

## **EXPERIMENTELE BEPALING VAN DE WEEFSELSPECIFIEKE TURNOVERSNELHEID VAN STABIELE C EN N ISOTOPEN BIJ DE MARIENE GRONDEL (*POMATOSCHISTUS MINUTUS*)**

Van Den Driessche Pieter

Laboratorium van Aquatische Ecologie, Departement Biologie, Katholieke Universiteit Leuven  
Charles De Bériotstraat 32, 3000 Leuven  
E-mail: pieter\_vandendriessche@hotmail.com

Estuaria vormen de overgangszones tussen rivieren en de zee en het zijn zeer productieve ecosystemen (Costanza *et al.*, 1997). Ondanks de sterk fluctuerende omgevingsvariabelen worden ze in grote aantallen bezocht door verscheidene mariene vissoorten die er de eerste maanden van hun levenscyclus doorbrengen. Het betreft onder meer haring- en kabeljauwachtigen en verschillende soorten platvissen en grondels die in een voorspelbaar, temporeel patroon in de verschillende estuaria langsheen de Noordzee aanwezig zijn. Deze soorten paaien in diepere zones van de Noordzee, wat de dispersie van de eieren en larven bevordert. Na uitkomen drijven de larven naar voedselrijke kustzones, waar zij mobiel worden en waar de juveniele levensstadia worden doorgebracht tot ze de adulte stock op zee kunnen vervoegen. Een deel van de juveniele vissen verlaat echter de kustzones en migreert naar de brakwatergebieden in de estuaria vooraleer ze de adulte stock op zee vervoegen. Estuaria worden immers verondersteld aantrekkelijke habitatten te zijn voor jonge O-vissen en in het verleden werden meerdere hypotheses omtrent de achterliggende mechanismen geformuleerd. In vergelijking met de kustzone is in de estuaria de kans op visuele predatie gereduceerd door de hogere turbiditeit (Blaber en Blaber, 1980) terwijl het voedselaanbod er zeer hoog is (Day *et al.*, 1989). Daartegenover staat dat de specifieke groeisnelheid van jonge vissen in estuaria lager is dan op zee waar de abiotische omgeving stabiel is (Power *et al.*, 2000).

Er zijn meerdere benaderingen om vismigratie te bestuderen. Het bestuderen van migratiedynamica en het kwantificeren van migraties van mariene organismen is echter niet evident. Het klassiek merken met labels of radiozendertjes is gewoonlijk niet geschikt voor kleine of ongrijpbare individuen. Als de soort onder studie bovendien gekenmerkt wordt door een massale productie van klein, pelagisch nageslacht, dat een hoge initiële mortaliteit ondervindt, zijn vangst-hervangstexperimenten uitgesloten (Hobson, 1999). Indien echter ook geen artificiële passages aanwezig zijn in rivieren, zodat directe observaties eveneens niet mogelijk zijn, kan men zich enkel wenden tot indirecte observaties om de migraties te bestuderen (Limburg, 2001).

Om een nauwkeurig beeld te krijgen van de migratiepatronen van de grondel *Pomatoschistus minutus* (dikkopje) tussen de Noordzee en het brakwatergebied van de Schelde werd geopteerd te werken met stabiele C en N isotopen. Het principe van stabiele isotopenanalyse om de oorsprong of migratie van dieren op te sporen, is gebaseerd op het feit dat de isotopenverhoudingen in dierlijke weefsels die van lokale voedselwebben reflecteren. De isotopenverhoudingen van lokale voedselwebben kunnen variëren als resultaat van verschillende biochemische processen betrokken bij de opname van het betreffende element (C, N, S, ...) en door de isotopenverhouding

van deze elementen in de omgeving van waaruit zij opgenomen worden door de primaire producenten. Deze verhouding kan dan bijna onveranderd overgenomen worden door de consumenten (S en C) of op constante wijze veranderen bij overgang naar een hoger trofisch niveau (N) (Fry en Sherr, 1984; Hesslein *et al.*, 1991). Organismen die tussen isotopisch verschillende voedselwebben migreren, dragen de signaturen van de vorige voedsellocatie nog een zekere tijd met zich mee en bijgevolg kunnen ze in hun nieuwe voedsellocatie, na isotopenanalyse, onderscheiden worden van individuen die daar reeds langer aanwezig zijn. De tijdspanne waarin pas gearriveerden kunnen onderscheiden worden omdat ze nog niet in evenwicht zijn met hun nieuwe isotopisch milieu is afhankelijk van hun specifieke weefsel turnover.

Het is cruciaal voor het gebruik van stabiele C en N isotopen als migratietracer enkele basisvoorwaarden te onderzoeken. Enerzijds is het nodig om de weefsel-specifieke turnoversnelheden te kennen. Er is nog steeds een lacune in de huidige literatuur voor juveniele mariene vissen omtrent turnoversnelheden tussen een bepaald dieet en de weefsels.

Anderzijds is het een noodzakelijke voorwaarde voor deze techniek om een duidelijke isotopengradiënt aan te tonen tussen de twee migratie eindpunten. Er is inderdaad een  $\delta^{13}\text{C}$  en  $\delta^{15}\text{N}$  gradiënt tussen de monding van de Schelde ter hoogte van Borssele en de brakwaterzone ter hoogte van Doel. De stabiele isotopensamenstelling van mariene voedselwebben is normaliter meer verrijkt in het zware isotoop dan zoetwaterbiomen (Peterson en Fry, 1987; Doucett *et al.*, 1999). Vooral  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  en  $^{34}\text{S}$  volgen dat patroon (Hobson, 1999).

Zowel het bepalen van de turnoversnelheden als de isotopengradiënt vormden de belangrijkste doelstellingen van dit onderzoek opdat in de toekomst isotopenanalyses van grondelweefsels uit het Schelde-estuarium éénduidig zouden kunnen geïnterp

Teneinde een nauwkeuriger beeld te krijgen van de migratiepatronen en de residentietijd van de juveniele grondels in het brakwatergebied van de Schelde, werd een 90 dagen durend aquariumexperiment te Yerseke uitgevoerd in een gecontroleerde omgeving, representatief voor het Schelde-estuarium. Het turnover experiment had als hoofddoelstelling de snelheid van de verandering van isotopensamenstelling in hart-, lever- en spierweefsel te bepalen. De verandering van isotopesignaal is afhankelijk van groei en metabolisme van het organisme; dit laatste vertegenwoordigt de vervanging van oud weefsel door nieuw. Om dit te verwezenlijken was het noodzakelijk zoveel mogelijk parameters constant te houden, wat mee de locatie van het experiment bepaalde. De grondels werden uit de Oosterschelde (mariene bioom) willekeurig verdeeld over 36 aquaria, met een dichtheid van 6 vissen per aquarium. Iedere grondel werd voorzien van een unieke merkcode zodat individuele opvolging mogelijk was. De aquaria werden willekeurig opgedeeld in 4 voedselcondities. De experimentele groep (21 aquaria) werd een pelletedieet toegediend die isotopisch verschilde van hun natuurlijke dieet. Er werden 2 controlevoedsels geselecteerd. *M. edulis* voldeed als controle voor het natuurlijke mariene  $^{13}\text{C}$  signaal. *Arenicola* sp. diende als controle voor het  $^{15}\text{N}$ -signaal. De overige 3 aquaria kregen de behandeling 'verhongering' om het effect van verhongering te testen op de isotopesignatuur van de verschillende visweefsels. Alle aquaria uit de 4 voedselgroepen werden op geregelde tijdstippen bemonsterd.

Per aquarium werden de 2 best gegroeide vissen geselecteerd voor verdere isotopenanalyses. Telkens werd een staal van spier-, lever- en hartweefsel isotopisch geanalyseerd. Eveneens werden 7 grondels op dag 0 van het experiment opgeofferd om het initiële isotopesignaal  $\delta_i$  te bepalen. Bij een isotopische dieetverandering zal de initiële isotoopsamenstelling van de grondel  $\delta_i$  geleidelijk veranderen naar een nieuwe evenwichtswaarde  $\delta_f$ , dit is de isotoopwaarde van het nieuwe dieet vermeerderd met de trofische fractionatiewaarde. De snelheid waarmee deze plaatsvindt, is de turnoversnelheid. De verandering van  $\delta^{13}\text{C}$  en  $\delta^{15}\text{N}$  werd, als gevolg van een dieet met een afwijkende isotopencompositie, opgevolgd voor spier-, lever- en hartweefsel.

In het experiment werd geopteerd te werken met dierlijke weefsels die een verschillende graad van metabolische activiteit kennen. Metabolisch actieve weefsels (hart, lever) kennen een snellere turnoversnelheid dan metabolisch minder actieve weefsels (spierweefsel) (Fry en Arnold, 1982). Eveneens verhoogt men de resolutie om migrerende organismen te onderscheiden van residenten door verschillende weefsels te vergelijken.

Algemeen wordt de isotopenverandering uitgedrukt ten opzichte van toegenomen biomassa bij snelgroeïende individuen, terwijl bij volwassen individuen dit ten opzichte van de tijd gebeurt (Bosley *et al.*, 2002). Bij adulte organismen is de turnoversnelheid immers enkel afhankelijk van het onderhoudsmetabolisme, terwijl turnover bij juvenielen vooral door groei wordt bepaald en dus eerder een functie van de toegenomen biomassa is dan van tijd (Fry en Arnold, 1982).

De experimentele grondels bevonden zich in een subadult stadium waardoor de  $\delta^{13}\text{C}$  en  $\delta^{15}\text{N}$  verandering voor de verschillende weefsels werd uitgezet in functie van tijd (dagen) en groei ( $W_t/W_i$ ). Om de weefsel-specifieke turnoversnelheden te berekenen kan vervolgens gebruik worden gemaakt van twee modellen (Bosley *et al.*, 2002).

→ Verandering van isotopensamenstelling in functie van de tijd

$$\delta_t = \delta_f + (\delta_i - \delta_f) e^{-vt}$$

- $\delta_t$  : isotoopwaarde bij het afdoden tijdens het experiment
- $\delta_i$  : initiële isotoopwaarde voor het experiment
- $\delta_{f,m}$  : finale isotoopwaarde bij evenwicht met nieuwe dieet
- $t$  : aantal dagen na de start van het experiment
- $v$  : turnoversnelheid

Ter bepaling van (finale isotoopwaarde)  $\delta_{f,m}$  en turnoversnelheid ( $v$ ) werd het exponentieel model zo goed mogelijk gefit aan de data voor elk weefsel. Turnoversnelheden worden typisch uitgedrukt in halfwaardetijden, dit is de tijd nodig om die isotopenwaarde te bereiken die exact in de helft ligt tussen de initiële waarde en de eindwaarde (Herzka en Holt, 2000).

→ Verandering van isotopensamenstelling in functie van de groei

$$\delta_t = \delta_f + (\delta_i - \delta_f) (W_t / W_i)^c$$

- $\delta_t$  : isotoopwaarde bij het afdoden tijdens het experiment
- $\delta_i$  : initiële isotoopwaarde voor het experiment
- $\delta_{f,m}$  : finale isotoopwaarde bij evenwicht met nieuwe dieet
- $W_i$  : initieel gewicht
- $W_t$  : gewicht bij vangen
- $c$  : indicatie voor de relatieve bijdrage voor groei en metabolische activiteit

De parameters  $c$  en  $\delta_{f,m}$  werden geschat door het model te fitten aan de experimentele datapunten. De onbekende  $c$  vertaalt de relatieve bijdrage van groei en metabolische activiteit in het model. Indien  $c = -1$ , dan kan de isotopenverandering volkomen toevertrouwd worden aan de groei. Indien  $c < -1$ , wordt de snelheid van isotopenverandering bovenop groei versneld door metabolische activiteit.

Uit de resultaten kon worden besloten dat alle weefsels in de experimentele groep isotopisch veranderden naar de compositie van het dieet. Verder kon besloten worden dat de exponentiële modellen een goede fit vertoonden met de  $\delta^{13}\text{C}$  en  $\delta^{15}\text{N}$  data van de 3 weefsels.

De drie weefsels konden voor  $\delta^{13}\text{C}$  als volgt gerangschikt worden in functie van hun halfwaardetijd (dagen): hart (6,2) < lever (10,65) < spier (24,8). Voor  $\delta^{15}\text{N}$  werd dit: lever (2,48) < spier (23,79) < hart (24,2). Er is dus duidelijk een verschil in turnoversnelheid voor de verschillende weefsels. Van spierweefsel werd conform de literatuur verwacht dat ze de laagste turnoversnelheid zou vertonen door de lagere metabolische activiteit. Dit was inderdaad het geval voor de  $\delta^{13}\text{C}$  data. In overeenstemming met de verwachtingen kon uit de groeimodellen besloten worden dat alle turnoversnelheden sterk beïnvloed werden door de metabole activiteit van de vissen.

Op basis van deze resultaten wordt voor de verdere studie van de migratiedynamica de voorkeur gegeven aan die modellen waarbij  $\delta^{13}\text{C}$  en  $\delta^{15}\text{N}$  van spierweefsel,  $\delta^{13}\text{C}$  van leverweefsel en  $\delta^{15}\text{N}$  van hartweefsel in functie van groei worden uitgedrukt. Deze besluiten werden getrokken uit een modelvalidatie waarbij de looptijden per aquarium op basis van het model ( $t$  est) werden berekend en vergeleken met de werkelijke residentietijd van het specifieke aquarium. Indien de richtingscoëfficiënt van de bekomen regressierechte niet significant afweek van 1 (perfecte correlatie), werd geconcludeerd dat het model betrouwbaar is.

Het experiment verschaftte ook inzicht in de effecten van verhogering op de  $\delta^{13}\text{C}$  en  $\delta^{15}\text{N}$  van de verschillende weefsels enerzijds en anderzijds in de weefselspecifieke trofische fractionatiewaarden bij grondels. Grondels kennen gedurende de winter immers een periode waarin geen of nauwelijks groei optreedt (Fonds, 1973) en hierbij bestaat de mogelijkheid dat ze daadwerkelijk niet foerageren. Doordat er geen voedsel voorhanden was, werden de grondels geconfronteerd met nutriëntenstress en werden ze verplicht te teren op hun reserves en proteïnen in bepaalde weefsels te mobiliseren voor gebruik op andere plaatsen in het lichaam. Deze mobilisatie en hergebruik van proteïnen zou moeten leiden tot een verrijking in  $^{15}\text{N}$  door een preferentiële verwijdering van de lichte ( $^{14}\text{N}$  bevattende) aminegroepen in de ammoniak, ureum en urinezuur excretie. Een mobilisatie, reorganisatie en katabolisme van de opgeslagen lipidenreserves zou eveneens moeten leiden tot een verrijking in  $^{13}\text{C}$ , aangezien er een preferentiële uitstoot is van  $^{12}\text{C}$  in de respiratie (Doucett *et al.*, 1999).

In het experiment werd enkel een significante verrijking vastgesteld voor  $\delta^{15}\text{N}$  in lever- en  $\delta^{13}\text{C}$  in hartweefsel ten gevolge van de verhogering.

Het nagaan van de  $\delta^{13}\text{C}$ - en  $\delta^{15}\text{N}$ -gradiënt tussen de Noordzee en het Schelde-estuarium kon omwille van technische problemen niet uitgevoerd worden.

Het gebruik van  $\delta^{13}\text{C}$  en  $\delta^{15}\text{N}$  als tracers voor individuele rekruteringen naar het estuarium leidt tot een nauwkeurige kennis omtrent de temporele resolutie van de migratiepatronen van *P. minutus*. Het bepalen van de isotopengradiënt over het Schelde-estuarium behoorde initieel tot een doelstelling maar kon in laatste instantie niet opgenomen worden in dit eindwerk omwille van technische problemen. Eens de karakteristieke isotopenwaarden van het eigenlijke mariene en estuariene bioom vastgelegd, bezit men alle informatie om aan de hand van de turnovermodellen een betrouwbare schatting te maken van een residentietijd van individuele grondels in het Schelde-estuarium.

#### Referentielijst

- Blaber S.J.M. en T.G. Blaber. 1980. Factors affecting the distribution of juvenile estuarine and inshore fish. *Journal of Fish Biology* 17:143-162.
- Bosley K.L., D.A. Witting, R.C. Chambers, en S.C. Wainright. 2002. Estimating turnover rates of carbon and nitrogen in recently metamorphosed winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* with stable isotopes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 236:233-240.
- Costanza R., R. d'Arge, R. de Groot, S. Farber, M. Grasso, V. Hannon, K. Limburg, S. Naeem, R.V. O'Neill, J. Paruelo, R.G. Raskin, P. Sutton en M. Van den Belt. 1997. The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* 387:253-260.
- Day J.W., C.A.S. Hall, W.M. Kemp en A. Yanez-Arancibia. 1989. *Estuarine Ecology*. John Wiley and Sons. New York, 558p.
- Doucett R.R., W. Hooper, en G. Power. 1999. Identification of anadromous and nonanadromous adult brook trout and their progeny in the Tabusintac River, New Brunswick, by means of multiple stable isotope analysis. *Transactions of the American Fisheries Society* 128:278-288.

- Fonds M. 1973. Sand gobies of the Dutch Wadden Sea (*Pomatoschistus*, Gobiidae, Pisces). *Netherlands Journal of Sea Research* 6:417-478.
- Fry B. en C. Arnold. 1982. Rapid  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  turnover during growth of brown shrimp (*Penaeus aztecus*). *Oecologia* 54:200-204.
- Fry B. en E.B. Sherr. 1984.  $\delta^{13}\text{C}$  measurements as indicators of carbon flow in marine and freshwater ecosystems. p.201-218. In: *Stable isotopes in ecological research*. Rundel P.W. & K.A. Nagy (Eds).
- Hesslein R.H., K.A. Hallard, en P. Pamlal. 1993. Replacement of sulfur, carbon, and nitrogen in tissue of growing broad whitefish (*Coregonus nasus*) in response to a change in diet traced by  $\delta^{34}\text{S}$ ,  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$ . *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50:2071-2076.
- Herzka S.Z. en G.J. Holt. 2000. Changes in isotopic composition of red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae in response to dietary shifts: potential applications to settlement studies. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 57:137-147.
- Hobson K.A. 1999. Tracing origins and migration of wildlife using stable isotopes: a review. *Oecologia* 120:314-326.
- Limburg K.E. 2001. Through the gauntlet again: demographic restructuring of American shad by migration. *Ecology* 82:1584-1596.
- Peterson B.J. en B. Fry. 1987. Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18:293-320.
- Power M., M.J. Attrill en R.M. Thomas. 2000. Temporal abundance patterns and growth of juvenile herring and sprat from the Thames Estuary 1977-1992. *Journal of Fish Biology* 56:1408-1426.