

# Eerste plan voor wetenschappelijke ondersteuning van een beleid gericht op duurzame ontwikkeling (PODO I)

## *Programma "Duurzaam beheer van de Noordzee"*

### Zeevogels en zeezoogdieren van de Noordzee: pathologie en ecotoxicologie

#### Samenvatting van het onderzoek

**Bouquegneau J.-M<sup>1.</sup>, Coignoul, F.<sup>2.</sup>, Das, K.<sup>1</sup>, Debacker, V.<sup>1</sup>, Haelters, J.<sup>3</sup>,  
Holsbeek, L.<sup>4</sup>, Jauniaux, T.<sup>2</sup>, Joiris, C.<sup>4</sup>, Stienen, E.<sup>5</sup>, Tavernier, J.<sup>6</sup>,  
Van Waeyenberge, J.<sup>5</sup>**

<sup>1</sup> Océanologie, Université de Liège, B6c Sart Tilman B-4000 Liège.

<sup>2</sup> Département de Pathologie, Collège Vétérinaire, Université de Liège, B43 Sart Tilman, B-4000 Liège.

<sup>3</sup> Departement voor Marien Ecosysteem-management (Mathematisch Model voor de Noordzee\_ MUMM);  
3e en 23e Linierégimentsplein, B-8400 Oostende.

<sup>4</sup> Laboratorium voor Ecotoxicologie en Polaire Ecologie, Vrije Universiteit Brussel, Pleinlaan, 2, B-1050 Brussel.

<sup>5</sup> Instituut voor Natuurbehoud, Kliniekstraat, 25, B-1070 Brussel.

<sup>6</sup> Koninklijk Belgisch Instituut voor Natuurwetenschappen (KBIN), Vautierstraat, 29, B-1000 Brussel.

## Algemene inleiding

Tijdens de afgelopen vijf jaar werden door de Federale instanties meerdere onderzoeksprojecten inzake een 'Duurzaam Management van de Noordzee' ondersteund. In dit kader werd de gezondheidsstatus van de populaties van zeevogels en van zeezoogdieren langs het Belgisch kustgebied onderzocht, inbegrepen het voorkomen van pathologieën en de blootstelling aan stabiele pollutanten. Ook een evolutie in de tijd en het zoeken naar bv. de oorzaken van onnatuurlijke sterfte, werden onderzocht. Met het oog op dit multidisciplinair onderzoek werd een koepel van onderzoeksgroepen opgericht onder de naam MARIN: Marine Animals Research and Intervention Network. De Zuidelijke Noordzee, en in het bijzonder de Vlaamse banken zijn bijzonder belangrijke overwinteringgebieden voor een groot aantal zeevogels. Tijdens deze overwinteringsperiode wordt een groot aantal hiervan dood \_of uitgeput- aangetroffen langs de kustlijn. Zeezoogdieren zijn weliswaar minder talrijk maar worden heel het jaar door in kleinere aantallen op het strand gevonden. Niettegenstaande dat de olievervuiling langs onze kust de laatste periode gevoelig lijkt te dalen (Seys et al., submitted a), blijft stookolie in minstens 50% van de gevallen de oorzaak van het aanspoelen van zeevogels. Bij gestrande zeezoogdieren werden een reeks van laesies en ziektepatronen waargenomen die mogelijk mee aan de basis kunnen liggen van een graduele verzwakking van de individuen. Hoe dan ook blijft het noodzakelijk om verder onderzoek te verrichten naar mogelijke indirecte oorzaken van sterfte bij beide groepen van toppredatoren. Ze zijn immers onderhevig aan een combinatie van stressfactoren, inbegrepen zware weercondities, voedseltekort, contaminatie en ziekte. Al deze gegevens maakten het voorwerp uit van de wetenschappelijke studie, verricht door de groep MARIN, in het kader van het programma 'Duurzaam Management van de Noordzee'.

## Zeevogels

De aanwezigheid en opstapeling van pollutanten en de mogelijke effecten op in het wild levende vogels was het onderwerp van menige studie in de afgelopen decennia. Het merendeel van deze studies spitste zich toe op individuen; weinig aandacht werd echter besteed aan de mogelijke negatieve impact van pollutanten op individuen die reeds blootgesteld zijn aan bijkomende elementen van omgevingsstress. Het werken met gestrande zeevogels biedt de kans om dit in een breder waaier van, vaak gerelateerde condities, te bestuderen. Van deze vogels wordt verwacht dat ze meer vatbaar zouden zijn voor de mogelijke negatieve effecten van pollutanten, aangezien ze dagelijks blootgesteld zijn aan een reeks van andere, natuurlijke of antropogene, stressfactoren (Nicholson et al. 1983; Foulkes, 1990). Deze studie is een eerste poging om pathologische en toxicologische gegevens met elkaar in verband te brengen en om de exacte rol van bv. zware metalen en organochloren als bijkomende factoren voor een algemene verzwakking, te duiden in een populatie van overwinterende zeekoeten (Offringa et al. 1995, 1996).

De op het strand gevonden vogels zijn slechts een fractie van het totaal aantal op zee gestorven zeekoeten (Piatt and Ford, 1996; Flint and Fowler, 1998). Een extrapolatie van deze aantallen naar een globaal schatting van sterfte is echter moeilijk. Een groot aantal van de dode dieren zal immers nooit op de kusten aanspoelen, zinkt naar de bodem van de zee, of wordt opgeruimd door aaseters allerhande. Op basis van bestaande ringgegevens wordt algemeen aangenomen dat de in de zuidelijke Noordzee overwinterende zeekoeten afkomstig zijn van zomerkolonies in Noordoost Schotland.

Een aantal driftexperimenten werden uitgevoerd met het oog op een extrapolatie van het aantal aangespoelde en teruggevonden dieren. De resultaten bleken in hoge mate beïnvloed door de windrichting en -snelheid in de dagen volgend op het uitzetten van de dode vogels. De kans dat de dieren aanspoelden waren in eerste lijn omgekeerd evenredig met de afstand tot de kustlijn. Duurexperimenten toonden bovendien aan dat vogels gemiddeld tussen 5.8 en 13.3 dagen na aanspoelen nog terug te vinden zijn op de stranden. De laagste waarde moet geduid worden als zijnde de mogelijk meest realistische (Seys, submitted b).

Gestrande, nog levende dieren, vertonen in hoge mate verschijnselen van uitputting. In het algemeen waren alle dieren in een vrij slechte algemene conditie. Een groot aantal van de aangespoelde zeekoeten vertoonde duidelijke sporen van een algemene staat van vermagering, een gegeven dat gekarakteriseerd wordt door een al dan niet zware atrofie van de borstspieren en het volledig ontbreken van onderhuids en/of abdominaal vet, zijnde een algemene staat van cachexie (Jauniaux et al. 1997, 1998). Deze gegevens bevestigen dat de meerderheid van zeekoeten uiteindelijk een beroep moet doen op de proteïnereserves van de spieren, alvorens uiteindelijk toch te sterven. Een courante laesie, die vaak gelinkt kan worden aan de uiteindelijke doodsoorzaak, is een acute hemorrhagische gastro-enteropathie (AHGE).

Het is in deze context dat de niveaus van zware metalen en PCBs werden onderzocht in de weefsels van enerzijds cachectische, anderzijds niet-cachectische zeekoeten. Cachectische vogels vertoonden significant hogere waarden voor Cu, Zn, totaal en anorganisch kwik Hg, maar ook voor PCBs in lever en nieren. Deze verschillen waren nog meer uitgesproken wanneer er een verdere onderverdeling gemaakt werd naar de graad van cachexie. Door middel van een multivariabel-analyse (eerste reeks variabelen: sekse, leeftijd, aan- of afwezigheid van oliesporen, aan- of afwezigheid van AhGe en graad van cachexie; tweede reeks: concentraties zware metalen) en op basis van een multi-pele regressie kon een duidelijk verband gelegd worden tussen de status van cachexie en de concentraties van Cu en Zn in lever, nier en spierweefsel (Debacker et al. 1997, 2000).

Een combinatie van omgevingsstress-factoren (o.a. koude, voedseltekort en olievervuiling) is verantwoordelijk voor een dalend totaal gewicht van de individuen, maar ook voor het dalen van de massa van inwendige organen van cachectische vogels. Ten gevolge van deze daling in gewicht zullen de concentraties van zware metalen en PCBs hier op volgend significant toenemen. Samen met een algemene daling van het gewicht werd eveneens een daling van de vetgehalten van lever en spier vastgesteld. Dit kan toegeschreven worden aan een te voorzien aanspreken van de vetreserves, vooraleer er overgegaan wordt op een proteïne-katabolisme.

In vergelijking met andere, minder vervuilde regio's van de Noordzee, vertonen de zeekoeten die gevonden worden op de Belgische kuststrook hoge concentraties van vooral Cu, Zn en Hg. Specifiek betreffende kwik en organochlore contaminanten (PCBs en p,p'-DDE) werd aangetoond dat de in de Zuidelijke Noordzee overwinterende populaties significant hogere waarden noteerden dan de Noordelijke zomerpopulaties (Joiris et al. 1997; Tapia, 1998). Bovendien werd er, ten gevolge van de hogere, antropogene, contaminatiegraad in de Zuidelijke Noordzee, een cyclisch patroon zichtbaar, met stijgende concentraties van November-December tot en met Maart-April. Dit type van cyclisch patroon werd weliswaar niet gevonden voor andere zware metalen (Cu, Zn, Fe en Cd); toch zijn er voldoende aanwijzingen die duiden op een hogere contaminatiegraad van het Zuidelijk Noordzeegebied: de concentraties in zeekoeten die verzameld werden in Bretagne, Frankrijk (incident Erika) waren van een significant lagere orde.

Een reeks van experimenten werd uitgevoerd met het oog op het leggen van verbanden tussen de gecombineerdere effecten van voedseltekort en blootstelling aan Cu, Zn en CH<sub>3</sub>Hg. In de helft van de gevallen leidde dit tot een status van cachexie, terwijl dit niet het geval was in de controlepopulatie (vasten, geen blootstelling). Hogere concentraties werden opgetekend in de weefsels van cachectische dieren in vergelijking met niet-cachectische dieren van dezelfde groep. Deze resultaten tonen aan dat, terwijl cachexia door voedseltekort leidt tot hogere concentraties van zware metalen in de weefsels, aan de andere kant er mogelijk een causaal verband bestaat tussen deze blootstelling en een algemene staat van verzwakte lichaamscondities (Debacker et al. 2001a).

In de context zijn metaal-speciatie en de mogelijke binding met metaalbindende proteïnen, metallothioneïnen (MT) van bijzonder belang. Onze resultaten suggereren dat de synthese van MT in zeekoeten gezien kan worden als een algemene respons op stress. Deze MT worden geacht een beschermend effect te genereren tegen de toxiciteit van vrije Cu-ionen (Debacker et al. 2001b).

## Zeezoogdieren

De Zuidelijke Noordzee is het natuurlijk habitat van voornamelijk vier species van zeezoogdieren: bruinvis *Phocoena phocoena*, gewone zeehond *Phoca vitulina*, grijze zeehond *Halichoerus grypus* en witsnuitdolfijn *Lagenorhynchus albirostris*. Bruinvis is veruit de meest algemene soort in de Noord-Atlantische en de Noordzee-regio (Hammond et al. 1995). Andere soorten, zoals witflankdolfijn *Leucopterus acutus*, klapmuts *Cystophora cristata*, potvis *Physeter macrocephalus* gewone vinvis *Balaenoptera physalus* worden zelden gesignaleerd in de Noordzee, en slechts sporadisch in de Zuidelijke Bocht (Camphuysen and Winter, 1995; Hammond et al. 1995). Van 1997 tot 2001 werden 77 bruinvissen onderworpen aan een autopsie; er was geen vast patroon van aanspoelen doorheen de verschillende jaren. Opvallend waren wel de grote aantallen tijdens de jaren 1999 en 2001. In een merendeel van de bruinvissen werd een sterke vorm van vermagering vastgesteld (60%). De helft van de dieren werden eveneens getroffen door een acute vorm van longontsteking (49%) of een uitgebreide multisystemische parasitose (51%). Doorgaans was het niet abnormaal om meer dan één mogelijke doodsoorzaak te identificeren bij eenzelfde dier; de verschillende pathologische condities zijn dan ook sterk met elkaar verbonden. Vermagering (emaciatie) wordt gekarakteriseerd door een algemeen verlies van gewicht, een verdunning van de vetlaag, maar ook door een atrofie van de dorsale spiermassa. Een status van acute bronchopneumonie wordt gekenmerkt doordat grote delen van de longen aangetast zijn door haemorrhagische vlekken en/of door het gegeven dat er etterende vloeistof uit het longparenchym sijpelt. Vaak was een dergelijke toestand geassocieerd met een massief voorkomen van nematoden in de luchtwegen. De tweede meest voorkomende pathologie was een zware en uitgebreide parasitosis, gekenmerkt door een zware aantasting van multipele organen en de daaraan verboden laesies zoals bronchopneumonie, chronische ulceratieve gastritis en chronische hepatitis. Bijvangst in visnetten kon worden vastgesteld als zijnde verantwoordelijk voor minstens 20% van de aangespoelde bruinvissen. In drie gevallen kon rechtstreeks worden gerapporteerd, in alle andere gevallen werden de dieren vermoedelijk terug in zee gegooid na te zijn bovengehaald in de netten (Jauniaux et al. 2002).

In de periode 1997 tot 2001 werden een totaal van 36 gewone zeehonden onderworpen aan een necropsie. De meest voorkomende kenmerken waren een emaciatie met een reductie van de vetlaag en een atrofie van de spieren, acute bronchopneumonie en enteritis; 3 zeehonden vertoonden sporen van trauma (verschillende spierhaematomas en botbreuken). Een van de zeehonden werd op het strand aangereden door een motorfiets, voor de andere twee is er geen aanwijsbare verklaring voor de verwondingen. Verdrinking in netten was de doodsoorzaak van minstens 3 gewone zeehonden. Tijdens de zomer van 1998 werden 7 zeehonden geïdentificeerd als zijnde geïnfecteerd met morbillivirus (Jauniaux et al. 2001). Bijkomend, en in de naloop van de massale sterfte van 1998, werden nog eens 5 dieren positief bevonden op basis van chemische immunohistologie (n=2) of RT-PCR (n=5).

Tussen 1997 en 2001 werden 4 gewone vinvissen onderzocht waarvan er één strandde op de Belgische kust (Raversijde, 1997), één vast kwam te zitten in een Nederlandse haven (Vlissingen, 2001) en twee strandden op de kusten van Noord Frankrijk (Wimereux, 1998; Dunkerque, 1999). Alle vier waren het immature wijfjes, plusminus 1 jaar oud. Twee van deze vinvissen scoorden positief voor morbillivirusinfectie op basis van chemische immunohistologie, bevestigd door RT-PCR, ultrastructuurtesten en serologisch onderzoek.

Mariene zoogdieren zijn goede indicatoren voor de mate van verspreiding en accumulatie van persistente polluenten in het mariene milieu. Mede onder invloed van hun hoge positie in het trofisch web, hun lange levensduur en de hoge halfwaardetijden voor eliminatie van een aantal moleculen zullen ze grote hoeveelheden polluenten accumuleren. Mogelijke effecten van persistente organische polluenten in normale concentraties werden uitgebreid bestudeerd bij zeehonden van de Waddenzee (Reijnders et al. 1986). Andere studies proberen ook een link te leggen tussen de concentraties van zware metalen en een aantal veel voorkomende

pathologieën bij zeezoogdieren (Hyvärinen and Sipilä, 1984; Siebert et al. 1999; Bennet et al. 2001).

PCB-concentraties in blubber van bruinvissen van de Zuidelijke Noordzee, uitgedrukt als ICES7, variëren 1.25 and 36  $\mu\text{g/g}$  op versgewicht-basis ( $n=18$ ). De congenere 153, 138 en 180 zijn samen goed voor 90% van deze ICES7 in alle weefsels met CB 153 variërend tussen 33 and 53 %. Deze waarden zijn van eenzelfde grootteorde als vermeld in eerdere studies in de Zuidelijke Noordzee (Van Scheppingen et al. 1999) of langs de Engelse kust (Kuiken et al. 1993; Jepson et al. 1999). Ook zeehonden in bv. de sterk gepollueerde Baai van St. Laurent, Canada, vertonen concentraties van eenzelfde orde (Bernt et al. 1999). De relatie van concentraties met leeftijd is niet uitgesproken duidelijk. Niettegenstaande vertonen alle oudere vrouwelijke dieren relatief lage concentraties, ongetwijfeld een gevolg van de excretie van organochloren via lactatie.

Concentraties van zware metalen zijn niet enkel afhankelijk van de concentraties in de omgeving, ze worden ook in hoge mate bepaald door biologische factoren zoals voedselkeuze en leeftijd (Das et al. 2002 a). Bij mariene zoogdieren werden zeer grote verschillen vastgesteld wat betreft de concentraties van Cd. De hoogste concentraties werden opgetekend in de nierweefsels van pelagische soorten zoals bv. potvis (Holsbeek et al. 1999; Das et al. 2000c). Cadmium-concentraties waren eveneens zeer hoog bij 2 witflankdolfijnen en 1 klapmuts, maar waren anderzijds laag in witsnuitdolfijn, bruinvis, grijze en gewone zeehond. De hoge waarden in potvis, witflankdolfijn en klapmuts zijn ongetwijfeld gebonden aan de voedselvoorkeur van deze soorten. Met name worden mariene zoogdieren die zich voeden met inktvisachtigen geacht hogere waarden voor cadmium op te tekenen, en dit zowel in de lever als in de nieren. (Bustamante et al. 1998).

De concentraties van zware metalen, zoals ze worden opgetekend in bruinvis van de Zuidelijke Noordzee, zijn hoog in vergelijking met referentiewaarden in de literatuur. Bruinvissen uit de Noordzee blijken significant hogere concentraties van zink en koper te accumuleren dan bv. bruinvissen van de Baltische of de Zwarte Zee. Siebert et al. (1999) beschreven reeds dat bruinvissen uit de Noordzee een significante hoeveelheid kwik accumuleren. De hoge concentraties in de weefsels van bruinvissen uit de Noordzee geven aan dat kwik een meer belangrijke bedreiging vormt voor dieren van deze regio, dan bv. het geval is voor dieren van het Balticum.

Cadmium en kwikconcentraties zijn sterk gelieerd aan de lengte, m.a.w. aan de leeftijd van de dieren. Hoe dan ook zou een systematisch onderzoek naar de exacte leeftijd van de onderzochte dieren een nog beter inzicht in de materie kunnen bieden.

Het meten van effecten van toxische metalen op levende walvisachtigen zijn, op ethische grond, niet wenselijk. Een mogelijke indirecte aanpak is het systematisch vergelijken van post-mortem resultaten m.b.t. de ziekte-toestand van gecontamineerde dieren, bij voorkeur in een groot aantal individuen van eenzelfde soort.

De concentraties van zware metalen werden vergeleken tussen de groepen van enerzijds normale, anderzijds sterk vermagerde dieren; de concentraties van zink en selenium in de lever van jonge en uitgeputte dieren was significant hoger dan in de controlegroep. Bij adulte dieren daarentegen, werden er geen verschillen tussen beide groepen vastgesteld. Ook voor de andere zware metalen (Cd, Cu, Ni, Cr, Pb, Hg, Fe) werden geen verschillen gevonden tussen beide groepen, zowel bij juveniele als bij adulte dieren ( $p > 0.1$ ).

Hoge concentraties van zink in sterk vermagerde jonge dieren zijn waarschijnlijk gelieerd met een fenomeen van herverdeling uit andere organen of uit de spieren (Bennet et al. 2001). Bij ratten werd vastgesteld dat zink werd herverdeeld in relatie tot een katabolisme van de proteïnen, en dat stijgende zinkconcentraties gerelateerd zijn met een verlies van levermassa (Krämer, 1993). Niettegenstaande deze vaststelling blijkt een verre staat van cachexie bij bruinvis geen daling van de levermassa teweeg te brengen (Siebert, pers. comm.). Dit zou er op kunnen wijzen dat de verhoogde concentraties in de lever eerder te wijten zijn aan

eiwitverbruik in de spieren, eerder dan aan een katabolisme in de lever. Alhoewel de niveaus van zware metalen bij invloed worden door effecten van vermagering, gaan we er toch van uit dat de hoge concentraties die we vinden in bruinvissen van de Noordzee mogelijk mee de basis liggen van processen die kunnen leiden tot een algemene staat van verzwakking en emaciatie.

Metallothioneïnen (MT) spelen een centrale rol in de homeostasis van zware metalen, ook bij mariene zoogdieren (Das et al. 2000a, 2002b). Het onderzoek m.b.t. MT werd uitgevoerd bij een geselecteerd staal van bruinvissen met een algemene goede staat van bewaring. Na meting van de totale hoeveelheid eiwitten werd vastgesteld dat de MT 1.3% van de totale hoeveelheid eiwitten vertegenwoordigen. Toch binden de MT 50% van de totale lading van zink in de lever. Meer nog, bij stijgende lading van zink, zal ook de fractie die gebonden is aan de MT stijgen; dit zou er op kunnen wijzen dat deze eiwitten tussenkomen in het neutraliseren van het overschot aan zink dat vrijkomt bij de consumptie van de eiwitten in de spieren. MT zijn sterk bepalend voor de detoxificatie van Cd in de nieren; gemiddeld 56% van de totale hoeveelheid is er aan geboden. In het geval van kwik, spelen de MT geen rol, noch in lever, noch in nieren. Kwik wordt dan ook teruggevonden in de pellet-fractie na centrifugatie.

### **Algemene conclusies**

Zeezoogdieren en zeevogels worden in de Noordzee blootgesteld aan een reeks van natuurlijke of antropogene stressfactoren. Chronische en acute olievervuiling blijft een belangrijke oorzaak van mortaliteit van zeevogels; er werd evenwel aangetoond dat voedseltekort eveneens een grote impact heeft op zowel de algemene staat van de zeezoeten als op de concentraties van zware metalen in de weefsels. Wat betreft bruinvis, zijn de algemene vaststellingen m.b.t. tot de doodsoorzaken, sterk vergelijkbaar met de conclusies voor de aangrenzende zones van de Noordzee. Verstikking in visnetten blijft een belangrijke doodsoorzaak, al blijkt de impact minder belangrijk te zijn dan in andere zones van de Noordzee. Onze gegevens lijken er op te wijzen dat een staat van emaciatie en een sterke infectie met parasieten de bruinvissen voorbestemmen tot een status van algemene aftakeling en een uiteindelijke aantasting door longontsteking. Een acute vorm van longontsteking wordt beschouwd als de uiteindelijke doodsoorzaak in 49% van de gevallen. Infectieuze ziektes werden vastgesteld bij 50% van de zeehonden. In het merendeel van de gevallen is dit een infectie door morbillivirus. Deze bevindingen zijn de eerste aanwijzing van distemper in de Noordzee na de massale sterfte van 1988. De andere helft van de dode zeehonden vertoonde sporen van bijvangst of zeer zware traumatische wonden. Een infectie door morbillivirus werd eveneens vastgesteld bij 2 van de 4 gewone vinvissen. Dit was de eerste keer dat morbillivirus-infecties met zekerheid werden vastgesteld bij baleinwalvissen. Bij gewone zeezoet gaan we er van uit dat een status van ondervoeding, en een aanpassing van het metabolisme om hieraan het hoofd te bieden, in het algemeen leidt tot een herverdeling van koper en zink -maar ook van organochlore residu's- tussen de weefsels. De opnieuw in omloop gebrachte contaminanten zullen terecht komen in een reeks van 'target'-organen, waar ze concentraties kunnen bereiken die uiteindelijk kunnen aanleiding geven tot een algemeen status van verzwakking. Concentraties van zware metalen in mariene zoogdieren vertonen sterke intra- and interspecifieke verschillen ten gevolge van verschillen in geografische herkomst, leeftijd, dieet, positie in de trofische keten, maar ook op basis van de status m.b.t. voeding van het individu. Zn, Cu, Hg en organochlore concentraties zijn in het algemeen hoger in bruinvissen van de Zuidelijke Noordzee dan in populaties van andere regio's. Leverconcentraties van Zn en Se zijn significant hoger in sterk vermagerde juveniele dieren, wat kan wijzen op een zware verstoring van de algemene metaal-homeostasis. Metallothioneïnen blijken een cruciale rol te spelen in de homeostasis van zink en koper en in de detoxificatie van cadmium. Kwik, daarentegen, is eerder geboden aan selenium, een gevolg detoxificatie door vorming van tiemannite-partikels.

Het onderzoek stelde ons in staat om nieuwe inzichten te verkrijgen in de mogelijke rol die stabiele pollutanten spelen in algemene processen die leiden tot verzwakking en dood van zowel zeezoeten als mariene zoogdieren. Nieuwe inzichten werden verkregen in de complexe verhoudingen tussen enerzijds de niveaus van stabiele pollutanten, en anderzijds hun mogelijke

rol in de inductie van negatieve effecten op de 'fitness' van de individuen. Niettegenstaande er voor beide groepen van toppredatoren –in het geval van normale, robuuste dieren- geen aanwijzingen zijn voor een onmiddellijke negatieve impact op toxicologisch vlak, moet er rekening gehouden worden met de rol die contaminanten kunnen spelen in een algemene status van verzwakking en achteruitgang van de algemene gezondheidsstatus.

## References

- Bennet, P.M., Jepson, P.D., Law, R.J., Jones, B.R., Kuiken, Y., Baker, J.R., Rogan, E., Kirkwood, J.K. 2001. Exposure to heavy metals and infectious disease mortality in harbour porpoises from England and Wales. *Environ. Pollut.* 112: 33-40.
- Bernt, K.E., Hammill, M.O., Lebeuf, M., Kovacs, K.M. 1999. Levels and patterns of PCBs en OC pesticides in harbour and grey seals 1999. *Sci. Total Environ.* 243-244: 243-262.
- Bustamante, P., Caurant, F., Fowler, S.W., Miramand, P. 1998. Cephalopods as a vector for the transfer of cadmium to top-predators in the north-east Atlantic ocean. *Sci. Total Environ.* 220: 71-80.
- Camphuysen, C.J. and Winter, C.J.N. 1995. Feeding fin whales *Balaenoptera physalus* in the North Sea. *Lutra* 38: 81-84.
- Das, K., Debacker, V., Bouquegneau, J.M. 2000a. Metallothioneins in marine mammals. *Cell. Mol. Biol.* 46: 283-294
- Das, K., Debacker, V., Lepoint, G., Gobert, S., Holsbeek, L., Joiris, C.R., Bouquegneau, J.M. 2000b. Marine mammals stranded on the Belgian and Dutch coasts: Approach of their feeding ecology by stable isotope and heavy metal measurements. *Pp.* 219-222 in: *European Research on Cetaceans*. Proceedings of the Fourteenth Annual Conference of the European Cetacean Society, Cork, Ireland, 2-5 April 2000 (Eds. P.G.H. Evans, R. Pitt-Aiken, E. Rogan) 384pp.
- Das, K., Lepoint, G., Loizeau, V., Debacker, V., Dauby P. and Bouquegneau, J.M. 2000c. Tuna and dolphin associations in the Northeast Atlantic: Evidence of different ecological niches from stable isotope and heavy metal measurements. *Mar. Pollut. Bull.* 40: 102-109.
- Das, K., Debacker, V., Pillet, S. and Bouquegneau, J.M. 2002a. Heavy metals in marine mammals. In: *Toxicology of Marine Mammals*, Taylor and Francis publishers Washington D.C. In press.
- Das K., Jacob V., Bouquegneau J.M. 2002b. White-sided dolphin metallothioneins: Purification, characterisation and potential role. *Comp. Biochem. Physiol. A*. In press.
- Debacker, V., Holsbeek, L., Tapia, G., Gobert, S., Joiris, C.R., Jauniaux, T., Coignoul, F., Bouquegneau, J.-M. 1997. Ecotoxicological and pathological studies of common guillemots *Uria aalge* beached on the Belgian coast during six successive wintering periods (1989-90 to 1994-95). *Dis. Aquat. Org.* 29: 159-168.
- Debacker, V., Jauniaux, T., Coignoul, F., Bouquegneau, J.-M. 2000. Heavy metals contamination and body condition of wintering guillemots (*Uria aalge*) at the Belgian coast from 1993 to 1998. *Environ. Res.* 84 (3) : 310-317.
- Debacker, V., L.-S. Shiettecatte, Jauniaux T. and Bouquegneau J.M. 2001a. Influence of age, sex and body condition on zinc, copper, cadmium and metallothioneins in common guillemots (*Uria aalge*) stranded at the Belgian coast. *Mar. Environ. Res.* 52: 427- 444.
- Debacker, V., Rutten, A., Jauniaux, T., Daemers, C., Bouquegneau, J.-M. 2001b. Combined effects of experimental heavy metals contamination (Cu, Zn and Hg) and starvation on quails: body condition and parallelism with a wild seabird population of common guillemots (*Uria aalge*). *Biol. Trace Elem. Res.* 82: 87-107.
- Flint, P.L. and Fowler, A.C. 1998. A drift experiment to assess the influence of wind on recovery of oiled seabirds on St Paul Island, Alaska. *Mar. Pollut. Bull.* 36(2): 165-166.
- Foulkes, E.C. 1990. The concept of critical levels of toxic heavy metals in target tissues. *Toxicology* 20 (5) : 327-339.
- Hammond, P.S., Benke, H., Berggren, P., Borcher, D.L., Buckland, S.T., Collet, A., Heide-Jørgensen, M.P., Heimlich-Boran, S., Hiby, A.R., Leopold, M.F., Lien, N. 1995. Distribution and abundance of the

- harbour porpoise & other small cetaceans in the North Sea & adjacent waters. Life 92-2/UK/027 Final Report, 240 pp.
- Holsbeek, L., Joiris, C., Debacker, V., Ali I., Roose, P., Nellissen, J.P., Gobert, S., Bouquegneau, J.M., Bossicart, M. 1999. Heavy metals, organochlorines and polycyclic aromatic hydrocarbons in sperm whales stranded in the Southern North Sea during the 1994/1995 winter. *Mar. Pollut. Bull.* 38: 304-313.
- Hyvärinen, H., Sipilä, T. 1984. Heavy metals and high pup mortality in the Saïmaa ringed seal population in Eastern Finland. *Mar. Pollut. Bull.* 15 (9): 335-337.
- Jauniaux, T., Brosens, L., Coignoul, F. 1997. Lesions observed on stranded seabirds along the Belgian coast from 1992 to 1995. *ICES J. Mar. Sc i.* 204: 714-717.
- Jauniaux, T., Brosens, L., Meire, P., Offringa, H., Coignoul, F. 1998. Pathological investigations on guillemots (*Uria aalge*) stranded on the Belgian coast during the winter 1993-94. *Vet. Rec.* 143: 387-390.
- Jauniaux, T., Boseret, G., Desmecht, M., Halters, J., Manteca, C., Tavernier, J., Van Gompel, J., Coignoul F. 2001. Morbillivirus in common seals stranded on the coasts of Belgium and Northern France during summer 1998. *Vet. Rec.* 148: 587-591.
- Jauniaux, T., Petitjean, D., Brenez, C., Borrens, M., Brosens, L., Haelters, J., Tavernier, J., Coignoul, F. 2002. Post-mortem findings and causes of death of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) stranded from 1990 to 2000 along the coastlines of Belgium and Northern France. *J. Comp. Pathol.* Accepted.
- Jepson, P.D., Bennett, P.M., Allchin, C.R., Law, R.J., Kuiken, T., Baker, J.R. 1999. Investigating potential associations between chronic exposure to polychlorinated biphenyls and infectious mortality in harbour porpoises from England and Wales. *Sci. Total Environ.* 243-244: 339-348.
- Joiris, C.R., Tapia, G., Holsbeek, L. 1997. Increase of organochlorines and mercury levels in common guillemots *Uria aalge* during winter in the southern North Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 34 : 1049-1057.
- Krämer, K., Markwitan, A., Menne, A., Pallauf, J. 1993. Zinc metabolism in fasted rats. *J. Trace Elem.* 7:141-146
- Kuiken, T., Bennet, P.M., Allchin, C.R., Kirkwood, J.K., Baker, J.R., Lockyer, C., Walton, M.J., Sheldrick, M.C. 1994. PCBs, cause of death and body condition in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from British waters. *Aquat. Toxicol.* 28: 13 - 28.
- Nicholson, J.K., Kendall, M.D., Osborn, D. 1983. Cadmium and mercury nephrotoxicity. *Nature* 304 (18): 633-635.
- Offringa, H., Meire, P., van den Bossche, W. 1995. Tellingen van gestrande zeevogels langs de Vlaamse kust, november 1993-maart 1994, Rapport IN 95.5. Rapport IN 95.5 Institute of Nature Conservation, Hasselt.
- Offringa, H., Seys, J., Van Den Bossche, W., Meire, P. 1996. Seabirds on the Channel doormat. *Le Gerfaut* 86: 3-71.
- Piatt, J.F. and Ford, R.G. 1996. How many seabirds were killed by the Exxon Valdez oil spill ? *American Fisheries Society Symposium* 18: 712-719.
- Piatt, J.F. and Van Pelt, T.I. 1997. Mass-mortality of Guillemots (*Uria aalge*) in the Gulf of Alaska in 1993. *Mar. Pollut. Bull.* 34 (8):656-662.
- Reijnders, P.J.H. 1986. Reproductive failure in common seals feeding on fish from polluted coastal waters. *Nature* 324: 456-457.
- Seys, J., Offringa, H., Van Waeyenberge, J., Meire, P., Kuijken, E. (submitted a). Long-term changes in oil pollution off the Belgian coast: evidence from beached bird monitoring.
- Seys, J., Offringa, H., Van Waeyenberge, J., Meire, P., Kuijken, E. (submitted b). Numbers of beached bird corpses and mortality of seabirds, how do they relate: a North Sea study in a wider context.
- Siebert, U., Joiris, C., Holsbeek, L., Benke, H., Failing, K., Failing, K., Frese, K., Petzinger, E. 1999. Potential Relation between mercury concentrations and necropsy findings in Cetaceans from German waters of the North and Baltic seas. *Mar. Pollut. Bull.* 38: 285-295.

- Tapia, G.R. 1998. Mercury and organochlorines in the common guillemot *Uria aalge* wintering in the southern North Sea. Ph.D Thesis, Faculty of Medicine and Pharmacy, Free University of Brussels, Belgium.
- van Scheppingen, W.B., Verhoeven, A.J.I.M, Mulder, P., Addink M.J., Smeenk, C. 1996. Polychlorinated biphenyls, dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) stranded on the Dutch coast between 1990 and 1993. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 30: 492 - 502.

# First scientific support plan for a sustainable development policy (SPSD I)

## *Programme "Sustainable management of the North Sea"*

**North Sea seabirds and marine mammals : pathology and ecotoxicology.**

### **Summary of the research**

**Bouquegneau J.-M.<sup>1.</sup>, Coignoul, F.<sup>2.</sup>, Das, K.<sup>1</sup>, Debacker, V.<sup>1</sup>, Haelters, J.<sup>3</sup>, Holsbeek, L.<sup>4</sup>, Jauniaux, T.<sup>2</sup>,  
Joiris, C.<sup>4</sup>, Stienen, E.<sup>5</sup>, Tavernier, J.<sup>6</sup>, Van Waeyenberge, J.<sup>5</sup>**

<sup>1</sup> Oceanology, University of Liège, B6c Sart Tilman B-4000 Liège.

<sup>2</sup> Pathology Department of the Veterinary College, University of Liège, B43 Sart Tilman, B-4000 Liège.

<sup>3</sup> Department of Marine Ecosystem Management (Management Unit of the North Sea Mathematical Models – MUMM) ;

3<sup>e</sup> en 23<sup>e</sup> Linieregimentsplein, B-8400 Oostende.

<sup>4</sup> Laboratory for Ecotoxicology and Polar Ecology, Free University of Brussels, Pleinlaan, 2, B-1050 Brussels.

<sup>5</sup> Institute of Nature Conservation, Kliniekstraat, 25, B-1070 Brussels.

<sup>6</sup> Royal Belgian Institute of Natural Sciences (RBINS), Biological Conservation, Vautierstraat, 29, B-1000 Brussels.

## General introduction

Over the past five years several major priority research actions were taken by the federal authorities within the framework of the program 'Sustainable Management of the North Sea'. In particular, the study of the health of the population of seabirds and marine mammals along the Belgian coast, its temporal evolution, the observed pathologies and contaminations as well as the possible causes of unusual mortalities were investigated by a multidisciplinary group of scientists backed up by a solid technical team, the MARIN group (Marine Animals Research and Intervention Network).

The Southern North Sea and in particular the Flemish Banks support a large population of wintering seabirds. During this period, many of them are found stranded dead or moribund on the shore. On the contrary, marine mammals are less numerous in the area and can be found stranded all year round. Oiling, however recently declining (Seys et al., submitted a) was found to be the major direct cause of death for at least half of the beached birds. For marine mammals different lesions and diseases leading to a progressive debilitation of the individuals were observed.

However, indirect causes of the death of individuals of these two top predator groups, most often combined as a succession of stressful conditions (bad weather conditions, scarcity of food, starvation, contamination, diseases, ...) were still debatable and needed further research. This was the main objective of the scientific research of the MARIN group within the framework of the programme 'Sustainable Management of the North Sea'.

## Seabirds

Evidence of pollutants accumulation and possible detrimental effects in wild bird species has received great attention during the last decades. A vast majority of these studies referred to robust individuals but not much research work has been devoted to the study of the potential detrimental effects of pollutants on debilitated specimens. Stranded debilitated seabirds represent a choice material offering a wide range of conditions often closely related. They are also likely to be more susceptible to the contaminants' potential detrimental effects compared to laboratory animals as they have to face a range of other (natural and anthropogenic) stressors (Nicholson et al. 1983 ; Foulkes, 1990). This study presents a first attempt to clarify the potential existing links between pathological and toxicological findings and precise the role of heavy metals and organochlorines as additional debilitating agents in a population of wintering common guillemots found stranded at the Belgian coast (Offringa et al. 1995,1996).

Stranded common guillemots collected on our coasts most likely represent only a small fraction of the total population at sea during the winter as not all dying birds at sea are recovered on beaches (Piatt and Ford, 1996; Flint and Fowler, 1998). However, a comparison with the population found wintering in the southern North sea is difficult as an unknown percentage of the individuals at sea will eventually strand on our coasts while the others either sink, are eaten by scavengers or simply drift away. The individuals collected at the Belgian coast are believed to originate mainly from the north-eastern Scottish colonies.

To evaluate the chance of recovery of the corpses drifting experiments were carried out off the Belgian coast. Results indicated a strong influence of the wind climate (direction and velocity) in the days after the dropping: the closer to the coast the corpses are released, the higher the probability that they will wash ashore. In addition, persistence experiments demonstrated that a bird corpse remains on the beach for 5.8 – 13.3 days, with the minimal value probably being the more realistic one (Seys, submitted b).

Stranded specimens presented evident signs of a progressive debilitation and were recovered in a general very poor health status. At necropsy, among other findings, a large majority of these common guillemots presented clear signs of a general emaciation characterised by a mild to severe atrophy of the pectoral muscles and complete absence of subcutaneous and/or

abdominal fat deposits (cachectic status) (Jauniaux et al. 1997, 1998). These features largely confirm that a large majority of the common guillemots had to rely on their protein reserves as an energy source prior to dying. Other frequent lesions considered as most common cause of death was **acute hemorrhagic gastroenteropathy** (AHGE).

In this context, we examined the organochlorines and heavy metal levels in the tissues of cachectic versus non cachectic guillemots. The cachectic birds clearly displayed higher renal and hepatic Cu, Zn, total and inorganic Hg and PCBs levels. These differences became even more striking when taking into account the different categories attributed to the cachectic status: the more cachectic the bird the higher the Cu and Zn levels found in the tissues. In addition, when statistically testing the potential influence of different variables (explanatory variables : sex, age, presence or absence of oiling, presence or absence of - AHGE - and cachexia severity) on heavy metal levels (response variables), using a multiple regression analysis, the cachectic status has been shown to significantly affect hepatic, renal and pectoral muscle Cu and Zn concentrations (Debacker et al. 1997, 2000).

In response to combined environmental stressors (*e.g.* cold weather, starvation, oiling, ...), the common guillemot's body and organs weight were shown to significantly decrease in cachectic individuals. As a result of this general weight loss, trace elements and organochlorine concentrations significantly increase in the tissues. Despite the tissues' weight loss, total lipid contents of both liver and pectoral muscles also decreased significantly underlining the use of fat reserves as energy source prior to protein catabolism. These results suggested that a general redistribution of heavy in the organs is likely to occur as a result of prolonged starvation and protein catabolism.

Compared to guillemots collected in more preserved areas of the North Sea, specimens collected at the Belgian coast were shown to display higher concentrations of Cu, Zn and total Hg. A specific study of Hg and organochlorines (total PCBs and p,p'-DDE) concentrations in the same individuals demonstrated that significantly higher levels of these contaminants were detected in the common guillemots while wintering in the southern North Sea (Joiris et al. 1997 ; Tapia, 1998). The authors discussed both a seasonal cyclic contamination-decontamination pattern and higher anthropogenic contaminant inputs (for Hg and organochlorines) in the southern North Sea. Although no seasonal pattern was observed for either Cu, Zn, Fe and Cd in our sample, evidence of a more contaminated Southern North Sea appeared while comparing heavy metal levels between common guillemots collected in Brittany (France), following Erika's oil spill to those collected at the Belgian coast.

A set of experiments using the common quail was developed to test the combined effect of contamination (using Cu, Zn and CH<sub>3</sub>Hg) and starvation. A cachectic status was shown to develop in half of the quails which were both contaminated and fasted while the fasted non contaminated counterparts did not display any cachectic characteristics. In addition, higher heavy metal levels were detected in the tissues of the cachectic quails (fasted and contaminated) compared to non cachectic specimens of the same group. These results tend to suggest that, although cachexia linked to starvation clearly influenced heavy metal levels in the tissues, those encountered high levels could well, in turn, be active participants favouring a generalised debilitated body condition (Debacker et al. 2001a).

In this general described context, examining the metals' speciation - and more specifically their possible binding to metallothioneins (MTs) - became of interest. The results suggest that MT synthesis could be viewed as a general response to stressing conditions for stranded common guillemots, as it appears to offer a cytoprotective effect against free Cu ions toxicity (Debacker et al. 2001b).

## **Marine mammals**

The Southern North Sea is part of the distribution area of at least four marine mammal species : the harbour porpoise, *Phocoena phocoena*, the harbour seal *Phoca vitulina*, the grey seal

*Halichoerus grypus* and the white-beaked dolphin *Lagenorhynchus albirostris*. The harbour porpoise is by far the most common species in the Northeast Atlantic and the North Sea (Hammond et al. 1995). Other species like white-sided dolphins *Leucopterus acutus*, hooded seals *Cystophora cristata*, sperm whales *Physeter macrocephalus* and fin whales *Balaenoptera physalus* can be sighted or occasionally found stranded but are still considered as very rare in the North Sea and especially in its Southern Bight (Camphuysen and Winter, 1995 ; Hammond et al. 1995).

Between 1997 and 2001, 77 porpoises were necropsied . The annual distribution was very irregular with major rises in 1999 and 2001. The most common findings were severe emaciation (60 %), acute bronchopneumonia (49 %), and extended multisystemic parasitosis (51 %). It was usual to find more than one apparent cause of death in one porpoise, fatal conditions being closely interwoven. Severe emaciation was characterised by weight loss, reduced blubber layer thickness and dorsal muscle atrophy. Acute bronchopneumonia was characterised by large areas of lung consolidation with haemorrhagic and/or purulent fluid oozing from the lung parenchyma. Most often, it was associated with massive nematodes infestation in airways. The second most frequent observation was severe and extended parasitosis consisting of heavy infestations of multiple organs with associated lesions of bronchopneumonia, chronic ulcerative gastritis and chronic hepatitis. By-catch in fishing nets was considered to be the cause of death of at least 20 % of the porpoises. Three animals were known by-catches, while others were suspected of having been thrown back into the water after capture (Jauniaux et al. 2002).

Thirty-six harbour seals were necropsied during the 1997-2001 period. The main findings were emaciation with reduction or absence of fat and muscles atrophy, acute bronchopneumonia and enteritis. In addition, 3 seals had evidence of trauma (numerous muscle hematomas and bone fractures). One of these seals was crushed by a motorbike when it was laying on the beach while the origin of the trauma for the 2 others was not determined. At least 3 common seals had drowned in fishing gear. Seven seals were infected by a morbillivirus during the 1998 summer (Jauniaux et al. 2001). In addition, five other cases were diagnosed positive after the 1998 epizootia by immunohistochemistry (n=2) or RT-PCR (n=5).

Between 1997 and 2001, 4 fin whales were necropsied, one being stranded on the Belgian coast (Raversijde, 1997), one being trapped in a Dutch harbour (Vlissingen, 2001) and two coming ashore in northern part of France (Wimereux, 1998; Dunkerque, 1999). All were immature females, aged about 1 year. Two whales had evidence of morbillivirus infections obtained by immunohistochemistry and confirmed by RT-PCR, ultrastructural investigations, and serology.

Marine mammals appear to be potentially valuable indicators of the level of persistent contaminants accumulated in the marine environment. According to their top position in the trophic network, their long life span and their long biological half-time of elimination of pollutants, these animals can accumulate high levels of these compounds. Several investigations have been carried out in an attempt to evaluate organic contaminant effects at ambient environmental levels (Reijnders et al. 1986). However, few studies have tried to link marine mammal health status and metal level within the North Sea and adjacent areas (H yvarinen and Sipil a, 1984; Siebert et al. 1999; Bennet et al. 2001).

PCB concentrations in blubber of harbour porpoises from the Southern North Sea, expressed as ICES7 ranged between 1.25 and 36  $\mu\text{g/g}$  on a fresh weight basis (n=18), with CBs 153, 138 and 180 covering over 90% of ICES7 in all tissues and CB 153 in particular ranging between 33 and 53 %. These values are of a same order as the ones recorded earlier for the same area (Van Scheppingen et al. 1999) in harbour porpoises stranded on the English coasts (Kuiken et al. 1993; Jepson et al. 1999) as well as in *e.g.* seals from the polluted Bay of St. Laurent, Canada (Bernt et al. 1999). A relation with age is not distinct, though all the older females show low concentrations as a result of the excretion of organochlorine through lactation.

Heavy metal concentrations depend not only on the environment contamination but also on several other biological factors such as the diet or the age (Das et al. 2002 a). Marine mammals display strong interspecific Cd concentrations. The highest Cd concentrations were observed in the kidney of the oceanic feeders such as sperm whales (Holsbeek et al. 1999; Das et al. 2000c). Cd values were also very high for the 2 white-sided dolphins and the hooded seal but were relatively low in white-beaked dolphin, harbour porpoise, grey and harbour seal kidneys. The high concentrations in the hooded seal, sperm whales and white-sided dolphins are likely to be diet related as teuthophageous marine mammals display elevated Cd concentrations in their livers and kidneys (Bustamante et al. 1998).

Trace metal concentrations measured in harbour porpoises stranded on the Southern North Sea coasts were higher compared with data available from the literature. It appears that harbour porpoises from the North Sea can display high hepatic Zn and Cu concentrations when compared to porpoises from the Baltic or the Black Sea. Siebert et al.(1999) observed that harbour porpoises from North Sea are carrying a significant burden of mercury. The higher mercury content in organs from harbour porpoises from the North Sea indicated that mercury is a more important threat for animals of this region than for animals of the Baltic Sea.

Cd and Hg accumulate strongly with length in most marine mammal tissues analysed reflecting an age accumulation. Nevertheless, a systematic age determination should provide a better understanding of this process.

Potential effects of toxic metals cannot be tested in free-living cetaceans because experimental manipulations are undesirable. One approach to this problem is to carry out systematic post-mortem investigations to establish the disease status of contaminated animals in a relatively large number of individuals from the same species.

Trace metal concentrations were compared between emaciated and non-emaciated porpoises. Hepatic Zn and Se concentrations measured were significantly higher in emaciated juveniles compared to non-emaciated ones. In adults, trace metal levels were similar between emaciated and non-emaciated porpoises. Other trace metal concentrations (Cd, Cu, Ni, Cr, Pb, Hg, Fe) were similar between emaciated and non-emaciated porpoises both for adults and juveniles ( $p > 0.1$ ).

High Zn concentrations encountered in emaciated juvenile porpoises could be related to a redistribution of zinc from other organs such as liver or muscle (Bennet et al. 2001). Indeed, food deprivation in rat can lead to a redistribution of the hepatic Zn due to protein catabolism and the increase of hepatic zinc concentration is related to a loss of the liver mass (Krämer, 1993). However during the emaciation process displayed by porpoises, no loss of liver mass has been observed (Siebert, *pers. comm.*), indicating that the increase of hepatic Zn concentration might be related to muscle rather than liver protein catabolism. Although emaciation can influence the heavy-metal levels, the high levels encountered in the porpoises from the Southern North Sea could possibly favour a debilitating process leading to emaciation.

Metallothioneins have been shown to play a key role in marine mammal metal homeostasis (Das et al. 2000a, 2002 b). Further investigations on MT function have been carried out on harbour porpoises displaying a good conservation state. Total proteins have been measured in the livers and it appears that MTs represent 1.3% of the total protein concentrations. Despite this low percentage, MTs appear to play a key role as binding 50 % of the total hepatic Zn. Moreover, when Zn increases in the liver, its percentage bound to MTs increases suggesting that these proteins might take in charge the Zn overload resulting from the emaciation process. MTs are also involved in renal Cd detoxication as they bind 56% of the total renal Cd. Both in livers and kidney, MTs appear to have a weak role in Hg detoxication as this metal is distributed mainly in the pellet.

## General conclusions

Whithin the North Sea, both marine mammals and seabirds have to face a wide variety of natural and human induced stressful conditions. Apart from oiling (acute and chronic) which remains an important source of mortality for seabirds, starvation has been shown to greatly influence the individuals general health status as well as its heavy metals levels. For porpoises, fatal conditions observed in this study were generally similar to those described from other regions of the North Sea. Entanglement in fishing nets was an important cause of death in our series although lower compared to other countries. In our analysis, it seems that emaciation and severe parasitosis predispose porpoise to progressive debilitation, leading to pneumonia. Acute bronchopneumonia was considered to be the cause of death of 49 % of the porpoises. Infectious diseases were diagnosed on half of the seals, most of them being infected by morbillivirus. It seems to be the first evidence of distemper in the North Sea since the 1988 epizootia. The other half showed evidences by-catch or severe trauma. Similarly, morbillivirus infection was also observed in 2 out of 4 fin whales. To the authors' knowledge, this is the first firm report of morbillivirus disease in baleen whales.

While starving and re-adjusting its whole metabolism and certainly increasing it to face its demanding energy requirements, the common guillemot also undergoes a general redistribution of its Cu, Zn and organochlorine contents. This results in increasing circulating contaminants which are then re-routed towards target organs where they reach levels which, in turn, could well favour a generalised lessened body condition.

Trace metal levels in marine mammals display strong intra- and interspecies variations due to geographic origin, age, diet, trophic position but also by nutritional status of the individuals. Zn, Cu, Hg and organochlorine concentrations were higher in harbour porpoises from the Southern North Sea compared to other areas. Hepatic Zn and Se concentrations were also shown to be significantly higher in emaciated juvenile porpoises than in normal animals suggesting a severe disturbance of the metal homeostasis. Metallothioneins appear to have a key role in the homeostasis of Zn and Cu and in the detoxication of Cd. On the contrary, Hg is mainly bound to Se in the insoluble fraction of the tissue in relation with the tiemmanite detoxication process.

In view of these different points, re-assessing the role of pollutants in both debilitated stranded common guillemots and marine mammals gave a first insight of the complex interactions existing between contaminants, their potential detrimental effects and the individuals' general fitness. Although not at risk on a toxicological basis under normal conditions (robustness) these two top predators could well be adversely affected by their contaminant levels with degrading body condition.

## References

- Bennet, P.M., Jepson, P.D., Law, R.J., Jones, B.R., Kuiken, Y., Baker, J.R., Rogan, E., Kirkwood, J.K. 2001. Exposure to heavy metals and infectious disease mortality in harbour porpoises from England and Wales. *Environ. Pollut.* 112: 33-40.
- Bernt, K.E., Hammill, M.O., Lebeuf, M., Kovacs, K.M. 1999. Levels and patterns of PCBs en OC pesticides in harbour and grey seals 1999. *Sci. Total Environ.* 243-244: 243-262.
- Bustamante, P., Caurant, F., Fowler, S.W., Miramand, P. 1998. Cephalopods as a vector for the transfer of cadmium to top-predators in the north-east Atlantic ocean. *Sci. Total Environ.* 220: 71-80.
- Camphuysen, C.J. and Winter, C.J.N. 1995. Feeding fin whales *Balaenoptera physalus* in the North Sea. *Lutra* 38: 81-84.
- Das, K., Debacker, V., Bouquegneau, J.M. 2000a. Metallothioneins in marine mammals. *Cell. Mol. Biol.* 46: 283-294
- Das, K., Debacker, V., Lepoint, G., Gobert, S., Holsbeek, L., Joiris, C.R., Bouquegneau, J.M. 2000b. Marine mammals stranded on the Belgian and Dutch coasts: Approach of their feeding ecology by stable isotope and heavy metal measurements. *Pp.* 219-222 in :

- European Research on Cetaceans*. Proceedings of the Fourteenth Annual Conference of the European Cetacean Society, Cork, Ireland, 2-5 April 2000 (Eds. P.G.H. Evans, R. Pitt-Aiken, E. Rogan) 384pp.
- Das, K., Lepoint, G., Loizeau, V., Debacker, V., Dauby P. and Bouquegneau, J.M. 2000c. Tuna and dolphin associations in the Northeast Atlantic: Evidence of different ecological niches from stable isotope and heavy metal measurements. *Mar. Pollut. Bull.* 40: 102-109.
- Das, K., Debacker, V., Pillet, S. and Bouquegneau, J.M. 2002a. Heavy metals in marine mammals. In: *Toxicology of Marine Mammals*, Taylor and Francis publishers Washington D.C. In press.
- Das K., Jacob V., Bouquegneau J.M. 2002b. White-sided dolphin metallothioneins: Purification, characterisation and potential role. *Comp. Biochem. Physiol. A*. In press.
- Debacker, V., Holsbeek, L., Tapia, G., Gobert, S., Joiris, C.R., Jauniaux, T., Coignoul, F., Bouquegneau, J.-M. 1997. Ecotoxicological and pathological studies of common guillemots *Uria aalge* beached on the Belgian coast during six successive wintering periods (1989-90 to 1994-95). *Dis. Aquat. Org.* 29: 159-168.
- Debacker, V., Jauniaux, T., Coignoul, F., Bouquegneau, J.-M. 2000. Heavy metals contamination and body condition of wintering guillemots (*Uria aalge*) at the Belgian coast from 1993 to 1998. *Environ. Res.* 84 (3) : 310-317.
- Debacker, V., L.-S. Shiettecatte, Jauniaux T. and Bouquegneau J.M. 2001a. Influence of age, sex and body condition on zinc, copper, cadmium and metallothioneins in common guillemots (*Uria aalge*) stranded at the Belgian coast. *Mar. Environ. Res.* 52: 427- 444.
- Debacker, V., Rutten, A., Jauniaux, T., Daemers, C., Bouquegneau, J.-M. 2001b. Combined effects of experimental heavy metals contamination (Cu, Zn and Hg) and starvation on quails: body condition and parallelism with a wild seabird population of common guillemots (*Uria aalge*). *Biol. Trace Elem. Res.* 82: 87-107.
- Flint, P.L. and Fowler, A.C. 1998. A drift experiment to assess the influence of wind on recovery of oiled seabirds on St Paul Island, Alaska. *Mar. Pollut. Bull.* 36(2): 165-166.
- Foulkes, E.C. 1990. The concept of critical levels of toxic heavy metals in target tissues. *Toxicology* 20 (5) : 327-339.
- Hammond, P.S., Benke, H., Berggren, P., Borchert, D.L., Buckland, S.T., Collet, A., Heide-Jørgensen, M.P., Heimlich-Boran, S., Hiby, A.R., Leopold, M.F., Lien, N. 1995. Distribution and abundance of the harbour porpoise & other small cetaceans in the North Sea & adjacent waters. Life 92-2/UK/027 Final Report, 240 pp.
- Holsbeek, L., Joiris, C., Debacker, V., Ali I., Roose, P., Nellissen, J.P., Gobert, S., Bouquegneau, J.M., Bossicart, M. 1999. Heavy metals, organochlorines and polycyclic aromatic hydrocarbons in sperm whales stranded in the Southern North Sea during the 1994/1995 winter. *Mar. Pollut. Bull.* 38: 304-313.
- Hyvärinen, H., Sipilä, T. 1984. Heavy metals and high pup mortality in the Saïmaa ringed seal population in Eastern Finland. *Mar. Pollut. Bull.* 15 (9): 335-337.
- Jauniaux, T., Brosens, L., Coignoul, F. 1997. Lesions observed on stranded seabirds along the Belgian coast from 1992 to 1995. *ICES J. Mar. Sc i.* 204: 714-717.
- Jauniaux, T., Brosens, L., Meire, P., Offringa, H., Coignoul, F. 1998. Pathological investigations on guillemots (*Uria aalge*) stranded on the Belgian coast during the winter 1993-94. *Vet. Rec.* 143: 387-390.
- Jauniaux, T., Boseret, G., Desmecht, M., Halters, J., Manteca, C., Tavernier, J., Van Gompel, J., Coignoul F. 2001. Morbillivirus in common seals stranded on the coasts of Belgium and Northern France during summer 1998. *Vet. Rec.* 148: 587-591.
- Jauniaux, T., Petitjean, D., Brenez, C., Borrens, M., Brosens, L., Haelters, J., Tavernier, J., Coignoul, F. 2002. Post-mortem findings and causes of death of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) stranded from 1990 to 2000 along the coastlines of Belgium and Northern France. *J. Comp. Pathol.* Accepted.
- Jepson, P.D., Bennett, P.M., Allchin, C.R., Law, R.J., Kuiken, T., Baker, J.R. 1999. Investigating potential associations between chronic exposure to polychlorinated biphenyls and infectious mortality in harbour porpoises from England and Wales. *Sci. Total Environ.* 243-244: 339-348.

- Joiris, C.R., Tapia, G., Holsbeek, L. 1997. Increase of organochlorines and mercury levels in common guillemots *Uria aalge* during winter in the southern North Sea. Mar. Pollut. Bull. 34 : 1049-1057.
- Krämer, K., Markwitan, A., Menne, A., Pallauf, J. 1993. Zinc metabolism in fasted rats. J. Trace Elem. 7:141-146
- Kuiken, T., Bennet, P.M., Allchin, C.R., Kirkwood, J.K., Baker, J.R., Lockyer, C., Walton, M.J., Sheldrick, M.C. 1994. PCBs, cause of death and body condition in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from British waters. Aquat. Toxicol. 28: 13 - 28.
- Nicholson, J.K., Kendall, M.D., Osborn, D. 1983. Cadmium and mercury nephrotoxicity. Nature 304 (18): 633-635.
- Offringa, H., Meire, P., van den Bossche, W. 1995. Tellingen van gestrande zeevogels langs de Vlaamse kust, november 1993-maart 1994, Rapport IN 95.5. Rapport IN 95.5 Institute of Nature Conservation, Hasselt.
- Offringa, H., Seys, J., Van Den Bossche, W., Meire, P. 1996. Seabirds on the Channel doormat. Le Gerfaut 86: 3-71.
- Piatt, J.F. and Ford, R.G. 1996. How many seabirds were killed by the Exxon Valdez oil spill ? American Fisheries Society Symposium 18: 712-719.
- Piatt, J.F. and Van Pelt, T.I. 1997. Mass-mortality of Guillemots (*Uria aalge*) in the Gulf of Alaska in 1993. Mar. Pollut. Bull. 34 (8):656-662.
- Reijnders, P.J.H. 1986. Reproductive failure in common seals feeding on fish from polluted coastal waters. Nature 324: 456-457.
- Seys, J., Offringa, H., Van Waeyenberge, J., Meire, P., Kuijken, E. (submitted a). Long-term changes in oil pollution off the Belgian coast: evidence from beached bird monitoring.
- Seys, J., Offringa, H., Van Waeyenberge, J., Meire, P., Kuijken, E. (submitted b). Numbers of beached bird corpses and mortality of seabirds, how do they relate: a North Sea study in a wider context.
- Siebert, U., Joiris, C., Holsbeek, L., Benke, H., Failing, K., Failing, K., Frese, K., Petzinger, E. 1999. Potential Relation between mercury concentrations and necropsy findings in Cetaceans from German waters of the North and Baltic seas. Mar. Pollut. Bull. 38: 285-295.
- Tapia, G.R. 1998. Mercury and organochlorines in the common guillemot *Uria aalge* wintering in the southern North Sea. Ph.D Thesis, Faculty of Medicine and Pharmacy, Free University of Brussels, Belgium.
- van Scheppingen, W.B., Verhoeven, A.J.I.M, Mulder, P., Addink M.J., Smeenk, C. 1996. Polychlorinated biphenyls, dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) stranded on the Dutch coast between 1990 and 1993. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 30: 492 - 502.