

Interactie van *Prorocentrum lima* met *Mytilus edulis* (2010-2011)

Deruytter David

Laboratorium voor Milieutoxicologie en Aquatische Ecologie (UGent), Jozef Plateaustraat 22,
B-9000 Gent, België
E-mail: david.deruytter@ugent.be

Inleiding

Harmful algal blooms (HAB's) produceren toxines die niet alleen verantwoordelijk zijn voor aanzienlijke gezondheidsproblemen maar ook voor economische schade. Eén van die toxines is okadazuur (OA) dat wordt geproduceerd door verschillende *Prorocentrum* en *Dinophysis* soorten. OA bindt met proteïnefosfatase enzymen (voornamelijk PPA2 en PP1) waardoor het defosforyleren van enzymen wordt geïnhibeerd. Hierdoor krijgt men een verstoring in het cellulair evenwicht door hyperfosforylatie. Bij de mens is de dunne darm waarschijnlijk het doelorgaan. OA is daar verantwoordelijk voor de hypersecretie van de darmvilli met gastro-intestinale klachten tot gevolg (Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP)).

In de naam DSP wordt al verwezen naar de belangrijkste oorzaak van intoxicatie bij de mens namelijk het consumeren van schaaldieren. Er zijn al uitgebreide onderzoeken uitgevoerd naar het effect van OA bij de mens, maar onderzoeken naar het effect bij schaaldieren zijn schaars. Uit voorgaande studies weet men dat er geen stijging is van de mortaliteit bij de gewone mossel (*Mytilus edulis*) na intoxicatie met OA. Twee sublethale effecten zijn bij de mossel wel gekend. Ten eerste worden bij het *in vitro* toevoegen van OA ook de proteïnefosfatase enzymen van de mossel geïnhibeerd, maar ook *in vivo* worden deze enzymen geïnhibeerd bij een concentratie van 1,7µg OA.g⁻¹ hepatopancreas. Ten tweede stijgt de mortaliteit bij hemocyten na het toevoegen van OA. In dit onderzoek wordt nagegaan of de lysosoommembraan-stabiliteit (LMS) en proteïnefosfatase-activiteit daalt bij een toenemende concentratie aan *P. lima*.

Materiaal en methoden

De mossels (*M. edulis*) werden verdeeld over een controle en twee behandelingen [500 *P. lima* cellen.ml⁻¹ (B1) en 1500 *P. lima* cellen.ml⁻¹ (B2)]. De voeding en *P. lima* cellen werden eenmaal per dag toegediend gedurende acht dagen. De lysosoommembraan-stabiliteit (LMS) werd bepaald via het neutral red retention time protocol geformuleerd in ICES (2004). De proteïnefosfatase-activiteit werd bepaald door na te gaan hoe snel P-nitrofenylfosfaat (pNPP, kleurloos) gedefosforyleerd werd naar p-nitrofenol (geel) door de aanwezige enzymen. Naast het *in vivo* experiment werd ook een *in vitro* experiment uitgevoerd. In dit experiment werd een OA-standaardreeks aangelegd (3 replicaten). Praktisch werd de enzymactiviteit bepaald door het meten van de kleurverandering bij 405nm met een spectrofotometer. De toxine concentratie van het water (dag 8) en de mossel (hepatopancreas en restweefsel) werd bepaald met een LC-MS volgens het protocol van Bravo *et al.* (2001).

Resultaten

Er werden geen toxines gedetecteerd in het water en in de hepatopancreas van de controle. Bij de behandelingen was er zowel in het water (B1: 3,9ng OA.ml⁻¹; B2: 13,5ng OA.ml⁻¹) als in de hepatopancreas (B1: 0,22µg OA.g⁻¹; B2: 0,74µg OA.g⁻¹) een significante stijging merkbaar. In de rest van het zachte weefsel werd geen verschil opgemerkt tussen de controle en de behandelingen.

Bij het *in vitro* experiment werd een significante daling waargenomen bij 0,1ng OA.ml⁻¹ (2x) of 1,6ng OA.ml⁻¹ (1x). Wanneer de concentratie hoger was dan 0,25µg OA.ml⁻¹ werd telkens een plateau gevormd waarna er geen verdere daling werd waargenomen. De maximale inhibitie lag tussen 14,5 en 20%. Bij het *in vivo* experiment werd de proteïnefosfatase-activiteit niet geïnhibeerd. Er werd geen significante daling in lysosoommembraan-stabiliteit genoteerd, maar er was wel een daling van het gemiddelde en een stijging in de variatie.

Discussie

Uit de resultaten blijkt dat *P. lima* OA produceert. Deze toxines worden ook opgenomen door de mossel waar ze accumuleren in de hepatopancreas. In de rest van de weefsels werden geen aantoonbare hoeveelheden gevonden. Niettegenstaande er geen verschil in LMS werd aangetoond was er waarschijnlijk wel een effect gezien de gemiddeld lagere membraan-stabiliteit. Door de grote variatie was deze daling echter niet significant. Bij het *in vitro* proteïnefosfatase-experiment werd een duidelijke daling waargenomen en op basis hiervan verwacht men ook een daling tussen 8 en

15% bij het *in vivo* experiment. Deze daling wordt niet waargenomen wat mogelijks wijst op het bestaan van een detoxificatiemechanisme bij de geteste concentraties. Deze capaciteit is waarschijnlijk wel beperkt aangezien er merkbare gevolgen zijn bij een concentratie van $1,7\mu\text{g OA.g}^{-1}$ hepatopancreas (Svensson, 2003). Uit de literatuur blijkt dat de inactivatie van OA door het binden met een lipoproteïne de meest waarschijnlijke verklaring is, maar verder onderzoek zou dit nog moeten uitwijzen.