

NOVANA

Teknisk anvisning for marin overvågning

4.5 Biologisk effektmonitoring - muslinger

Jakob Strand
Ingela Dahllöf
Afdeling for Marin Økologi

Miljøministeriet
Danmarks Miljøundersøgelser

Indhold

4.5	Bestemmelse af lysosomal stabilitet i celler fra hæmolympfen i muslinger	4.5-3
4.5.1	Formål	4.5-3
4.5.2	Baggrund	4.5-3
4.5.3	Principper	4.5-3
4.5.4	Prøvetagning	4.5-4
4.5.5	Analysemetoder	4.5-5
	4.5.5.1 Kemikalier	4.5-5
	4.5.5.2 Udtagning af hæmolympfprøve	4.5-5
4.5.6	Kvalitetssikring	4.5-7
4.5.7	Dataindberetning	4.5-7
	4.5.7.1 Stationsbeskrivelse	4.5-7
	4.5.7.2 Resultat	4.5-7
4.5.8	Referencer	4.5-8
	Bilag 4.5.1	4.5-9

4.5 Bestemmelse af lysosomal stabilitet i celler fra hæmolymfen i muslinger

4.5.1 Formål

At vurdere i hvilken grad der forekommer effekter på den lysosomale stabilitet hos muslinger i kystnære områder tilfølgende af miljøfarlige stoffer.

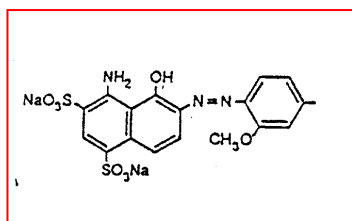
4.5.2 Baggrund

Cytotoksiske effekter i muslinger kan anvendes som følsomme markører for stress forårsaget af miljøfarlige stoffer (Dierickx and Van De Vijver, 1991). En række miljøfarlige stoffer som PAH, tungmetaller og TBT har vist at ved miljørealistiske koncentrationer at kunne inducere effekter på bl.a. lysosomer. Effekterne synes dog ikke umiddelbart stofspecifikke, og er derfor et mål for den samlede påvirkning.

Lysosomer er subcellulære organeller, der indeholder en række enzymer, som er involveret i for et bredt spektrum af væsentlige cellulært styrende funktioner så som protein katabolisme, immune respons, reproduktion, programmeret celledød og regenerering af beskadiget væv. Skader på lysosomer har derfor betydning for muslingernes sundhedstilstand og fysiologiske fitness. Skader på lysosomer kan resultere i celledød hvilket bruges i denne analyse (Lowe and Pipe, 1994). Denne anvisning tager udgangspunkt i metodebeskrivelsen af Bjørnstad (2000).

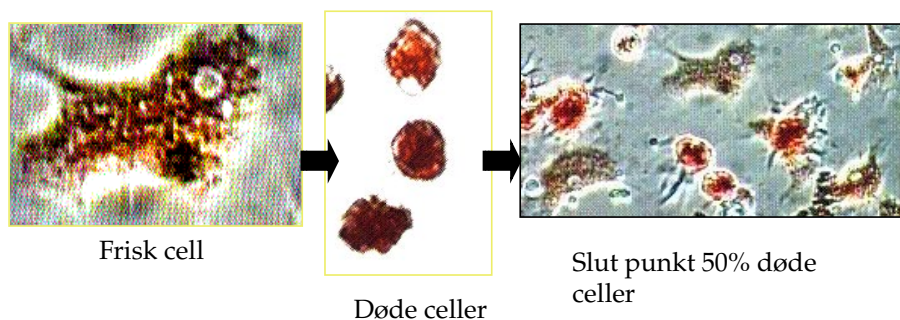
4.5.3 Principper

Lysosomerne er omgivet af en speciel membran som beskytter cellens egne organiske materiale som proteiner og DNA. Miljøfarlige stoffer kan påvirke lysosomernes membran på forskellige måder. Tungmetaller kan f.eks forstyrre membranets holdbarhed ved direkte interaktion, hvorimod nedbrydning af organiske miljøgifter inde i lysosomen påvirker membranens stabilitet gennem forandring af lipidsammensætning eller dannelse af frie radikaler. Uanset på hvilken måde påvirkningen sker så medfører en reduceret stabilitet til at lysosomen nemmere går i stykker og derved resultere i hurtig celledød.



Figur 4.5.1

Neutral Red (Figur 4.5.1) er et farvestof som tilbageholdes i lysosomerne så lang tid som membranen er helt. Efter en tid går membranen også i friske muslinger i stykker og cellen dør. Denne proces følges i mikroskop hvor tid til det at 50% af cellerne dør kvantificeres (Figur 4.5.2). I sunde muslinger er den tid 150-180 minutter, men undersøgelser af belastede områder bør sammenholdes med velegnede referenceområder.



Figur 4.5.2 Mikroskopbilleder af hæmolymfceller fra musling. Friske celler er svagt rødfarvede sammenlign med døde celler hvor som også bliver rundere når lysosomerne gået i stykker. Se også Bilag 4.5.1.

4.5.4 Prøvetagning

Muslingerne skal indsamles i perioden Oktober- December, dvs. udenfor den reproduktive sæson hvor variationer i metaboliske processer er mindst. Muslingerene indsamles f.eks. sammen med prøvetagning for miljøfarlige stoffer. Herved bliver belastningsniveauet bestemt i den samme population som de kemiske analyser bliver udført på, hvorved resultaterne kan forholdes til hinanden. Der skal bruges 10 muslinger per analyse og minimallængde bør være 40 mm. For en sikkerheds skyld anbefales at 20 stk. indsamles per station i så fald at den senere udtagning af hæmolymfprøver ikke lykkes for alle.

Under transport til laboratoriet skal muslingerne opbevares på en sådan måde at de ikke bliver stressede af iltsvind eller temperaturforændringer, hvilket betyder at de skal have afkølet vand fra prøvetagningsområdet som er luftet så at muslingerne kan filtrere normalt. Muslingerne kan opbevares op til 3 dage i vand med god lufttilførsel ved 5°C.

4.5.5 Analysemetoder

4.5.5.1 Kemikalier

Fysiologisk saltløsning (for af holde hæmolymfer ved liv).

Afvej:

4,77 g	Hepes (99%)
1,47 g	CaCl ₂ , 2H ₂ O (Kalcium klorid 99,5%)
13,06 g	MgSO ₄ , 7H ₂ O(99,0-102%)
25,48 g	NaCl (Natrium klorid 99,8%)
0,75g	KCl (Kalium klorid 99,5%)

Opløses i en liter demineraliseret vand. Justere pH til 7,36 med 1 M NaOH, og opbevar i køleskab. Om opløsningen bruges i mere end fem dage skal pH kontrolleres.

Neutral red

Stamopløsning (opbevares i mørk flaske i 3 uger ved 5°C):

Neutral Red 28,8 mg der opløses i 1 ml Dimethyl sulfoxide (DMSO).

Arbejdsløsning (laves frisk hverdag i mørk flaske):

- 10 µl stamopløsning
- 5 ml fysiologisk saltløsning

Mikroskop

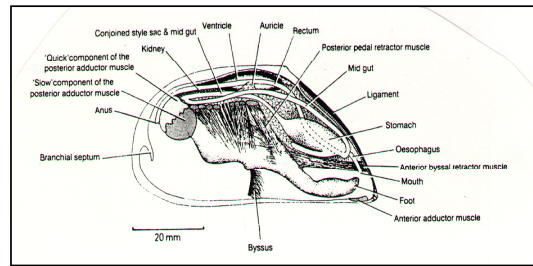
Der bør bruges et lysmikroskop med ned til 100 gangers forstørrelse.

4.5.5.2 Udtagning af hæmolymfprøve

0,05 ml fysiologisk saltvand trækkes op i en 1 ml sprøjte med kanyle (0,6 mm* 30 mm).

- Muslingen åbnes forsigtigt ved at lirke op skallerne uden at muslingen skades

PAM



- Den bagerste lukke muskel lokaliseres. Den består af hvide, lidt gennemsigtige filament som løber fra den undre til den øvre skaldel.
- Kanylen stikkes forsigtigt ind i lukke musklen og hæmolymfen trækkes ud. Bland ved at vende på røret.
- Denne procedure bør ikke tage længere end 1-2 minutter per musling.

Opsætning af mikroskopglas. Der skal bruges duplikater af hver musling, dvs. 20 glas per station, samt 4 glas for sammenligning med referencemuslinger.

- Eventuelt kan mikroskopglasset behandles med en dråbe 1:10 Poly-L-leucine:destilleret vand som får tørre under dækglas. Dette underletter vedhæftning af celler.
- 40 µl celle suspension (hæmolymf:fysiologisk saltløsning) sættes som en dråbe på midten af glasset. Glasset lægges i en mørk kammer med fugtig atmosfære ved stuetemperatur i 15 minutter.
- Efter 15 minutter fjernes overflødig væske ved at forsigtigt slå dem af. På mikroskopglasset er nu efterladt et monolager af celler. Glasset sættes tilbage i fugtighedskammeret igen.

Farvning og analyse af neutral red:

- 40 µl Neutral Red arbejdsløsning tilsættes hvert glas og dækkes med dækningsglas. Stopuret sættes i gang ved farvning af den første prøve.
- Efter 15 minutter undersøges cellerne i mikroskop for andelen døde celler. Cellerne lokaliseres ved X10/20 og undersøges ved X40/100 med lavest muligt lysniveau. En minut er maksima tid per prøve.
- Hver prøve analyseres igen efter yderligere 15 minutter og derefter hver halv time for at bestemme ved hvilket tidspunkt halvdelen af cellerne er døde.

- Det er vigtigt at tætheden af celler er tilstrækkelig stor for at få reproducerbare retentionstider. Dette bør gøres ved at vurdere cellernes tilstand i min. 5 områder på mikroskopglasset og disse områder må ikke være i yderkanten af cellelaget eller i områder med lav tæthed af celler.

De ti muslingers skallængde og kødvægt måles.

4.5.6 Kvalitetssikring

For at ensarte observationerne skal de angivne metoder i denne vejledning anvendes.

Derudover anbefales det, at der afholdes tilbagevendende workshops hvor prøvetagning, undersøgelser og beregninger gennemgås.

4.5.7 Dataindberetning

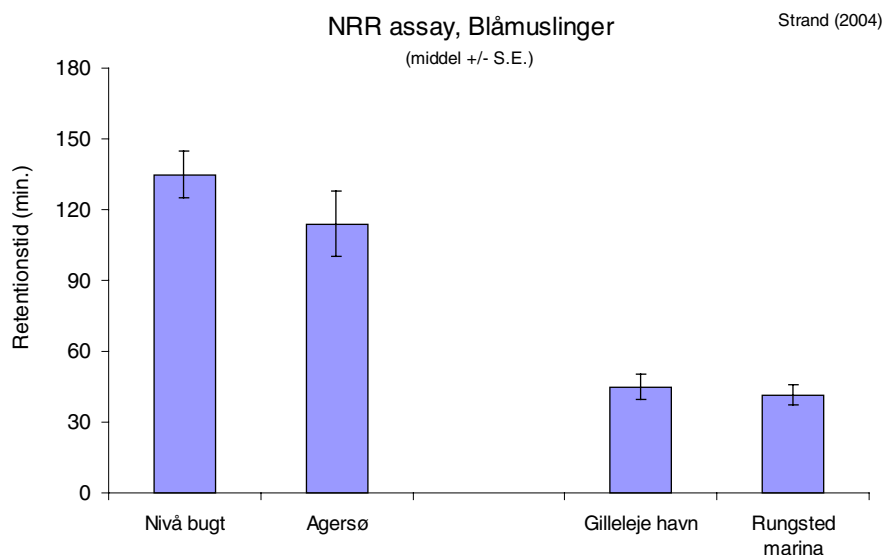
4.5.7.1 Stationsbeskrivelse

Ifølge rapporteringen for miljøfarlige stoffer i muslinger.

4.5.7.2 Resultat

50%-tiden for hver musling samt dets vægt og længde.

Stationsdata angives som middel 50%-tid og standardfejl.



4.5.8 Referencer

Bjørnstad, A. 2000: Standard operating procedure, The Neutral Red Lysosomal Retention Assay, *Mytilus edulis*, Rogland Research, Norway, 8pp.

Dierickx, P.J. & Van De Vijver, I. 1991: Correlation of the neutral red uptake inhibition assay of cultured fathead minnow cells with fish lethality tests. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 649-653.

Lowe, D.M. & Pipe, R.K. 1994: Contaminant-induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an in vitro study. *Aquat. Toxicol.* 30, 357-365.

Moore, M.N. 1990: Lysosomal Cytochemistry in Marine Environmental Monitoring. *Histochemical Journal*, 22(4): 187-191.

Bilag 4.5.1

