

STUDIE VAN DE JAARCYCLUS VAN ENKELE HISTOCHEMISCH BEPAALDE
INDICATOREN VAN POLLUTIE-STRESS BIJ DE MOSSEL.

II. EVALUATIE VAN TEMPORELE EN RUIMTELIJKE GRADIËNTEN
LANGS DE BELGISCHE KUST.

Peter M.J. HERMAN, Marianne HABETS en Carlo HEIP

RIJKSUNIVERSITEIT GENT
Instituut voor Dierkunde
Sectie Mariene Biologie
Ledeganckstraat 35
9000 Gent

Studie uitgevoerd in opdracht van de Beheerseenheid van het
Mathematisch Model van de Noordzee en het Schelde-estuarium
(Ministerie van Volksgezondheid en Leefmilieu),
Ref.BH/21/86.

SUMMARY.

The present investigation aimed at a description of seasonal and spatial variation in histochemically determined stress parameters of mussel populations along the Belgian coast. The parameters described are: lysosomal stability, NADPH - neotetrazolium reductase activity, Shikata test for metalloproteins, Timm sulfide reaction for heavy metal localization, lipofuscin determination and reproductive state.

It was hypothesized at the start of the experiment that a pollution gradient would be present along the Belgian coast ranging from the mouth of the Western Scheldt (the major pollution source) to the French border. Evidence for such a gradient could not be found in the data. In fact the station Breskens, located in the mouth of the Western Scheldt, had one of the best thriving mussel populations in the investigated area.

The condition of the mussels along the Belgian coast, as compared with mussels from experimental off-shore stations, or with literature data, is very poor. Lysosomal stability was seldom higher than 10 min; Shikata test yielded most often positive reactions; NTR was always slightly elevated; lipofuscin determination gave very dark reaction, in which no differences could be detected any more.

In general spatial or temporal gradients were by far overruled by local, short term variations. These are most probably caused by local contaminations. That conclusion is supported by the sharp peaks sometimes found in heavy metal concentrations in a concomitant study (Dopagne et al., 1987), and by the often unexpected variation in NTR activity, which points to local and temporary problems with organic micropollutants.

It is shown that NTR activity is related to lysosomal stability in the sense that a high NTR activity is not compatible with a high lysosomal stability. This is more expressed when the animals are in a poor condition.

A positive Shikata reaction can occur even with high lysosomal stability, but when lysosomal stability is low, it is improbable to find a negative Shikata reaction.

The Shikata reaction, although poorly quantified, is found to be highly correlated with an index of heavy metal content in the mussels.

A general discussion is devoted to the value of the different histochemical methods.

A short appendix indicates that the methods used here for mussels can successfully be applied to shrimp (Crangon crangon).

1. Inleiding.

1.1. Opzet en doelstelling van de experimenten.

Dit verslag behandelt de resultaten van het musselstress experiment, dat aan de RUG uitgevoerd werd in opdracht van de Beheerseenheid Mathematisch Model.

Het programma van dit experiment voorzag in het volgen van de jaarlijkse cyclus in een aantal fysiologische en histochemische stress-indicatoren in natuurlijke mossel-populaties langs de Belgische kust. De evolutie van de fysiologische indicatoren wordt, samen met andere aspecten, gerapporteerd in het eindrapport van de ULg (Dopagne et al., 1987). Wij bespreken hier de resultaten van de histochemische analyses.

Het volgen van de jaarlijkse cyclus in stress-indicatoren is van belang voor het opzetten van routinematige stress-monitoring programma's. Het is immers bekend dat zowel de fysiologische als de histochemische responsen sterk kunnen variëren gedurende het jaar (Bayne et al., 1985, Korpelaar en Smaal, 1986, en referenties daarin). Het voorkomen van 'natuurlijke' variaties bemoeilijkt de interpretatie van resultaten uit stress-testen aanzienlijk. Het is duidelijk dat in dit geval geen absolute waarde kan gehecht worden aan het resultaat van een test. Dit zal steeds relatief tot de verwachte waarde (voor gezonde mosselen in hetzelfde seizoen) moeten bekeken worden.

De belangrijkste factoren die de bestudeerde conditie-indices bepalen zijn de beschikbaarheid van voedsel, de reproductieve cyclus en de temperatuur. Widdows (1978) onderzocht de invloed van voedselconcentratie en "seizoenaal effect" op vele fysiologische variabelen in een multifactoriële studie. Hij vond dat beide factoren een significante invloed uitoefenen op de respiratorische intensiteit (na correctie voor lichaamsgewicht), de assimilatie-efficiëntie en de ammonium-excretie.

Voor de histochemische stress-indicatoren wordt in het algemeen de mogelijke interferentie van seizoenaal gebonden factoren met de resultaten van de testen beschreven (Bayne et al., 1985). Dit geldt in het bijzonder voor interferentie van de reproductieve cyclus. De afzet van gameten beïnvloedt de conditie van de dieren zeer negatief, wat bv. tot uiting komt in een vermindering van de stabiliteit van de lysosomale membranen. Eenzelfde vermindering zou ook kunnen voorkomen bij zeer hoge of lage temperaturen.

Het is bekend dat de reproductieve cyclus van de mossel sterk kan variëren naargelang de groeiplaats. Zo hebben mosselen in sommige streken een duidelijke najaarspiek in de reproductie, terwijl in andere streken de reproductie tot het voorjaar beperkt blijft.

Het grote belang van seizoenale interferenties, en de onbeschikbaarheid van basisgegevens over de reproductieve cyclus van mosselen uit de Belgische kustzone maakten het noodzakelijk de seizoenale evolutie van de bestudeerde stress-indicatoren te volgen.

Het bestuderen van de 'natuurlijke' seizoenale cyclus stelt een theoretisch probleem. Men moet ervan kunnen uitgaan dat de resultaten van de metingen niet of slechts in geringe mate beïnvloed worden door pollutie - invloeden. Indien immers pollutie (die eveneens een seizoenale schommeling kan vertonen) de metingen in eerste instantie bepaalt, is het onmogelijk deze invloed te onderscheiden van de invloed uitgaande van natuurlijke variabelen, zoals temperatuur en voedselaanbod.

Het is moeilijk om in de Belgische kustzone op basis van a priori informatie een lokatie te selekteren die aan deze voorwaarden van geringe pollutie - invloed voldoet. De resultaten van een vorig onderzoek (Herman et al. 1985) suggereerden evenwel een mogelijke oplossing, door het kiezen van een aantal lokaties langs de Belgisch - Nederlandse kustlijn, gaande van Koksijde in het westen, tot Breskens in het oosten.

Uit het stromingspatroon voor de Belgische kust is het duidelijk dat het oostelijk gedeelte van de kustzone (tot ongeveer ter hoogte van Oostende) sterk onder invloed van de Westerschelde staat. De Westerschelde is een gekende pollutiebron, en het is dan ook te verwachten dat de invloed van pollutie in dit kustgedeelte belangrijker zal zijn dan in het westelijk deel. Dit wordt overigens bevestigd door de resultaten van benthische monitoring (zie Heip et al., 1984, en de tabel hieruit overgenomen in Herman et al., 1985). De verwachting was dan ook dat er een gradiënt zou kunnen gevonden worden van relatief gepollueerde kustzones in het oosten, naar relatief zuivere zones in het westen.

De resultaten van een preliminair onderzoek met mosselen (Herman et al., 1985), wezen eveneens in deze richting. Voor mosselen uitgehangen in off-shore stations was er een duidelijke tendens in de meeste stress - parameters die wees op een gunstiger situatie voor Nieuwpoort dan voor Zeebrugge. Voor de mosselen die langs de Belgische kustzone werden bemonsterd werd een lagere stress gevonden in Nieuwpoort dan in Oostende. Op basis van deze resultaten werd een intensiever staalnameprogramma opgesteld. Het grondidee was dat, indien de aanwijzingen van een pollutiegradiënt konden bevestigd worden, tevens relatief ongepollueerde stations als indicatief voor de (seizoenale) achtergrondvariatie ter beschikking zouden staan.

Het monstername-programma werd in functie van deze hypothese opgesteld. Seizoenale variatie zou met een hogere resolutie bestudeerd worden in twee stations, Oostende en Nieuwpoort, terwijl ruimtelijke variatie en seizoenale variatie (met kleinere resolutie) tot uiting zou komen door het seizoenaal bemonsteren van zes stations langs de vooronderstelde pollutiegradiënt tussen Breskens en Koksijde.

1.2. Histochemisch bepaalde stress-indicatoren.

Als histochemisch bepaalde stress-indicatoren werden in eerste instantie de stabiliteit van de lysosomale membranen en de activiteit van het neotetrazolium reductase (NTR) bepaald, en werd de Shikata - test voor metallo-proteïnen uitgevoerd. De theoretische achtergrond van deze methodes wordt in groot detail beschreven door Bayne et al. (1985), en goed samengevat in Korporaal en Smaal (1986). In beide werken worden ook omstandige referentielijsten gegeven. Hij werd eveneens uiteengezet in vorige rapporten (Herman et al. 1985, 1986) en zal hier slechts kort samengevat worden.

1.2.1. Stabiliteit van de lysosomale membranen.

Het lysosomaal-phagosomaal complex is een intracellulair systeem bestaande uit membraanstructuren waaraan (in normale omstandigheden) inactieve hydrolytische enzymen gebonden zijn. Verschillende stress factoren kunnen de lysosomale membranen destabilizeren, en aldus de hydrolytische enzymen aktiveren. Deze enzymen katabolizeren zowel cellulaire als cel-vreemde componenten. De destabilisering wordt voorafgegaan door opname en accumulatie van de cel-vreemde stoffen in de lysosomen.

Bij de bepaling van de stabiliteit van de lysosomale membranen wordt het weefsel in een zure buffer gebracht (pH = 4.5) gedurende een periode die varieert van 2 tot 25 min (2, 5, 10, 15, 20 en 25 min). De zure oplossing destabiliseert de membranen. Hierna wordt een histochemische kleuring uitgevoerd, die specifiek is voor de lysosomale enzymen. De intensiteit van de kleuring is evenredig met de activiteit van de enzymen. De destabilisering brengt de enzymen in oplossing, waardoor de kleurintensiteit afneemt als de destabilisering langer doorgaat dan nodig is om de meeste membranen te breken. Een piek in de kleurintensiteit geeft aldus aan na welke tijd de membranen gedestabiliseerd zijn.

Zeer uiteenlopende stress-factoren kunnen een vermindering van de lysosomale stabiliteit tot gevolg hebben. Dit is beschreven voor droogstand (McHenery et al., 1983), hypoxia (Moore et al., 1979), hongering, hyposaliniteit en paaiing (Bayne et al., 1978), polycyclische aromatische koolwaterstoffen (Moore et al., 1978; Moore, 1979; Bayne et al., 1979), metaalionen (Viarengo et al., 1985; Steinert en Pickwell, 1985), olie (Lowe et al., 1981). De respons zou in het algemeen evenredig zijn met de sterkte van de stimulus. Tevens werd in gecontroleerde experimenten een goede correlatie gevonden tussen deze stress-index en de fysiologische indices (Bayne et al., 1985).

1.2.2. NADPH-neotetrazolium reductase (NTR).

NADPH-neotetrazolium reductase (NTR) is een enzyme dat deel uitmaakt van de 'mixed-function oxidases', geassocieerd met het gladde endoplasmatisch reticulum. De 'mixed -function oxidases' in het algemeen spelen een rol in de oxidatie en detoxificatie van (toxische) organische stoffen in het cytoplasma. De activiteit van het NTR is

een stap in deze oxidatieve reeks. Zijn activiteit is histochemisch goed te bepalen, en vormt een indicatie voor de sterkte van de oxiderende (en verondersteld detoxifiërende) reakties. Experimenteel is aangetoond dat de NTR - activiteit gestimuleerd wordt door de blootstelling aan aromatische koolwaterstoffen, phenorbital, en de water - oplosbare fraktie van aardolie. Omwille van zijn specifieke functie in de detoxificatie van organische bestanddelen is de NTR - activiteit een specifieke maat voor stress voortkomend van deze pollutia (Bayne et al., 1979; Moore, 1979).

1.2.3. Shikata-test voor metalloproteïnen.

De Shikata-test voor metalloproteïnen (Shikata et al., 1974) is een relatief weinig specifieke histochemische techniek. Sulphydryl-groepen in proteïnen (de typische bindingsplaatsen voor metalen) worden geoxideerd in een zure permanganaatoplossing. De metaalionen worden daarbij verwijderd, en de residuele groepen gekleurd met orceïne, wat aanleiding geeft tot de vorming van blauw - purpere granules (Jain et al. 1978). Vroeger (Herman et al., 1985) wezen we er reeds op dat deze kleuringsmethode niet specifiek is voor metallothioneïnen, maar alle metalloproteïnen kleurt. Bovendien is er interferentie van andere cellulaire bestanddelen, die eveneens kleuren met orceïne (met name elastische bindweefselvezels). Deze aspecten van de Shikata-test deden ons reeds twijfelen aan zijn bruikbaarheid bij stress-studies. Het niveau van contaminatie door zware metalen in de Belgische kustzone is niet hoog genoeg voor de vorming van metallothioneïnen bij de mossel, zodat nooit een zeer sterke kleuringsmethode met deze techniek verkregen wordt. Anderzijds zijn de blauw-purpere granules nooit volledig afwezig, omwille van de hoger genoemde kenmerken van de kleurtechniek.

1.2.4. Timm sulfide methode voor zware metalen.

De drie genoemde bepalingen werden aangevuld met enkele nieuwe indicatoren, die uitvoerig beschreven werden in het interim - rapport (Herman et al., 1986). De essentiële punten van deze beschrijving zullen hier overgenomen worden.

Voor het aantonen van zware metalen werd de Timm sulfide methode toegepast. Als indicator van algemene stress werd, naast de stabiliteit van de lysosomale membranen, eveneens de aanwezigheid van lipofuscine bestudeerd. De reproductieve toestand van elke mossel werd genoteerd.

Danscher & Zimmer (1978) geven een uitvoerige beschrijving van een verbeterde Timm sulfide methode voor het aantonen van zware metalen in weefselcoupes. Het principe van deze methode is dat de metalen, aanwezig in het weefsel, gereduceerd worden met vorming van metaalsulfiden. Daartoe worden de weefsels in een oplossing van Na₂S in fosfaatbuffer gebracht. De sulfiden worden nadien aangetoond in een "ontwikkelbad": de coupes worden geïncubeerd in een mengsel van arabische gom,

hydroquinone en zilvernitraat. De metaalsulfiden veroorzaken een reductie van het zilver, dat als metallisch zilver neerslaat. De zwarte korrels metallisch zilver worden gemakkelijk mikroskopisch waargenomen.

De methode werkt optimaal als het te bestuderen organisme vooraf geperfuseerd wordt met de natriumsulfide-oplossing. Dit is evenwel onmogelijk uit te voeren met ons materiaal. Bovendien is het beter om de verschillende testen uit te voeren op dezelfde organismen. Het bleek uit onze testen dat vriescoupes, gefixeerd in glutaraaldehyde en ondergedompeld in de reagentia, uitstekende resultaten gaven. Het protocol opgenomen in Bijlage 3 van het interim rapport (Herman et al., 1986) geeft de methode weer, zoals ze nu door ons toegepast wordt.

Volgens Danscher & Zimmer (1978) is de Timm sulfide methode zeer specifiek voor metalen die onoplosbare of zwak oplosbare metaalsulfiden vormen. Andere chemische bestanddelen van de weefsels geven geen noemenswaardige kleuring. Bovendien treedt de reactie slechts op bij hoge gehalten aan metalen ("is indicative of high metal content"). Het omgekeerde is echter niet waar: sommige metalen zijn zo gebonden dat ze geen Timm sulfide reactie geven. Binnen de metalen is de methode echter niet specifiek: het is onmogelijk uit te maken met deze methode met welk metaal men te maken heeft. Een mogelijke uitzondering vormt kwik dat onder de vorm van kwiksulfide in het lichaam aanwezig is: dit zou reactie kunnen geven zonder voorbehandeling met sulfide.

De intensiteit van de kleuring bij de Timm sulfide methode verschilt van individu tot individu. Deze verschillen deden ons de mogelijkheid overwegen de methode op semi-quantitatieve wijze te gebruiken, door een schaal van intensiteit op te stellen.

1.2.5. Lipofuscine.

Het aantonen van lipofuscine in de lysosomen is een techniek die recent werd toegepast in het onderzoek naar stress-indicatoren bij mosselen (Moore et al., 1985). Lipofuscine is een pigment dat gevormd wordt door peroxidatie van lipiden en de daarop volgende polymerisatie. De intensiteit van autofagocytose en van peroxidatie van lipiden beïnvloedt de accumulatiesnelheid van lipofuscine. Het is bekend dat lipofuscine accumuleert in levercellen als gevolg van verschillende ziekten; accumulatie wordt ook waargenomen bij het verouderen van cellen. Moore et al. (1985) toonden aan dat blootstelling van *Littorina littorea* aan 400 ug/l phenantreen een sterke stijging van de lipofuscine concentratie tot gevolg had. Na het toedienen van phenantreen gedurende drie dagen werden de dieren overgebracht in zuiver zeewater. Gedurende deze recuperatie - periode verminderde het gehalte aan lipofuscine tot het niveau voor blootstelling.

We hebben de techniek voor het aantonen van lipofuscine met succes toegepast op ons materiaal. Het protocol van deze methode is opgenomen in het interim rapport (Herman et al., 1986, Bijlage 4).

1.2.6. Ouderdomsbepalingen met de acetate peel methode.

Het bepalen van de ouderdom van de mosselen door toepassing van de acetate peel methode was niet succesvol. Wij zijn er niet in geslaagd om de moeilijkheden met het materiaal, beschreven in het interimrapport (Herman et al., 1986), op te lossen. Het voornaamste probleem is het verkrijgen van een goede zaagsnede. Hiervoor moeten de mosselen ingebed worden, en moet een geschikte zaag gebruikt worden. De zagen waarover wij konden beschikken waren evenwel ofwel te fijn (en te breekbaar) of te grof (zodat de mosselschelpen braken).

1.2.7. Reproductieve toestand.

De reproductieve toestand van de bestudeerde mosselen werd eveneens gevolgd. Van elke mossel worden enkele coupes gekleurd met een algemene kleuring (Papanicolaou-kleuring, d.i. een haematoxyline - eosine kleuring). Deze coupes worden gebruikt als controle op het proces van preservatie der weefsels en snijden der coupes (bv. ontthoofding van de weefsels, niet snel genoeg invriezen, problemen met het mes van de cryostaat,...). Tegelijk geven deze coupes een beeld van de reproductieve toestand (aanwezigheid en graad van rijpheid van de follikels).

Mosselen zijn van gescheiden geslacht; het genitaalstelsel bestaat bij beide sexen uit talrijke vertakkende kanalen die zich tot tussen het bindweefsel van andere organen en rond de spijsverteringsklier kunnen ontwikkelen. Deze kanalen eindigen in follikels waarin zich de eieren en de spermatozoa ontwikkelen (Chipperfield, 1953). Gametogenese wordt geïnitieerd door een daling van de temperatuur in de herfst en verloopt langzaam verder tot ontwikkeling van de gameten (Kautsky, 1982; Seed 1969). Na spawning worden de follikels snel ingegroeid door bindweefsel, waarbij resorptie gebeurt van de niet gespawnde gameten. Daarna ligt de reproductieve activiteit laag, hoewel, afhankelijk van de groeiplaats en het jaar, een tweede rijping en spawning in de herfst kan voorkomen. In deze periode (zomer) worden glycogeenreserves gevormd in de Adipo-Granulaire cellen. Tijdens de gametogenese ziet men het aandeel van de Adipo-Granulaire cellen in het mantelweefsel afnemen, ten voordele van de follikels en de vesiculaire bindweefselcellen (Wittevrongel, 1986).

2. MATERIAAL EN METHODEN.

2.1. Methoden voor de histochemische analyses.

De principes van de verschillende bepalingen werden in de inleiding behandeld. De gedetailleerde methoden voor de histochemische analyses werden uitvoerig besproken in het interim rapport (Herman et al. 1986), waar in de bijlagen de protocols zijn opgenomen. Wij verwijzen hier naar dit rapport, zonder deze details opnieuw over te nemen. Vermits de verschillende bepalingen (op uitzondering van de leeftijdsbepaling met de acetate peel methode) op bevredigende wijze konden uitgevoerd worden, werd hieraan niets meer gewijzigd.

Voor wat betreft de lysosomale stabiliteit, NTR - activiteit en Shikata-test werd een bevredigende manier van interpretatie gevonden. We citeren uit Herman et al. (1985):

" De stabiliteit van de lysosomale membranen werd beoordeeld als die labiliseringsstijd waarna een maximale kleuring van de lysosomen werd verkregen.

De activiteit van het NTR werd beoordeeld in een schaal van 0 (geen kleuring) tot 5 (zeer intense kleuring).

De Shikata-test werd beoordeeld als -1 (geen reactie), 0 (zwakke, enkel plaatselijke reactie) of +1 (algemene reactie).

De beoordeling van het resultaat van de testen werd telkens onafhankelijk door twee personen uitgevoerd. Meestal kwamen de resultaten zeer goed overeen. Voor de stabiliteit van de lysosomale membranen was de Kendall's rang-correlatiecoëfficiënt tussen twee reeksen van 55 waarnemingen gelijk aan 0.95 ($P < 0.001$). Voor de NTR-test was deze coëfficiënt voor twee reeksen van 75 waarnemingen 0.98 ($P < 0.001$).

Voor die coupes waar geen overeenstemming bestond verschilde de score steeds maar 1 eenheid. In die gevallen werd een discussie gewijd aan de betreffende coupe. Wanneer geen overeenstemming kon bereikt worden werd de kleuring overgedaan, en de beoordelingsprocedure herhaald. "

Deze procedure werd onveranderd gehandhaafd.

Voor de Timm sulfide methode werd een beoordelings-schaal in drie categorieën opgesteld. De eerste categorie (licht positief, +) zijn coupes waarin enkel de cellen uit de verteringstubuli licht grijs gekleurde granules bevatten, die individueel zichtbaar zijn omdat de dichtheid laag is. In de tweede categorie (positief, ++), waarin veruit de meeste van onze proefdieren vallen, zijn de cellen van de verteringstubuli en de gonaden (indien aanwezig) zwart gekleurd, omdat een hoge dichtheid aan elkaar overlappende granules aanwezig is. In de laatste categorie tenslotte (zwaar positief, +++) zijn de verteringstubuli en de gonaden volledig zwart, zonder dat nog granules kunnen onderscheiden worden. Het was niet

mogelijk meer dan drie categorieën te onderscheiden, omdat de variabiliteit van de reactie bij eenzelfde individu een overlapping tussen categorieën veroorzaakte.

Voor de lipofuscine - bepaling werd gepoogd om eveneens een intensiteitsschaal op te stellen. De observatie dat alle mosselen uit de Belgische kustzone een zeer sterke reactie vertoonde (dit in tegenstelling tot mosselen uit off-shore stations : zie resultaten) deed ons hiervan verder afzien.

2.2. Monsternamprogramma.

Tabel 1 geeft een overzicht van de plaatsen en data van monsternam. Alle monsters werden genomen bij eb, op de diepste delen van de golfbrekers (behalve in Breskens, waar een mosselpopulatie op een oud wrak werd bemonsterd). Gewoonlijk werd gemonsterd op of rond de datum van springtij in de betreffende periode, zodat populaties konden gevonden worden die relatief kort aan de atmosfeer blootgesteld zijn per getijdencyclus.

Lokatie	Data
Koksijde	20/10/86 13/04/87 15/05/87
Nieuwpoort	07/07/86 26/08/86 06/10/86 20/10/86 02/12/86
	30/01/87 13/04/87 15/05/87
Middelkerke	20/10/86 13/04/87 15/05/87
Oostende	07/07/86 26/08/86 06/10/86 02/12/86
	30/01/87
Wenduine	20/10/86 13/04/87 15/05/87
Knokke	20/10/86 13/04/87 15/05/87
Breskens	20/10/86 13/04/87 15/05/87

Tabel 1. Overzicht van de monsternam van mosselpopulaties langs de Belgische kust.

Van iedere plaats werden op ieder datum 15 mosselen gedissekteerd, waarna de hepatopancreas werd ingevroren in aromatenvrije hexaan, gekoeld in vloeibare stikstof. 10 mosselen werden geanalyseerd, 5 dienden als reserve. Er werd gepoogd om zoveel mogelijk mosselen van dezelfde grootte te gebruiken in de analyses. Dit was soms onmogelijk omdat enkel kleine dieren voorkwamen.

3. RESULTATEN.

3.1. Lysosomale stabiliteit.

De resultaten van de analyses van de lysosomale stabiliteit worden weergegeven in Tabel 2, en eveneens voorgesteld in Fig. 1 (Nieuwpoort) en Fig. 2 (Oostende) als functie van de tijd. In Fig. 3 worden de resultaten van de uitgebreide monsterkampagnes in zes stations langs de kust weergegeven.

Bij deze waarden dient opgemerkt te worden dat de "standaarddeviatie" slechts als indicatie voor de spreiding binnen het monster wordt opgegeven. Vermits de lysosomale stabiliteit niet op een continue schaal gemeten wordt, moeten deze waarden als benaderingen beschouwd worden.

Voor de vijf kampagnes waar gelijktijdig in Nieuwpoort en Oostende gemonsterd werd, is een vergelijking gemaakt tussen beide stations. Ondanks de grote variabiliteit in de tijd, blijkt de algemene toestand van de mosselen in Nieuwpoort beter te zijn dan in Oostende.

3.2. Aktiviteit van het NADPH-neotetrazolium reductase.

De resultaten van deze bepalingen worden weergegeven in Tabel 3, en voorgesteld in Fig. 4 (Nieuwpoort) en Fig. 5 (Oostende) als functie van de tijd. In Fig. 6 worden de resultaten van de uitgebreide monsterkampagnes in zes stations langs de kust weergegeven.

Dezelfde opmerking als bij de lysosomale stabiliteit omtrent de "standaarddeviatie" moet ook hier gemaakt worden.

Voor de vijf kampagnes waar gelijktijdig in Nieuwpoort en Oostende gemonsterd werd, is geen verschil gevonden tussen beide stations.

3.3. Shikata - test.

De gemiddelde score van de Shikata - test voor de verschillende stations en monsternamedata wordt gegeven in Tabel 4. Gezien de resultaten van deze test op een schaal met slechts 3 scores gemeten wordt, hebben wij geen maat voor de spreiding gegeven.

3.4. Timm sulfide bepalingen.

Veruit de meeste dieren werden in de categorie positief (++) geklasseerd. De resultaten van de Timm sulfide bepalingen zijn vooral kwalitatief belangrijk. In het interimrapport (Herman et al., 1986) bespraken we reeds het algemeen beeld van de kleuring met de Timm sulfide methode. We stelden dat vooral de cellen van de digestieve tubuli in de hepatopancreas sterk gekleurd worden, wat aantoonde dat hier een sterkere concentratie van zware metalen voorkomt, vooral in vergelijking met het bindweefsel. Verdere observaties leerden dat ook de kieuwen en de gonaden vaak zeer sterk gekleurd worden met deze methode. Dit is mogelijk een belangrijke waarneming,

Lokatie	Datum	n	x	s
Oostende	07-07-86	11	12.3	2.6
	26-08-86	11	5.4	5.3
	06-10-86	10	2.0	0.0
	02-12-86	10	2.0	0.0
	30-01-87	10	14.0	3.2
Nieuwpoort	07-07-86	10	12.2	5.4
	26-08-86	10	19.5	5.5
	06-10-86	10	2.3	1.0
	20-10-86	10	2.0	0.0
	02-12-86	10	19.0	4.6
	30-01-87	10	2.0	0.0
	13-04-87	10	2.0	0.0
	15-05-87	10	3.6	2.4
Koksijde	20-10-86	10	-	-
	13-04-87	10	7.0	3.9
Middelkerke	20-10-87	10	3.9	4.1
	13-04-87	10	6.8	8.0
	15-05-87	10	4.4	1.3
Wenduine	20-10-87	10	4.4	4.4
	13-04-87	10	6.2	3.5
Knokke	20-10-87	10	11.7	4.8
	13-04-87	10	2.5	1.3
Breskens	20-10-86	10	18.5	3.4
	13-04-87	10	7.1	3.9

Tabel 2. Gemiddelde (x), standaarddeviatie (s) en aantal waarnemingen van de lysosomale destabiliserings-tijd (min) in de onderzochte populaties. Waarnemingen gebeurden op 2, 5, 10, 15, 20 en 25 min.

NIEUWPOORT - LYS.STAB.

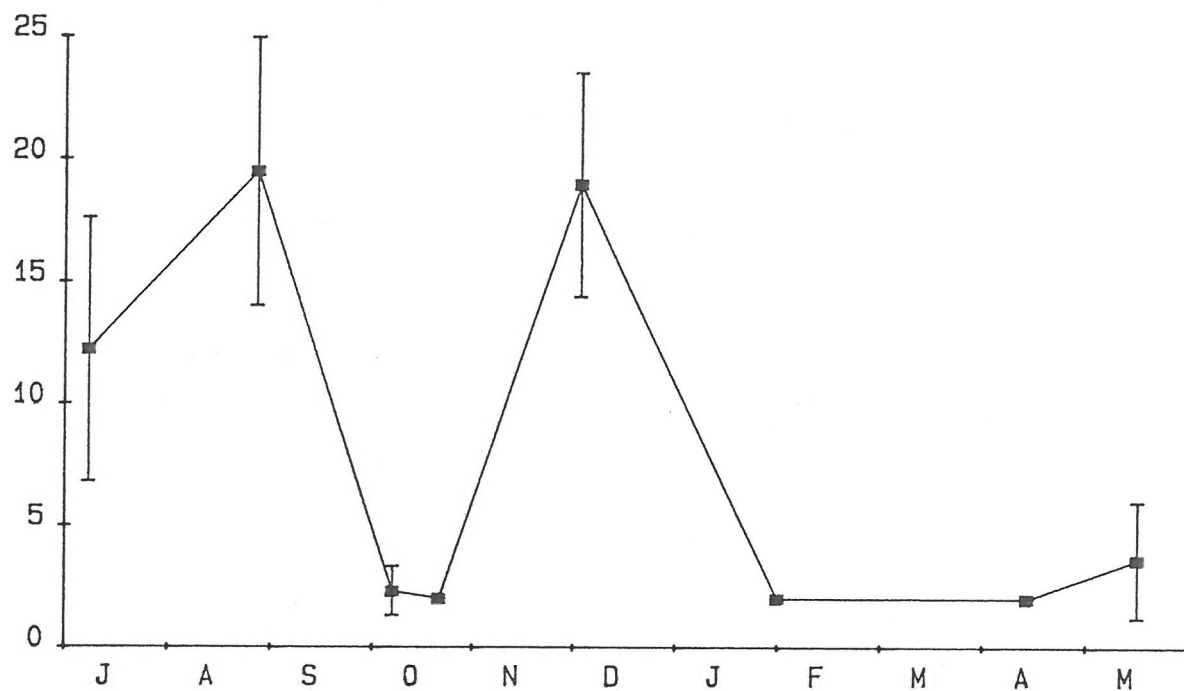


Fig. 1. Bepaling van de lysosomale stabiliteit in het Station Nieuwpoort. Deze parameter wordt uitgedrukt in het aantal minuten nodig voor een destabilisering van de lysosomale membranen. Gemiddelden +/- standaarddeviatie zijn uitgezet.

OOSTENDE - LYS.STAB.

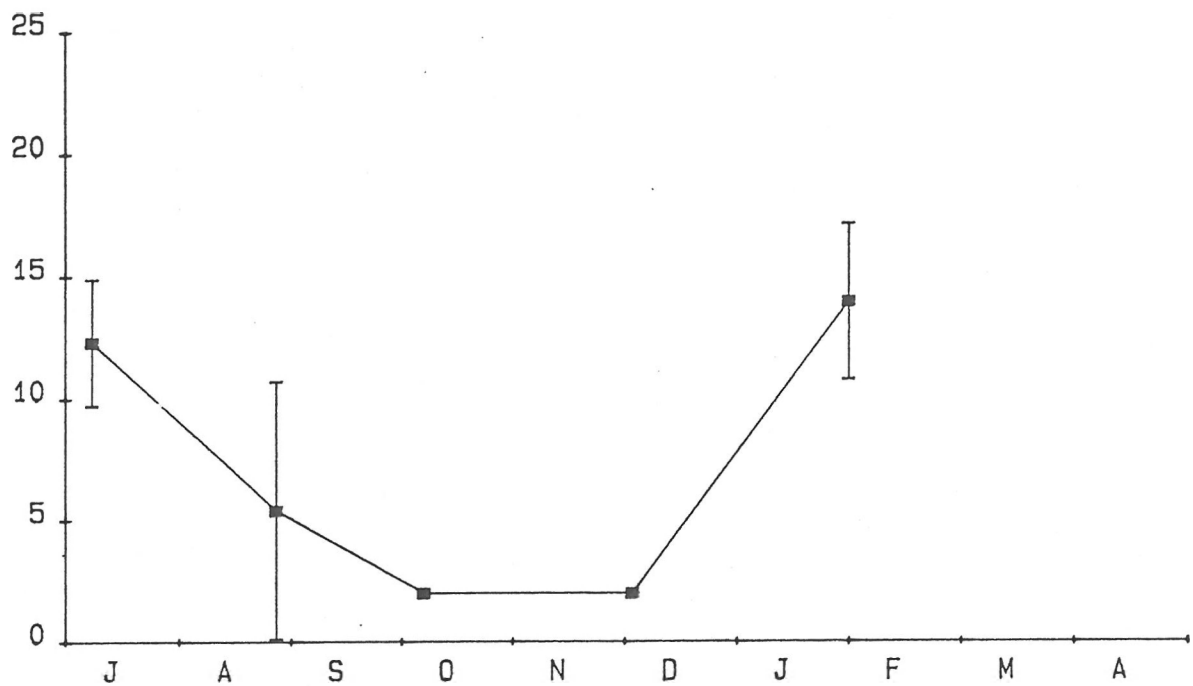


Fig. 2. Bepalingen van de lysosomale stabiliteit in het station Oostende. Deze parameter wordt uitgedrukt in het aantal minuten nodig voor een destabilisering van de lysosomale membranen. Gemiddelden +/- standaarddeviatie zijn uitgezet.

LYS. STAB.

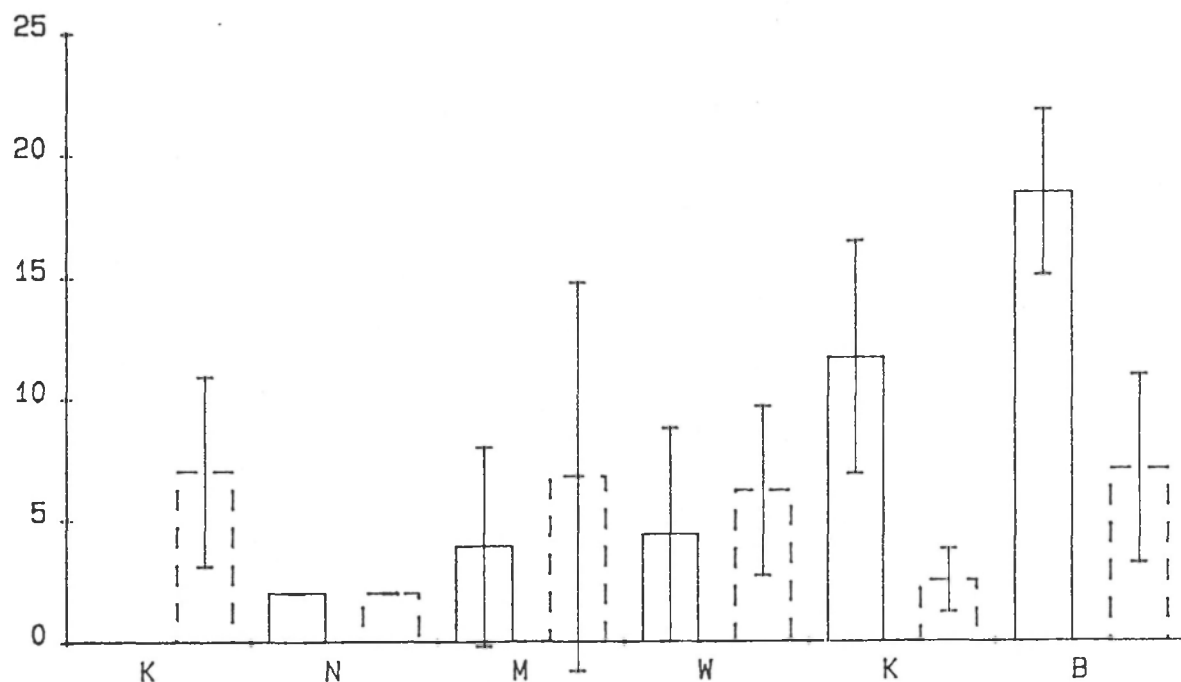


Fig. 3. Bepalingen van de lysosomale stabiliteit in de zes stations langs de Belgische kust. In volle lijn: 20-10-86, in streepjeslijn : 13-04-87. Gemiddelden +/- standaarddeviatie zijn uitgezet. Deze parameter wordt uitgedrukt in het aantal minuten nodig voor een destabilisering van de lysosomale membranen.

Lokatie	Datum	n	x	s
Oostende	07-07-86	11	1.4	0.7
	26-08-86	11	1.9	0.9
	06-10-86	10	1.9	0.7
	02-12-86	10	2.3	0.5
	30-01-87	10	1.8	0.8
Nieuwpoort	07-07-86	10	0.7	0.8
	26-08-86	10	2.7	0.9
	06-10-86	10	1.5	0.5
	20-10-86	10	3.0	0.8
	02-12-86	10	1.6	0.7
	30-01-87	10	1.4	1.0
	13-04-87	10	0.8	0.4
	15-05-87	10	3.4	0.9
Koksijde	20-10-86	10	0.8	0.6
	13-04-87	10	0.2	0.4
Middelkerke	20-10-87	10	1.7	0.7
	13-04-87	10	1.6	0.8
	15-05-87	10	2.1	0.6
Wenduine	20-10-87	10	2.7	1.3
	13-04-87	10	1.3	0.5
Knokke	20-10-87	10	1.3	1.0
	13-04-87	10	1.8	0.6
Breskens	20-10-86	10	1.5	0.6
	13-04-87	10	1.6	0.9

Tabel 3. Aktiviteit van het NADPH - Neotetrazolium reductase. Gemiddelde x van de scores op een schaal van 0 tot 5, aantal waarnemingen n en standaarddeviatie s.

NIEUWPOORT - NTR

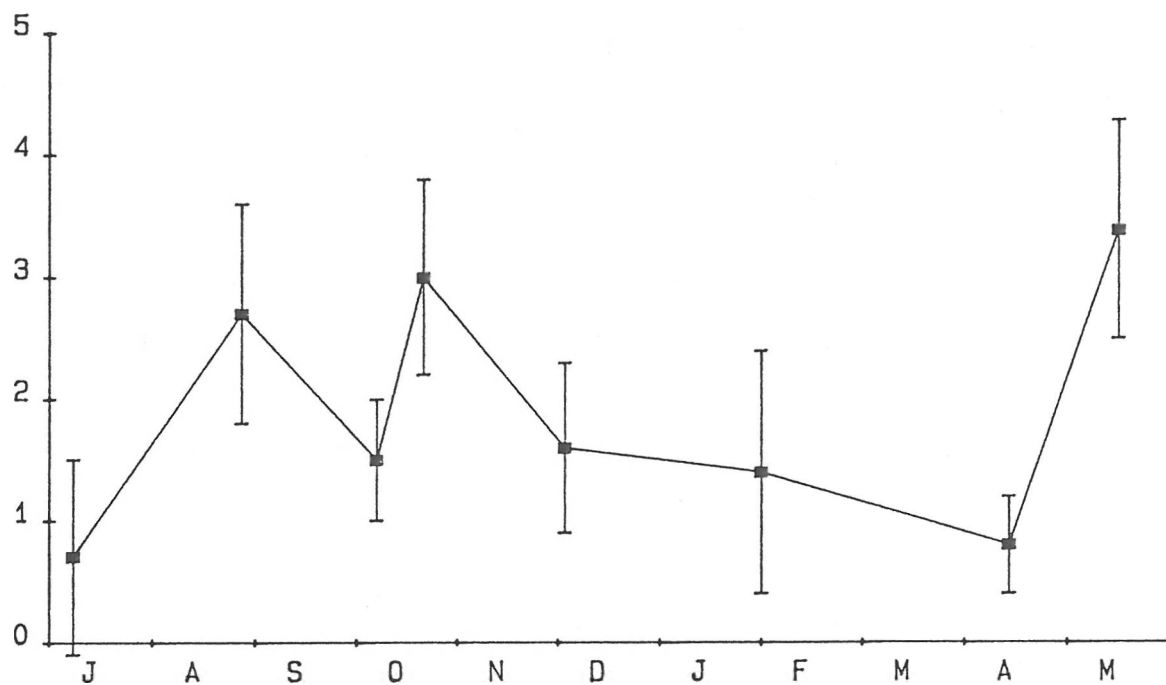


Fig. 4. Bepalingen van de NTR - aktiviteit in het station Nieuwpoort.
 Voor ieder individu wordt de aktiviteit genoteerd op een relatieve
 schaal van 0 tot 5.
 Gemiddelden +/- standaarddeviatie zijn uitgezet.

OOSTENDE - NTR

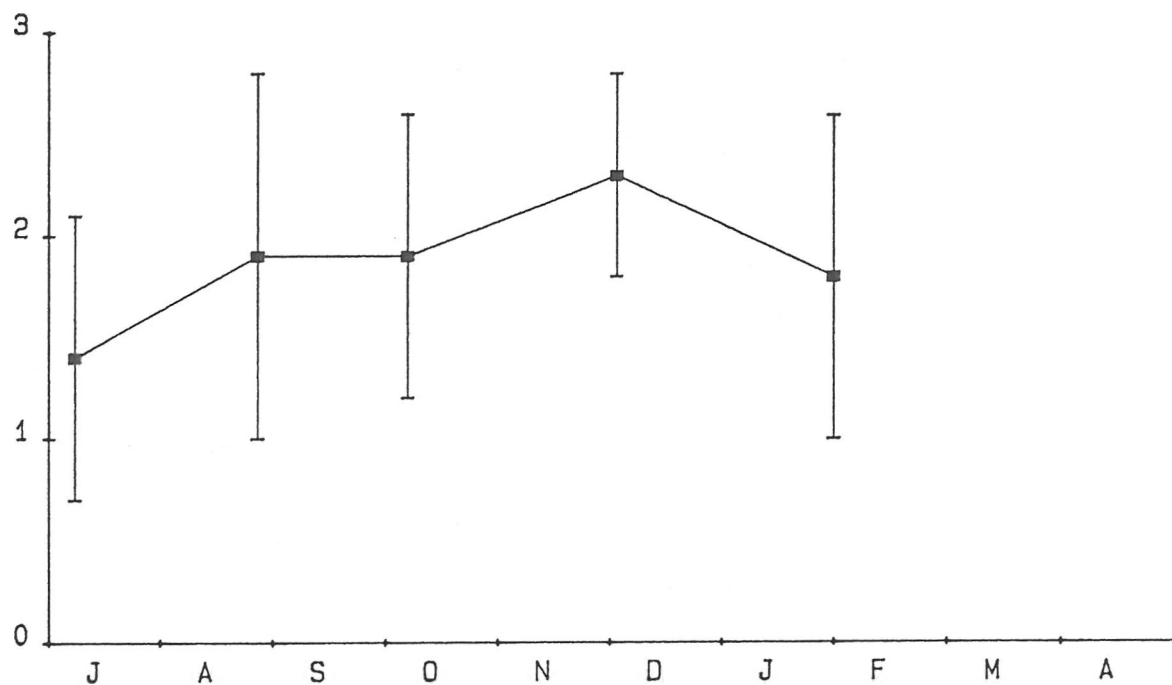


Fig. 5. Bepalingen van de NTR-aktiviteit in het station Oostende.
 Voor ieder individu wordt de aktiviteit genoteerd op een relatieve
 schaal van 0 tot 5.
 Gemiddelden +/- standaarddeviatie zijn uitgezet.

NTR

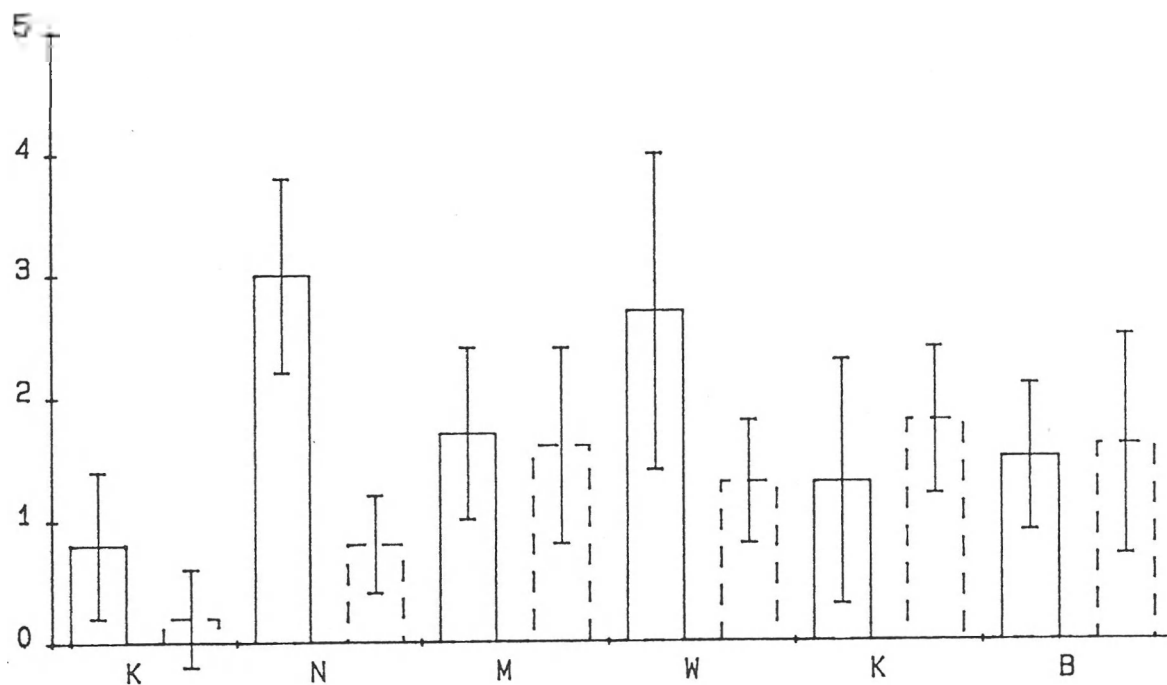


Fig. 6. Bepalingen van de NTR - aktiviteit in de zes stations langs de Belgische kust. Volle lijn : 20-10-86 ; streepjelijijn : 13-04-87.
 Gemiddelden +/- standaarddeviatie.
 Voor ieder individu wordt de aktiviteit genoteerd op een relatieve schaal van 0 tot 5.

Lokatie	Datum	n	x
Oostende	07-07-86	11	-1.0
	26-08-86	11	-0.3
	06-10-86	10	0.2
	02-12-86	10	1.0
	30-01-87	10	1.0
Nieuwpoort	07-07-86	10	0.8
	26-08-86	10	-0.2
	06-10-86	10	0.2
	20-10-86	10	1.0
	02-12-86	10	1.0
	30-01-87	10	1.0
	13-04-87	10	-0.2
Koksijde	20-10-86	10	1.0
	13-04-87	10	0.0
Middelkerke	20-10-87	10	1.0
	13-04-87	10	0.1
	15-05-87	10	-1.0
Wenduine	20-10-87	10	0.4
	13-04-87	10	0.0
Knokke	20-10-87	10	-0.7
	13-04-87	10	0.0
Breskens	20-10-86	10	0.0
	13-04-87	10	0.3

Tabel 4. Gemiddelde score (x) van n proefdieren in de Shikata test voor metalloproteïnen. Een scoresysteem met drie categorieën (positief = +1, licht positief = 0, negatief = -1) werd gebruikt. Een spreidingsmaat werd niet berekend met een dergelijke beperkte classificatie.

vermits een trend tot seizoensale schommeling waargenomen wordt in de doseringen van zware metalen (Dopagne et al., 1987), met een minimum belasting in de late lente en vroege zomer. Het is mogelijk (maar niet bewezen) dat de mosselen een deel van hun belasting aan zware metalen tijdens de spawning evacueren. Deze mogelijkheid verdient zeker verder (experimenteel) onderzoek.

3.5. Lipofuscine.

De lipofuscine - bepaling was voor onze monsters niet zeer informatief. Bij alle dieren werd een sterke blauw-zwarte reactie aangetroffen. Bepalingen, door ons uitgevoerd op monsters van mosselen die in de Noordzee waren uitgehangen (ons beschikbaar gesteld door TNO Delft) toonden aan dat dit geen artefact van de methode was. De mosselen uit de zuiverder gebieden in de Noordzee vertoonden een hogere lysosomale stabiliteit, een lagere NTR - activiteit en een zwakkere kleuring met Timm - sulfide dan de mosselen uit onze monsters. Analooq daarmee was ook de lipofuscine - kleuring veel lichter dan bij de mosselen uit de Belgische kustzone. Dit toont aan dat de lipofuscine - bepaling nuttig is voor een andere range van stress, en slechts discriminatie kan geven wanneer de mosselen in relatief gunstige omstandigheden hebben gegroeid. Als gevolg van deze observaties hebben wij geen verdere pogingen gedaan in onze monsters een onderscheid te maken tussen zeer zwart en zeer zeer zwart. De belangrijkste conclusie uit deze bepalingen is dat de mosselen van de Belgische kustzone allemaal in sub-optimale tot slechte toestand verkeren, althans vergeleken met deze uit off-shore stations. De lipofuscine - bepaling kan echter een nuttig instrument vormen voor de analyse van de off-shore experimenten gepland voor de nabije toekomst.

3.6. Reproductieve toestand.

Het volgen van de reproductieve toestand leverde volgend beeld. In juli 1986 waren de meeste mosselen reeds in een "spent" stadium, waar vaak nog wel follikels te vinden waren. Dit was sterker uitgesproken voor wijfjes dan voor mannetjes. Er zijn meer mannetjes met een in de tijd gespreide reproductie dan wijfjes. De follikels waren tegen eind oktober volledig geresorbeerd. Er waren geen aanwijzingen voor een tweede reproductieperiode in de herfst. In de winter observeren wij een geleidelijke toename van het volume van de follikels. Tot en met 15 mei 1987 werd geen spawning waargenomen, maar de follikels zijn groot en rijp op dat ogenblik. De periode van spawning voor de mosselen langs de Belgische kust ligt waarschijnlijk eind mei - begin juni.

4. DISCUSSIE.

4.1. Seizoenale en plaatsgebonden invloeden op de metingen van stress.

Uit de resultaten blijkt vooral dat de oorspronkelijke hypothese, met name een pollutiegradiënt van de Westerschelde naar de westkust toe, niet door de feiten bevestigd wordt. In de twee ruimtelijke gradiënten die volledig uitgewerkt werden is geen enkele indicatie te vinden voor een dergelijk mechanisme. Onze resultaten komen daarin overeen met deze van Dopagne et al. (1987). Daaruit blijkt eveneens duidelijk dat naast de Westerschelde, ook het kanaal een beduidende bron van pollutie is voor de Belgische kustwateren. Het beeld dat verkregen wordt uit de Titanium - belasting is misschien representatief voor andere pollutia: hieruit blijkt duidelijk het bestaan van een bron in Frankrijk, en een bron in de Westerschelde.

Uit onze gegevens komt vooral naar voren dat lokale en temporeel beperkte factoren een grote rol spelen in de stress die de mosselen ondervinden. Of deze factoren noodzakelijk pollutie vertegenwoordigen is moeilijk te bewijzen. Seizoenale factoren spelen eveneens een rol, en met name de zomer en de winter schijnen gunstiger te zijn voor de mosselen dan de herfst en de lente. Toch worden deze trends gemakkelijk doorbroken door lokaal beperkte factoren. Zo vinden wij in twee wintermonsters in Nieuwpoort de hoogste en de laagste lysosmale stabiliteiten die in dit station zijn waargenomen. Het is dus moeilijk hieruit een algemeen beeld te distilleren.

Dopagne et al. (1987) wezen er op dat de belasting met zware metalen op vrij korte tijd kan wijzigen in eenzelfde station. Dit toont aan dat mosselen zich snel kunnen herstellen van een bepaalde (in de tijd beperkte) pollutiestress. Onze resultaten zijn hiermee volledig in overeenstemming.

Het feit dat we natuurlijke populaties van vrij onstabiele milieu's (voor wat betreft de fysische omstandigheden) hebben bemonsterd, kan hierin zeker een rol spelen. Toch zijn er belangrijke argumenten om natuurlijke populaties te blijven bestuderen. Het belang van pollutie moet noodzakelijk afgewogen worden aan de effecten die ze heeft op precies de populaties die van nature voorkomen.

Het algemeen niveau van de pollutiestress in de mosselen van de Belgische kustzone ligt hoger dan de normale achtergrond. De NTR score ligt rond 1 - 2, terwijl ongepollueerde achtergrond maximaal 1 heeft. Pieken komen voor, die echter ook beperkt zijn in ruimte en tijd. De lysosomale stabiliteit ligt algemeen laag, zoals overigens ook de SFG. Metaalbelasting kan duidelijk aangetoond worden.

De belangrijkste conclusies van ons onderzoek, voor wat betreft de toestand van de mosselen langs de Belgische kust zijn dan ook :

- dat lokaal en temporeel beperkte factoren een sterkere invloed uitoefenen op de toestand van de mosselen dan seizoenale schommelingen;
- dat seizoenale effecten slechts aanwijsbaar zijn in de achtergrond;
- dat geen aanwijzingen kunnen gevonden worden voor het bestaan van een pollutiegradiënt van de Westerschelde naar de westkust toe, en dat met name vanuit het Kanaal of vanuit de kustzone zelf een belangrijke aanvoer van pollutie moet verondersteld worden
- tenslotte dat, in vergelijking met mosselen uit off-shore stations in de Noordzee, de mosselen van de Belgische kustzone in een zeer slechte konditie verkeren. Dat pollutie hierin meespeelt is zeer waarschijnlijk

4.2. Relaties tussen de histochemisch bepaalde parameters.

Men kan veronderstellen dat de lysosomale stabiliteit, als algemene indicator van stress op de organismen, in beperkte mate bepaald wordt door de reactie van het organisme op organische xenobionten. Deze reactie wordt gemeten in de aktiviteitsbepaling van NTR. Men verwacht dan een verband, waarbij een hoge lysosomale stabiliteit niet compatibel is met een sterke aktiviteit van NTR, maar het omgekeerde niet noodzakelijk waar is: het organisme kan lijden onder een andere stressfaktor, zonder een verhoogde NTR-aktiviteit te vertonen. Deze hypothese wordt bevestigd door een analyse van de beschikbare gegevens. Er bestaat een statistisch significante associatie tussen beide variabelen. Tabel 5 toont het aantal individuen dat in verschillende categorieën van beide variabelen voorkomt (omwille van de statistische analyse zijn bepaalde categorieën samengenomen, vandaar het lagere aantal vrijheidsgraden dan men uit tabel 5 zou afleiden - deze opmerking geldt ook voor tabellen 6 t/m 10). Het beeld dat uit Tabel 5 naar voren komt, stemt overeen met de gestelde hypothese: vele dieren hebben een lage lysosomale stabiliteit en een lage NTR-aktiviteit, maar slechts weinige komen voor in de rechter bovenhoek van de tabel (hoge lysosomale stabiliteit ondanks een hoge NTR - aktiviteit). Dit kan inderdaad geïnterpreteerd worden als een aanwijzing dat pollutie door organische pollutia, en met name door koolwaterstoffen, een stress kan veroorzaken op de organismen. Een alternatieve verklaring is dat de concentratie van alle belangrijke pollutia onderling gecorreleerd is: een verhoogde NTR - aktiviteit zou dan onveranderlijk samengaan met een reactie op de verhoogde concentraties van andere pollutia. Deze verklaring lijkt ons nochtans vrij onwaarschijnlijk, gezien de diversiteit van de pollutiebronnen aan de Belgische kust.

Het opsplitsen van de bestudeerde relatie naar seizoen levert eveneens interessante resultaten. De lysosomale stabiliteit is relatief het hoogst in winter en zomer, en lager in herfst en lente. In de seizoenen waar de dieren relatief minder stress hebben, is de relatie tussen lysosomale stabiliteit en NTR - aktiviteit niet statistisch

NTR score	Lysosomale stabiliteit (min)					
	2	5	10	15	20	25
5	2	0	0	0	0	0
4	6	2	0	3	0	0
3	21	2	4	3	2	0
2	40	12	4	15	1	3
1	32	14	15	15	11	4
0	3	4	6	3	1	0

Tabel 5. Frequentietabel van de variabelen lysosomale stabiliteit en NTR - score. Ieder element van de matrix geeft aan hoeveel individuen (in de totale studie) de overeenkomstige scores hadden voor de twee kenmerken.

Een G/q test (Sokal & Rohlf, 1981) toont aan dat er een significante associatie bestaat tussen de twee kenmerken. ($G/q = 22.33$, $df = 9$, $P < 0.01$)

NTR score	Lysosomale stabiliteit (min)							
	2	5	10	15	20	25		
5	0	0	0	0	0	0	0	
4	0	1	0	2	0	0	0	
3	0	0	2	0	2	0	0	
2	6	0	2	3	0	3		
1	2	1	4	8	0	1		
0	0	0	2	2	1	0		

Tabel 6. Als tabel 5, maar enkel voor de waarnemingen in de ZOMER. Hier bestaat geen significante associatie.
 $G/q = 6.19$, $df = 4$, $P > 0.1$

NTR score	Lysosomale stabiliteit (min)							
	2	5	10	15	20	25		
5	1	0	0	0	0	0	0	
4	4	0	1	1	0	0	0	
3	8	0	0	0	0	0	0	
2	18	2	2	4	1	0		
1	13	2	3	5	8	1		
0	0	0	0	0	0	0	0	

Tabel 7. Als tabel 5, maar enkel voor de waarnemingen in de HERFST. De associatie is significant:
 $G/q = 11.72$, $df = 4$, $P < 0.025$.

NTR score	Lysosomale stabiliteit (min)						
	2	5	10	15	20	25	
5	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0
3	5	0	1	2	0	0	0
2	8	0	1	7	0	0	0
1	6	0	1	2	3	3	
0	1	0	0	0	0	0	0

Tabel 8. Als tabel 5, maar enkel voor de waarnemingen gedurende de WINTER. De associatie is niet significant. $G/q = 0.72$, $df = 2$, $P > 0.5$

NTR score	Lysosomale stabiliteit (min)						
	2	5	10	15	20	25	
5	1	0	0	0	0	0	0
4	2	1	0	0	0	0	0
3	8	2	0	0	0	0	0
2	8	11	0	1	0	0	0
1	15	10	7	1	0	0	0
0	1	4	4	0	0	0	0

Tabel 9. Als tabel 5, maar enkel voor de waarnemingen in de LENTE. De associatie is significant: $G/q = 14.85$, $df = 6$, $P < 0.025$.

=====								
Shikata	Lysosomale stabiliteit (min)							
score	2	5	10	15	20	25		
=====								
+	49	3	7	17	4	3		
0	38	21	12	10	7	0		
-	21	10	9	8	1	0		
=====								

Tabel 10. Frequentietabel van de variabelen lysosomale stabiliteit en Shikata - score. Ieder element van de matrix geeft aan hoeveel individuen (in de totale studie) de overeenkomstige scores hadden voor de twee kenmerken.

Een G/q test (Sokal & Rohlf, 1981) toont aan dat er een significante associatie bestaat tussen de twee kenmerken. ($G/q = 32.45$, $df = 8$, $P < 0.01$)

NIEUWPOORT

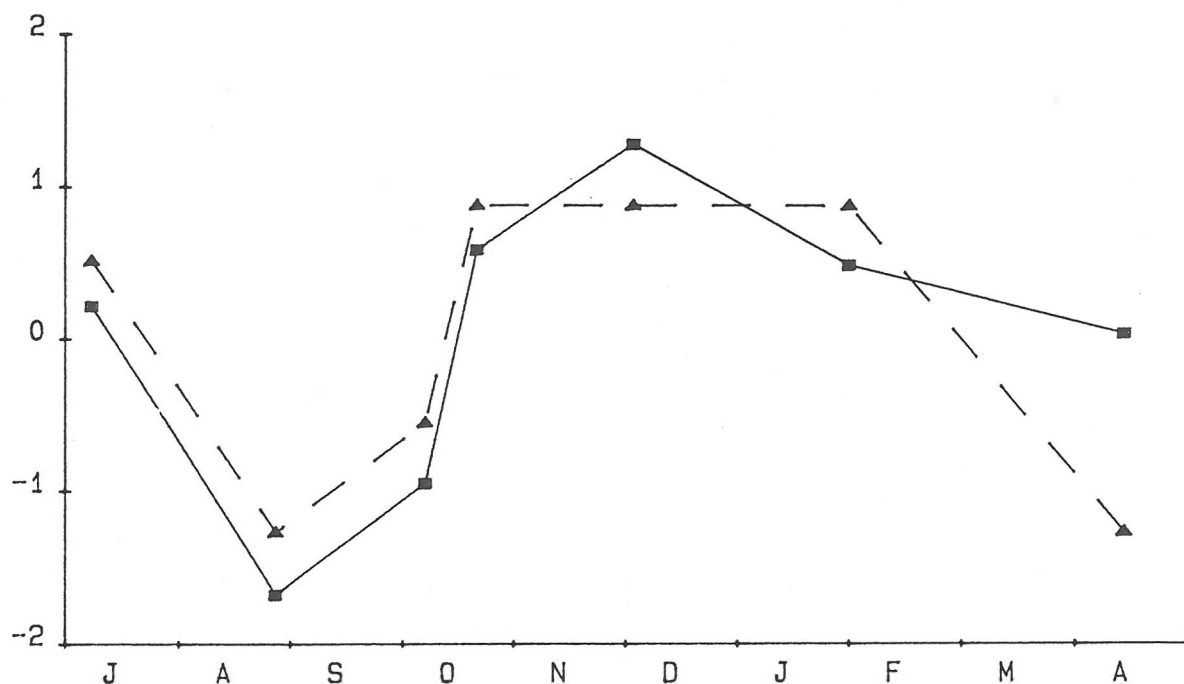


Fig. 7. Vergelijking tussen de index van de contaminatie van de mosselen door zware metalen (volle lijn) en de Shikata-index (streepjeslijn). De berekening van de index wordt in de tekst uitgelegd. Beide variabelen zijn uitgezet op een relatieve schaal, waarbij 1 overeenkomt met 1 standaarddeviatie.

OOSTENDE

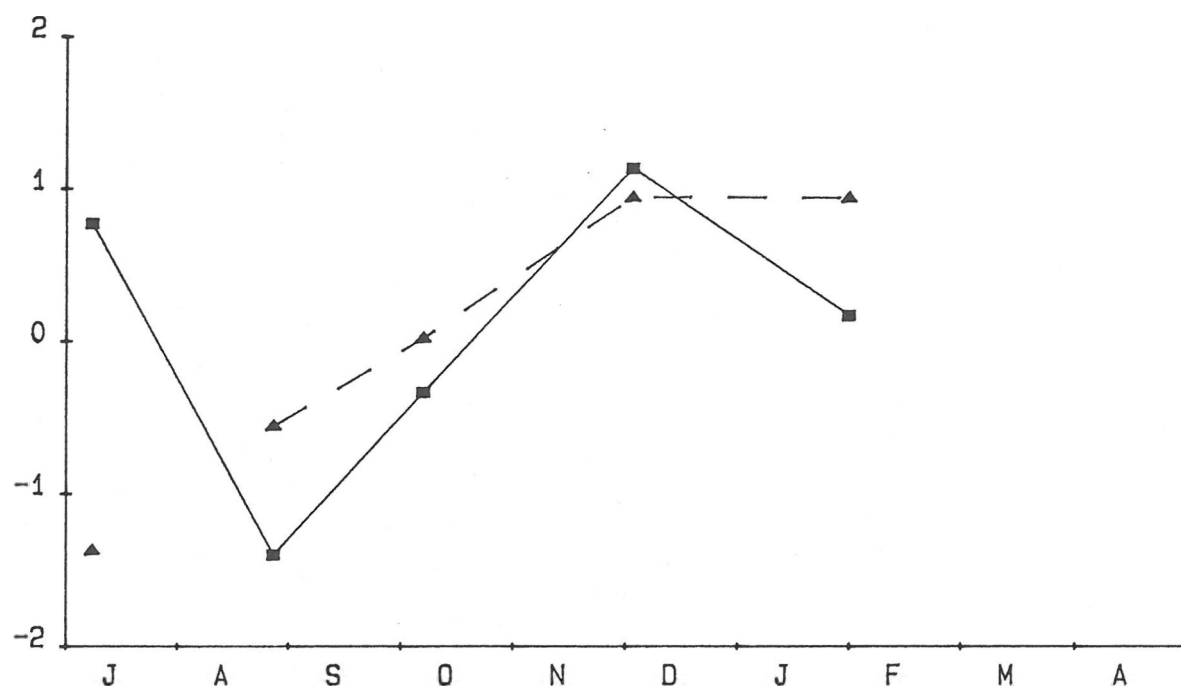


Fig. 8. Als fig. 7, maar voor het station Oostende.
 Het eerste punt van de Shikata - score werd niet verbonden met de andere, omdat over deze bepaling twijfel bestaat als gevolg van technische problemen.

signifikant. In herfst en lente daarentegen is het verband wel duidelijk. Dit wijst er eveneens op dat organische pollutie een bijkomende stress vormt (naast vele andere), waarvoor de dieren het gevoeligst zijn als hun algemene konditie reeds zwak is.

Een vergelijkbare analyse werd gemaakt voor de relatie tussen de resultaten van de Shikata - test en de lysosomale stabiliteit. De resultaten van deze analyse worden voorgesteld in Tabel 10. Zoals voor de vorige relatie wordt een significante associatie gevonden tussen beide variabelen. Toch blijken er verschillen te bestaan in vergelijking met de situatie bij de NTR score. Voor de Shikata vinden we geen incompatibiliteit tussen een positieve score en een hoge lysosomale stabiliteit. Het meest opvallende is het feit dat zeer veel dieren (en veel meer dan verwacht in een random model) zowel een positieve Shikata-score als een lysosomale stabiliteit van slechts 2 min hebben. Gezien het feit dat de Shikata score naar boven toe te beperkt blijkt te zijn (zie verder) leiden we hieruit af dat tenminste een deel van de lage lysosomale stabiliteiten zou kunnen te wijten zijn aan de invloed van van zware metalen, en wel deze waar de concentratie het sterkst is (maar door de beperktheid van onze methode als gelijkwaardig aan lagere, minder toxische concentraties wordt bevonden).

Zoals vermeld in de inleiding, en zoals ook blijkt uit de voorafgaande analyse, waren de resultaten van de Shikata - test moeilijk interpreteerbaar. Zij zijn niet representatief voor de aanwezigheid van metallothioneïnes, en het was, uit de voorafgaande studies, niet duidelijk wat de waarde van deze bepalingen was. Een vergelijking tussen de resultaten van deze test en de doseringen van zware metalen (Dopagne et al., 1987) leverde echter verrassende resultaten op. Voor de stations Nieuwpoort en Oostende, waar we over verschillende waarnemingen over het jaar gespreid beschikken, hebben we een index van de concentratie aan zware metalen in de mosselen berekend op de volgende manier. Van ieder metaal werd de gemiddelde concentratie en de standaarddeviatie berekend. De gegevens werden dan gestandaardiseerd door het gemiddelde af te trekken en te delen door de standaarddeviatie. De aldus gestandaardiseerde waarden voor de verschillende metalen werden gesommeerd en opnieuw gestandaardiseerd op dezelfde manier. De resultaten van de Shikata - testen werden eveneens gestandaardiseerd. Het blijkt dat in beide stations de resultaten van de Shikata - test zeer goed correleren met de index van metalenconcentraties (Fig. 7 en 8). Het ene afwijkende punt in Oostende is een (om technische redenen) zeer onzekere bepaling van de Shikata - reactie. Dit was als zodanig op het protocol van de observatie aangeduid.

De berekening van deze index is slechts zinvol als men ervan uitgaat dat de concentraties van de verschillende metalen in een bepaald station onderling gecorreleerd zijn, en dat de concentratie van ieder metaal afzonderlijk dus een ongeveer gelijkwaardige indruk verschaft van de totale metalenbelasting op dat ogenblik. Men kan aannemen dat binnen een station deze assumptie te verantwoorden is. Dat

is niet het geval wanneer men verschillende stations onderling vergelijkt. Een gelijkaardige analyse als we in de tijd deden voor de stations Nieuwpoort en Oostende, werd ook voor de campagnes oktober en april uitgevoerd over de zes stations. Hier vonden wij totaal geen correlatie tussen de resultaten van de Shikata - test en de index van metaalbelasting. In het licht echter van de duidelijk verschillende pollutiebronnen die door Dopagne et al. (1987) werden aangetoond, is het duidelijk dat de onderlinge verhoudingen van de metalen in de verschillende stations anders zijn, zodat onze index nauwelijks waarde heeft. Het hoeft dan ook niet te verwonderen dat hier geen correlatie gevonden wordt.

Het blijkt uit deze analyse dat de Shikata - test, in elk geval tegen onze eigen verwachting in, een redelijke relatieve maat geeft voor de belasting met zware metalen. De range van bruikbaarheid van de test is echter beperkt. De maximale score (+1) wordt bereikt voordat de maximale metalenconcentratie bereikt wordt.

Uit de multidimensionele analyse van Dopagne et al. (1987) blijkt dat de O:N ratie en de Scope For Growth, hoewel onderling min of meer gecorreleerd, weinig associatie hebben met de andere door deze auteurs bepaalde variabelen. Analooch konden wij geen correlatie vinden tussen O:N, SFG en de door ons bepaalde indices van stress. Het is duidelijk dat O:N en SFG sterk bepaald worden door de ecologische omstandigheden, zoals temperatuur, beschikbaarheid van voedsel enz. Deze beïnvloeding is potentieel ook belangrijk voor de lysosomale stabiliteit, maar gebeurt blijkbaar op een andere manier. Bovendien kunnen een groot aantal factoren wel invloed uitoefenen op de lysosomale stabiliteit, zonder tegelijk de metabolische activiteit sterk te bepalen. We moeten hieruit konkluderen dat de beide benaderingen van stress komplementair zijn, maar zeker niet hetzelfde meten.

Er moet hierbij opgemerkt worden dat de mosselen langs de Belgische kust in een gemiddeld zeer slechte konditie zijn. Reeds herhaaldelijk hebben wij erop gewezen dat een bepaalde maat gevoelig is voor veranderingen in stress binnen een bepaalde range van stress (cfr. de bespreking van de lipofuscine - test, en de bespreking van het verband Shikata - test / doseringen van zware metalen). De range voor de lysosomale stabiliteit wordt herhaaldelijk naar onderen toe overschreden. Zeer vele mosselen hadden een lysosomale stabiliteit van 2 minuten, wat het minimum is dat de test kan meten. Het is onwaarschijnlijk dat al deze dieren zich in een gelijke toestand van stress bevinden. Wij vermoeden, uit het groot aantal waarnemingen van negatieve SFG in Dopagne et al. (1987) dat de range voor de SFG eveneens naar onder toe werd overschreden. Het is moeilijk nog een onderscheid te maken tussen mosselen die zich in slechte, of zeer slechte toestand bevinden. Een negatieve SFG en een zeer lage lysosomale stabiliteit zijn beide aanwijzingen van zware stress, zonder dat men deze nog kwantitatief kan benaderen.

4.3. Een algemene appreciatie van de waarde van histochemisch bepaalde stress - indicatoren.

De huidige studie heeft de beperkingen en kwaliteiten van de histochemisch bepaalde stress-indicatoren duidelijk aangeduid. Het bestaan van zeer zware stress kunnen we wel aantonen (lysosomale stabiliteit 2 min), maar kunnen we niet verder kwantificeren. Bij minder ernstige stress verschaft de lysosomale stabiliteit een goede maat voor de algemene toestand van de dieren. Deze wordt niet, of niet rechtstreeks bepaald door de metabolische mogelijkheden (SFG, D:N ratio). Het is waarschijnlijk dat pollutie een grote invloed op deze variabele uitoefent. De seizoenale cyclus werd in de kuststations gemaskeerd door (voornamelijk lokale) fenomenen op korte termijn. Anderzijds is een hoge activiteit van het NTR niet compatibel met een hoge lysosomale stabiliteit. Dit wijst erop dat organische pollutie de lysosomale stabiliteit beïnvloedt. Een dergelijke invloed werd ook experimenteel aangetoond (Bayne et al. 1985).

De lipofuscine - bepaling, waarvan experimenteel ook het nut werd aangetoond voor de detectie van stress (Moore et al. 1985) was voor de mosselen van de Belgische kust niet bruikbaar. De range van bruikbaarheid van deze test ligt hoger dan deze van de lysosomale stabiliteit. Voor mosselen uit off-shore stations in de Noordzee was deze bepaling wel zinvol.

Een hoge NTR - activiteit is geassocieerd met een lage lysosomale stabiliteit, en een algemeen grotere stress van de organismen. Dit effect is sterker uitgesproken naarmate de dieren algemeen in een slechtere konditie zijn. Dit wijst erop dat de NTR - activiteit, in overeenstemming met literatuurgegevens, een specifieke stress-maat is. De specificiteit voor organische pollutia hebben we uit de veldgegevens niet kunnen onderzoeken. Zij lijkt nochtans vrij vast te staan, zowel op basis van experimentele gegevens, als vanuit biochemisch - fysiologische overwegingen.

De Shikata - test leverde tot onze eigen verrassing goed interpreteerbare resultaten op. Met de restrictie dat de test een beperkte range heeft, tenminste met het door ons gehanteerde scoresysteem, was er een goede correlatie met de gemeten metaaldoseringen. Deze resultaten wijzen erop dat een beter scoresysteem voor de positief reagerende dieren zal moeten gevonden worden. Het zal waarschijnlijk nodig zijn sterker vervuilde mosselen te bestuderen, om het scoresysteem naar boven toe te verbeteren. In elk geval hebben we nu sterke aanwijzingen dat het verder uitvoeren van deze test zinvol is. Het is niet gemakkelijk om uit doseringen van zware metalen een zinvolle maat voor de pollutie door deze elementen te distilleren. Elk metaal moet afzonderlijk 'gewogen' worden naar zijn belangrijkheid in de fysiologie van de organismen, en dit stelt zeker ernstige problemen. Het gebruik van de Shikata - test als een geïntegreerde maat wordt dan ook een aantrekkelijk

alternatief.

Hoewel de Timm sulfide methode een veel duidelijker beeld geeft van de aanwezigheid van metalen dan de Shikata-test, is de bruikbaarheid ervan als indicator van stress beperkt. Het blijkt namelijk zo te zijn dat altijd een positieve reactie verkregen wordt, en dat deze moeilijk te quantificeren is. Anderzijds levert de Timm sulfide kleuring interessante kwalitatieve resultaten. De verspreiding van de zware metalen in het lichaam, en met name de hoge concentratie in de gonaden, is een potentieel belangrijk gegeven.

De suggestie dat de aanwezigheid van kwik in het lichaam afzonderlijk kan bestudeerd worden, omdat het aantonen van kwik geen behandeling met sulfide behoeft, is door ons ook onderzocht. Dit leverde nochtans geen bevredigende resultaten. De kleuring was onbetekenend, en bovendien is het niet mogelijk een test te doen voor achtergrondkleuring, zodat er een grote onzekerheid blijft over de betekenis van de verkregen kleuring.

4.4. Annex: het gebruik van andere testorganismen.

Tenslotte willen we hier nog wijzen op een klein experiment dat we verrichtten met garnalen (Cragnon cragnon). Deze soort, omnivoor - predatorisch en in de sedimenten levend, zou een belangrijke bron van informatie kunnen zijn over de effecten van in de bodem gestockeerde pollutantia. Onze preliminaire testen wezen erop dat de methoden, gebruikt voor de mossel, ook kunnen toegepast worden op de garnaal. De test voor lysosomale stabiliteit levert een duidelijke piek op (bij onze testdieren op 5 en op 10 min); de Shikata levert ongeveer hetzelfde beeld op als bij de mossel (bij de testdieren positief); Timm sulfide kleuring geeft duidelijke reactie langs het lumen van de tubuli van de hepatopancreas; lipofuscine kleurt minder sterk dan bij de mosselen van de Belgische kust; NTR geeft een beeld (bij onze testdieren) overeenkomstig de score 2-3 bij de mosselen.

In tegenstelling tot de mossel zijn deze metingen absoluut niet gevalideerd door experimentele gegevens, of uitgebreide veldstudies. Het is dus niet mogelijk hun betekenis op dit ogenblik in te schatten. Toch menen wij dat hier een interessante mogelijkheid voor verder onderzoek ligt.

Referenties.

- Bayne, B.L., D.L. Holland, M.N. Moore, D.M. Lowe & J. Widdows. 1978. Further studies on the effects of stress in the adult on the eggs of *Mytilus edulis*. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 58: 825-841.
- Bayne, B.L., M.J. Moore, J. Widdows, D.R. Livingstone, P. Salkeld. 1979. Measurement of the responses of individuals to environmental stress and pollution: studies with bivalve molluscs. Phil. Trans. r. Soc. Lond. B. 286: 563-581.
- Bayne, B.L., D.A. Brown, K. Burns, D.R. Dixon, A. Ivanovici, D.R. Livingstone, D.M. Lowe, M.N. Moore, A.R.D. Stebbing, J. Widdows. 1985. The effects of stress and pollution on marine animals. Praeger, New York. 384 pp.
- Chipperfield, P.N.J. 1953. Observations on the breeding and settlement of *Mytilus edulis* (L.) in British Waters. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 32 : 449-476.
- Danscher, G. & J. Zimmer. 1978. An improved Timm Sulphide silver method for light and electron microscopic localization of heavy metals in biological tissues. Histochemistry 55: 27-40.
- Dopagne, C., P. Gervais & J.M. Bouqueneau. 1987. Mussel stress experiment - Belgian coastal zone. Rapport final UGMM. 87 pp.
- Heip, C., R. Herman & M. Vincx. 1984. Variability and productivity of meiobenthos in the Southern Bight of the North Sea. Rapp. P.-v. Reun. Cons. int. Explor. Mer, 183: 51 - 56.
- Herman, P.M.J., M. Habets, C. Heip, J.M. Bouqueneau & C. Dopagne. 1985. Mussel stress experiment - final report. BMM-UGMM report. 22 pp.
- Herman, P.M.J., M. Habets & C. Heip. 1986. Studie van de jaarcyclus van enkele histochemisch bepaalde indicatoren van pollutie-stress bij de mossel. I. Methodologie en eerste resultaten. Interimrapport BMM, 20 pp.
- Jain, S., P.J. Scheuer, B. Archer, S.P. Newman and S. Sherlock. 1978. Histological demonstration of copper and copper-associated protein in chronic liver diseases. J. Clin. Path. 31: 784-790.
- Kautsky, N. 1982. Quantitative studies on the gonad cycle fecundity, reproductive output and recruitment in a Baltic *Mytilus edulis* population. Mar. Biol. 68: 143-160.
- Korporaal, H. & A. Smaal. 1986. Overzicht van de "stress-

- parameters" voor de conditiebepaling van mariene bodemdieren. Rapport Rijkswaterstaat, Dienst Getijdewateren, Nr. GWA0-86.108. 31 pp.
- Lowe, D.M., M.N. Moore & K.R. Clarke. 1981. Effects of oil on digestive cells in mussels: quantitative alterations in cellular lysosomal structure. *Aquat. Toxicol.* 1: 213-226.
- McHenery, J.G., J.A. Allen, T.H. Birbeck. 1983. Effect of tidal submersion on lysozyme activity in *Mytilus edulis* and *Tellina tenuis*. *Mar. Biol.* 75: 57-61.
- Moore, M.N. 1979. Cellular responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and phenobarbital in *Mytilus edulis*. *Mar. Environ. Res.* 2: 255-263.
- Moore, M.N., D.M. Lowe, P.E.M. Fieth. 1978. Lysosomal responses to experimentally injected anthracene in the digestive cells of *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 48: 297-302.
- Moore, M.N., D.M. Lowe, S.L. Moore. 1979. Induction of lysosomal destabilisation in marine bivalve molluscs exposed to air. *Mar. Biol. Letts.* 1: 44-57.
- Moore, M.N., J.A. Mayernik & C.S. Giam. 1985. Lysosomal responses to a polynuclear aromatic hydrocarbon in a marine snail: effects of exposure to phenanthrene and recovery. *Mar. Envir. Res.* 17: 230-233.
- Seed, R. 1969. The ecology of *Mytilus edulis* L. (Lamelli-branchiata) on exposed rocky shores. *Oecologia (Berl.)* 3: 277-316.
- Steinert, S.A., Pickwell, G.V. 1985. Multiple forms of lysozyme in copper stressed mussels (*Mytilus edulis*). 3d Int. Symp. on Resp. of Mar. Org. to Pollut., Progr. and Abstr. IMER.
- Shikata, T. T. Uzawa, N. Yoshiwara, T. Akatsuka and S. Yamazaki. 1974. Staining methods of Australia antigen in paraffin section. *Japanese journal of experimental medicine*, 44: 25-36.
- Viarengo, A., M.N. Moore, M. Pertica, G. Mancinelli, G. Zanicchi & R.K. Pipe. 1985. Detoxification of copper in the cells of the digestive gland of mussels: the role of lysosomes and thioneins. *The Science of the total Environment* 44: 135-145.
- Widdows, J. 1978. Combined effects of body size, food concentration and season on the physiology of *Mytilus edulis*. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 58: 109-142.
- Wittevrongel, K. 1986. Studie van de reproductiecyclus van de mossel *Mytilus edulis* (L.) in de Oosterschelde en de Westerschelde. Licentiaatsverhandeling RUG.