



Titel: <b>Biologisk effektmonitoring i muslinger</b>			
Dokumenttype: Teknisk anvisning	TA. nr.: M28	Version: 2	Oprettet: 28.09.2013
Forfattere: Jakob Strand og Ingela Dahllöf	Gyldig fra: 3.10.2013		
	Sider: 16		
	Sidst ændret: 3.10.2013		
TA henvisninger	M22		

## 0 Indhold

1 Indledning .....	1
2 Metode .....	2
2.1 Tid, sted og periode.....	2
2.2 Udstyr .....	3
2.3 Procedure.....	4
2.3.1 Procedure for indsamling, transport og opbevaring.....	4
2.3.2 Procedure for håndtering og målinger af skalhøjden og vægt .....	5
2.3.3 Procedure for udtagning af hæmolymfe og bestemmelse af lysosomal membranstabilitet .....	6
2.4 Tjekliste .....	8
2.5 Vedligehold af instrumenter .....	8
2.6 Særlige forholdsregler - faldgruber .....	8
3 Databehandling .....	9
4 Kvalitetssikring .....	10
4.1 Kvalitetssikring af metode .....	10
4.2 Kvalitetssikring af data og dataaflevering .....	10
5 Referencer .....	11
6 Bilag .....	12
6.1 Skema til brug af analyser af lysosomal membranstabilitet.....	12
6.2 Mikroskopbilleder af celler fra muslinge hæmolymfe .....	14
6.3 Relaterede TA'er .....	15
7 Oversigt over versionsændringer .....	16

## 1 Indledning

Denne tekniske anvisning er udarbejdet for at sikre sammenlignelighed af målinger udført med det formål at undersøge de biologiske effekter af miljøfarlige stoffer i muslinger i det danske havmiljø. Den beskriver både procedurer til prøveindsamling og opbevaring og analyserne, der omfatter bestemmelse af biomarkøren lysosomal membranstabilitet i blåmuslinger.

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 PCB har vist at kunne inducere effekter på bl.a. lysosomer ved miljørealistiske koncentrationer. Effekterne synes dog ikke umiddelbart at være stofspecifikke, og de 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 i sig selv resultere i celledød, men derudover har undersøgelser påvist en korrelation mellem den lysosomale stabilitet med andre typer af skader i muslingerne bl.a. genotoxicitet, oxidativt stress, scope for growth og reproduktionssucces (Moore et al. 2004a). Dermed kan den lysosomale membranstabilitet i muslinger anvendes som et integreret kvalitetselement til dokumentation af de biologiske effekter i dyrelivet som følge af belastningen med miljøfarlige stoffer det danske havmiljø.

Fremgangsmåden i denne tekniske anvisning følger den internationalt anbefalede procedure for overvågning af lysosomal membranstabilitet i muslinger i det Nordatlantiske område (Moore et al. 2004b). Her baseres metoden på brugen af farvestoffet Neutral red, som anvendes til at måle tiden, som det tager lysosomernes membraner at sprænges i celler fra muslingernes hæmolymfe ('blod').

## 2 Metode

### 2.1 Tid, sted og periode

Muslingerne skal indsamles i perioden september - december, dvs. uden for den reproduktive sæson, hvor variationer i metaboliske processer er mindst. Muslingerne skal indsamles fra den samme population, som bruges i analysen af miljøfarlige stoffer i muslinger (se TA M22), så resultaterne kan forholdes til hinanden. I praksis betyder dette, at muslinger til biologisk effektmonitoring og miljøfarlige stoffer indsamles på samme tidspunkt.

Blåmusling (*Mytilus edulis*) (se billede) foretrækkes som indikatorart, men metoden virker principielt også på andre større arter af muslinger.



I Tabel 1 er angivet art, indsamlingsområder og metoder samt antal.

Ved valg af art skal der tages hensyn til nogle basale forudsætninger. Den valgte art skal være:

- Almindeligt forekommende så der nemt kan indsamles 20 individer med en skallængde på 40 – 60 mm på den udvalgte station – altså 10 ekstra i forhold til de 10 individer per station, som skal analyseres, da prøvetagning af hæmolymfe er vanskelig (se 2.3.3) og derfor ikke altid er lige vellykket.

**Tabel 1** Art, typeområder, indsamlingsmetoder og det anbefalede antal individer pr. station/lokalitet i overvågningsprogrammet

Art	Typer af indsamlingsområder	Indsamlingsmetoder	Antal per station
Blåmusling <i>Mytilus edulis</i>	Kystnære områder og ved punktkilder	Manuel indsamling i tidevandszonen, alternativt med dykker eller rammeskrab	10 (+ 10 ekstra)

Den samme art skal derefter i de efterfølgende år også anvendes som indikatorart for at kunne vurdere den tidlige udvikling i det samme område.

Ved en vedvarende monitoring skal det efterstræbes, at tidspunktet for indsamlingen af muslingerne er det samme hvert år.

## 2.2 Udstyr

- Indsamlingsudstyr består af beholder/pose, et fugtigt klæde samt køletaske med køleelementer til opbevaring af levende muslinger under transport
- Elektrisk luftpumpe ved transport mere end 24 timer
- 2,5 liter vanddunk med havvand fra indsamlingsstedet til at opbevare levende muslingerne efter ankomsten og frem til analyserne i laboratoriet
- Skydelære til at måle skallængde
- Vægt til at måle totalvægt og skalvægt
- Udstyr til måling af saltholdighed ( $\pm 1$  psu) i havvand, fx refraktometer.
- 1 ml sprøjte med kanyler (0,6 mm \* 30 mm) samt eppendorfrør ved prøvetagning af hæmolymfe
- Fugtighedskammer
- Spatel, skalpel og pincet til åbning og dissektion af muslingerne
- Mikroskop (250 – 400x forstørrelse) til brug ved analysen
- Stopur til analyserne
- Kemikalier til sammensætning af fysiologisk saltvand samt farvestoffet Neutral red

### Fysiologisk saltvand:

1 liter stamopløsning af fysiologisk saltvand med salinitet på 32 psu laves ved at blande:

Afvejet mængde til 1 liter demineraliseret vand	Stof	Koncentration
25,48 g	NaCl (natriumklorid 99,8%)	0,435 M
13,06 g	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O (99%)	0,109 M
0,75 g	KCl (kaliumklorid 99,5%)	0,020 M
1,47 g	CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O (kalciumklorid 99,5 %)	0,013 M
4,77 g	Hepes (99%)	0,020 M

pH justeres derpå til 7,36 med 1 M NaOH og opbevares i køleskab. Hvis opløsningen bruges i mere end fem dage, skal pH kontrolleres.

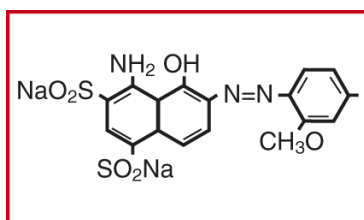
Den fysiologiske saltvandsopløsning skal bruges til at holde cellerne i hæmolymfen i live. Den skal derfor fortyndes før brug, så saliniteten af det fysiologiske saltvand svarer til saliniteten i havvandet, som muslingerne har levet i. Fortyndingen foretages med en opløsning, som udelukkende indeholder 0,020 M Hepes.

Som et alternativ til fysiologisk saltvand kan anvendes filtreret havvand fra indsamlingslokaliteten.

#### Neutral red:

Stamopløsning laves ved at afveje 28,8 mg Neutral red (Figur 1) som opløses i 1 ml dimethylsulfoxid (DMSO). Opløsningen kan opbevares i en mørk flaske i op til 3 uger ved 5 °C.

Arbejdsopløsning laves hver dag i en mørk flaske ved at fortynde 10 µl stamopløsning med 5 ml fysiologisk saltvand eller filtreret havvand fra lokaliteten.



**Figur 1** Den kemiske struktur af farvestoffet Neutral red

## 2.3 Procedure

### 2.3.1 Procedure for indsamling, transport og opbevaring

Det er vigtigt at byssustråde ikke er flået af de indsamlede muslinger, da dette vil kunne beskadige deres væv og medføre et tab af hæmolympfvæske og påvirke muslingernes immunforsvar. Hvis muslingerne sidder fast eller er sammenfilterede pga. byssustråde, skal disse klippe/skæres forsigtigt over.

Vandtemperaturen måles og noteres ved indsamlingstidspunktet.

Salinitet af havvandet måles i laboratoriet forud for analyserne i vandet udtaget til opbevaring.

Umiddelbart efter indsamlingen overføres de 20 muslinger til en pose, hvor de omvikles med en klud fugtet med havvand og opbevares derpå køligt (ca. 5 °C), dvs. lægges i en køleboks med køleelementer, eller i et køleskab.

Husk også at medbringe yderligere 2,5 liter havvand fra indsamlingsstedet i en vanddunk til senere brug under opbevaring af muslinger i laboratoriet og frem til analyserne.

#### Transporten til analyselaboratorium

*Transport mindre end 24 timer:*

Muslingerne skal ligge viklet ind i et fugtigt stykke stof i en pose lagt ned i en køleboks med køleelementer. Det er dog VIGTIGT, at der IKKE er anvendt så meget vand til fugtningen af klædet, at muslingerne ligger dækket med vand nede i posen! Lav eventuelt huller i posen.

*Transport mere end 24 timer:*

Muslingerne skal hurtigst muligt efter indsamlingen lægges i koldt vand, dvs. som vandtemperatur på indsamlingsstedet eller koldere. Vandet iltes med luftpumpe (batteridrevne pumper forefindes). Læg fx et mindre kølelement ned i vandet.

Ved ankomsten til laboratoriet skal muslingerne straks overføres til en beholder med vand fra indsamlingsstedet. Vandet skal iltes med luftpumpe og stå koldt ved +5 °C.

Muslingerne skal undersøges inden for de 3 efterfølgende dage. Derfor er det vigtigt i god tid at have aftaler med analyselaboratoriet om tidspunkter på plads. Det er bedst, hvis muslinger ankommer senest onsdag, så de kan analyseres inden weekenden.

### **2.3.2 Procedure for håndtering og målinger af skalhøjden og vægt**

Muslingerne opbevares i afkølet vand med lufttilførsel i laboratoriet frem til analyse.

Inden analyserne skal muslingernes længde måles med en skydelære til den nærmeste mm. Længden noteres i en logbog.

Muslingen åbnes derpå forsigtigt på klem ved at lirke skallerne op med en flad spartel, uden at muslingens lukkemuskler tager skade. En lille spids sættes i klemme mellem skallerne, så muslingen kan sættes til afdrypning for vand på en bakke i ca. 1 minut.

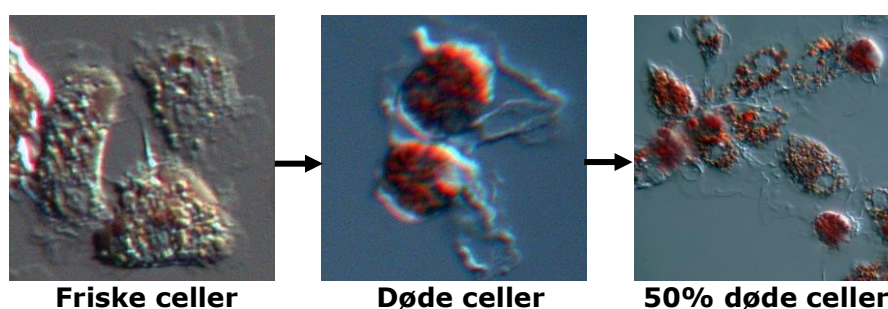
Totalvægten af muslingen (dvs. vægt af skaller og bløddele) vejes derpå med en vægt (0,1 g), og vægten noteres i en logbog, hvorpå muslingen er klar til prøvetagning af hæmolymfevæske (se nedenfor).

Efter prøvetagning af hæmolymfevæske fjernes alle bløddele fra skallerne med skalpel og pincet. Skallerne nummereres og lægges til tørre. De tørre skaller vejes (med 0,1 g nøjagtighed), og skalvægten noteres i en logbog.

Bløddelsvægten udregnes ved at fratække skalvægten fra totalvægten.

### 2.3.3 Procedure for udtagning af hæmolymfe og bestemmelse af lysosomal membranstabilitet

Hæmolymfecellerne farves med neutral red (et rødt farvestof) og undersøges derpå i 30 minutters intervaller med et lysmikroskop. Til at starte med tilbageholder lysosomerne det røde farvestof så lang tid, som membranen er stabil. Efter en tid sprænges membranen, og farvestoffet lækker ud i cellevæsken (cytosolen) og cellen dør. Det er denne tid, der anvendes som et mål for, hvor påvirket muslingen er (Figur 2). I sunde muslinger er den tid normalt på >120 minutter.

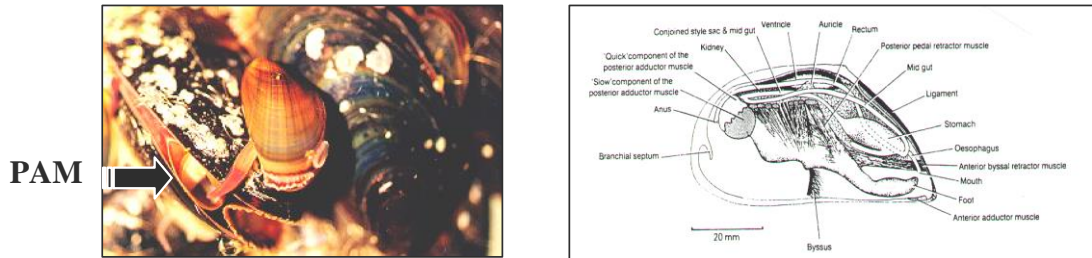


**Figur 2** Mikroskopbilleder af hæmolymfeceller fra musling. Friske celler er svagt rødfarvede sammenlignet med døde celler, som også bliver rundere, når lysosomerne er gået i stykker (fra Bjørnstad, 2000). Se også Bilag 6.2.

Den lysosomale membranstabilitet bestemmes ved følgende procedure:

- Først trækkes 0,05 ml fysiologisk saltvand op i en 1 ml sprøjte med kanylen (0,6 mm \* 30 mm). Som alternativ til fysiologisk saltvand kan anvendes filtreret havvand fra indsamlingslokaliteten
- Muslingen åbnes forsigtigt ved at lirke skallerne op, uden at muslingens lukkemuskler tager skade.
- Den bagerste lukkemuskel lokaliseres (se Figur 3). 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
- Ved klargøring af mikroskopglas, skal der tages højde for, at der skal bruges duplikater for hver musling, dvs. 20 glas pr. station. Eventuelt kan mikroskopglassene behandles med en dråbe 1:10 Poly-L-leucine:destilleret vand, som skal tørre på mikroskopglasset. Dette underlag letter vedhæftning af celler

- 40 µl cellesuspension (hæmolymfe:fysiologisk saltvand) sættes som en dråbe på midten af glasset. Glasset lægges på et stativ i et mørkt og lukket "fugtighedskammer" med fugtig atmosfære fra en vådt klæde i bunden ved stuetemperatur



**Figur 3** Blåmuslingens anatomi og angivelse af placeringen af den bagerste lukkemuskel, PAM = "Posterior Adductor Muscle", hvor fra hæmolymfeprøven tages med kanyle (Fra Bjørnstad, 2000).

- 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
- Derpå gøres prøven endelig klar til analyse ved at farve hæmolymfecellerne med 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 den ene replikatprøve i mikroskop for at vurdere andelen af døde celler. Cellerne lokaliseres ved X10/20 og undersøges ved X40/100 med lavest mulig lysniveau
- Derpå observeres den første replikatprøve igen efter yderligere 15 minutter og derefter hver halve time og frem til maksimalt 180 minutter (3 timer)
- Observationstiden noteres, hvor halvdelen af cellerne vurderes at være døde, fordi lysosomernes membraner er bristet og neutral red farvestoffet lækker ud i cellevæsken (cytosolen). Slutresultatet for den første replikatprøve, bekræftes derpå med en analyse af anden replikatprøve, som er den værdi, der skal rapporteres. Den lysosomale membranstabilitet bestemmes som det sidste observationstidspunkt (retentionstiden), hvor minimum 50 % af cellerne har lysosomer, hvor membranerne endnu ikke er bristet.



**BEMÆRK:** Det er vigtigt, at tætheden af celler er tilstrækkelig stor til at få reproducerbare retentionstider. Dette bør gøres ved at vurdere cellernes tilstand i minimum 5 områder på mikroskopglasset, og disse områder må ikke være i yderkanten af cellelaget eller i områder med lav tæthed af celler. Der bør maksimalt bruges 1 minut pr. prøve pr. gang.

## 2.4 Tjekliste

- Indsamling af muslinger og vand fra stationen
- Måling af vandtemperatur
- Hurtig transport (muslingerne skal være fremme ved analyselaboratoriet inden 24 timer efter indsamlingen)
- Måling af opbevaringsvandet salinitet foretages forud for analyserne
- Analyser lysosomal membranstabilitet inden for 3 dage efter muslingernes ankomst til laboratoriet
- Måling af de biologiske variable: skallængde, totalvægt og skalvægt.

## 2.5 Vedligehold af instrumenter

Okularer i mikroskop kontrolleres før brug.

## 2.6 Særlige forholdsregler - faldgruber

Resultatet af analyserne kan blive forstyrret, hvis muslingerne har været for længe ude af vandet eller har været opbevaret for varmt mellem indsamlingstidspunktet og frem til analyserne.

### 3 Databehandling

En udførlig beskrivelse af databehandlingen vil blive udarbejdet i en separat datateknisk anvisning knyttet til denne tekniske anvisning.

For hver musling rapporteres følgende individuelle data:

- Art
- Skallængde (mm)
- Skalvægt (g)
- Vægt af bløddele (g)
- Retentionstiden for den lysosomale membranstabilitet (min)

På stationsniveau rapporteres følgende værdier:

- Antal undersøgte individer
- Længdeinterval
- Konditionsindeks = vægt af bløddele/skalvægt
- Skalindeks = skalvægt/skallængde
- Middelværdi og 95 %-konfidensinterval for lysosomal membranstabilitet

## 4 Kvalitetssikring

En udførlig beskrivelse af kvalitetssikringen vil blive udarbejdet i en separat datateknisk anvisning knyttet til denne tekniske anvisning.

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

### 4.1 Kvalitetssikring af metode

Analyselaboratorierne skal kunne dokumentere deltagelse i tilbagevendende nationale eller internationale workshops eller ringtests, som fx udbydes under QUASIMEME (<http://www.quasimeme.org/>) eller BEQUALM ([www.bequalm.org](http://www.bequalm.org)) for at interkalibrere de forskellige observatørers analyser af lysosomal membranstabilitet i muslinger.

Laboratorieanalyser, billeder og diskussion er væsentlige elementer i workshoppen for at opnå en optimal ensartning af observationer.

Ved rapportering af data skal der hvis muligt, henvises til deltagelse i nationale eller internationale workshops eller ringtests.

### 4.2 Kvalitetssikring af data og dataaflevering

Dataindberetning sker via MFSBasen på Miljøportalen.

## 5 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.

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

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

## 6 Bilag

### 6.1 Skema til brug af analyser af lysosomal membranstabilitet

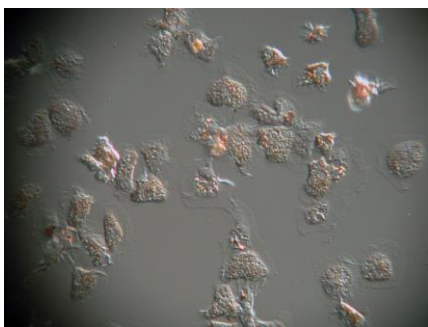
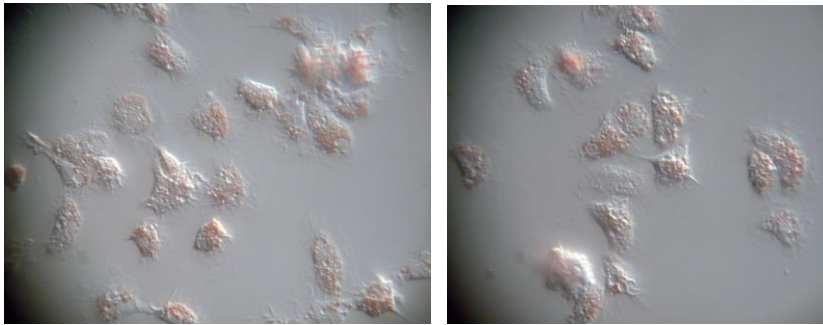
**STATION 1:** \_\_\_\_\_ Dato: for indsamling: \_\_\_\_\_ Dato for undersøgelse: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Salinitet: \_\_\_\_\_ Person: \_\_\_\_\_

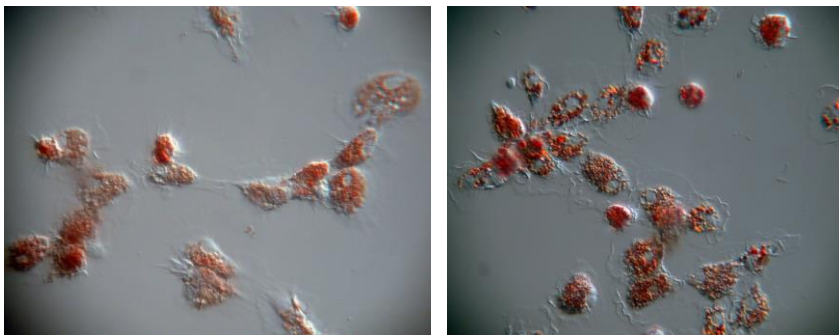
Prøve	Dæknings- grad	15min	30min	1 time	1½ t	2 t	2½ t	3 t	Læng- de (mm)	Total- vægt (g)	Skal vægt (g)	Evt.
1												
2												
3												
4												
5												
6												

Prøve	Dæknings- grad	15min	30min	1 time	1½ t	2 t	2½ t	3 t	Læng- de (mm)	Total- vægt (g)	Skal vægt (g)	Evt.
7												
8												
9												
10												
11												
12												

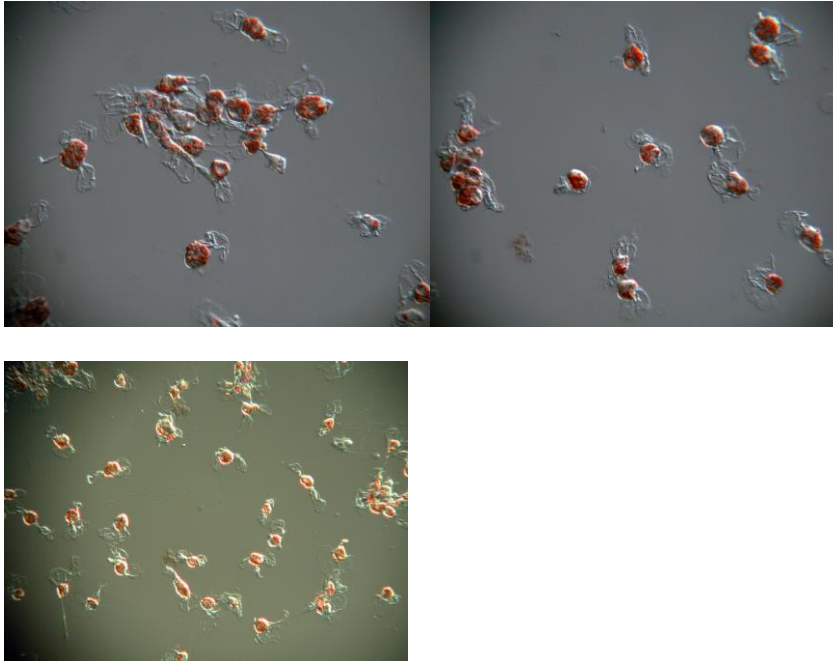
## 6.2 Mikroskopbilleder af celler fra muslingehæmolympfe



**Figur 4** Friske levende celler



**Figur 5** Ca. 50 % døde celler



**Figur 6** Alle celler er døde

### 6.3 Relaterede TA'er

Prøvetagning kan med fordel koordineres med prøvetagning af muslinger TA M22 Miljøfarlige stoffer i muslinger.



## 7 Oversigt over versionsændringer

Version	Dato	Emne:	Ændring:
2	03/10/2013	3.1 Miljøvurderingskriterier	Slettet