Marine Monitoring
RESEARCH & CONSULTING

Påverkan av miljögifter på blåmussla, analyserad genom lysosomal stabilitet

Provtagningsår 2011

Jonatan Hammar

Titel
Påverkan av miljögifter på blåmussla,
analyserad genom lysosomal stabilitet
Provtagningsår 2011

Framtagen av
Marine Monitoring AB
Lysekil, Sweden
Jonatan Hammar

Medarbetare i fält
Marina Magnusson
Annelie Hilvarsson
Anna Scherer

Kvalitetsgranskning
prof. Åke Granmo

Datum
Februari 2012

Beställare
Bohusläns vattenvårdsförbund
ISBN: 978-91-86461-20-1

MARINE MONITORING AB
Strandvägen 9, 453 30, Lysekil
Tel +46 523-101 82 | Mobil 0702 565 551 | Fax +46 523-101 83
E-post marina@marine-monitoring.se | www.marine-monitoring.se

Innehållsförteckning

Bakgrund 4

Metod 4

Provtagning 4

Analys 5

Statistisk analys 5

Resultat 7

Diskussion 11

Slutsats 12

Referenser 12

Bakgrund

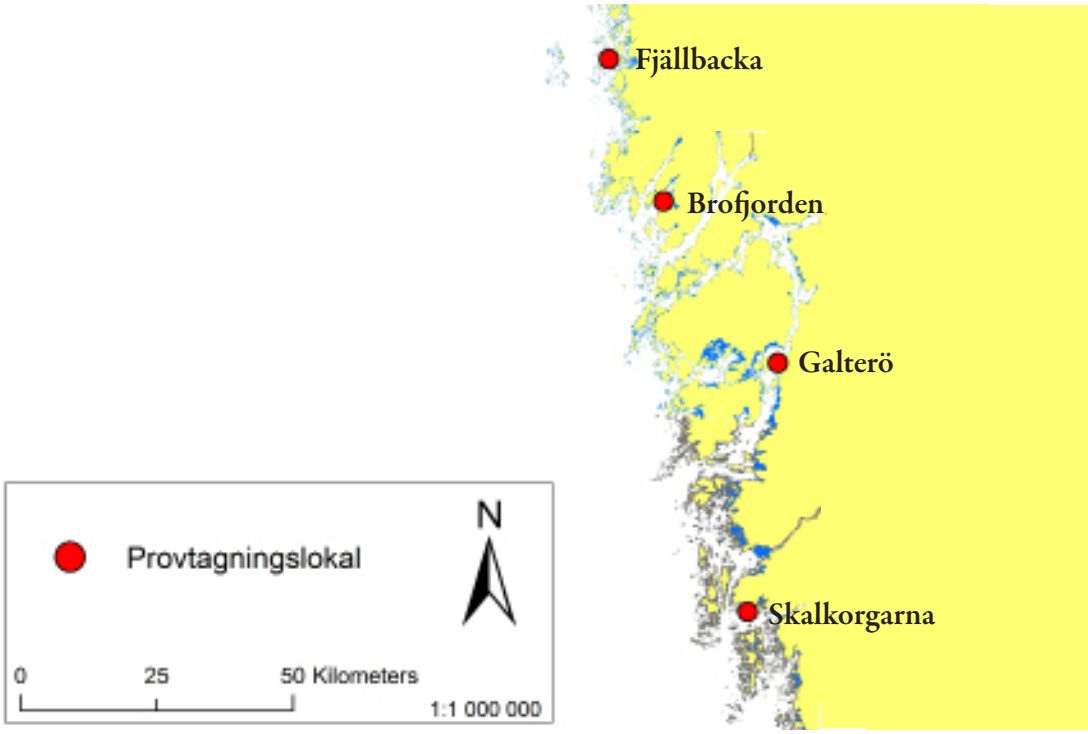
På uppdrag av Bohuskustens Vattenvårdsförbund har Marine Monitoring AB utfört en studie på blåmussla, *Mytilus edulis* (Faktaruta 1). Studien syftar till att analysera eventuell föroreningspåverkan inom fyra områden; Galterö, Brofjorden, Skalkorgarna och Fjällbacka där Fjällbacka användes som referensstation (Figur 1).

I stora delar av Europa används en metod där man genom att analysera lysosomal membran stabilitet (Faktaruta 2) hos musslor kan få ut värden på föroreningspåverkan i vattnet. Denna metod är ett effektivt och accepterat alternativ till analyser på exv. fisk (ICES, 2010). Framförallt är studier på musslor ett kostnadseffektivt alternativ då musslor är stationära, lättillgängliga och vid behov kan placeras ut för att användas vid analys av specifika punkter.

Metod

Provtagning

Under perioden 12:e till 20:e oktober 2011 insamlades musslor av arten blåmussla, *Mytilus edulis*, vid fyra tillfällen. Då förutsättningarna mellan de olika insamlingslokalerna skilde sig åt i tillgänglighet på musslor användes olika insamlingsmetoder beroende på förutsättningarna vid respektive lokal. Vid två lokaler skedde insamlingen med håv och kratta medan skrapa användes vid två djupare belägna lokaler, 6-9 m (Figur 2). En lokal insamlades per tillfälle och musselindivider transporterades till laboratoriet för analys. Under transporten förvarades musslorna inlindade i handdukar i kylbagar. Vid ankomsten till laboratoriet placerades de sedan under ett dygn svalt i akvarier försedda med luftpumpar. För att i möjligaste mån efterlikna de lokala förhållandena medtogs havsvatten med hjälp av vattenhämtare från respektive station och djup, detta för att bibehålla rätt salthalt. Detta förfarande syftade även till att avstressa musslorna från den yttre påverkan som flytten kan ha gett upphov till.



Figur 1. Karta över de provtagningslokaler från vilka blåmusslor har analyserats med avseende på lysosomal stabilitet.

Lokal	Metod	Djup	Temp.	Salinitet	Koordinater		Datum	Tid
Fjällbacka	håv/kratta	1,5 m	13,1	30,6	N 58° 34,808'	Ö 11° 13,217'	2011-10-12	15.30
Galterö	skrapa	9 m	13,6	30,2	N 58° 05,908'	Ö 11° 48,546'	2011-10-13	12.00
Brofjorden	håv/kratta	1,5 m	12,1	28,6	N 58° 21,144'	Ö 11° 25,035'	2011-10-19	14.00
Skalkorgarna	skrapa	6 m	11	23,5	N 57° 41,188'	Ö 11° 45,717'	2011-10-20	14.00

Figur 2. Information angående provtagningen på de olika lokalerna.

Analys

Analysen utfördes enligt internationellt accepterad metodik (ICES, 2010; BEQUALM).

Inför analyserna förbereddes en stamlösning baserad på färgämnet neutralrött utspätt med DMSO (Dimetylsulfoxid). Denna lösning användes sedan till samtliga analyser. Inför varje analys späddes lösningen med filtrerat havsvatten från respektive lokal.

Vid varje analys användes 10 individer av arten blåmussla. Dessa individer öppnades försiktigt med kniv och tömdes på eventuellt vatten, därefter användes en injektionsspruta innehållande 0,1 ml filtrerat havsvatten för att extrahera 0,1 ml blod ur musslans bakre slutarmuskel. Av denna lösning användes 40 µl som kontroll och 40 µl pipetterades på ett objektglas varefter det placerades i en ljustät fuktkammare (Figur 3). Då celler fastnat på objektsglaset avlägsnades överflödig vätska och 40 µl av lösningen innehållande neutralrött tillsattes. Därefter analyserades proverna i x40 ggr förstoring i mikroskop. Analys av varje prov skedde efter 15, 30, 60, 90, 120, 150 och slutligen 180 min.

Vid varje analys av proverna scannades proven för lysosomala avvikelser eller läckage. Då fler än 50 % av cellerna i ett prov uppvisade någon form av avvikelse avslutades analysen och föregående tid noterades som den specifika musslans retentionstid (RT), det vill säga den sista tiden då över 50 % av lysosomerna ej visade någon avvikelse. För att säkerställa att resultatet inte påverkats av för lång exponering i ljus eller annan felhantering analyserades sedan kontrollen som legat avskild i fuktkammare separerad från de övriga.

Faktaruta 1

Blåmussla, *Mytilus edulis*

Blåmusslan leker i maj-juni vid en vattentemperatur på 8-10°c. Efter ett larvstadium på 3-4 veckor settlar mussellarverna på fria hårda ytor. Settlingen sker från mitten av juni (svenska västkusten) och redan efter några månader kan storlekar på 2 cm uppnås. Storleken hos blåmusslan ökar med tiden och beroende på miljön kan individer på västkusten uppnå storlekar på över 10 cm. (Marbipp 2012)

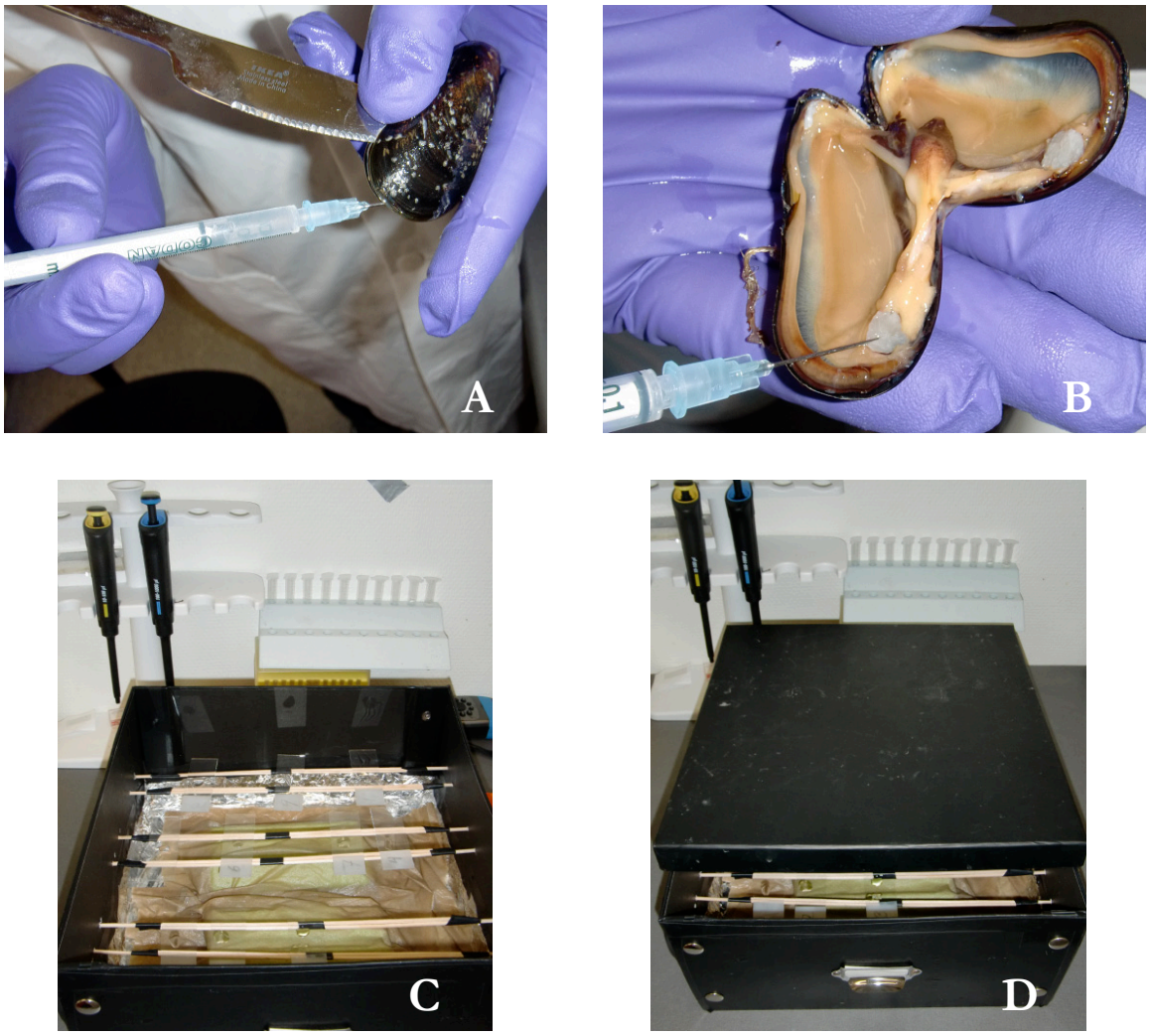
Blåmusslan har en stor utbredning i våra hav och då den är stationär och filtrerar stora volymer vatten är den ofta mycket lämplig vid undersökningar av lokala vattenförhållanden. En stor mussla kan filtrera 6-9 liter havsvatten i timmen (Marbipp 2012) vilket bidrar till att musslan bioackumulerar stora mängder av de lösta och sedimentbundna substanser som finns inom området.

De iakttagelser som i denna undersökning räknades till avvikelser var;

- Lysosomal förstoring
- Färgläckage
- Avrundning av cellerna

Statistisk analys

Värdena testades för homogenitet genom Cochrans test, vidare analyserades datan genom ANOVA för att visa på eventuell signifikant skillnad i retentionstid mellan lokalerna.



Figur 3. A, Blodet extraheras ur bakre slutarmuskeln. B, Förtydligande av var blodprov extraheras,. C-D Ljustät, kyld fukt-kammare.

Faktaruta 2

Lysosomal membranstabilitet, LMS

Lysosomer är subcellulära organeller med ett semipermeabelt membran i eukaryota celler, från protozoa till däggdjur. Beroende på vävnad och organism, fungerar lysosomerna väldigt olika men är alltid involverade i nedbrytning av material som genom endocytos kommit in i cellen (Moore et al. 2006). Denna nedbrytning kan ha olika funktioner såsom matsmältning och immunförsvar. Lysosomerna har en unik förmåga att ackumulera en mängd toxiska ämnen, däribland PCB:s, PAH:s och metaller vilka kan vara skadliga för celler (Moore et al. 2004). Koncentrationen av toxiska ämnen i cellen resulterar i att lysosomernas membran försvagas och cellens innehåll inklusive de toxiska ämnena läcker ut i cytosolen. Detta leder till en nedsättning av cellens funktion och kan leda till celldöd.

Studier av lysosomers stabilitet används som biomarkör och indikator för stress orsakat av föroreningar hos en mängd olika marina djur (Moore et al. 2006, Lowe et al. 1995). Förändringar i cellernas kapacitet att ta upp ett tillsatt färgämne (neutralrött) kan användas som en indikator på cellskador. Detta sker eftersom de friska och opåverkade cellerna kan ta upp och behålla större mängder infärgning under längre tid än celler påverkade av föroreningar.

Resultat

För respektive lokal beräknades ett medelvärde för retentionstiden. Detta värde avgör vilken status lokalen får med avseende på stresspåverkan hos musslorna (Figur 4).

Det fanns en stor variation i retentionstid inom de flesta lokaler. Referenslokalen Fjällbacka hade högst retentionstid med ett medelvärde på 45 min (±10 S.E.) vilket faller inom intervallet för statusen allvarligt stressad. Värdena inom lokalen låg mellan 0-90 min (Figur 5).

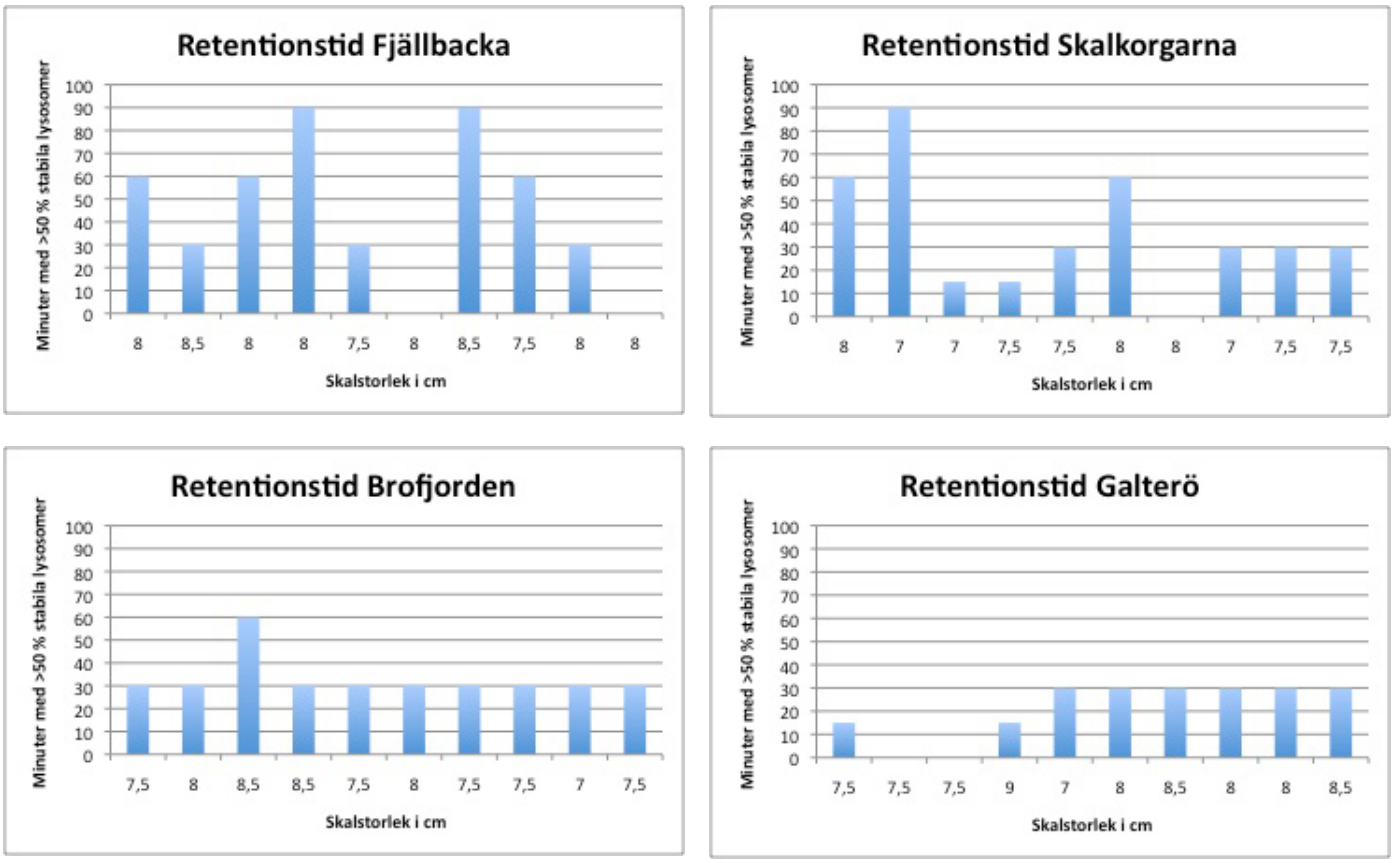
Skalkorgarna hade en retentionstid på 36 min (±8 S.E.) vilket faller inom intervallet för statusen allvarligt stressad. Värdena inom lokalen låg mellan 0-90 min (Figur 5).

Brofjorden hade en retentionstid på 33min (±3 S.E.) vilket faller inom intervallet för statusen allvarligt stressad. Värdena inom lokalen låg mellan 0-60 min (Figur 5).

Galterö var den lokal som hade lägst retentionstid med ett medel på 21 min (±4 S.E.) vilket faller inom intervallet för statusen allvarligt stressad. Värdena inom lokalen låg mellan 0-30 min (Figur 5).

Status	Medelretentionstid (RT)
Hälsosam	>120 min
Stressad men kompenserande	50 - 120 min
Allvarligt stressad	<50 min

Figur 4. Medelretentionstiden delas in i tre kategorier beroende på minuter.



Figur 5. Retentionstiden för tio individer av blåmussla från respektive lokal.

Värdena rot-transformerades och kontrollerades för homogenitet genom Cochrans test, vilket visade på homogena värden (C = 0,488, Ccrit = 0,502). Därefter analyserades värdena genom 1-vägs ANOVA. Resultatet (ANOVA) visade att det saknades signifikant skillnad (p = 0,351) i retentionstid mellan de olika lokalerna (Figur 6). Däremot syns en trend i retentionstiden där referenslokalen skiljer sig från de övriga med en högre retentionstid, medan Galterö skiljer sig från de övriga med en lägre retentionstid (Figur 7).

Två individer från referenslokalen Fjällbacka visade sig vara allvarligt stressade med värden på 0 min, dessa 0 min värden fanns på alla lokaler utom Brofjorden. För att sålla bort individer som eventuellt blivit stresspåverkade genom felaktig behandling, gjordes en andra statistisk analys då de två mest stressade individerna togs bort från respektive lokal. Resultatet visade då på en signifikant skillnad (p = 0,02) mellan referenslokalen Fjällbaka och Galterö (Figur 8), men denna skillnad syns endast som en trend om alla värden används. Figur 9 visar skillnaderna mellan retentionstiden på respektive lokal då de två mest stressade musslorna avlägsnats och då alla musslor ingår i analysen. I detta fall uppnår referenslokalen Fjällbacka miljöstatusen stressad men kompenserande.

Anova: En faktor

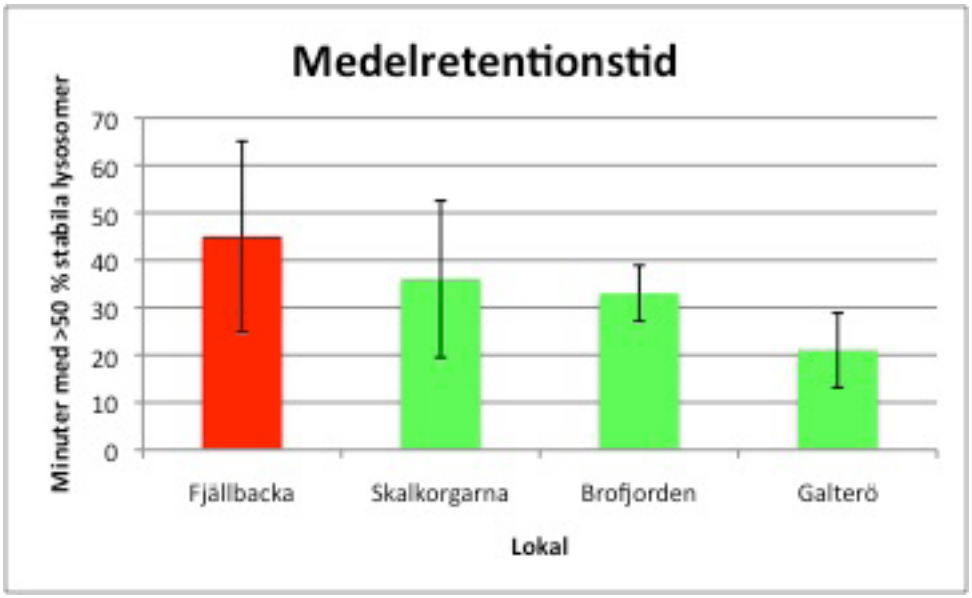
SAMMANFATTNING

Grupper	*Antal*	*Summa*	*Medelvärde*	*Varians*
Fjällbacka	10	58,64	5,864324	11,789
Galterö	10	40,61	4,060932	5,0098
Skalkorgarna	10	54,63	5,463364	6,8352
Brofjorden	10	57,04	5,7041	0,5147

ANOVA

Variansursprung	*KvS*	*fg*	*Mkv*	*F*	*P-värde*	*F-krit*
Mellan grupper	20,41	3	6,802861	1,1268	0,351	2,866
Inom grupper	217,3	36	6,037066			
Totalt	237,7	39				

Figur 6. 1-vägs ANOVA för skillnad i retentionsvärde mellan de olika lokalerna. Datan är rot-transformerad.



Figur 7. Medelvärdena i retentionstid för de olika lokalerna (± K.I.), Fjällbacka i rött är referenslokal.

Anova: Single Factor

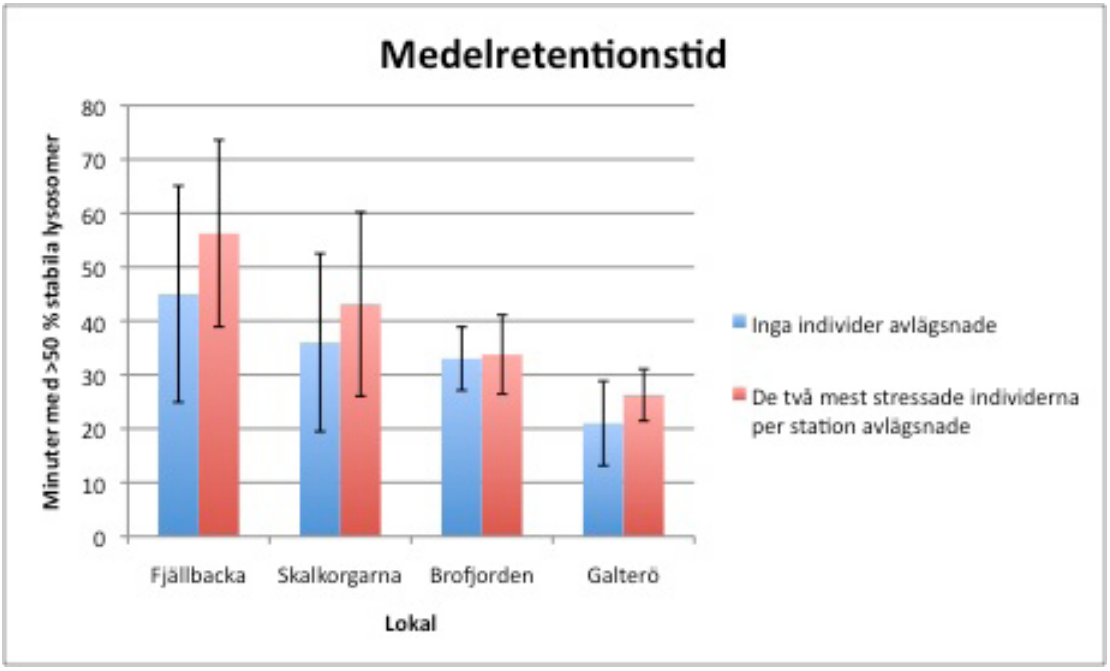
SUMMARY

Groups	*Count*	*Sum*	*Average*	*Variance*
Fjällbacka	8	450	56,25	626,79
Skalkorgarna	8	345	43,13	606,7
Brofjorden	8	270	33,75	112,5
Galterö	8	210	26,25	48,214

ANOVA

Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Between Groups	4014,84375	3	1338	3,8396	0,02	2,947
Within Groups	9759,375	28	348,5			
Total	13774,2188	31				

Figur 8. 1-vägs ANOVA för skillnader i retentionsvärde mellan de olika lokalerna då de två mest stressade individerna från respektive lokal avlägsnats.



Figur 9. Diagrammet visar skillnaden i medelvärdet för retentionstiden (± K.I.) vid de olika lokalerna efter att de två mest stressade individerna avlägsnats från respektive lokal.

Diskussion

Resultatet från undersökningen antyder en viss skillnad i retentionsvärde mellan de olika lokalerna där referenslokalen Fjällbacka visar på längst retentionstid och Galterö står för den kortaste retentionstiden. De antydda skillnaderna i retentionstid är dock inte statistiskt signifikanta då de har ett p-värde på p = 0,351. En stor bidragande faktor till det höga p-värdet kan vara den höga variationen inom varje lokal. Störst variation fanns inom lokalerna Skalkorgarna och Fjällbacka som båda visade sig inneha individer med både den kortaste samt längsta retentionstiden. Båda dessa lokalers medelvärden blev starkt sänkta av de nollvärden (individer som visade sig starkt stressade från start) som påträffades inom lokalerna (Figur 5 och 9). Även om nollvärden återfanns på alla lokaler, med undantag från Brofjorden, så får nollvärdena starkast utfall på medelvärdena från lokalerna med lång retentionstid. Detta kan i sin tur leda till en sänkning av medelvärdet som ej är proportionerlig med verkligheten.

Att enstaka musslor visar på höga stressvärden kan i sällsynta fall vara kopplad till felbehandling eller faktorer som på annat sätt utlöst stress hos individen. Om man för att kringgå detta eventuella problem skulle avlägsna de två mest stressade musslorna från respektive lokal med hänvisning till risken för eventuell felbehandling får man istället värden som ger annorlunda resultat. De nya värdena är homogena och genom 1-vägs ANOVA kan en signifikant skillnad (p = 0,02) i retentionstid mellan referenslokalen Fjällbacka och Galterö observeras. Dock placerar sig fortfarande tre av lokalerna (Skalkorgarna, Brofjorden och Galterö) inom kategorin allvarligt stressade (<50 min RT). Referenslokalen höjer sig däremot till kategorin stressad men kompenserande (50–120 min RT). Oavsett tolkning av resultatet hamnar ingen av de fyra lokalerna i den bästa och önskvärda kategorin hälsosam (>120 min).

I tidigare studier, där blodprov från tånglake har analyserats, indikeras att individer i området Brofjorden och Stenungsund (i denna rapport kallad Galterö) har varit utsatta för en högre stress än de övriga två lokalerna (Förlin 2008). Detta stämmer väl överens med de resultat som presenteras i denna rapport där man även ser en indikation på högre stressvärden hos blåmusslor från Brofjorden och Galterö (Figur 7 och 9). I tidigare undersökningar från 2001 visas att området runt Stenungsund (lokal Galterö) har förhöjda halter av pesticiderna hexaklorbensen (HCB) och lindan (Cato 2006). Dock har Galterö en lägre påverkan från tenn än vad som påträffas i närområdena för Skalkorgarna och Brofjorden som båda placerades i den sämsta klassen enligt bedömningsgrunderna från Naturvårdsverket år 2001 (Cato 2006). I områdena Brofjorden och Galterö visar tidigare data (1992-2001) på en ökning av halterna ∑7 PCB (Cato 2006). Tidigare studier har även påvisat polybromerade difenyletrar (DekaBDE) i området för lokal Brofjorden vilket tyder på emission (Cato2006). Detta kan möjligen ha inverkan på RT hos individer i de berörda områdena.

Det överraskande låga värdet på RT i referenslokalen Fjällbacka bör uppmärksammas då det faller inom kategorin allvarligt stressad. Även i studier gjorda på tånglake (åren 1999-2006) har man sett en gradvis ökad störning hos individer från Fjällbacka-lokalen (Förlin 2008). Detta bör beaktas vid val av referensstationer inför fortsatta undersökningar. En annan faktor som skulle kunna ha en roll i den allmänt låga retentionstiden hos lokalerna kan vara en ökad koncentration av algtoxiner i vattnet. I analyser utförda av Livsmedelverket av lokaler längs västkusten har man uppmätt höga halter av algtoxiner inom flera områden. Främst har man tidvis sett en ökning inom två toxingrupper DST och YTX (Malin Persson *pers. komm.*). Dessa toxiner kan eventuellt ge en inverkan på musslans stressnivå och därmed sänka individens RT. Men då inga analyser har tagits av toxiner i vattnet vid de lokaler som behandlas i denna rapport är toxinets inverkan i resultatet svår att ta med i beräkningen.

Ett ökat antal prover vid varje lokal skulle möjligen kunna ge säkrare resultat med mindre variationer. Eftersom tiden från provtagning till analys är begränsad kan detta dock innebära praktiska svårigheter

Slutsats

Resultatet visar att även om det finns en trend mot att referenslokalen Fjällbacka har en bättre status än de övriga tre lokalerna så faller alla inom kategorin ”allvarligt stressad”. Den lokal som uppvisade störst påverkan från föroreningskällor i vattnet var lokalen Galterö, med en RT på 21 min, vilket anses vara ett mycket lågt värde. Detta bör följas upp med upprepade studier, där provtagning möjligen sker årligen vid flera tidpunkter under året för att täcka upp eventuell säsongsvariation hos musslor eller alternativt föroreningskällor.

Den använda metoden är en, för Sverige, ny och kostnadseffektiv metod som tidigare använts i stora delar av Europa. Tillgången till musslor är ofta stor och möjligheten att placera ut musslor vid specifika lokaler gör metoden effektiv och punktspecifik. Resultatet ger en god bild av föroreningspåverkan i vattnet.

Referenser

BEQUALM, Lysosomal Stability, Work package 8.

Cato Ingemar, 2006. Miljökvalitet och trender i sediment och biota utmed Bohuskusten 2000/2001 - en rapport från sju kontrollprogram. SGU Rapporter och meddelanden 122.

Förlin Lars, 2008. Miljögifters effekter hos tånglake längs Bohuskusten 2006. Zoologiska institutionen, Göteborgs universitet. På uppdrag av Bohuskustens vattenvårdsförbund

ICES/OSPAR WKLYS REPORT 2010. Report of the ICES/OSPAR Workshop on Lysosomal Stability Data Quality and Interpredation (WKLYS). 13-17 September 2010. Alessandria. Italy

Lowe D. et al 1995. Contaminant-induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussels Mytilus galloprovincials from the Venice Lagoon: an in vitro study. Mar. Ecol. Prog. Ser. vol. 129: 189-196.

Malin Persson, Livsmedelsverket. Personlig kommentar. Kontakt 13 jan 2012

Moore M. N. et al 2004. Biological effects of contaminants : Measurements of lysosomal membran stability. ICES Techniques in Marine Environmental Science. No. 36

Moore M. N. et al 2006. Environmental prognostics: An integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status. Marine Environmental Research 61. 278-304.

Internet adresser

Artdatabanken 2010, www.artfakta.se

Marbipp, www.marbipp.se

Marine Monitoring
RESEARCH & CONSULTING

Påverkan av miljögifter på blåmussla, analyserad genom lysosomal stabilitet

ISBN: 978-91-86461-20-1

MARINE MONITORING AB
Strandvägen 9, 453 30, Lysekil
Tel +46 523-101 82 | Mobil 0702 565 551 | Fax +46 523-101 83
E-post marina@marine-monitoring.se | www.marine-monitoring.se