

**NOVANA**

# Teknisk anvisning for marin overvågning

## 4.5 Biologisk effektmonitoring - muslinger

**Jakob Strand**  
**Ingela Dahllöf**  
*Afdeling for Marin Økologi*

**Miljøministeriet**  
**Danmarks Miljøundersøgelser**

## Indhold

<b>4.5</b>	<b>Biologisk effektmonitoring - Bestemmelse af lysosomal stabilitet i celler fra hæmolymfen i muslinger</b>	<b>4.5-3</b>
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 hæmolymfeprøve	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	Mikroskopbilleder af celler fra muslinge-hæmolymfe	4.5-9
Bilag 4.5.2	Supplement - Anvisning til undersøgelse af kønsudvikling og kønsratio i muslinger	4.5-10

## 4.5 Biologisk effektmonitoring - 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 som følge af påvirkninger fra miljøfarlige stoffer.

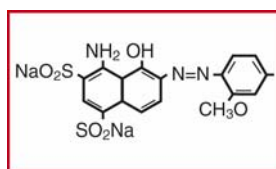
### 4.5.2 Baggrund

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

Lysosomer er subcellulære organeller, der indeholder en række enzymer, som er involveret i et bredt spektrum af væsentlige cellulært styrende funktioner, så som proteinkatabolisme, immunrespons, 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 & Pipe 1994*). Undersøgelser har korreleret den lysosomale stabilitet med bl.a. genotokicitet, oxidativt stress, scope for growth og reproduktionssucces (*Moore et al. 2004*). Denne anvisning tager udgangspunkt i metodebeskrivelsen af *Bjørnstad (2000)* og *Moore & Lowe (2004)*.

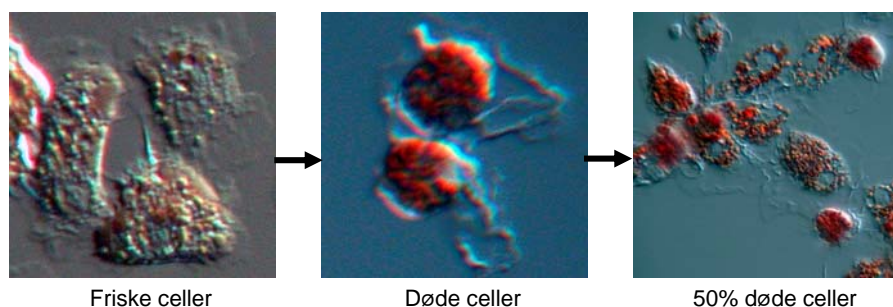
### 4.5.3 Principper

Lysosomerne er omgivet af en speciel membran, som beskytter cellens eget organiske materiale som proteiner og DNA. Miljøfarlige stoffer kan påvirke lysosomernes membran på forskellige måder. Tungmetaller kan fx forstyrre membranens holdbarhed ved direkte interaktion, hvorimod nedbrydning af organiske miljøgifte 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, at lysosomen nemmere går i stykker og derved resulterer i hurtig celledød.



**Figur 4.5.1** Neutral red.

Neutral red (*Figur 4.5.1*) er et farvestof, som tilbageholdes i lysosomerne så lang tid, som membranen er hel. Efter en tid går membranen også i friske muslinger i stykker og cellen dør. Denne proces følges i mikroskop, og tiden, når 50% af cellerne er døde, anvendes som mål for, hvor påvirket muslingen er (*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 hæmolymfeceller fra musling. Friske celler er svagt rødfarvede sammenlignet med døde celler, som også bliver rundere, når lysosomerne er gået i stykker (fra *Bjørnstad 2000*). Se også *Bilag 4.5.1*.

#### 4.5.4 Prøvetagning

Muslingerne skal indsamles i perioden september - december, dvs. uden for den reproduktive sæson, hvor variationer i metaboliske processer er mindst. Mål temperatur og salinitet ved prøvetagningstidspunktet.

Muslingerne indsamles fx 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 pr. analyse og længden bør være mindst 40 mm. For en sikkerheds skyld anbefales, at 20 stk. indsamles pr. station i tilfælde af at den senere udtagning af hæmolymfeprovver ikke lykkes for alle.

Under transport til laboratoriet skal muslingerne opbevares på en sådan måde, at de ikke bliver stressede af iltvind eller temperaturændringer, hvilket betyder, at de skal have afkølet vand fra prøvetagningsområdet, som er luftet, så 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

#### Stamopløsning til fysiologisk saltløsning med salinitet på 32

(for at holde hæmolymfeceller i live).

Afvej:

4,77 g	Hepes (99%)
1,47 g	CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O ( kalciumklorid 99,5%)
13,06 g	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O (99,0-102%)
25,48 g	NaCl ( natriumklorid 99,8%)
0,75g	KCl (kaliumklorid 99,5%)

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

Den fysiologiske saltvandsopløsning skal bruges til at holde cellerne i hæmolymfen i live. Den skal derfor fortyndes før brug, så saliniteten af det fysiologiske saltvand svarer til saliniteten i havvandet, som muslingerne har levet i. Fortyndingen foretages med en opløsning, som udelukkende indeholder Hepes.

#### Neutral red

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

Neutral red 28,8 mg, der opløses i 1 ml dimethylsulfoxid (DMSO).

Arbejdsløsning (laves frisk hverdag i mørk flaske):

- 10 µl stamopløsning
- 5 ml fysiologisk saltløsning

#### Mikroskop

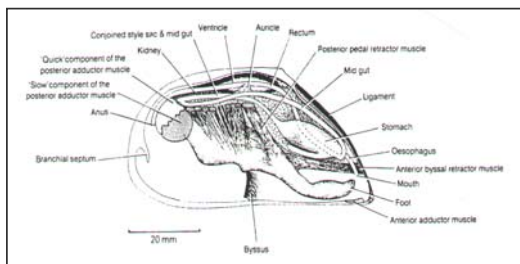
Der bør bruges et lysmikroskop med op til 100 gangers forstørrelse.

### 4.5.5.2 Udtagning af hæmolymfeprøve

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

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

PAM



Figur 4.5.3 Blåmusling (Fra Bjørnstad 2000).

- Den bagerste lukkemuskel lokaliseres. Den består af hvidt, lidt gennemsigtigt filament, som løber fra den nederste til den øvre skaldel.
- Kanylen stikkes forsigtigt ind i lukkemusklen, og hæmolymfen trækkes ud. Bland ved at vende på røret.
- Denne procedure bør ikke tage længere end 1-2 minutter pr. musling.

### Opsætning af mikroskopglas

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

- Eventuelt kan mikroskopglasset behandles med en dråbe 1:10 Poly-L-leucine:destilleret vand, som skal tørre på mikroskopglasset. Dette underlag letter vedhæftning af celler.
- 40 µl celle suspension (hæmolymfe:fysiologisk saltopløsning) sættes som en dråbe på midten af glasset. Glasset lægges i et mørkt kammer med fugtig atmosfære ved stuetemperatur i 15 minutter.
- Efter 15 minutter fjernes overflødig væske ved forsigtigt at stille mikroskopglasset på højkant. 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 arbejdsopløsning tilsættes hvert mikroskopglas, hvorpå det dækkes med et dækglas. Stopuret sættes i gang ved farvning af den første prøve.

Efter 15 minutter undersøges cellerne i mikroskop for andelen af døde celler. Cellerne lokaliseres ved X10/20 og undersøges ved X40/100 med lavest muligt lysniveau. En minut er maksimum tid pr. prøve.

Hver prøve analyseres igen efter yderligere 15 minutter og derefter hver halve time, for at bestemme på 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

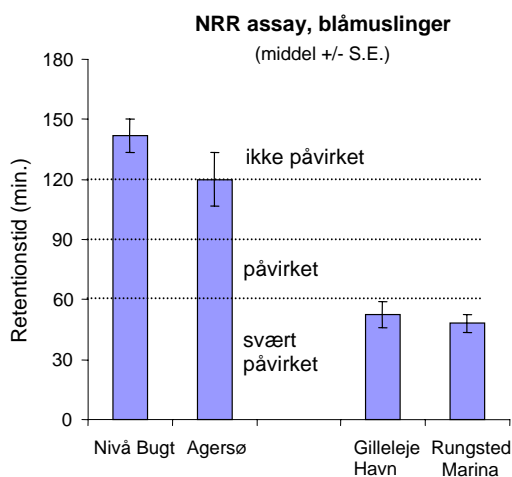
##### 4.5.7.1 Stationsbeskrivelse

Ifølge rapporteringen for miljøfarlige stoffer i muslinger.

##### 4.5.7.2 Resultat

- Retentionstiden for hvornår 50% af celler i hæmolyse vurderes som døde.
- Vægt og længde.

Stationsdata angives som middel retentionstid og standardfejl.



**Figur 4.5.4** Lysosomal stabilitet i blåmuslinger fra NOVANA-stationer i hhv. Øresund og Storebælt samt i to havne. Målt med neutral red retention (NRR).

Normalsituationen for retentionstiden er 120-150 min. En graduering af resultaterne kan foretages ved, at muslinger vurderes som "svært påvirkede" ved retentionstider på <60 min. og som "påvirkede" fra 60-<90 min. (Moore & Lowe 2004).

Data for lysosomal stabilitet i muslinger kan evt. også præsenteres sammen med data for konditionsindeks og lipidindhold, som indgår som parametre under overvågningen af miljøfarlige stoffer i muslinger.

#### 4.5.8 Referencer

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

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. – Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 46: 649-653.

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

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

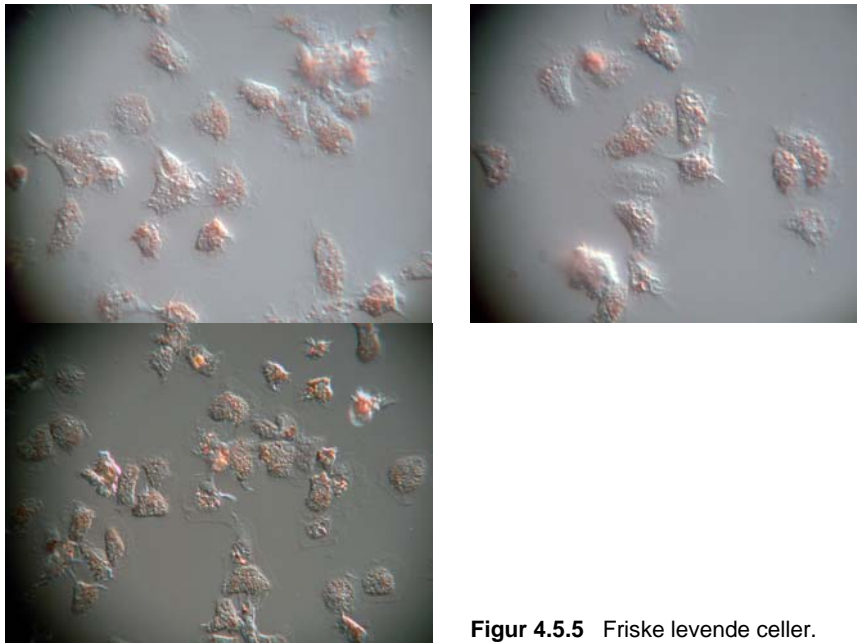
Moore, M.N. & Lowe D. 2004: Biological effects of contaminants: Measurement of lysosomal membrane stability. – ICES Techniques in Marine Environmental Sciences No. 36.

<http://www.ices.dk/pubs/times/times36/TIMES36.pdf>

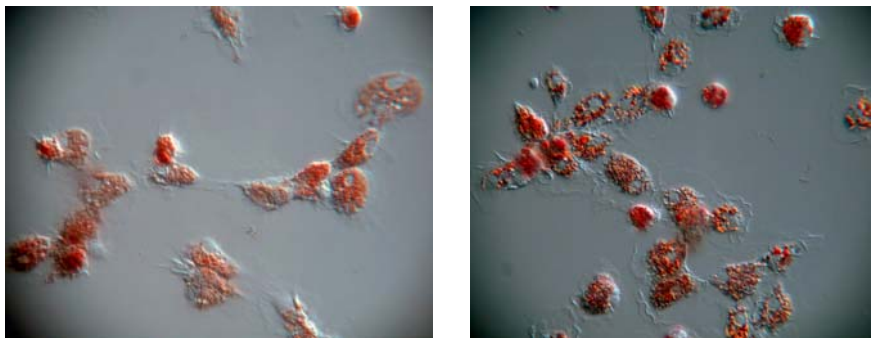
Moore, M.N., Depledge, M.H., Readman, J.W., Leonard, D.R.P. 2004: An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. – Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 552: 247-268.



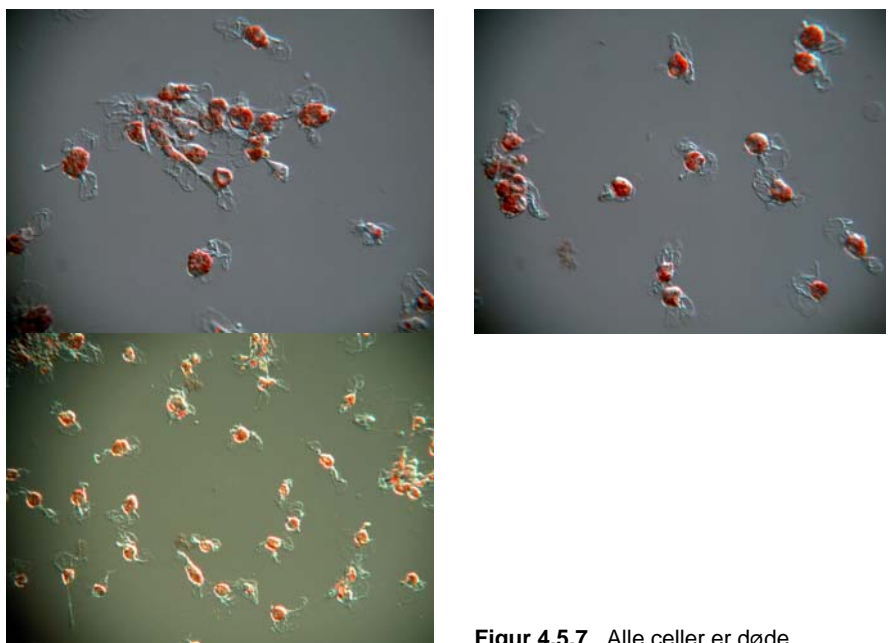
## Bilag 4.5.1 Mikroskopbilleder af celler fra muslingehæmolympfe



Figur 4.5.5 Friske levende celler.



Figur 4.5.6 Ca. 50% døde celler.



Figur 4.5.7 Alle celler er døde.

## Bilag 4.5.2

### Supplement - Anvisning til undersøgelse af kønsudvikling og kønsratio i muslinger

#### Formål

At vurdere om kønsudviklingen i muslinger er påvirket af hormonforstyrrende stoffer.

#### Baggrund

For at kunne vurdere i hvilket omfang der forekommer biologiske effekter af miljøfarlige stoffer i miljøet, behøves forskellige metoder til at kunne supplere hinanden afhængig af den pågældende forurening, der ønskes undersøgt. Kønsmodning og kønsratio mellem hanner og hunner kan være sådanne relevante parametre, der vil kunne bidrage til at opnå en viden, om der forekommer effekter på reproduktion og rekruttering hos muslinger i et område.

Denne metoden er inspireret af canadiske undersøgelser af forskellige muslinger, herunder blåmusling (*Mytilus edulis*) og sandmusling (*Mya arenaria*), der har vist en overrepræsentation af hanner (op til 75% hanner) indsamlet i kystnære områder med udledninger fra by, industri og havne (Gagné et al. 2003; Hellou et al. 2003). Dette tyder på effekter af androgene stoffer, eventuelt tributyltin (TBT), idet der normalt er en ligelig kønsfordeling – dog med en svag overvægt af hanner (Seed 1969). Derimod er en overrepræsentation af hunner hos ferskvandsmuslinger (op til 70% hunner) fundet i områder med udledning af byspildevand, hvilket vurderes at være et tegn på påvirkninger af østrogene stoffer (Blaise et al. 2003).

Hormonforstyrrende stoffer kan også medføre en forsinket gametogenese, dvs. kønsmodning (Gagné et al. 2003; Hellou et al. 2003), der igen kan resultere i en forsinket udvikling og settling af muslingelarver i et område. Kønsmodningen kan fx vurderes ved at udregne det gonade-somatisk indeks.

Alternativt kan kønsmodningen bedømmes ud fra en visuel vurdering, som vist i Figur 4.5.9. En mere detaljeret bedømmelse kan foretages ved histologiske undersøgelser af gonadernes modenhed på vævsmateriale, der har været fikseret i Bouins-væske. Modenheden kan derpå inddeles i 5 forskellige udviklingsstadier bestående af 1) uudviklet, 2) begyndende udvikling, 3) næsten moden, 4) gydemoden og 5) tom efter gydning (Seed 1969; Gagné et al. 2003). For at vurdere dette skal prøverne skæres i skiver af ca. 5 µm tykkelse og efterfølgende præpareres, hvilket kræver særligt udstyr og er derfor ikke medtaget i denne anvisning.

Det skal bemærkes, at også andre ydre faktorer end miljøfarlige stoffer kan give sig udslag i en forsinket gonadeudvikling i muslinger. En række studier har vist, at især (vinter)temperaturen er en vigtig parameter (Caceres-Martinez & Figueras 1998; Claxton & Gerry 1998), men også fødeligtæthed kan påvirke dette (Wacker & von Elert 2003).

## Prøvetagning

Undersøgelser bør altid inddrage sammenligninger med forventet referenceområde, hvor muslinger fra begge områder er indsamlet og undersøgt på samme tidspunkt.

Minimum 60 muslinger bør indsamles og undersøges pr. station.

Undersøgelserne skal foregå før gydningen, dvs. i perioden april-juni.

Det anbefales, at muslingerne opbevares levende frem til analyse. Især blåmuslinger bør opbevares koldt og fugtigt – fx viklet ind i en klud. Ved opbevaring i vand kan man risikere, at blåmuslingerne gyder pga. de ydre stressforhold, hvilket vil vanskeliggøre den efterfølgende undersøgelse. Det skal bemærkes, at kønsbestemmelsen til nød også kan udføres på frosne individer.

Husk at måle vandets salinitet og temperatur ved indsamlingstidspunktet.

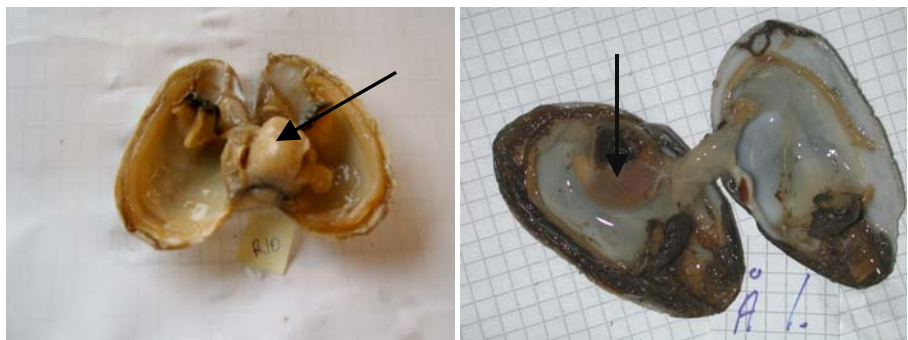
## Udstyr

Mikroskop med 100-400 gange forstørrelse.

## Fremgangsmåde

1. Muslingerne åbnes ved at skære lukkemusklerne over med en skalpel.
2. Hos sandmuslinger vejes hele muslingen, hvorpå gonaden dissekeres ud og afvejes separat. Til sidst afvejes vægten af skaller uden bløddele, hvor blødvægten kan beregnes ved at trække blødvægten fra totalvægten. Herfra kan man så beregne det gonade-somatiske indeks:

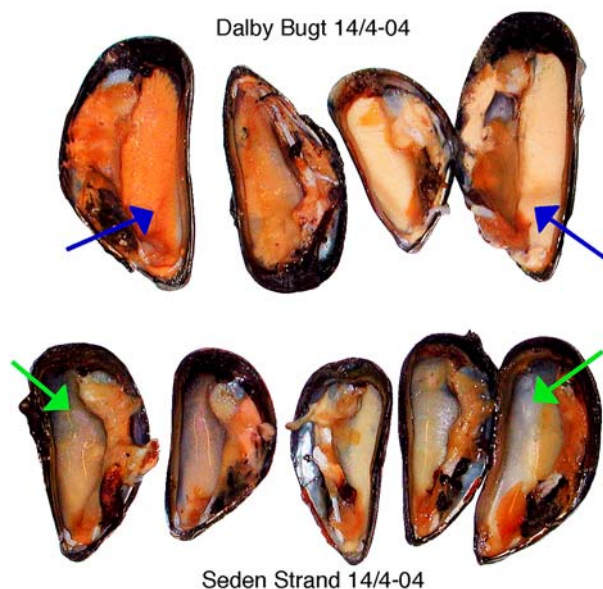
$$\text{GSI} = (\text{vægt af gonade}) / (\text{vægt af bløddele}) * 100\%$$



**Figur 4.5.8** Sandmuslinger med hhv. fuldtudviklet og ikke udviklet gonade. Det er ikke muligt at bestemme køn i sidstnævnte, hvorfor den karakteriseres som "indifferent".

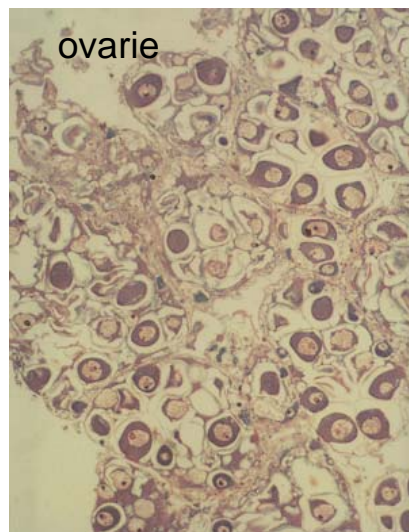
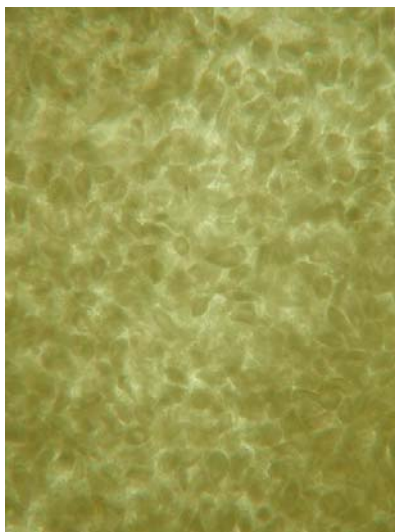
3. Hos blåmuslinger vejes hele den gonadefyldte kappe. Eventuelt kan man også lave en visuel vurdering af kønsmodningen, ud fra hvor fyldig gonaden er.

**Figur 4.5.9** Blåmuslinger med mere eller mindre udviklet gonader fra to områder i Odense Fjord. Gonaderne udvikles i kappen og kan være hvidlige (oftest hanner) til orange (oftest hunner). Muslingerne fra Seden Strand har forsinket gametogenese sammenlignet med referencestationen Dalby Bugt, hvilket kan skyldes stresspåvirkninger, herunder effekter af miljøfarlige stoffer.

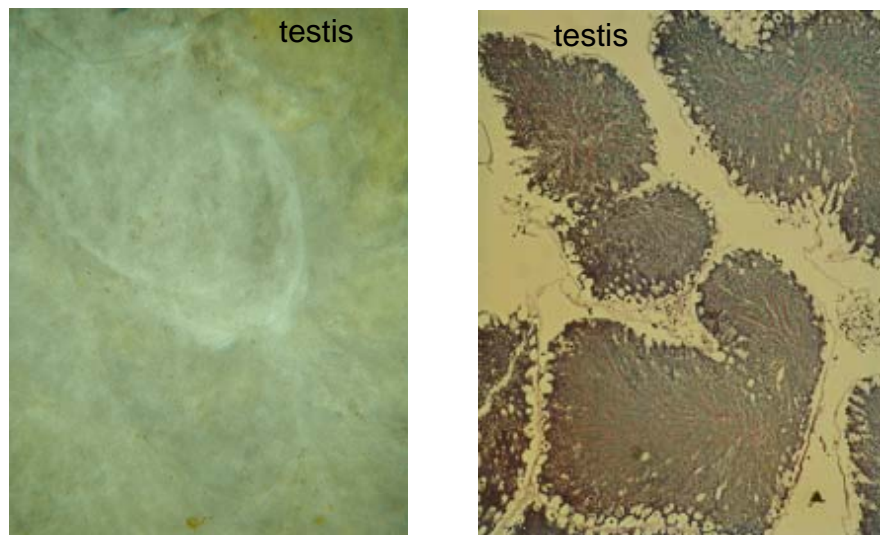


4. Et mindre stykke af gonaden (hos blåmuslinger kappe inklusive gonade) lægges på et mikroskopglas og dækglasset presses forsigtigt på.
5. Bestemmelsen af køn gøres med mikroskop med 250-400 gange forstørrelse ved at se, om der er follikler med oocytter eller spermatozoer til stede i gonaden (se *Figur 4.5.10* og *4.5.11*). Hvis disse køns karakterer ikke er til stede, vurderes kønnet som værende ikke udviklet, dvs. "indifferent".

**Figur 4.5.10** Hunnens ovarie identificeres på tilstedeværelsen af tydelige oocytter. (Foto: F. Gagne)



**Figur 4.5.11** Hannens testis identificeres på tilstedeværelsen af tydelige follikler med spermatozoer (Foto: F. Gagne).



6. Et prøveantal på min. 60 individer pr. station anbefales.
7. Den statistiske sammenligning foretages vha. student t-test eller "2x2 contingency tables".
8. Husk at supplere med almindelige biometriske oplysninger som bl.a. skallængde og konditionsindeks (se Teknisk anvisning: 4.4 Miljøfarlige stoffer i muslinger).

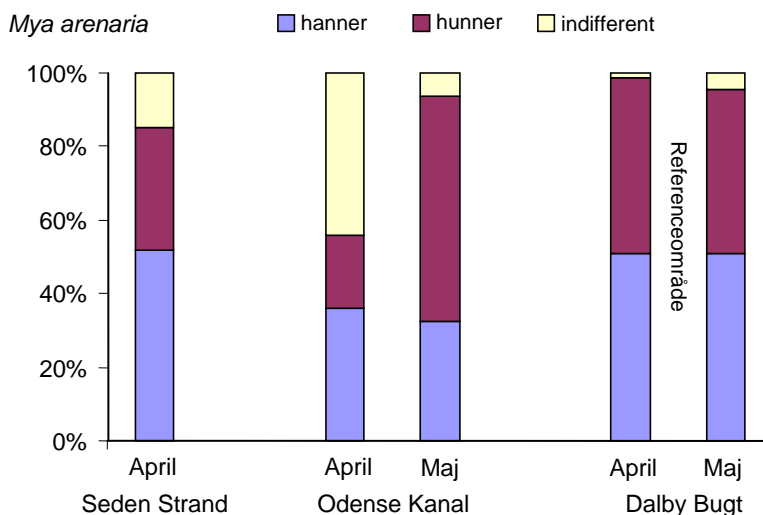
### Rapportering

Følgende parametre bør rapporteres:

- Skallængde (mm), KI (middelværdi  $\pm$  S.E.)
- Konditionsindeks, KI (middelværdi  $\pm$  S.E.)
- Gonade-somatisk indeks, GSI (middelværdi  $\pm$  S.E.)
- Visuel bedømmelse af gonadeudvikling
- Køn og %-andel af hanner og hunner
- %-andel af indifferent køn

I forbindelse med tolkning af data er det en god ide at kunne inddrage information om temperatur og fytoplanktonforhold i de forudgående måneder før prøvetagningen.

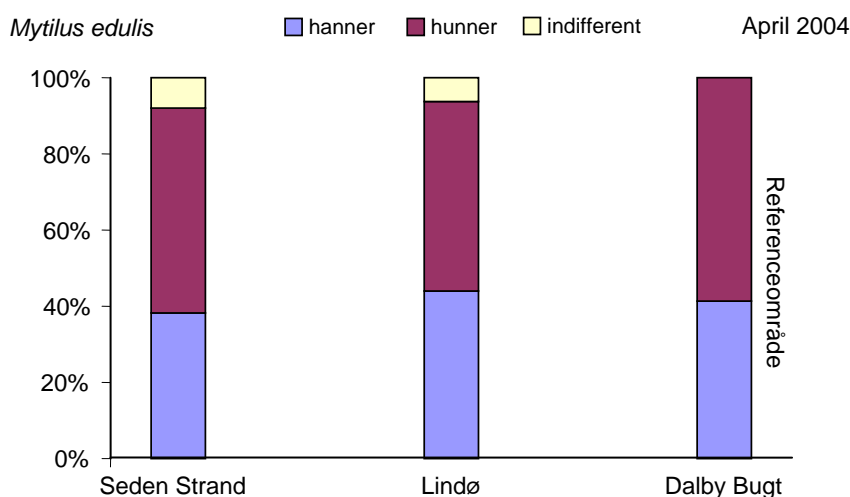
## Eksempler på præsentation af data



**Figur 4.5.12** Kønsfordeling i sandmuslinger fra Odense Fjord 2004.

I sandmuslinger fra den indre del af Odense Fjord forekom i 2004 både en skæv kønsfordeling og en forsinket gametogenese (indifferent køn) sammenlignet med Dalby Bugt, der ligger uden for fjorden (Figur 4.5.8, Figur 4.5.12). Dette kan tyde på, at muslingerne er påvirket af hormonforstyrrende stoffer, muligvis TBT.

Tilsvarende forekom der en tydelig forsinket gametogenese i blåmuslinger (Figur 4.5.9), men der er ingen signifikante forskelle i kønsratioen i forhold til referencestationen Dalby Bugt. (Figur 4.5.13).



**Figur 4.5.13** Kønsfordeling i blåmuslinger fra Odense Fjord 2004.

## Relevant litteratur

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

Blaise, C., Gagne, F., Salazar, M., Salazar, S., Trottier, S., Hansen, P.D. 2003: Experimentally-induced feminisation of freshwater mussels after long-term exposure to a municipal effluent. - *Fresenius Environmental Bulletin* 12 (8): 865-870.

Claxton, T.W. & Gerry, L. 1998: Mackie Seasonal and depth variations in gametogenesis and spawning of *Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis* in eastern Lake Erie. - *Canadian Journal of Zoology* 76 (11): 2010-2019.

Caceres-Martinez, J. & Figueras, A. 1998: Long-term survey on wild and cultured mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk) reproductive cycles in the Ria de Vigo (NW Spain). - *Aquaculture* 162 (1-2): 141-156.

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. - *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 46: 649-653.

Gagne, F., Blaise, C., Pellerin, J., Pelletier, E., Douville, M., Gauthier-Clerc, S., Viglino, L. 2003: Sex alteration in soft-shell clams (*Mya arenaria*) in an intertidal zone of the Saint Lawrence River (Quebec, Canada). - *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 134 (2): 189-198.

Gagné F., Blaise C., Pellerin J., Pelletier E. & Strand J. (*In press*): Health effects of *Mya arenaria* bivalves collected from contaminated sites in Canada (Saguenay Fjord, Québec) and Denmark (Odense Fjord) during their reproductive period. - *Ecotoxicology and Environmental Safety*, accepted for publication 2005.

Hellou, J., Yeats, P., Steller, S., Gagne, F. 2003: Chemical contaminants and biological indicators of mussel health during gametogenesis. - *Environmental Toxicology and Chemistry* 22 (9): 2080-2087.

Seed, R. 1969: The ecology of *Mytilus edulis* on exposed rocky shores. I. Breeding and settlement. - *Oecologia* 3: 277-316.

Wacker, A. & von Elert, E. 2003: Food quality controls reproduction of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). - *Oecologia* 135 (3): 332-338.