagen aan lucht blootgesteld. In tabel 4 staat weergegeven hoeveel dieren na terugplaatsing in water binnen 15 dan wel 30 minuten tekenen van activiteit vertoonden. De resultaten in de tabel laten zien dat er geen grote verschillen bestaan tussen de referentie groep (Wolderwijd) en de experimentele groep (Biesbosch). De PNR-waarden zijn

Tabel 4: Activiteit na expositie aan lucht van *D. polymorpha*, die waren ge-exposeerd aan Wolderwijd- dan wel Biesbosch-sediment. Inzet: n = 30 dieren. Het experiment werd in duplo uitgevoerd.

Actief binnen 15 minuten			
Exp. aan lucht	Wolderwijd	Biesbosch	PNR
1 dag	18	21	-16.7
2 dagen	12	10	16.7
3 dagen	22	15	31.8
5 dagen	20	21	- 5.0
6 dagen	25	24	4.0
7 dagen	27	22	18.5
8 dagen	27	22	18.5
9 dagen	25	20	20.0
12 dagen	14	13	7.1
Gem. (%)	70.4	62.2	10.6
s.d.	17.4	15.1	13.9

Actief binnen 15 minuten			
Exp. aan lucht	Wolderwijd	Biesbosch	PNR
1 dag	21	21	0.0
2 dagen	12	17	-41.7
3 dagen			
5 dagen	27	23	14.8
6 dagen			
7 dagen	27	27	0.0
8 dagen	26	26	0.0
9 dagen			
12 dagen	11	14	-27.3
Gem. (%)	68.9	71.1	- 9.0
s.d.	22.7	15.5	19.2

Actief binnen 30 minuten			
Exp. aan lucht	Wolderwijd	Biesbosch	PNR
1 dag	22	23	- 4.5
2 dagen	17	14	17.6
3 dagen	27	26	3.7
5 dagen	26	27	- 3.8
6 dagen	28	28	0.0
Gem. (%)	80.0	78.7	2.6
s.d.	13.5	16.9	8.1

Actief binnen 30 minuten			
Exp. aan lucht	Wolderwijd	Biesbosch	PNR
1 dag	28	24	14.3
2 dagen	16	19	-18.8
3 dagen			
5 dagen	27	23	14.8
6 dagen			
Gem. (%)	78.9	73.2	3.5
s.d.	18.1	7.2	15.7

laag of negatief, wat inhoud dat de experimentele groep geen slechtere respons vertoont in vergelijking tot de controle groep. De duplo metingen komen goed met elkaar overeen en er kunnen geen verschillen in activiteit worden aangetoond tussen de metingen na 15 en 30 minuten terugplaatsing in schoon IJsselmeerwater.

Corbicula fluminea

Er wordt geen duidelijk verschil in ingraafgedrag of activiteit waargenomen tussen de twee groepen na 48 en 72 h expositie aan lucht. De PNR-waarden zijn in alle gevallen laag of licht negatief.

Tabel 5: Ingraafgedrag en activiteit van *C. fluminea* na 24 en 48 uur expositie aan lucht.

Gedrag na expositie aan lucht	Inzet	Wolderwijd	Biesbosch	PNR
Ingegraven na 48 h expositie	15	14	12	14.3
Ingegraven na 72 h expositie	15	12	12	0.0
Activiteit na 48 h expositie	25	24	23	4.2
Activiteit na 72 h expositie	25	20	22	-10.0

DISCUSSIE

De resultaten van deze pilot-studie hebben aangetoond dat biologische effecten meetbaar zijn in de zoetwater bivalven *D. polymorpha* en *C. fluminea* nadat deze aan verontreinigd sediment waren geëxposeerd. De expositieduur dient echter wel voldoende lang te zijn, aangezien duidelijke effecten uitbleven na de expositie-experimenten in het laboratorium, die, overeenkomstig de experimenten bij de zeemossel *Mytilus edulis*, twee weken duurden. De zes weken durende exposities in het veld hadden in alle gevallen een duidelijke negatieve biologische respons tot gevolg. De in de Biesbosch geëxposeerde *D. polymorpha* hadden

een verhoogde mortaliteit nadat ze gedurende 72 uur aan lucht waren blootgesteld. Het ingraafgedrag van in de Biesbosch geëxposeerde *C. fluminea* was geremd ten opzichte van dieren die waren geëxposeerd op de referentielokatie Wolderwijd nadat ze 24 uur en 72 uur aan lucht waren blootgesteld.

Voor het beoordelen van de toxiciteit van verontreinigde zoetwaterbodems lijkt *C. fluminea* een geschikter testorganisme dan *D. polymorpha* en wel om de volgende redenen:

C. fluminea leeft in het sediment en komt daardoor waarschijnlijk beter in contact met de verontreinigde sedimentdeeltjes, waardoor xenobiotische stoffen zich in hogere mate in de weefsels kunnen accumuleren. Chemische analyses zullen moeten uitwijzen of dit inderdaad het geval is.

Doordat *C. fluminea* zich onder normale omstandigheden snel in sediment ingraaft, is deze natuurlijke respons goed bruikbaar als eindpunt van een toxiciteitstest. Mortaliteit is bij beide onderzochte soorten veel moeilijker als eindpunt te gebruiken dan bij de zeemossel *M. edulis*, aangezien beide onderzochte soorten geen consistent gaapgedrag (= openstand van schelpen) vertonen bij overlijden. Het vaststellen van het tijdstip van overlijden wordt zodoende aanzienlijk bemoeilijkt, wat de gevoeligheid en eenvoud van de test niet ten goede komt. Het bepalen van het ingraafgedrag van *C. fluminea* is eenvoudig en neemt niet meer dan 30 minuten in beslag. Het ingraafgedrag is evenals de bepaling van de overlevingsduur tijdens droogstand bij de zeemossel *M. edulis* gerelateerd aan het vermogen van de testdieren om tijdens blootstelling aan lucht energie te produceren. De mogelijkheid om zich te kunnen ingraven wordt bepaald door de hoeveelheid energie die tijdens droogstand wordt geproduceerd. Tabel 2 laat duidelijk zien dat aan Biesbosch sediment geëxposeerde dieren na 24 en 72 uur blootstelling aan lucht slechts in geringe mate of geen verminderde activiteit bezitten ten opzichte van controle dieren (PNR-waarden zijn respectievelijk 26.3 en -5.5 %), terwijl 50 % van deze dieren niet meer in staat is zich in te graven (PNR-waarden zijn respectievelijk 50.0 en 53.8 %). De hoeveelheid geproduceerde energie tijdens droogstand was kennelijk wel voldoende om tekenen van activiteit te vertonen, maar niet voldoende voor het veel meer energie verbruikende ingraafproces.

Het feit dat de laboratoriumexperimenten geen duidelijke resultaten hebben opgeleverd is waarschijnlijk het gevolg van de te korte expositieduur. Uit de chemische analyses zal moeten blijken in welke mate de testdieren contaminanten hebben geaccumuleerd. Bij onvoldoende accumulatie lijkt een langere expositieduur aan te bevelen.

Bij het routinematig toepassen van biologische sedimenttoetsen dient rekening gehouden te worden met het feit dat de structuur en samenstelling van het schone referentiesediment zoveel mogelijk overeenkomt met die van het testsediment. Bij de huidige experimenten is gebleken dat het referentie-sediment afkomstig van de lokatie Wolderwijd fijnkorreliger van structuur was dan het testsediment uit de Biesbosch. Dit hoeft geen effect op de testresultaten te hebben, maar helemaal uitsluiten kan men dit ook niet.

Concluderend kan worden gesteld dat de huidige pilot-studie, ondanks de geringe voorbereidingsperiode, succesvol is verlopen. Met name het ingraafgedrag van de japanse bivalve *C. fluminea* na een periode van expositie aan lucht lijkt een gevoelige en eenvoudig te bepalen respons voor het beoordelen van de toxiciteit van waterbodems in het zoetwater milieu. Het is echter wel noodzakelijk om bij een eventueel vervolg een aantal randvoorwaarden voor de test verder te onderzoeken. Hierbij valt te denken aan de effecten van de volgende parameters: (1) structuur van sediment, (2) temperatuur tijdens expositie aan lucht en (3) seizoensinvloeden.

REFERENTIES

- Bij de Vaate, A. (1991) Distribution and aspects of population dynamics of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1871), in the Lake IJsselmeer area (The Netherlands). *Oecologia* 86, 40-50.
- Bij de Vaate, A. & Greijdanus-Klaas, M. (1990) The Asiatic clam, *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) (Pelecypoda, Corbiculidae), a new immigrant in the Netherlands. *Bull. Zool. Mus. Univ. Amst.* 12, 173-177.
- Eertman, R.H.M., Wagenvoort, A.J., Hummel, H. & Smaal, A.C. (1993) "Survival in air" of the blue mussel *Mytilus edulis* L. as a sensitive response to pollution-induced environmental stress. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 170, 179-195.
- Eertman, R.H.M. & de Zwaan, A. (1994) Survival of the fittest: resistance of mussels to aerial exposure. In: *Biomonitoring of coastal waters and estuaries*, K.J.M. Kramer (Ed.), CRC Press Inc., Boca Raton, 269-284.
- Kluytmans, J.H. & Zandee, D.I. (1983) Comparative study of the formation and excretion of anaerobic fermentation products in bivalves and gastropods. *Comp. Biochem. Physiol.* 75B, 729-732.
- McMahon, R.F. (1988) Respiratory response to periodic emergence in intertidal molluscs. *Amer. Zool.* 28, 97-114.
- Veldhuizen-Tsoerkan, M.B., Holwerda, D.A. & Zandee, D.I. (1991) Anoxic survival time and metabolic parameters as stress indices in sea mussels exposed to cadmium or polychlorinated biphenyls. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20, 259-265.
- Wang, W.X., Widdows, J. & Page, D.S. (1992) Effects of organic toxicants on the anoxic energy metabolism of the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Environ. Res.* 34, 327-331.