

0-
80003.09
5

ARKIV
EKSEMPLAR



1867
Statlig program for
forurensningsovervåking

Rapport 226/86

Oppdragsgiver

Statens forurensningstilsyn

Deltakende institusjoner

NIVA

A/S Miljøplan

Delrapport 2
Metaller i tang
Toksisitetstester

Tiltaksorienterte miljø- undersøkelser i SØRFJORDEN og HARDANGERFJORDEN 1984 - 1985





Statlig program for forurensningsovervåking

Det statlige programmet omfatter overvåking av forurensningsforholdene i

**luft og nedbør
grunnvann
vassdrag og fjorder
havområder**

Overvåkingen består i langsiktige undersøkelser av de fysiske, kjemiske og biologiske forhold.

Hovedmålsettingen med overvåkingsprogrammet er å dekke myndighetenes behov for informasjon om forurensningsforholdene med sikte på best mulig forvaltning av naturressursene.

Hovedmålet spenner over en rekke delmål der overvåkingen bl.a. skal:

gi informasjon om tilstand og utvikling av forurensningssituasjonen på kort og lang sikt.

registrere virkningen av iverksatte tiltak og danne grunnlag for vurdering av nye forurensningsbegrensende tiltak.

påvise eventuell uheldig utvikling i resipienten på et tidlig tidspunkt.

over tid gi bedre kunnskaper om de enkelte vannforekomsters naturlige forhold.

Sammen med overvåkingen vil det føres kontroll med forurensende utslipp og andre aktiviteter.

For å sikre den praktiske koordineringen av overvåkingen av luft, nedbør, grunnvann, vassdrag, fjorder og havområder og for å få en helhetlig tolkning av måleresultatene er det opprettet et arbeidsutvalg.

Følgende institusjoner deltar i arbeidsutvalget:

**Direktoratet for vilt og ferskvannsfisk (DVF)
Fiskeridirektoratets Havforskningsinstitutt (FHI)
Norges Geologiske Undersøkelser (NGU)
Norsk institutt for luftforskning (NILU)
Norsk institutt for vannforskning (NIVA)
Statens forurensningstilsyn (SFT)**

Overvåkingsprogrammet finansieres i hovedsak over statsbudsjettet. Statens forurensningstilsyn er ansvarlig for gjennomføring av programmet.

Resultater fra de enkelte overvåkingsprosjekter blir publisert i årlige rapporter.

Henvendelser vedrørende programmet kan i tillegg til de aktuelle institutter rettes til Statens forurensningstilsyn, Postboks 8100, Dep. Oslo 1, tlf. 02 - 22 98 10.

NIVA – RAPPORT

Norsk institutt for vannforskning



NIVA

Hovedkontor

Postboks 333
0314 Oslo 3
Telefon (02) 23 52 80

Sørlandsavdelingen

Grooseveien 36
4890 Grimstad
Telefon (041) 43 033

Østlandsavdelingen

Rute 866
2312 Ottestad
Telefon (065) 76 752

Vestlandsavdelingen

Breiviken 2
5035 Bergen - Sandviken
Telefon (05) 25 97 00

| | |
|-------------------------|-----------|
| Prosjektnr.: | 0-8000309 |
| Undernummer: | 5 |
| Løpenummer: | 1867 |
| Begrenset distribusjon: | |

| | |
|---|-----------------------------------|
| Rapportens tittel: TILTAKSORIENTERTE MILJØUNDERSØKELSER I SØRFJORDEN OG HARDANGERFJORDEN 1984-1985. Delrapport 2. Metaller i tang. Toksitetstester. (Overvåkingsrapport nr. 226/86) | Dato: 17. mars 1986 |
| Forfatter (e): Lars Kirkerud Jon Knutzen | Rapportnr. 0-8000309 |
| | Faggruppe: Marinøkologisk |
| | Geografisk område: Hordaland |
| | Antall sider (inkl. bilag): 56 |

| | |
|--|----------------------------------|
| Oppdragsgiver: Statens forurensningstilsyn (SFT) (Statlig program for forurensningsovervåking) | Oppdragsg. ref. (evt. NTNF-nr.): |
|--|----------------------------------|

| |
|---|
| Ekstrakt: Grisetang fra Sørfjorden 1984 inneholdt meget høye konsentrasjoner av særlig kadmium, bly og sink, men hadde også høyere enn normalt innhold av kvikksølv og kobber. Registreringene viste omlag samme forhold som i 1981-82, samt bekreftet betydelig spredning av sink og kadmium innover og utover i Hardangerfjorden. Imidlertid var det noe minsket innhold av kvikksølv, muligens også av bly. Vann fra innerst i Sørfjorden var giftig overfor blåskjell og sjøpinnsvin, men syntes ikke å ha effekt på utvikling av befructede torskeegg, larver av rur eller tanglopper. Det alt vesentlige av giftigheten synes å kunne forklares ved vannets sink-innhold. Forekomst av blåskjell innerst i fjorden antas å kunne skyldes en arvelig betinget tilpasning. |
|---|

| |
|--|
| 4 emneord, norske: |
| 1. Forurensningsovervåking ; 1984-1985 |
| 2. Tang |
| 3. Metaller |
| 4. Toksitetstester |
| Blåskjell |
| Sjøpinnsvin |

| |
|---------------------------------------|
| 4 emneord, engelske: |
| 1. Pollution Monitoring ; 1984 - 1985 |
| 2. Fucoids |
| 3. Metals |
| 4. Toxicity tests |
| Common mussel |
| Sea urchin |

Prosjektleder:


.....
Jens Skei

For administrasjonen:


.....
Tor Bokn

ISBN 82-577-1079-2



Statlig program for forurensningsovervåking

TILTAKSRETTEDE MILJØUNDERSØKELSER I SØRFJORDEN OG HARDANGERFJORDEN 1984-1985

Delrapport 2. Metaller i tang. Toksisitetstester.

Oslo, 17. mars 1986

Prosjektleder: J. Skei

Medarbeidere: Å. Bakketun (NIVA)
V. Frivoll, Tromsø Univ.
H. Hovde Tromsø Univ.
L. Kirkerud (NIVA)
J. Knutzen (NIVA)
J. Rytter Hasle,
Miljøplan A/S
A. Stene, Tromsø Univ.

INNHOLDSFORTEGNELSE

| | | |
|----|----------------------------------|---------|
| | FORORD | Side 3 |
| | SAMMENDRAG OG KONKLUSJONER | 4 |
| 1. | INNLEDNING | 5 |
| 2. | MÅLSETTING | 6 |
| 3. | MATERIALE OG METODER | 7 |
| | 3.1 Tang | 7 |
| | 3.2 Toksisitetstester | 10 |
| 4. | RESULTATER OG DISKUSJON | 15 |
| | 4.1 Metaller i tang | 15 |
| | 4.2 Toksisitetstester | 22 |
| 5. | LITTERATURHENVISNINGER | 30 |
| 6. | VEDLEGG | 32 - 56 |

F O R O R D

På et møte mellom Statens forurensningstilsyn (SFT) og industrien i Odde 3. april 1984 ble det besluttet å be Norsk institutt for vannforskning (NIVA) og A/S Miljøplan om å utrede og budsjettere en deling av de enkelte oppgavene i forbindelse med overvåkingen av Sørfjorden og Hardangerfjorden. Samarbeidsprosjektet skulle bygge på NIVAs og Miljøplans opprinnelige programforslag, med NIVA som prosjektkoordinator. I et møte mellom NIVA og Miljøplan 3. mai 1984 ble arbeidsdelingen diskutert. I grove trekk gikk arbeidsdelingen ut på at Miljøplan skulle utføre feltarbeidet og skrive en datarapport, mens NIVA skulle bearbeide resultatene og skrive rapport til oppdragsgiverne.

I delprosjektet rapportert her har to eksterne institusjoner bidratt på oppdragsbasis. Universitetet i Tromsø (Sunniva Lønning Vader (†), Anne Stene og Vigdis Frivoll) har utført testing av giftighet på marint embryologisk materiale og Henry Hovde, Universitetet i Oslo (Balanus Tox Test System) har utført biotester på bunnslåing av rur. Jon Rytter Hasle, Miljøplan A/S, har stått for innsamlingen av tang til metallanalyser.

Ved NIVA har Jon Knutzen hatt ansvaret for rapportering av tungmetaller i tang og Lars Kirkerud for rapportering av toksisitetstester. Åse Bakketun har hatt ansvar for den praktiske utførelsen av NIVAs giftighetstester.

Oslo, den 17 mars 1986

Jens Skei
Prosjektleder

EDA
17/03/1986
20/06/1986

SAMMENDRAG OG KONKLUSJONER

(i) Metaller i tang

Observasjonene av metallene kvikksølv, kadmium, bly og sink i tang fra Sørfjorden 1984 viste stort sett samme høye forurensningsgrad som konstatert i 1981-82, muligens med en tendens til minskning for bly og særlig kvikksølv, (fig. 3-6). For sinks og kadmiums vedkommende lot forurensningene seg spore både innover og langt utover i Hardangerfjorden. Også kobber opptrådte i forhøyede konsentrasjoner, men i mindre grad og sannsynlig begrenset til Sørfjorden.

Av sølv og tinn ble det ikke observert forhøyede konsentrasjoner i tang.

Bortsett fra kobber og muligens kvikksølv synes blåskjell å være en mer ømfintlig og egnet indikator på vannets midlere metallinnhold enn grisetang. Særlig gjaldt dette bly, men for de fjerneste lokalitetene også kadmium og muligens sink.

(ii) Toksisitetstester

Vannet fra Eitrheimsvågen innerst i Sørfjorden var akutt toksisk overfor 2 av de 5 artene som ble testet. Den akutte giftvirkningen skyldes det høye sinkinnholdet kombinert med redusert saltholdighet.

Giftvirkningen av sink og redusert saltholdighet kan forklare at den ene av artene (sjøpinnsvin), som var følsom for testen, ikke finnes innerst i Sørfjorden. Den andre følsomme arten (blåskjell) viste tilsynelatende større utbredelse og forekomst enn testresultatet skulle tilsi, noe som antakelig kan tilskrives adaptasjon til sink hos den lokale stamme.

Befruktede torskeegg og to krepsdyrarter (rurlarver og tanglopper) var også blant testorganismene. Disse viste liten reaksjon på vannet fra Eitrheimsvågen.

1. INNLEDNING

Alvoret i forurensningen av Sørfjorden ble først slått fast i begynnelsen av 70-årene, da Miljøvernkomiteen i Odda la fram sine rapporter for en 3-årsundersøkelse. Det ble da konstatert at Sørfjorden i sin fulle lengde var betydelig forurenset av tungmetaller både i vann, organismer og bunnsedimenter. I Miljøvernkomiteens konklusjoner og anbefalinger het det at man ikke kunne se bort fra at Hardangerfjorden også var påvirket av forurensninger fra Odda, og anbefalte at undersøkelsesområdet skulle utvides til også å omfatte Hardangerfjorden. Dette ble først realisert 10 år etter at Miljøvernkomiteens arbeid var avsluttet. I mellomperioden er det fremskaffet ytterligere dokumentasjon om forurensningstilstanden i selve Sørfjorden, i regi av Statlig program for forurensningsovervåking (Skei, 1979, Næs & Rygg, 1982, Knutzen, 1983). Likeså er det påvist at diffuse kilder for tungmetallforurensning i Eitrheimsvågen er av så stor betydning at dette kan påvirke vannkvaliteten i Hardangerfjorden (Skei, 1985).

På bakgrunn av dette ble undersøkelsen av Hardangerfjorden (og Sørfjorden) igangsatt i 1984, delvis for å beskrive tilstanden, men også som et situasjonsbilde før de planlagte utslippsendringer iverksettes fra 1986. De kommende to år vil bli merkeår i Sørfjordens forurensningshistorie. Siden 1968 har Norzink brukt Sørfjorden som resipient for jarositt. I 1986 vil jarosittavfallet bli deponert i fjellhaller, noe som vil føre til en betydelig avlastning på Sørfjorden med hensyn til tungmetaller. Videre er nå en spunsvegg under bygging i Eitrheimsvågen. Denne har til hensikt å avskjerme tungmetall-lekkasjen fra gamle deponier. I 1986-87 vil også ilmenittverket starte sin produksjon i Tyssedal, og et nytt utslipp av partikulært materiale vil bli etablert. Hva dette bidraget vil bety i det totale forurensningsbilde i Sørfjorden, er vanskelig å forutsi, men vil trolig være beskjedent med hensyn til metallforurensning, noe mer usikkert hva angår partikkelbelastning.

Delrapport 1 presenterte resultater fra undersøkelsen av sedimentering av tungmetaller (og delvis PAH) og hvilken effekt dette har på bløtbunns-faunaen i Sørfjorden og Hardangerfjorden. Denne delrapporten (delrapport 2) tar for seg innholdet av tungmetaller i tang, samt giftighetstester på torske-egg, sjøpinnsvinlarver, rur og blåskjell.

2. MÅLSETTING

Undersøkelsene som er rapportert i denne delrapporten er uavhengige av hverandre og har således forskjellige delmål:

Metaller i tang

Formålet med fortsatte undersøkelser har vært å

- følge utviklingen og dokumentere tilstanden før tiltak (overføring av jarositt til fjellhaller, bygging av spunsvegg i Eitrheimsvågen)
- få informasjon om forurensningers spredning og nivå i Sør fjorden og i Hardangerfjorden
- undersøke nivået i tang med hensyn til tidligere ikke observerte metaller (sølv og tinn).

Giftighetstester

Hensikten med giftighetstestene var å gi opplysninger om i hvilken grad dagens tungmetallutslipp (1985) hadde giftvirkninger på marine organismer; dertil belyse hvilke metaller som antas å ha størst giftighet overfor testorganismene.

3. MATERIALE OG METODER

3.1 Tang

Tang til metall-analyse er samlet inn 10-14/9 1984 fra stasjoner som fremgår av Fig. 1. Nærmere om beliggenheten av stasjonene ses av Tabell 1. Lokalitetene i selve Sørfjorden og B11, B12 er de samme eller ligger nær tidligere benyttede stasjoner (Knutzen 1983), unntatt St. B2. På de 3 indre stasjonene (B1-B3) er det samlet inn blæretang, på alle de øvrige grisetang. Prøvene er samlet som blandprøver av minst 20 individer. Såvidt mulig epifyttrensede skudd omfatter for blæretangs del de øvre 10-15 cm av planten (gamle deler uten fotosyntetiserende vev unngått). Grisetangsskuddene er kuttet over tredje blære regnet ovenfra. Dette utgjør for det meste 1-2 år gamle plantedeler og reflekterer dermed midlere påvirkning over lengre tid i større grad enn nye skuddspisser (Knutzen 1985).

Grisetang og blæretang synes å ha temmelig like akkumuleringsegenskaper, muligens er oppkonsentreringer for enkelte metaller (blant annet kadmium og sink) noe høyere i blæretang, (for referanser, se Knutzen 1985).

Metallanalysene er foretatt ved Senter for industriforskning etter laboratoriets vanlige metoder (tørking ved 50⁰C i 48 timer, homogenisering og analyse ved plasmaemisjons-spektrometri etter forasking og oppslutning i blanding av saltsyre og salpetersyre). Kvikksølvinnholdet er bestemt ved flammeløs atomabsorpsjonsspektrofotometri etter oppslutning med salpetersyre og hydrogenbromid i lukket apparatur.

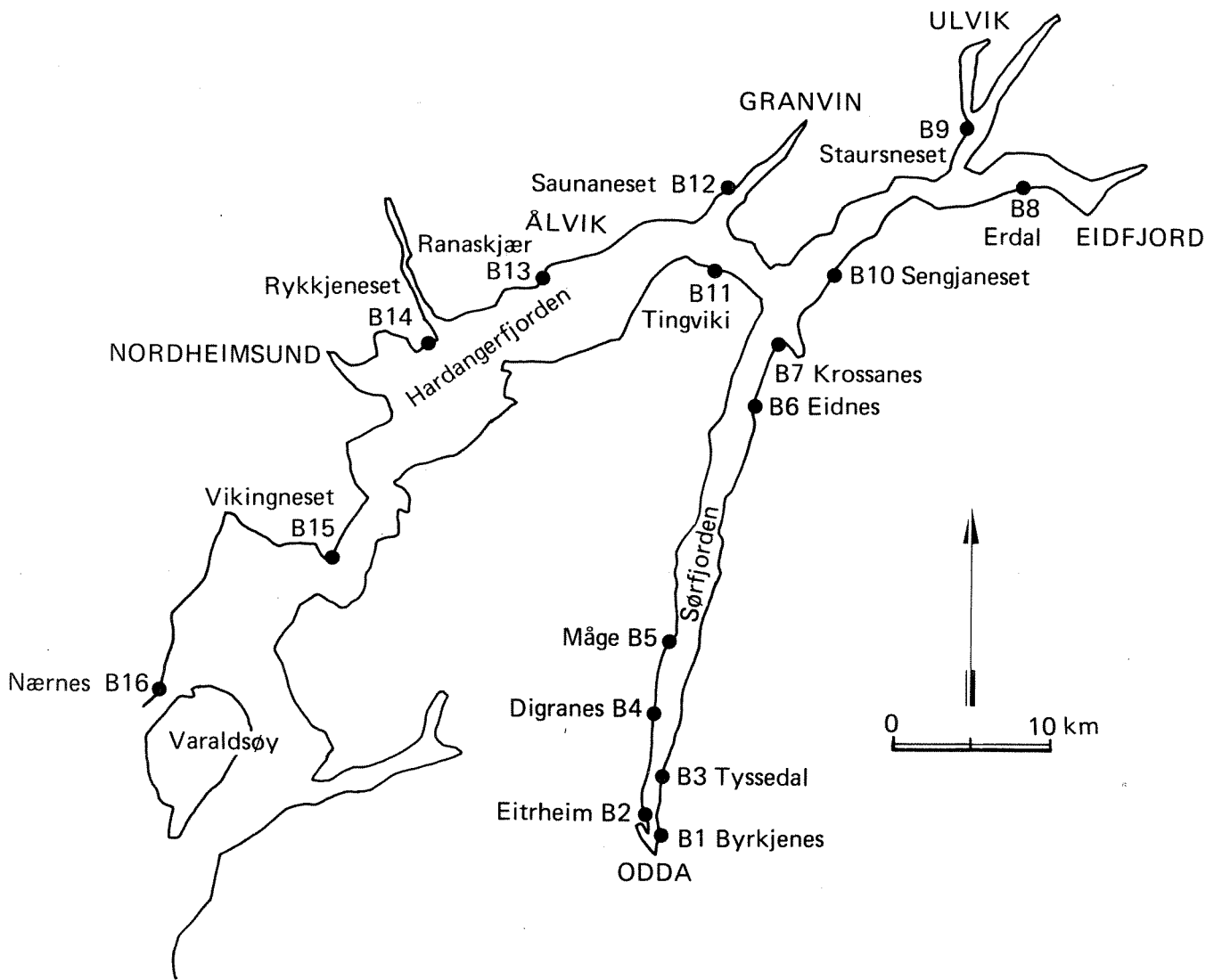


Fig. 1. Stasjonsnett for tangprøver innsamlet i 1984.

Tabell 1. Stasjoner for innsamling av tang 10-14/9 1984

| Stasjon nr. | Beliggenhet | Art |
|-------------|--|-----------|
| B1 | Byrkjenes, Sørfj nes N for badestrand | Blåretang |
| B2 | Eitrheim, Sørfj., ved naust N for tankanlegg | Blåretang |
| B3 | Tyssedal, Sørfj., kai ved kraftstasjonen | Blåretang |
| B4 | Digranes, Sørfj., brygge | Grisetang |
| B5 | Måge, Sørfj., strand langs veien | Grisetang |
| B6 | Eidnes, Sørfj., ved naust mellom bensinstasjon og fruktlager | Grisetang |
| B7 | Krossanes, Sørfj., ved molo og naust ytterst på neset | Grisetang |
| B8 | Erdal, Eidfj., brygge og svalberg ved naust og hytte | Grisetang |
| B9 | Staursnes, Osafj., nedenfor veifylling | Grisetang |
| B10 | Sengjaneset, Eidfj., svaberg | Grisetang |
| B11 | Tingviki, Utnefj., utenfor naust | Grisetang |
| B12 | Sauaneset, Granvinfj., nedenfor bratt skrent | Grisetang |
| B13 | Ranaskjær, Samlafj., skjær med sementkum, rett overfor Bølvefossen | Grisetang |
| B14 | Rykkjeneset, Samlafj., svaberg nedenfor eng | Grisetang |
| B15 | Vikingneset, Hissfj., ved fyrlykt | Grisetang |
| B16 | Nærnes, Bondesundet, skjær med brygge og naust | Grisetang |

3.2 Toksisitetstester

Testene ble konsentrert om å karakterisere resipientvann fra Eitrheimsvågen (Fig. 2) for å finne grad av giftighet overfor marine organismer og identifisere den viktigste toksiske komponent.

På bakgrunn av kjemiske analyser av vann, ble sink og kadmium ansett å kunne foreligge i toksiske konsentrasjoner. For å finne ut om resipientvannet var giftig, og om innholdet av sink og/eller kadmium (eventuelt kobber) kunne forklare resipientvannets eventuelle giftighet, ble en serie tester utført (Tabell 2).

Tabell 2. Giftighetstester

| Organismer | Torsk | Sjøpinnsvin | Rur | Blåskjell | Tanglopper |
|--------------------------------------|-------|-------------|-----------------|------------|------------|
| Testløsning | egg | egg/larver | bunnslå- ing | filtrering | dødelighet |
| Vann fra Eitrheimsvågen | x | x | x | x | x |
| Kadmium fortynnet i naturlig sjøvann | x | x | x | x | x |
| Sink fortynnet i naturlig sjøvann | x | x | x | x | x |
| Kobber fortynnet i naturlig sjøvann | | | x | | |
| Kontroller (naturlig sjøvann) | x | x | x | x | x |

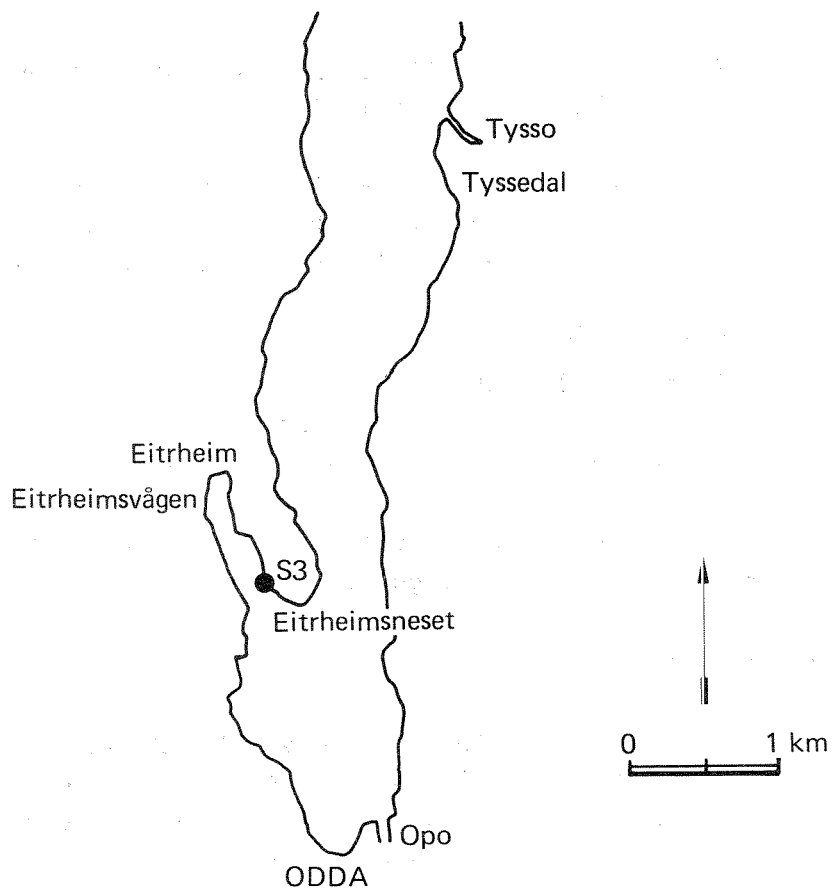
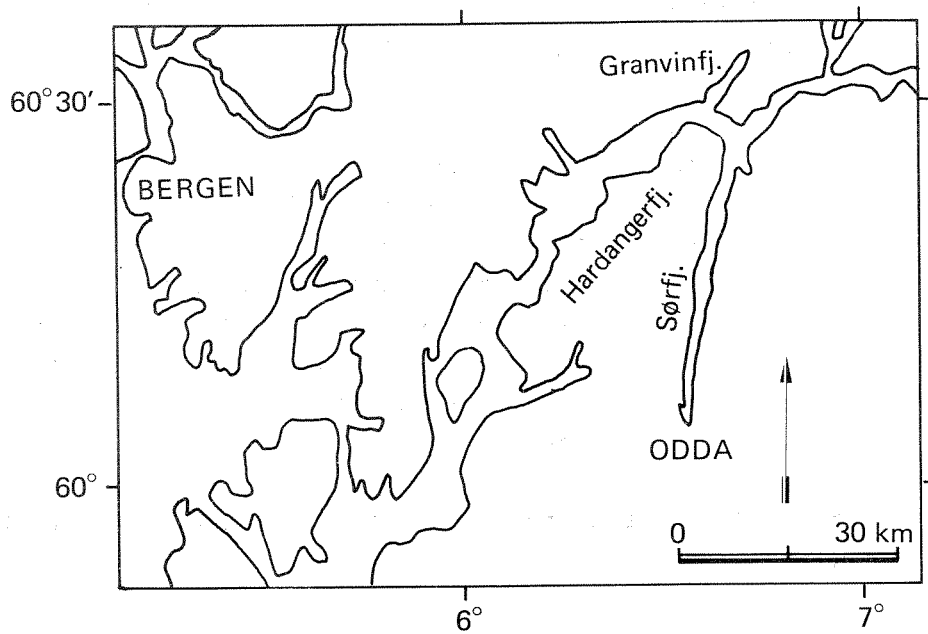


Fig. 2. Kart som viser hvor resipientvannprøver til biotesting ble tatt (S3).

TORSK, eggtest: Art: Torsk Gadus morhua
 Populasjon: Vill fisk fra Tromsø-området
 Stadium: Egg befruktet i laboratoriet
 Varighet: 4 døgn
 Temperatur: 5°C
 Saltholdigh: 26-33 o/oo
 pH: 7.1 (toleranse 7-9)
 Parametre: % normale, unormale og døde embryo.
 Resultatene oppgis for hvert enkelt akvarium og som EC 50 for testsubstansen dvs. den konsentrasjon som med størst sannsynlighet ville gitt 50% normale etter 4 døgn.

Testene er utført ved Universitetet i Tromsø. Testrapporten er tatt med som vedlegg (1).

SJØPINNSVIN, egg/larvetest

Art: Strongylocentrotus droebachiensis
 Populasjon: Ville dyr fra Tromsø-området (5-20 m dyp)
 Stadium: Egg befruktet i laboratoriet.
 Normalt klekkes disse i løpet av testen og den cilierte larven svømmer opp.
 Varighet: 4 døgn
 Temperatur: 5°C
 Saltholdigh: 26 -33 o/oo
 pH: 7.1 (toleranse 7-9)
 Parametre: % normale, unormale og døde

Resultatene oppgis som for torsk ovenfor og er utført ved samme institusjon. Det refereres til Vedlegg 1.

RUR, bunnslåingstest:

Art: Skipsrur Balanus improvisus
 Populasjon: Ville rur fra Indre Oslofjord
 Stadium: Cypris-larver oppdrettet i laboratoriet
 (fra modne fosterlameller)
 Varighet: 10 døgn
 Temperatur: 22°C

Saltholdigh: 26-34 o/oo
 pH: 7.1 - 7.3 (Toleranse 6.5 - 9.1)
 Parametre: Andel av normalt og unormalt utviklede samt døde testorganismer i hvert akvarium etter 10 døgn. Ved normal utvikling forutsettes bunnslåing, sementering til bunnen, omvandling til den voksne form og normal aktivitet.

Resultatene er oppgitt som EC 50-verdier og som konsentrasjon-responskurver for de enkelte stoffer. Forsøkene er utført ved Balanus Tox Test System - Henry Hovde (Vedlegg 2).

BLÅSKJELL, filtreringstest.

Art: Blåskjell, Mytilus edulis.
 Populasjon: Dyrkede skjell, Indre Oslofjord
 Individider: Antall pr akvarium: 5
 Stadium: Arsyngel (0-gruppe), 2-3 cm lange
 Varighet: 4 døgn
 Temperatur: 8°C
 Saltholdigh: 30 - 34 o/oo (Toleranse 12-35 o/oo)
 pH: 7 - 8
 Parametre: Reduksjon i filtreringsaktivitet (immobilitet). Filtreringsaktivitet ble målt som fjerning av algeceller, Phaeodactylum tricorutum, registrert ved telling på Coulter Counter.

Resultatene oppgis som % reduksjon av filtreringsrate i de enkelte akvarier og estimat av EC 50 etter 1, 2, 3 og 4 døgn. Testene er utført ved Norsk institutt for vannforskning (Vedlegg 3).

TANGLOPPE, dødelighetstest.

Art: Gammarus oceanicus
 Populasjon: Ville tanglopper fra Indre Oslofjord (Nærnes) knyttet til blåretang.
 Stadium: Voksne individer, 1-2 cm lange
 Antall individer pr akvarium: 5
 Varighet: 4 døgn

Temperatur: 8°C
Saltholdigh: 26-34 o/oo
pH: 7-8
Parametre: Aktivitet, dødelighet

Resultatene er oppgitt som dødelighet i de enkelte akvarier og estimert LC50 (konsentrasjon som ville gitt 50% dødelighet i testperioden).

Testen er utført ved Norsk institutt for vannforskning (Vedlegg 3).

4. RESULTATER OG DISKUSJON

4.1 Metaller i tang

Observasjoner i Sørfjorden 1981-82 viste blant annet høye konsentrasjoner av kvikksølv, kadmium, bly og sink i tang og blåskjell. Overkonsentrasjoner jevnført med "normalverdier" ble konstatert i hele fjordens lengderetning og utenfor fjordmunningen. For sink, kadmium og bly syntes metallinnholdet snarere å ha steget enn avtatt i løpet av perioden 1971-81, på tross av teoretisk redusert belastning ved reduserte utslipp. Det ble påpekt at forholdet måtte skyldes direkte belastning på fjordens overflatevannmasser ved utløsning av metaller fra sedimenter på grunt vann, og ved sig fra land-deponier (Knutzen 1983). Dette er senere bekreftet ved målinger (Skei, 1985).

De hygieniske og næringslivsorienterte sider av problemet er dekket gjennom studier av metallinnholdet i fisk og blåskjell. Resultatene fra disse undersøkelser foreligger i rapport fra Fiskeridirektoratet (Julshamn og medarb. 1985).

Bakgrunnen for å bruke tang som indikator i tillegg til blåskjell er at de to arter gjenspeiler noe ulike former for belastning: tang vesentlig oppløste stoffer, blåskjell også partikkelbunden forurensning.

Resultatene er oppsummert i appendikstabell A1 og utvalgte data vedrørende hovedforurensningene kvikksølv, kadmium, bly og sink er fremstilt i Fig. 3-6.

Kvikksølv-innholdet i tang fra lokaliteter i indre del av Sørfjorden var stort sett lavere enn det som tidligere er observert (Fig. 3, kfr. også Knutzen 1983). Denne minskning står i tilsynelatende kontrast til at det ikke ble konstatert noe tilsvarende nedgang i blåskjells kvikksølvinnhold sammenlignet med 1981-82 (Julshamn og medarb. 1985). Det er ingen umiddelbar forklaring på dette manglende samsvar, men det kan i hvert fall tyde på at blåskjell er mer formålstjenlig som kvikksølvindikator enn de to tangartene. Dette vises også ved at påvirkningen fra Sørfjorden innover og utover i fjorden spores bedre i blåskjell enn i tang. Som man ser av Fig. 3, var kvikksølvkonsentrasjonene i tang fra steder utenfor Sørfjorden neppe over det som kan betegnes som et "høyt normalnivå" (Knutzen 1985). I blåskjell syntes det derimot å være tydelige avstandsgradienter ikke bare langsetter Sørfjorden, men også utenfor (Julshamn og medarb. 1985).

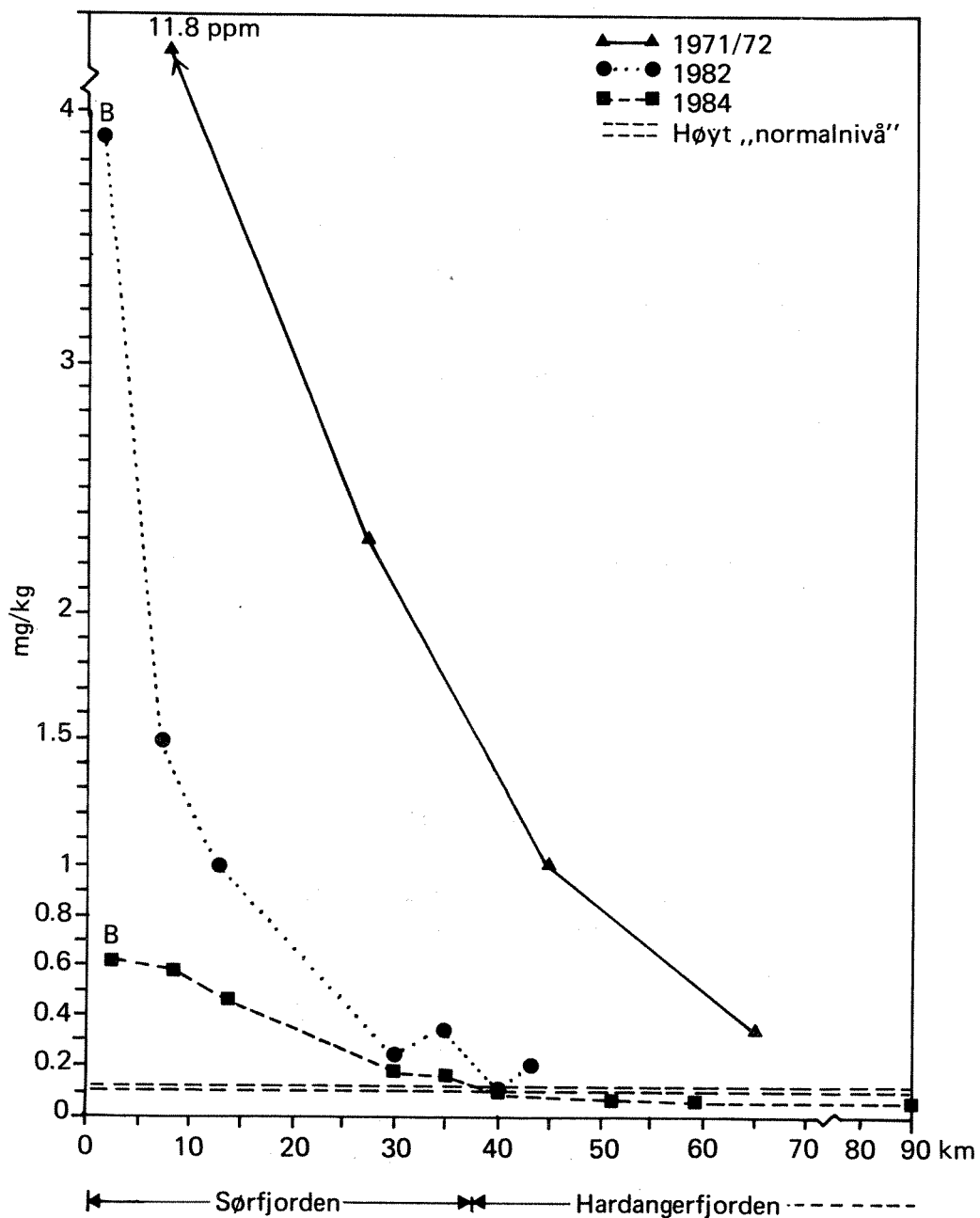


Fig. 3. Kvikksølv i blæretang (B) og grisetang fra Sørfjorden og Hardangerfjorden. Data 1971/72 etter Haug et al (1974)

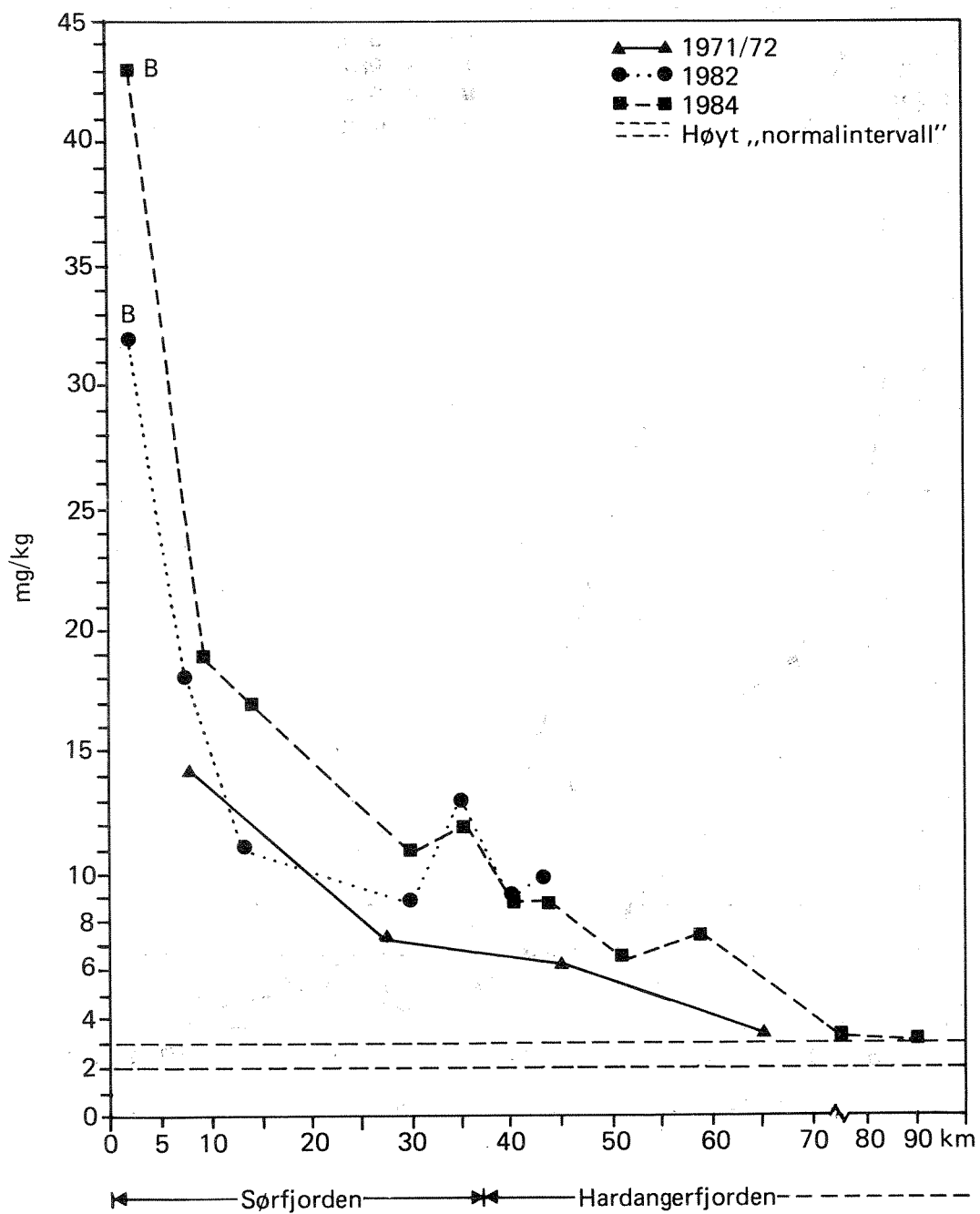


Fig. 4. Kadmium i blæretang (B) og grisetang i Sør fjorden og Hardangerfjorden.

Data 1971/72 etter Haug et al (1974)

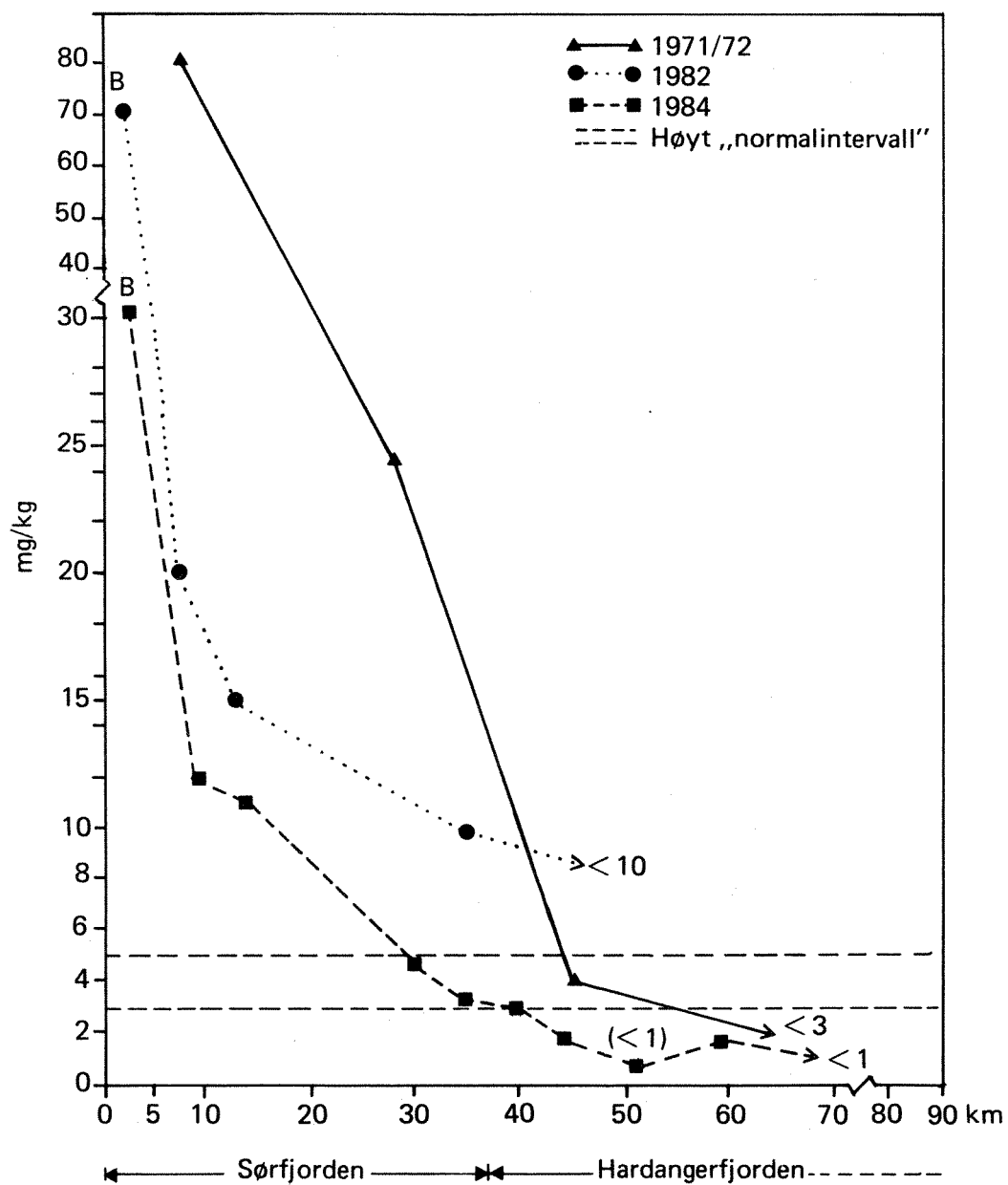


Fig. 5. Bly i blæretang (B) og grisetang fra Sør fjorden og Hardangerfjorden. Data 1971/72 etter Haug et al (1974).

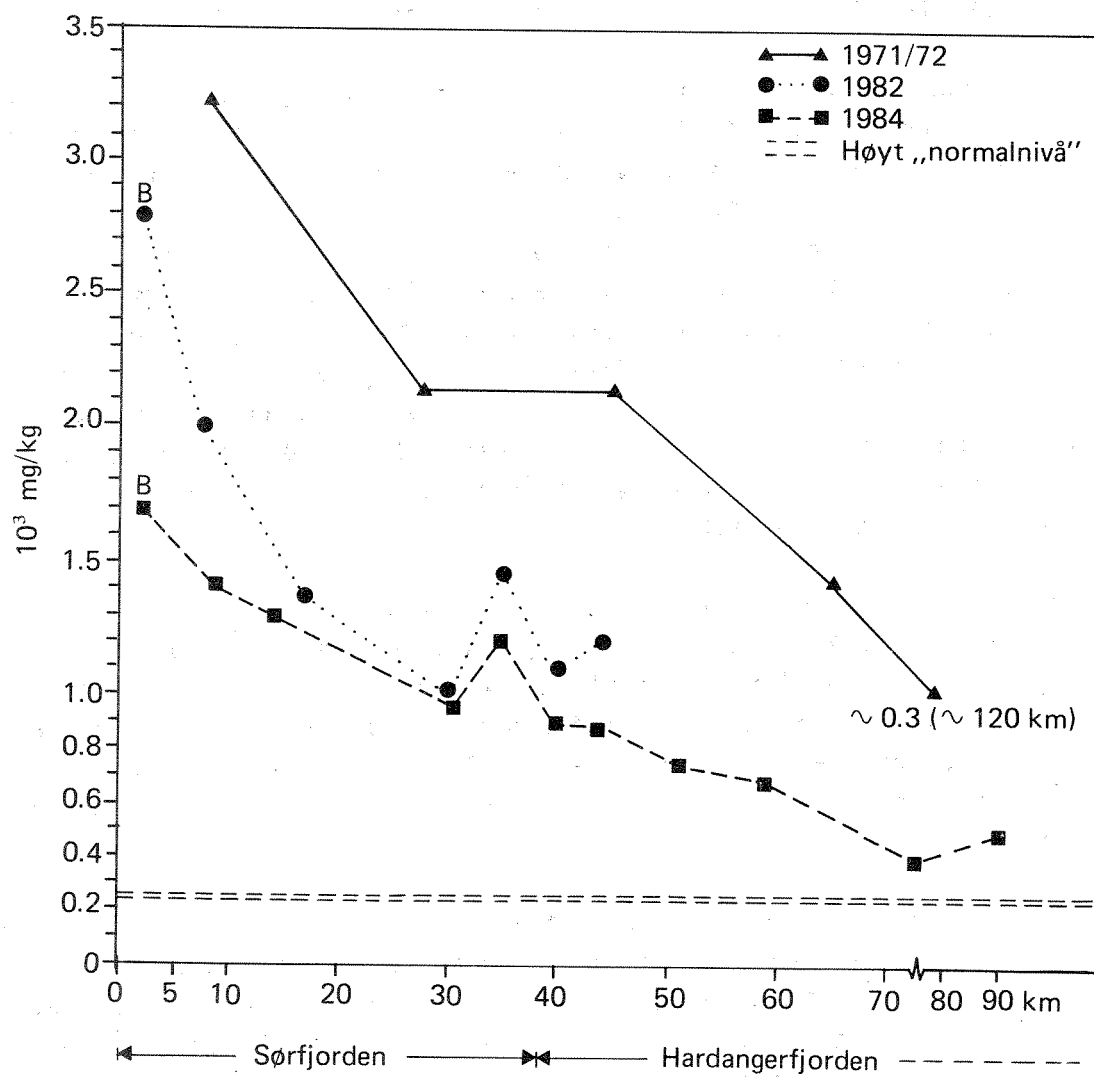


Fig. 6. Sink i blæretang (B) og grisetang fra Sørfjorden og Hardangerfjorden.

Data 1971/72 etter Haug et al (1974).

Forholdet kan ha sammenheng med at mesteparten av kvikksølv er partikkelbundet (lite av lett løselige forbindelser etter 1973).

Kadmium-konsentrasjonene viste omtrent samme situasjon som i 1981-82, og bekreftet økningen fra 1971/72 (Fig. 4 og Knutzen 1983). Sammenlignet med et "høyt normalnivå" i blæretang og grisetang (kfr. Knutzen 1985), ble det i indre del av Sørffjorden registrert overkonsentrasjoner på ca. 15-25 x, bare langsomt avtagende til ca 10 x i ytre del. Videre bekreftet resultatene fra hovedfjorden det forhold at kadmium tidligere er blitt påvist i betydelige mengder både i blåskjell (Julshamn 1981) og direkte i vann (Næs og Rygg 1982). Overkonsentrasjonene i grisetang synes å kunne spores i hvert fall 50 km utover i Hardangerfjorden fra Sørffjordens munning (Fig. 1). Senere data fra blåskjellanalysene har sannsynliggjort at hele Hardangerfjorden har forhøyet kadmiuminnholdet i vannet (Julshamn og medarb. 1985).

Både blåskjellanalyser (Julshamn og medarb. 1985) og målinger i tang (appendikstabell A) tyder på at spredningen av kadmium også skjer innover i Hardangerfjorden. Jevnført med det omtalte "høye normalnivå" i grisetang ble det ved Erdal i Eidfjord observert overkonsentrasjoner i størrelsesorden 2-3 x. Forhøyelsen av kadmiuminnholdet i blåskjell fra tilsvarende langt inn i fjorden var enda mer markert (Julshamn og medarb. 1985).

Bly-innholdet i tang avtok hurtigere utover i fjorden enn kadmiumkonsentrasjonene, og lå omkring eller under et "høyt normalnivå" ved munningen mot Hardangerfjorden (Fig. 5). Konsentrasjonen i tang fra stasjoner i hovedfjorden lå markert lavere, og noen påvirkning lot seg ikke med sikkerhet påvise ved bruk av 1-2 år gamle skudd av grisetang som indikator. I blåskjell var det derimot markerte overkonsentrasjoner langt ut i hovedfjorden (Julshamn og medarb. 1985), med til dels bemerkelsesverdig høye konsentrasjoner. Mens tangens blyinnhold kan antyde noe svakere forurensningsgrad i 1984 enn to år tidligere (Fig. 5), var det ut fra analysene av blåskjell uendret tilstand (kfr. Knutzen 1983 med Julshamn og medarb. 1985).

Sink viste omtrent samme utvikling i konsentrasjonen med økende avstand fra kilder som kadmium (Fig. 6). Forhøyede sinkkonsentrasjoner i vannet lot seg spore mer enn 90 km fra Odda. Samme konklusjon følger av blåskjellanalysene (Julshamn og medarb. 1985).

Avstandsgradientene i tang viste overkonsentrasjoner av sink i størrelsesorden 10 x innerst i Sørffjorden, synkende til omkring 2 x et "høyt normalnivå" 90 km unna. Spredningen innover i Hardangerfjorden var

også tydelig ut fra tangens sink-innhold (appendikstabell A1).

Kobber-innholdet var også noe høyere enn normalt på lokaliteter innerst i Sørfjorden (appendikstabell A1), men sank hurtig utover. Kobberkonsentrasjonene observert i tang fra Hardangerfjord-lokaliteter var bemerkelsesverdig lave og vesentlig under det som kan betraktes som øvre grense for tangens "normalinnhold" av dette metall (ca. 15-20 mg/kg tørrvekt) i henhold til litteraturdata sammenstilt av Knutzen (1985), men dette er muligens noe høyt (vanligvis ikke over 10-15 mg/kg tørrvekt).

Kobberkonsentrasjonene var omlag som tidligere observert på Sørfjordenstasjonene, men lavere enn i tang fra hovedfjorden i 1981-82 (Knutzen 1983). Den tydelige avstandsgradienten ut fjorden viser imidlertid industriens betydning også som kobberkilde.

Tilsvarende gradienter lot seg ikke konstatere i blåskjell, som må anses å være mindre egnet enn tang som indikator på kobberforurensing (kfr. også Julshamn og medarb. 1985).

Verken sølv eller tinn opptrådte i konsentrasjoner som oversteg det man kan registrere i tang fra områder uten punktkilder (kfr. data i appendikstabell A1 med Knutzen 1985).

4.2 Toksistetstester

Sørfjordvann fra Eitrheimsvågen 27. november 1984 ble funnet å være toksisk i 2 av de 5 testene, mens testene med torskeegg, skipsrur og tanglopper bare viste en svak reaksjon på ufortynnet resipientvann. Resultatene er oppgitt som EC 50-verdier i Tabell 2.

Tabell 2. Giftigheten av en vannprøve fra Sørfjorden, Eitrheimsvågen 27. november 1984. Konsentrasjonene i kolonnen "EC50" er angitt som % Sørfjordvann i testløsningen.

| Test | Tid, døgn | EC50 (%) | Kommentar |
|-------------------------|-----------|----------|--|
| Torsk, eggutvikling | 4 | > 100 | Liten men ikke statistisk signifikant, effekt av ufortynnet Sørfjordvann |
| Sjøpinnsvin, egg/larver | 4 | 25 | |
| Rur, bunnslåing | 10 | > 100 | Svak hemming av utvikling i ufortynnet Sørfjordvann |
| Blåskjell, filtrering | 4 | 5 | |
| Tanglopper, dødelighet | 4 | > 100 | Litt redusert aktivitet i ufortynnet Sørfjordvann |

Sink

EC 50/LC 50-verdiene er i tabell 3 oppgitt i mg sink pr liter testløsning.

Tabell 3. Giftigheten av sink i tester med 5 marine arter, mg/liter.

| Test | Varighet, d | Resultat | Kommentar |
|-------------------------|-------------|--------------|--------------------|
| Torsk, eggutvikling | 4 | EC 50 = 19 | |
| Sjøpinnsvin, egg/larver | 4 | EC 50 = 2 | |
| Rur, bunnslåing | 10 | EC 50 = 2,4 | |
| Blåskjell, filtrering | 4 | EC 50 = 0,05 | Ekstrapolert verdi |
| Tanglopper, dødelighet | 4 | LC 50 = 5,3 | |

Kadmium

Resultatene av giftighetstestene med kadmium er gjengitt i tabell 4.

Tabell 4. Giftigheten av kadmium i tester med 5 marine arter, mg/liter

| Test | Varighet, d | Resultat | Kommentar |
|-------------------------|-------------|-------------|-----------|
| Torsk, eggutvikling | 4 | EC50 = 45 | |
| Sjøpinnsvin, egg/larver | 4 | EC50 = 3 | |
| Rur, bunnslåing | 10 | EC50 = 1,0 | |
| Blåskjell, filtrering | 4 | EC50 = 0,13 | |
| Tanglopper, dødelighet | 4 | LC50 = 22 | |

Kobber

Hos skipsrur ble det funnet en EC 50-verdi av kobber på

0,15 mg/l.

Postulert og registrert giftighet i resipientvannet

I utgangspunktet må man regne med at giftvirkningen av Sørfjordvannet kan skyldes flere giftige komponenter i kombinasjon. Metaller som sink, kadmium og kobber, som er sterkest i søkelyset her, virker oftest additivt når det gjelder akutte effekter. Dette vil si at summen av konsentrasjonene av enkeltkomponentene uttrykt i toksiske enheter (fraksjon av toleransegrensen overfor en og samme test) er et mål for blandingens giftighet (uttrykt i toksiske enheter, T.U.). En slik additiv modell for giftigheten er fremstilt i tabell 5 sammen med den registrerte giftighet av resipientvannet.

Tabell 5. Giftigheten av resipientvann beregnet ved additiv kombinasjon av sink, kadmium og kobber sammenlignet med direkte målt giftighet. Konsentrasjoner i resipientvannet funnet ved kjemiske analyser var i mg/l: Zn = 2.4 Cd = 0.047 Cu = 0.035 T.U. = toksiske enheter i.r. = ikke registrert

| Test | Sink resip.vann T.U. | Kadmium resip.v. T.U. | Kobber resip.vann T.U. | Addert giftighet T.U. | Målt giftighet T.U. |
|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| Torsk, egg | 0.13 | 0.001 | i.r. | 0.13 | < 1 |
| Sjøpinnsvin, egg/larver | 1.2 | 0.016 | i.r. | 1.2 | 4 |
| Rur, bunnsl. | 1 | 0.047 | 0.23 | 1.3 | < 1 |
| Blåskjell, filtr. | 48 | 0.36 | i.r. | 48 | 20 |
| Tanglopper, dødelighet | 0.45 | 0.002 | i.r. | 0.45 | < 1 |

Testene som ble gjort med overflatevann fra Eitrheimsvågen viste at dette var klart giftig ved to av testene (egg/larvestadiet hos sjøpinnsvin, filtreringsaktivitet hos blåskjellyngel). De øvrige 3 testene (torskeegg, rurlarver og tanglopper) viste også skadevirkning på enkelte individer. Filtreringsaktiviteten hos blåskjell viste seg å være den mest følsomme testen, der ca 20 gangers fortykning ga halvering av filtreringen, mens 6 gangers fortykning reduserte filtreringsaktiviteten til mindre enn 10%.

Av de metallene som ble testet, viste kopper seg å være mest giftig. Sink var noe mer giftig enn kadmium i 4 av de 5 testene, mens det var omvendt i testen med rurlarver. Det skal bemerkes at rurlarve-testen varer 2,5 ganger så lenge (10 døgn) som de øvrige testene. Kadmium, som er kjent for utpreget bioakkumulering, vil derfor kunne gi relativt sterkere utslag her.

De kjemiske analysene av resipientvannprøven som ble testet, viser at sink forelå i langt høyere konsentrasjoner enn kadmium og kopper (og bly). I tabell 5, kolonne 1, er resipientkonsentrasjonene dividert med de respektive EC 50 (LC 50)-verdier. Tallene gir altså uttrykk for hvor mange ganger resipientvannet må fortynnes for å oppnå EC 50 (eller for tanglopper: LC 50) for det enkelte metall. Tall mindre enn 1 betyr at vannet må oppkonsentreres med avløpsvann for å få utslag som kan uttrykkes ved EC 50 eller LC 50-verdier.

En sammenligning av de tre første kolonner i tabell 5 viser at av metallene sink og kadmium bidrar sink med den dominerende andel av giftigheten. Kobber ble bare testet overfor rur, og bidro her med ca 1/5 av giftigheten, mens sink bidro med 4/5. At sink vil være betydelig mer giftig enn kobber overfor marine organismer, når forholdet mellom metallene er som i den mottatte vannprøve fra Eitremsvågen (69:1) samsvarer med testresultater hos Connor (1972), Abel (1976), MacInnes & Calabrese (1977), Reish (1978) og Strømgren (1982). Disse testene omfatter krepsdyr, muslinger og børstemark (Polychaeta).

Dersom resipientvannets sinkinnhold alene forklarer giftigheten overfor sjøpinnsvin og blåskjell, skulle det vært samsvar mellom tallene i første og siste kolonne i tabell 5.

På grunn av usikkerhet i mange ledd, både når det gjelder kjemiske analyser, metallenes tilstandsform og biotestresultatene, må resultatene for blåskjell kunne sies å stemme rimelig godt overens med antagelsen om en additiv effekt og at sinkinnholdet har vært utslagsgivende, mens det for sjøpinnsvin var større avvik. At resipientvannet var så mye som 3 ganger giftigere enn sinkinnholdet alene, skulle tilsi at sjøpinnsvinene var ømfintlige overfor den nedsatte saltholdigheten i resipientvannet. I kontrollkulturen med samme saltholdighet (26 0/00) viste således bare 41% av sjøpinnsvineggene normal utvikling.

Det har vært forsøkt flere metoder for å beskrive en kombinert effekt av to eller flere giftstoffer. Mest kjent er systemet basert på lineær additivitet, som antatt ovenfor, antagonisme (mindre enn additiv) og synergisme (mer enn additiv effekt).

I dette systemet (Fig. 7) kan effekten av vannprøven fra Eitrheimsvågen betegnes som synergisme mellom ferskvannandel og sink. En annen måte å betrakte dette på er å la sink og ferskvannandel bli representert ved vektorer. Punkter med samme vektorsum (kvadratsum) vil her ligge på en sirkel. I Fig. 8 er det anvendt logaritmiske skalaer, noe som innebærer at det er logaritmene til de 2 størrelsene som betraktes som vektorer. Dette harmonerer med den ellers utstrakte bruk av logaritmiske konsentrasjonsskalaer og fortynningsrekker i toksikologiske eksperimenter og ved bearbeiding av resultatene.

På logaritmiske skalaer lar det seg ikke gjøre stringent å plote inn et 0-punkt. Men dersom datapunktene i plottet lar seg beskrive ved konsentriske sirkelbuer som isolinjer, kan sentrum i det best tilpassede sirkelsettet betraktes som toksikologisk terskel for de to påvirkningsfaktorene. Figur 8 viser at faktorene ferskvann og sink overfor sjøpinnsvinegg antakelig kan beskrives på denne måten, selv om den rene ferskvannstoleransen bare er belagt med en enkelt observasjon. Terskelverdien for sink skulle etter dette bli ca 0.05 mg/l, og terskelverdien for ferskvann på omlag 0,004, dvs 0,4% tilsetning. Den siste er imidlertid svært usikker og mindre sannsynlig.

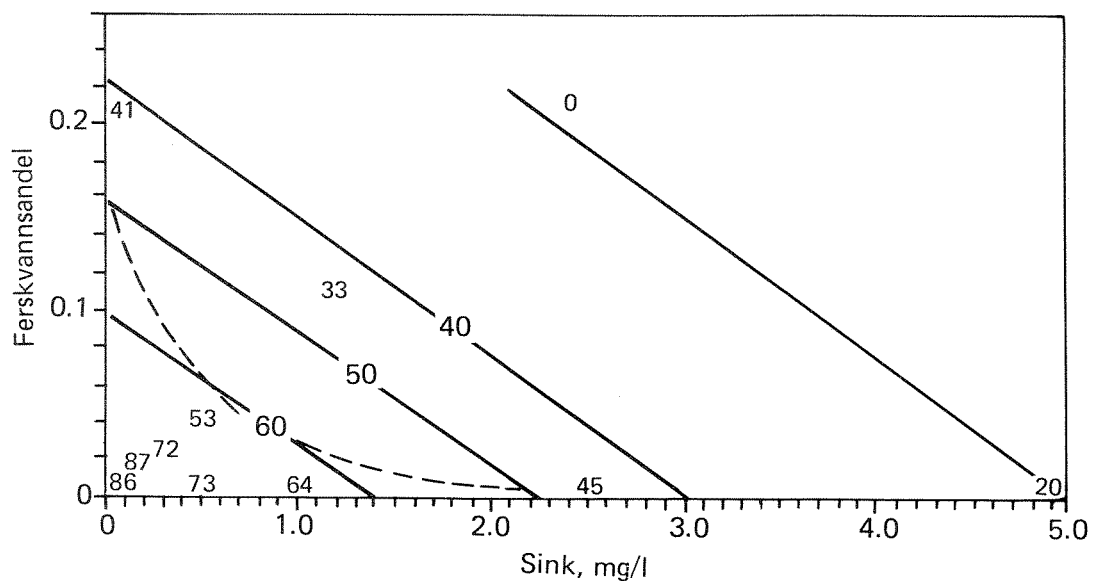


Fig. 7. Normalutvikling (%) hos sjøpinnsvinegg som funksjon av ferskvannsinnblanding og sink. Lineære koordinater.

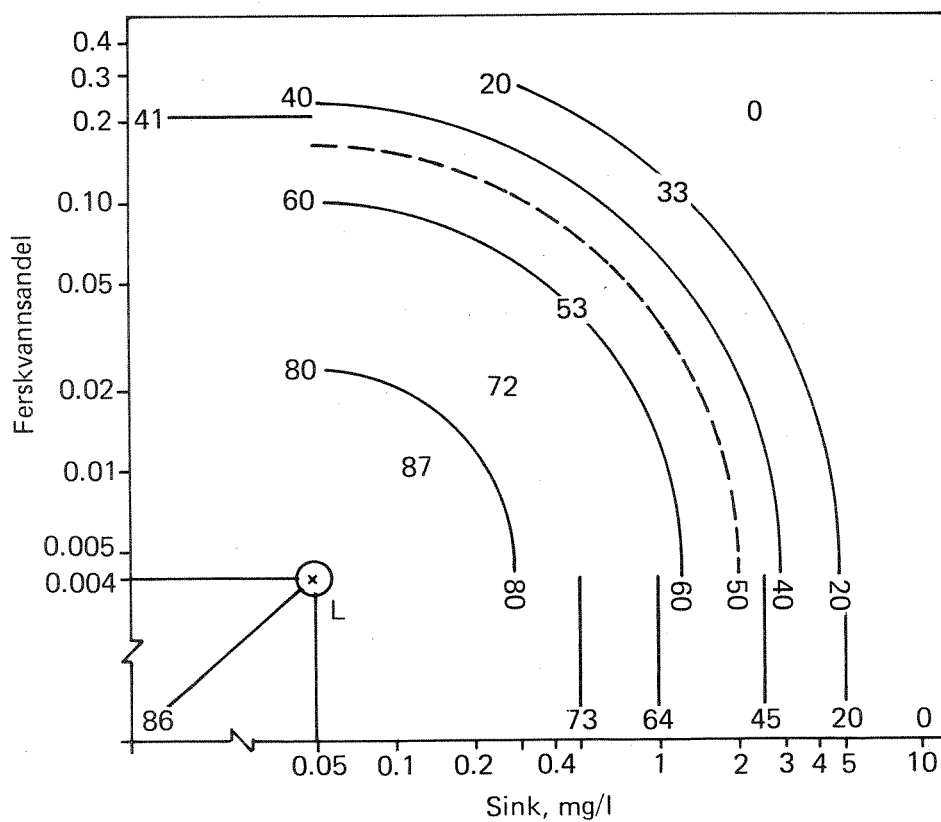


Fig. 8. Normalutvikling (%) hos sjøpinnsvinegg som funksjon av ferskvannsinnblanding og sink (logaritmiske koordinater). Estimert av nedre grense for effekt (L).

Tidligere publisert arbeid med effekter av sink på marine organismer oppsummert av Taylor (1981) viser toleransegrenser i områdene:

| | |
|---------------|-----------------|
| Fisk | 2.0 - 80 mg/l |
| Krepsdyr | 0.3 - 20 mg/l |
| Børstemark | 0.5 - 10 mg/l |
| Muslinger | 0.1 - 100 mg/l |
| Pigghuder | 0.02 - 40 mg/l |
| Planktonalger | 0.01 - 100 mg/l |

Alt i alt er det svært få eksempler på giftvirkning ved lavere sinkkonsentrasjon enn 0.05 mg/liter. For de fleste grupper, unntatt planktonalger og pigghuder, stopper giftvirkningene ved 0.1 mg/l eller høyere. Et nyere eksperimentelt arbeid (Strømgren 1982) viser begynnende hemning av blåskjellens lengdevekst allerede ved 0.01 mg Zn/l og 50% hemning ved ca 0.06 mg/l. Dette stemmer overens med den lave toleransegrensen blåskjellens filtrering viste overfor sink i vårt arbeid.

Undersøkelser av metallkonsentrasjonene i Sørfjorden (Skei, 1981, Næs & Rygg, 1982, Knutzen 1983) viser verdier ofte høyere enn 0.5 mg/l både i mellomsjiktet og i brakkvannslaget innerst i fjorden, mens 0.05-0.1 mg/l er vanlig i hele fjordens brakkvann.

På bakgrunn av testresultatene skulle blåskjell i hele Sørfjorden vise redusert filtrering og dårligere vekst og konkurransevne. Forekomsten av sjøpinnsvin-arten Strongylocentrotus droebachiensis skulle også vise redusert forekomst innover i fjorden på grunn av lav toleranse for ferskvannsinnblanding og sink.

En gjennomgang av de biologiske observasjoner fra høsten 1981 viser at blåskjell finnes levende i hele området. På de innerste stasjonene (Geitholmen - Oaldskor og innover) var blåskjellene i strandsonen og ned til 1-3 m døde, mens det her fantes levende blåskjell dypere ned. At det fantes blåskjell i brakkvannslaget i hele fjorden, viser allikevel at de over lengre perioder må ha hatt tilstrekkelig gode forhold for formering og vekst.

Sjøpinnsvinet S. droebachiensis fantes i tette bestander i det meste av fjorden under saltholdighets-sprangsjiktet (ca 5-10 m). Men på de innerste stasjonene (fra Geitholmen og innover) var de borte. Det samme gjalt sjøstjernene, en annen pigghudart.

Toleransen (EC 50) hos sjøpinnsvinlarver for kombinasjonen sink og

ferskvannspåvirkning var ca 0.7 mg Zn/liter ved 31 o/oo. Det høye sinkinnholdet i vannet gir derfor en rimelig forklaring på at sjøpinnsvin (og andre pigghuder som sjøstjerne) ikke fantes innerst i fjorden.

Når blåskjell som i våre tester viste en EC 50 for fødeinntak på 0.05 mg Zn/l (0.12 mg Zn/l i Sjørfjordvann), allikevel fantes også innerst i fjorden, kan dette skyldes fysiologisk/genetisk adaptasjon til høyt sinkinnhold i miljøet (jfr. Bryan & Gibbs, 1983) og til en viss grad blåskjellets særegne lukkereaksjon, som beskytter det mot ekstremverdier i et varierende miljø.

5. LITTERATURHENVISNINGER

- Abel, P.D. 1976. Effect of some pollutants on the filtration rate of *Mytilus*. Marine Pollut. Bull. 7., 228-231.
- Bryan, G.W. & Gibbs, P.E. 1983. Heavy metals in the Fal estuary, Cornwall: A study of long-term contamination by mining waste and its effects on estuarine organisms. Mar. Biol. Ass. U.K. Occasional Publ. No. 2. 111 pp.
- Connor, P.M. 1972. Acute toxicity of heavy metals to some marine larvae. Mar. Pollut. Bull. 3, 190.
- Haug, A., Melsom, S. og Omang, S., 1974. Estimation of heavy metal pollution in two Norwegian fjord areas by analysis of the brown alga *Ascophyllum nodosum*. Environ. Pollut. 7: 179-192.
- Julshamm, K., Slinning, K.-E., Haaland, H., Bøe, B. og Føyn, L. 1985. Analyse av sporelementer og klorerte hydrokarboner i fisk og blåskjell fra Hardangerfjorden og tilstøtende fjordområder høsten 1983 og våren 1984. Fiskeridirektoratet. Rapporter og meldinger 6/85, Bergen, juli 1985, 55 s + figurer.
- Julshamm, K. 1981. Studies on major and minor elements in molluscs in Western Norway VII. The contents of 12 elements, included copper, zinc, cadmium and lead in common mussel (*Mytilus edulis*) and brown seaweed (*Ascophyllum nodosum*) relative to the distance from the industrial sites in Sørfjorden, inner Hardangerfjord. Fisk.Dir. S-r. ERnæring Vol 1 (No 5): 267-287.
- Knutzen, J. 1983. Supplerende basisundersøkelse i Sørfjorden (Hardanger) 1981-1982. Metaller, PAH og fluor i organismer (med tillegg av eldre data om PAH i sedimenter). Rapport 114/83 innen Statlig program for forurensningsovervåking 12. des. 1983, 43 s.
- Knutzen, J. 1985. "Bakgrunnsnivåer" av utvalgte metaller og andre grunnstoffer i tang. Øvre grense for "normalinnhold", konsentrasjonsfaktorer, naturbetingede variasjoner, opptaks- og utskillelsesmekanismer. NIVA-rapport 0-83091 I 22. juli 1985, 121 s.
- MacInnes, J.R. & Calabrese, A. 1977. Response of embryos of the American oyster *Crassostrea virginica*, to heavy metals at different temperatures. Pp. 195-202 in McLusky, D.S. & Berry, A.J. (eds) Physiology and behaviour of marine organisms. Pergamon Press, Oxford m.fl.
- Næs, K. og Rygg, B. 1982. Supplerende basisundersøkelse i Sørfjorden 1981. Rapport 51/82 i Statlig program for forurensningsovervåking, NIVA-rapport 0-8000309, 10/2 1982, 18 s.
- Reish, D.J. 1978. The effects of heavy metals on polychaetous annelids. Rev. Int. Océanogr. Méd. 49, 99-104.
- Skei, J. 1981. Dispersal and retention of pollutants in Norwegian fjords. Rapp. P.v. Réun. Cons.int. Explor. Mer., 181, 78-86.

Skei, J. 1985. Diffuse tilførsler av tungmetaller fra Eitrheimsvågen - Odda. Resultater fra undersøkelser i 1984. 0-85111. NIVA-notat.

Strømngren, T. Effect of heavy metals (Zn, Hg, Cu, Cd, Pb, Ni) on the length growth of *Mytilus edulis*. Marine Biology 72, 69-72.

Taylor, D. 1981. A summary of the data on the toxicity of various materials to aquatic life. 13, Zinc.
Report BL/A/2143. Brixham Laboratory, Freshwater Quarry Overgang, Grixham. 40 pp.

V E D L E G G

Tabell A1. Metaller i blæretang (Fucus vesiculosus) og grisetang (Ascophyllum nodosum) fra Sørfjorden (B1-B7) og Hardangerfjorden (B8-B16), 10-14/9 1984, mg/kg tørrvekt. For stasjonenes beliggenhet, se fig. 1 og tabell 1.

| metall | | | Hg | Cd | Pb | Zn | Cu | Ag | Sn |
|-------------|-------------|------|------|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| Stasjon/art | | | | | | | | | |
| B1 | Byrkjenes | F.v. | 0.63 | 43 | 31 | 1700 | 27 | 0.3 | < 1 |
| B2 | Eitrheim | " | 0.55 | 31 | 22 | 1200 | 31 | 0.3 | < 1 |
| B3 | Tyssedal | " | 0.60 | 36 | 28 | 1600 | 35 | 0.3 | < 1 |
| B4 | Digranes | A.n | 0.58 | 19 | 12 | 1400 | 12 | 0.4 | < 1 |
| B5 | Måge | " | 0.47 | 17 | 11 | 1300 | 9.1 | 0.5 | < 1 |
| B6 | Eidnes | " | 0.17 | 11 | 4.7 | 940 | 8.0 | 0.6 | < 1 |
| B7 | Krossanes | " | 0.15 | 12 | 3.3 | 1200 | 7.9 | 0.4 | < 1 |
| B8 | Erdal | " | 0.08 | 5.6 | < 1 | 600 | 2.3 | 0.4 | < 1 |
| B9 | Staurneset | " | 0.07 | 5.0 | < 1 | 500 | 1.8 | 0.3 | < 1 |
| B10 | Sengjaneset | " | 0.10 | 7.8 | 1.7 | 650 | 3.9 | 0.7 | < 1 |
| B11 | Tingvika | " | 0.10 | 8.9 | 3.2 | 890 | 3.2 | 0.4 | < 1 |
| B12 | Sauaneset | " | 0.10 | 9.2 | 1.8 | 880 | 4.1 | 0.4 | < 1 |
| B13 | Ranaskjær | " | 0.07 | 6.5 | < 1 | 740 | 5.1 | 0.4 | < 1 |
| B14 | Rykkjeneset | " | 0.07 | 7.7 | 1.9 | 670 | 1.9 | 0.3 | < 1 |
| B15 | Vikingneset | " | 0.04 | 3.4 | < 1 | 390 | 2.0 | 0.2 | < 1 |
| B16 | Nærnes | " | 0.05 | 3.1 | < 1 | 490 | 2.2 | 0.3 | < 1 |

RAPPORT TIL NIVA JUNI 1985

Testing av Zn, Cd og forurenset vann fra Sørfjorden
på marint embryologisk materiale.

Prosjektleder: Sunniva Lønning Vader †

Forsøk utført av: Anne Stene

Vigdis Frivoll

Rapporten er skrevet av Anne Stene

UNIVERSITETET I TROMSØ

Akvatisk avdeling, Institutt for biologi og geologi

1. PRINSIPP

Egg av testorganismene suspenderes i naturlig sjøvann. Klekking og utvikling av larver følges over 4 dogn ved 5⁰ C. Antall normalt utviklede larver i testprøvene beregnes som prosent av tilsvarende i kontrollprøven. Konsentrasjonen for 50% hemming av utviklingen, EC₅₀-verdien, bestemmes.

2. TESTORGANISMER

Egg fra sjøpinnsvin og fisk er velegnet til laboratoriestudier. Eggene er lette å befrukte, de er gjennomsiktige og det byr derfor ikke på problemer å registrere unormale celledelinger. De tidlige delingsstadier av både sjøpinnsvin og fisk er relativt følsomme for ulike miljøgifter.

2.1. SJØPINNSVIN

Strongylocentrotus droebachiensis finnes i sublittoralen på 5-20 meters dyp i store mengder, gonadene er modne fra februar til juli. Modne egg måler 0.165 mm.

- Dyrene klippes opp og gonadene dissekeres ut.
- Ovariene legges i en skål med filtrert sjøvann for frigjøring av egg (modne hunner avgir lett store mengder egg, hundretusner til millioner).

Eggene sjekkes i mikroskop (dersom det er innslag av umodne, kantete eller mørke egg forkastes materialet).

- Eggene skylles to ganger i filtrert sjøvann ved dekantering og bunnfelling.

Testiklene legges tørt. Disse frigjør lett sperma.

- To dråper med sperma fortynnes i 10 ml sjøvann. 1 ml av dette blandes med egg suspendert i 500 ml sjøvann.
- Befrukningsprosenten sjekkes etter et par minutter (det er lett å skille befruktede egg fra ubefruktede på den relativt høye befruktningsmembranen).
- Kulturer med befruktningsprosent under 95 % forkastes.

De befruktede eggene skylles to ganger i sjøvann og fortynnes før bruk (ca. 100 egg/ml). pH-toleranseområdet er ca 7 - 9.

2.2.FISK

Torsk (*Gadus morhua*) har modne gonader i mars og april. Eggene måler 1,3 mm.

Fiskene strykes for rogn og melke som holdes tørt og kjølig. Rett før befruktning helles eggene over i 1 - 2 liter sjøvann. (Fiskeegg av god kvalitet flyter oppe i vannflaten. Bare kulturer hvor flesteparten av eggene holder seg flytende brukes i eksperimentene.)

- Ca 1/2 ml sperma blandes godt med eggsuspensjonen.

Befruktningsprosenten sjekkes etter ca 30 minutter og kulturer med befruktningsprosent under 90 % forkastes.

-De befruktede eggene skylles en gang i sjøvann.

- Eggene overføres til forsøksskålene ved hjelp av skje. pH-toleranseområdet er 7 - 9.

3. FORSØKSBEETINGELSER

Standard test utføres ved 5^o C i kjølerom. Testen går over 4 døgn med sjekking av % normale, unormale og døde testorganismer etter 4 døgn.

4. FORBEREDELSE AV TESTLØSNINGER

En 10 liters frossen prøve av vannet fra Sørfjorden ble mottatt fra NIVA i februar. Denne ble tint og overført til mindre 1 liters flasker som igjen ble frosset. Prøver ble så tatt ut av fryseren 1 døgn før forsøket startet.

Løsninger av tungmetallene på 50 ppm ble tillaget ved å veie inn hhv 104,2 mg $ZnCl_2$ eller 82 mg $CdCl_2$ i 1 liter filtrert sjøvann. Disse stamløsningene ble tillaget og fortynnet til 40, 20, 10, 5, 2,5, 1 og 0,5 ppm.

5 FØRSØKSOPPSETT

Forsøkene foregikk i 150 ml sylindriske glasskåler med 100 ml av hver testløsning og konsentrasjon. I skålene ble det så tilsatt ca 10000 nybefruktede sjøpinnsvinegg eller ca 100 nybefruktede torskkeegg. Kontrollorganismene utviklet seg i tilsvarende 150 ml skåler med reint filtrert sjøvann.

6 MÅLINGER

Sjøpinnsvineggene ligger på bunnen de to første utviklingsdøgn (ved 5 °C), deretter svømmer den cilierte larven opp mot overflaten. Torskkeeggene flyter i vannoverflaten. Eggene/larvene av sjøpinnsvin og eggene av torsk ble sjekket i lupe. Antall døde, unormale og normale embryo noteres.

7 KONTROLL AV pH OG SALINITET.

Det ble ikke foretatt noen forandringer av pH i løsningene da denne lå innenfor organismenes toleranseområde (pH 7). Vannet fra Sørflorden hadde imidlertid en salinitet på 26 ‰ mens det sjøvannet som ble benyttet i løsningene med tungmetaller og kontroll hadde en salinitet på 33 ‰. Det ble derfor satt opp en ekstra kontroll i reint filtrert sjøvann som var fortynnet med destilert vann til 26 ‰ s.

RESULTATER

Resultatene av forsøkene er oppført i tabell 2. Av tungmetallene var det zink som ga de sterkeste effektene på både sjøpinnsvinegg og torskeegg. Sjøpinnsvineggene var imidlertid mest sensitive for substansene. Vannet fra Sørfjorden ga også mest effekter på sjøpinnsvineggene. Effektene kan kanskje til en viss grad skyldes den lave saliniteten som gir høy dødelighet i kontroll 26 ‰. Den lave saliniteten ga mindre effekt på torskeeggene, selv om de mistet flyteevnen og la seg på bunnen av forsøksskåla ved 26 ‰. Tabell 1 viser EC_{50} -verdiene til de benyttede løsningene.

50

Effekter av eksponeringen ble hos sjøpinnsvin registrert som uregelmessige/forsinkede celledelinger, hemmet dannelse av tarmen, embryoner fylt med umormale celler og økt dødelighet. Hos torskeegg ble effektene registrert som uregelmessige celledelinger, redusert delingshastighet, mørke flekker i cytoplasmaet og økt dødelighet.

Tabell 1: EC_{50} verdiene til Zn, Cd og forurenset vann fra Sørfjorden.

| | | |
|-----------------|---------------|------------------|
| EC_{50} Zn | 2 ppm | 19 ppm |
| EC_{50} Cd | 3 ppm | 45 ppm |
| EC_{50} Sørfj | 25 ‰ ekstrakt | > kons. ekstrakt |

Tabell 2: Prosent normale organismer etter 4 døgns eksponering for løsninger av tungmetaller og forurenset vann fra Sørfjorden. Resultatene er et gjennomsnitt av 4 paralleller (N) og standard avviket på parallellene (S.D.).

| Substans | Sjøpinnsvinegg | | Torskeegg | |
|--------------------|----------------|------|-----------|------|
| | N | S.D. | N | S.D. |
| Kontroll 32% S. | 86 | 7 | 81 | 3 |
| Cadmium/50 ppm | 0 | 0 | 43 | 8 |
| 40 ppm | 0 | 0 | | |
| 20 ppm | 7 | 5 | 74 | 4 |
| 10 ppm | 25 | 9 | 72 | 3 |
| 5 ppm | 38 | 13 | 82 | 4 |
| 2.5 ppm | 58 | 8 | | |
| 1 ppm | 73 | 8 | 86 | 4 |
| 0.5 ppm | 83 | 7 | | |
| Zink/50 ppm | 0 | 0 | 4 | 4 |
| 40 ppm | 0 | 0 | | |
| 20 ppm | 0 | 0 | 49 | 15 |
| 10 ppm | 0 | 0 | 69 | 13 |
| 5 ppm | 20 | 4 | 84 | 4 |
| 2.5 ppm | 45 | 12 | | |
| 1 ppm | 64 | 7 | 85 | 4 |
| 0.5 ppm | 73 | 5 | | |
| Kontroll 26% S | 41 | 13 | 80 | 5 |
| Sørfj. konsentrert | 0 | 0 | 72 | 7 |
| 1:1 50% | 33 | 24 | 82 | 5 |
| 1:5 20% | 53 | 24 | 83 | 3 |
| 1:10 10% | 72 | 14 | 82 | 4 |
| 1:20 5% | 87 | 7 | | |

BALANUS TOX TEST SYSTEM

Henry Hovde

Laboratorium:
Biologibygget, rom 4617
Universitetet i Oslo
Telefon: 45 45 13



Kontor og postadr.:
Haugmannsveien 22
0586 Oslo 5
Telefon: 22 35 62

Postgiri: 9 17 26 93
Bankgiro: 6094.10.95006

Oslo, 30.10.85

Norsk institutt for
vannforskning

Postboks 333, Blindern
0314 OSLO 3

Attn.: Lars Kirkerud

BIOTESTER SØRFJORDVANN/TUNGMETALLER

Toxtester bunnslåing rur

I n n l e d n i n g. Foreliggende rapport presenterer resultatene fra biotester med resipientvann fra Sørfjorden og tungmetaller; dvs. effekter av disse på bunnslåing og metamorfose hos rur. I tillegg til de to opprinnelig planlagt inngående metallene sink og kadmium, omfatter forsøkene etter senere uttrykt ønske også en ekstra serie med undersøkelse av kobbers giftvirkning.

Av de opprinnelig to aktuelle arter er forsøkene som senere avtalt gjennomført med Balanus improvisus DARWIN (Crustacea, Cirripedia).

M a t e r i a l e o g m e t o d e r. For testbeskrivelse henvises til de to vedleggene

- 1) "Toxicity testing with the acorn barnacle - MATERIALS AND METHODS" og
- 2) "BALANUS IMPROVISUS (RUR) - HEMMING AV BUNNSLÅING OG METAMORFOSE".

Disse er utarbeidet tidligere i forbindelse med testing av boreslam, og i forbindelse med punktet "preparering av teststoff" avvek prosedyren ved de her utførte forsøk ved at forsøkene her ble igangsatt umiddelbart etter tilblanding testløsningene. Den mottatte vannprøve har etter mottagelsen, bortsett fra opptining umiddelbart før igangsetting forsøkene, vært kontinuerlig nedfrosset ved -25°C . De oppgitte konsentrasjoner angir volumprosent.

For metallenes vedkommende ble separate 1000 ppm stockløsninger laget umiddelbart før forsøkene igangsettelse ved til 1000 g totalløsning å tilsette henholdsvis:

- | | | | |
|----|--------|---------------------------------------|-----------------|
| a) | 4,40 g | ZnSO ₄ ·7H ₂ O | (287,47g/65,37) |
| b) | 2,03 g | CdCl ₂ ·2½H ₂ O | (228,30g/112,4) |
| c) | 2,51 g | CuSO ₄ | (159,64g/63,54) |

hvorfra fortyningsserier (testløsninger) straks ble laget.

| | |
|---|---|
| B | T |
| T | S |

R e s u l t a t e r o g d i s k u s j o n. Detaljresultatene fra innledende/orienterende testing er presentert i tabell 1, og resultatene fra de supplerende forsøksserier er gjengitt i tabell 2.

Vannprøve. Konsentrert (100%) resipientvann (1985 nr 142 og 182) synes å gi en svak redusering i frekvens normal utvikling ved at en mindre andel av de bunnslåtte individer metamorfoserer abnormt eller stopper opp i utviklingen uten å fullføre metamorfosen til voksen form fullstendig (kolonne 9 i tabellene). Men allerede ved 13% "utvanning" er det liten eller ingen påvisbar hemming av prosessen hos Balanus improvisus.

Tungmetaller. Dose-respons diagrammer for de tre metaller er vist i figur 1 nedenfor, visende frekvens succé bunnslåing med normal metamorfosering som funksjon av konsentrasjon metallioner, dvs. en sammenligning av metallenes toksisitet overfor målte parameter.

En sammenligning av de tilhørende EC_{50} -verdier er vist i tabell 3 (neste side).

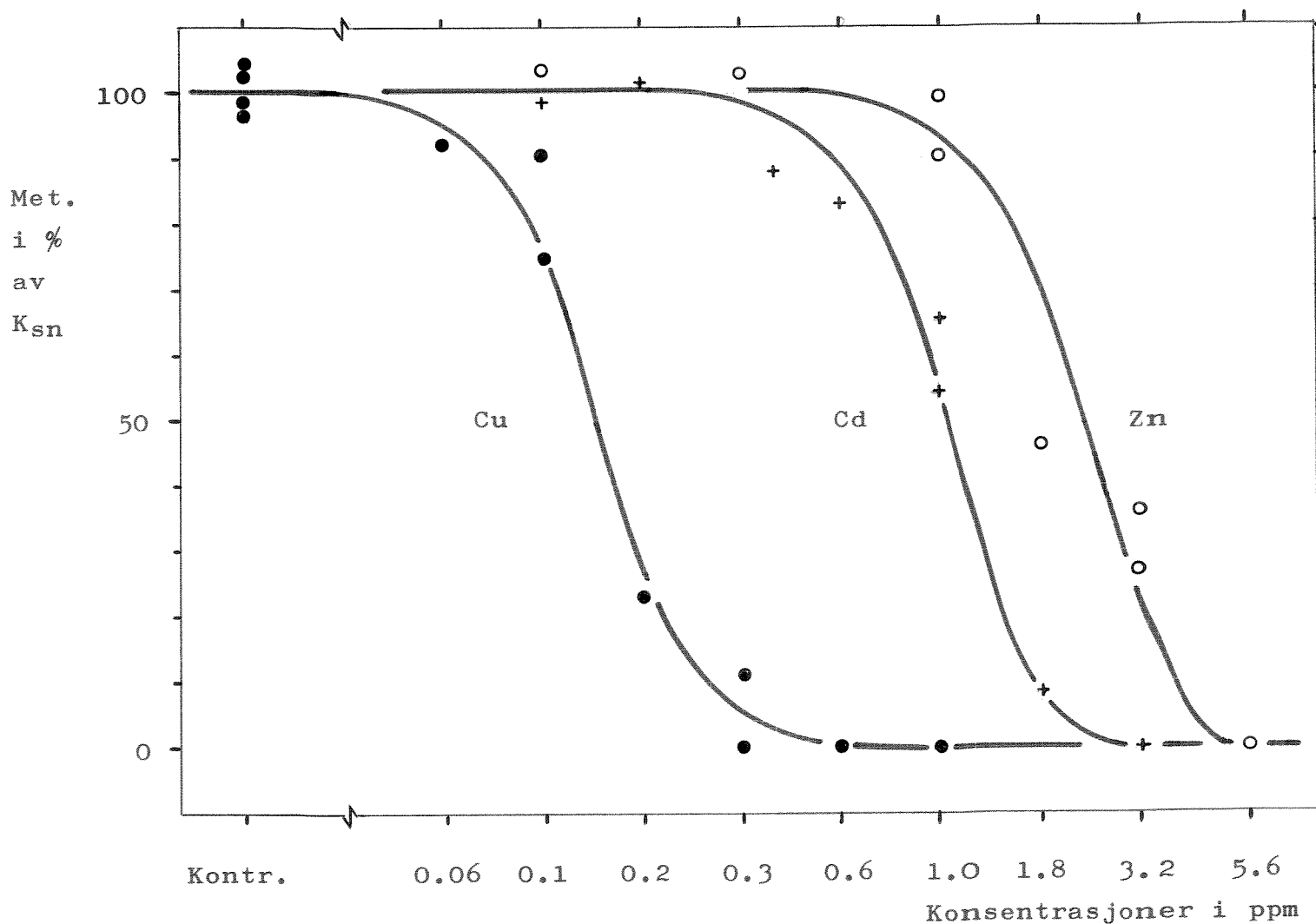


Fig. 1. Dose-respons kurver for de tre undersøkte metaller.

Tabell 3. Sammenligning av effekt hos de undersøkte metaller på bunnslåing og metamorfose hos ruren Balanus improvisus, uttrykt ved EC₅₀.

| | | | |
|----|---------|------------------|----------|
| 1. | Kobber | EC ₅₀ | 0,15 ppm |
| 2. | Kadmium | " | 1,0 ppm |
| 3. | Sink | " | 2,4 ppm |

pH-forhold. Total spredning pH ved forsøkernes avslutning var: Sørfjordvann 7,09-7,19, sink 7,09- 7,27, kobber 7,11-7,28 og kadmium 7,22-7,34. pH toleranse (sikkert område) er funnet å være 6,5-9,1, dvs. pH nivåene under forsøkene har ikke influert på resultatene.

Sensitivitetskontroll. Kontrollforsøk utført med 3,5-diklorfenolviste at forsøksdyrene var noe mer sensitive enn det tidligere funne gjennomsnitt, dog innenfor det normale variasjonsområde.

K o n k l u s j o n. Ut fra den aktuelle vannprøve å dømme synes ufortynnet resipientvann fra Sørfjorden å gi en svak hemming av frekvens normal metamorfose under bunnslåingen hos B. improvisus. Av de tre undersøkte metaller viser kobber størst giftighet (EC₅₀=0,15ppm). etterfulgt av kadmium (EC₅₀=1,0 ppm), og med sink visende minst giftvirkning overfor den målte parameter.

Tabell 1. Balanus improvisus 1985 (28.7-19.8). Innvirkning på bunnslåing og metamorfose hos ruren Balanus improvisus av vannprøve merket "Sørfj. 27/11-84 LAK" (Vannpr.), av sink (Zn), av kobber (Cu) og av kadmium (Cd).

Orienterende tester.

| 1. | 3. | 4. | 5. | 6. | 7. | 9. | 10. | 11. | 12. | 13. | 13a. |
|------------|----------------|-------|------------|----------------------------|-------------------------------------|------------|---------------------------|--------------|-------------|------------|---------------------------|
| Nr 1985 | Stoff tils. | Kons. | Tid dgn | Cypris fanget overfl | <u>Bunnslette</u> Met.N glass | Met abn | Løse/ Gjenv. cypris | derav def | Sum 7-10 | % Met.N | i % av K _{sn} |
| 138. | K | - | 22 | 4 | 23 | 2 | 1 | (0) | 26 | 88 | 96 |
| 139. | K | - | 22 | 0 | 25 | 0 | 1 | (1) | 26 | 96 | 104 |
| 142. | Vannpr. | 100% | 23 | 1 | 19 | 4 | 2 | (1) | 25 | 76 | 82 |
| 143. | " | 31.7% | 22 | 2 | 23 | 1 | 0 | (-) | 24 | 96 | 104 |
| 144. | " | 10.0% | 23 | 8 | 14 | 0 | 1 | (1) | 15 | 93 | 101 |
| 145. | " | 3.2% | 22 | 11 | 19 | 1 | 0 | (-) | 20 | 95 | 103 |
| 146. | " | 1.0% | 23 | 6 | 16 | 0 | 0 | (-) | 16 | 100 | 108 |
| 147. | Zn 10.0 ppm | | 21 | 1 | 0 | 0 | 27 | (17) | 27 | 0 | 0 |
| 148. | Zn 3.17 " | | 22 | 0 | 5 | 3 | 7 | (1) | 15 | 33 | 36 |
| 149. | Zn 1.00 " | | 21 | 3 | 15 | 1 | 2 | (1) | 18 | 83 | 90 |
| 150. | Zn 0.32 " | | 22 | 11 | 21 | 0 | 1 | (0) | 22 | 95 | 103 |
| 151. | Zn 0.10 " | | 21 | 1 | 23 | 0 | 1 | (0) | 24 | 96 | 104 |
| 152. | Cu 10.0 ppm | | 21 | 0 | 0 | 0 | 23 | (23) | 23 | 0 | 0 |
| 153. | Cu 3.17 " | | 22 | 2 | 0 | 0 | 21 | (20) | 21 | 0 | 0 |
| 154. | Cu 1.00 " | | 21 | 3 | 0 | 0 | 20 | (11) | 20 | 0 | 0 |
| 155. | Cu 0.32 " | | 22 | 4 | 1 | 1 | 8 | (3) | 10 | 10 | 11 |
| 156. | Cu 0.10 " | | 21 | 2 | 13 | 2 | 4 | (0) | 19 | 68 | 74 |
| 157. | Cd 10.0 ppm | | 21 | 5 | 0 | 0 | 19 | (19) | 19 | 0 | 0 |
| 158. | Cd 3.17 " | | 22 | 11 | 0 | 1 | 13 | (13) | 14 | 0 | 0 |
| 159. | Cd 1.00 " | | 21 | 1 | 14 | 7 | 7 | (7) | 28 | 50 | 54 |
| 160. | Cd 0.32 " | | 22 | 8 | 22 | 2 | 3 | (1) | 27 | 81 | 88 |
| 161. | Cd 0.10 " | | 22 | 3 | 18 | 1 | 1 | (0) | 20 | 90 | 98 |

Tabell 2. Balanus improvisus 1985 (5.9-30.9). Innvirkning på bunnslåing og metamorfose hos ruren Balanus improvisus av vannprøve merket "Sørfj. 27/11-84 LAK" (Vannpr.), av sink (Zn), av kobber (Cu) og av kadmium (Cd).

Supplerende forsøk.

| 1. Nr 1985 | 3. Stoff tils. | 4. Kons. | 5. Tid dgn | 6. Cypris fanget overfl | 7. <u>Bunnslette</u> Met.N glass | 9. Met abn | 10. Løse/ Gjenv. cypris | 11. derav def | 12. Sum 7-10 | 13. % Met.N | 13a. i % av K _{sn} |
|------------------|----------------------|-------------|------------------|----------------------------------|---|------------------|----------------------------------|---------------------|--------------------|-------------------|-----------------------------------|
| 180. | K | - | 23 | 3 | 44 | 1 | 7 | (2) | 52 | 85 | 102 |
| 181. | K | - | 23 | 2 | 17 | 0 | 4 | (1) | 21 | 81 | 98 |
| 182. | Vannpr. | 100% | 23 | 1 | 15 | 5 | 2 | (1) | 22 | 68 | 82 |
| 183. | " | 87% | 23 | 2 | 14 | 0 | 3 | (1) | 17 | 82 | 99 |
| 184. | " | 75% | 23 | 1 | 16 | 3 | 0 | (-) | 19 | 84 | 102 |
| 185. | " | 65% | 23 | 0 | 14 | 0 | 2 | (0) | 16 | 88 | 106 |
| 186 | " | 56% | 24 | 1 | 18 | 0 | 3 | (2) | 21 | 86 | 104 |
| 187. | Zn | 0.56ppm | 22 | 1 | 23 | 1 | 1 | (0) | 25 | 92 | 111 |
| 188. | Zn | 1.00 " | 24 | 3 | 14 | 2 | 1 | (1) | 17 | 82 | 99 |
| 189. | Zn | 1.78 " | 24 | 12 | 5 | 5 | 3 | (1) | 13 | 38 | 46 |
| 190. | Zn | 3.17 " | 24 | 4 | 4 | 3 | 11 | (2) | 18 | 22 | 27 |
| 191. | Zn | 5.64 " | 22 | 0 | 0 | 1 | 22 | (14) | 23 | 0 | 0 |
| 192. | Cu | 0.06ppm | 22 | 1 | 16 | 3 | 2 | (0) | 21 | 76 | 92 |
| 193. | Cu | 0.10 " | 24 | 2 | 12 | 1 | 3 | (2) | 16 | 75 | 90 |
| 194. | Cu | 0.18 " | 25 | 2 | 3 | 1 | 12 | (3) | 16 | 19 | 23 |
| 195. | Cu | 0.32 " | 25 | 7 | 0 | 2 | 12 | (6) | 14 | 0 | 0 |
| 196. | Cu | 0.56 " | 23 | 0 | 0 | 0 | 23 | (21) | 23 | 0 | 0 |
| 197. | Cd | 0.18ppm | 23 | 2 | 20 | 1 | 3 | (2) | 24 | 83 | 101 |
| 198. | Cd | 0.32 " | 25 | 6 | 6 | 0 | 3 | (1) | <u>9</u> | 67 | (81) |
| 199. | Cd | 0.56 " | 25 | 2 | 13 | 4 | 2 | (1) | 19 | 68 | 83 |
| 200. | Cd | 1.00 " | 25 | 3 | 7 | 2 | 4 | (4) | 13 | 54 | 65 |
| 201. | Cd | 1.78 " | 25 | 5 | 1 | 3 | 12 | (12) | 16 | 6 | 8 |

BALANUS TOX TEST SYSTEM

Henry Hovde

45

Laboratorium
Biologibygget, rom 4617
Universitetet i Oslo
Telefon: 45 45 13



Kontor og postadr.
Haugmannsveien 22
0586 Oslo 5
Telefon: 22 35 62

BALANUS IMPROVISUS (RUR) - HEMMING AV BUNNSLÅING OG METAMORFOSE

1. PRINSIPP

Larver på cyprisstadiet suspenderes i naturlig sjøvann, og utviklingen av larvene følges i testprøver uten (kontroll) og med teststoff tilsatt i økende konsentrasjoner. Etter 10 døgn ved 22°C i kontinuerlig lys, registreres utviklingen av larvene i prøvene: antall larver som er bunnslått og utviklet til normale, voksne individer, samt antall av og tilstanden til de larver som ikke er bunnslått. Frekvens normalt utviklede larver i testprøvene beregnes som prosent av tilsvarende i kontrollprøvene. Konsentrasjonen for 50% hemming, EC₅₀-verdien, bestemmes med 95% konfidensintervall.

2. TESTORGANISME

Balanus improvisus DARWIN (Crustacea, Cirripedia) - skipsrur

B. improvisus er en vanlig forekommende marin og estuarin art i Vest-Europa og Atlantisk Nord-Amerika. Etter gyting/frigjøring fra foreldrenes "eggmasser" gjennomløper larvene seks planktoniske naupliestadier frem til de ikke spisende cyprider som etter noen tid bunnslår seg og metamorfoserer (forvandler seg) til den voksne, fastsittende form.

For herværende formål blir dyr vanligvis hentet fra Indre Oslofjord. I laboratoriet blir store antall (opp til 50.000) forsøksdyr (cypris) fremskaffet ved oppdrett av larver (klekket ut fra gyte-modne fosterlameller utdissekert fra kjønnsmodne dyr) i fem liters begerglass gjennom de seks naupliestadier ved bruk av diatoméen Skeletonema costatum (GREVILLE) CLEVE som fôr. Optimal temperatur for oppdrett er 17-18°C, og passende medium er filtrert naturlig sjøvann med saltholdighet 33-34‰.

Når cyprisstadiet er nådd, kan bunnslåingen til de dyr ikke umiddelbart brukt i tester forhindres ved oppbevaring av dyrene mørkt og kaldt ($\pm 1^\circ\text{C}$), og et stock reservoar av cypris kan på denne måte lagres som velegnede forsøksdyr gjennom flere måneder.

| | |
|---|---|
| B | T |
| T | S |

Minimumskrav for testing:

- Alder til cypris minimum 4 dager
- Tilstandskrav til cypris er at minst 90% av dyrene i kontrollforsøkene gjennomløper normal bunnslåing, metamorfosering, videre utvikling og fremdeles er aktive (cirrebevegelse) 3 uker etter igangsettelsen av et forsøk (uten fôring underveis).

3. TESTLØSNING

Som testløsning benyttes naturlig sjøvann (pumpet opp fra 40 m dyp ved Drøbak for å sikre jevn kvalitet). Vannet sterilfiltres før bruk med Sartorius 0.2 μ m biologisk inerte cellulose-nitrat membranfilter (SM 113 07). Foruten teststoffet selv foretas ingen ytterligere tilsetninger til testløsningen.

4. TESTUTSTYR

Testen kjøres stillestående, lukket og statisk i glassbeholder (fullstendig væskefylt, med siliconkork lukket prøveglass (dramsglass) nr 16 = 67 ml).

5. TESTBETINGELSER

Testen kjøres ved 22°C gjennom 10 døgn under kontinuerlig belysning (75 W glødetråd ca 1 m avstand).

6. PREPARERING AV TESTSTOFF

Teststoffet innveies i testløsningen, det hele rystes kraftig og får stå til likevektsinnstilling mørkt i 45 timer ved 10°C. Vann-ekstraktet sifoneres så av og filtreres gjennom dobbelt filteringspapir slik at hverken flytestoffer eller sedimentert stoff kommer med.

Testkonsentrasjonene velges fra en logaritmisk konsentrasjons-serie; eks. x 1.78 (100, 178, 317, 564 .. osv.), x 1.334 eller evt. x 1.155. Den utveide mengde teststoff gir beregnet og opp-gitt konsentrasjon i ppm (vekt/vekt).

7. PREPARERING AV TESTPRØVER

Sifonert ekstrakt av hver utveid testporsjon tilsettes minimum 30 cyprider. Dyrene spiser ikke i cypridstadiet, og hele forsøket kjøres uten noen form for fôring. Testkarene lukkes og

settes til inkubering. Det kjøres først en innledende test over et stort konsentrasjonsområde, deretter en endelig test med minimum 6 testkonsentrasjoner og minst 2 paralleller pr. testkonsentrasjon.

8. MÅLINGER

Etter 10 døgn telles antall normalt utviklede testorganismer i hver testprøve. Normal utvikling er fullstendig bunnslåing med fastsementering til bunnssubstratet, med tilhørende/påfølgende normal metamorfosering (forvandlig) til den voksne form, med normal utvikling og aktivitet. I tillegg registreres antall av og tilstanden til de individer som ikke har oppført seg normalt, f.eks. svømme/gå-aktiviteten til ikke bunnslåtte individer, bunnslåtte individer med unormal cirral aktivitet, og dødeligheten ved de forskjellige stadier under testtiden.

Etter endt testtid måles pH i alle testprøvene.

9. BEREGNINGER

Frekvens individer med normal utvikling beregnes for hver testprøve som prosent av tilsvarende antall i kontrollprøver uten teststoff. Resultatene fra denne beregning brukes til beregning av testkonsentrasjonen for 50% hemming av responsparameteren, EC_{50} -verdien, med tilhørende 95% konfidensintervall.

10. SPESIELLE KONTROLLTESTER

Følsomhetskontroll

Testorganismens følsomhet kontrolleres ved å måle dens respons ovenfor en kontrollsubstans med kjent virkning. Middelveidien for EC_{50} -verdiene fra mange tester med kontrollsubstans er beregnet, og responsintervallet for denne middelveidi er bestemt. For hver ny serie av tester inkluderes en testprøve med et innhold av kontrollsubstansen lik den nevnte middelveidi. Gir denne testprøve respons innen det normale responsområdet, har testorganismen normal følsomhet. Hvis ikke, må hele testserien repeteres. Som kontrollsubstans benyttes 3,5-diklorfenol. Middelveidien for

EC₅₀ fra mange tester med dette stoff er funnet å være 2.61 mg/kg (7 tester med variasjonsområde 2.07-3.03 mg/kg). Denne testkonsentrasjon (middelverdien) er funnet å gi respons innen området 21-78% av normal bunnslåing og metamorfosering (dvs. av den funnet i de kontrollforsøkene som kjøres uten belastning).

pH-kontroll

Viser det seg at noen av testløsningene har pH-verdi utenfor testorganismens toleranseområde, vurderes om resultatene fra disse testprøvene har betydning for fastleggelsen av EC₅₀-verdien. Er resultatene av betydning, gjentas testen med regulering av pH i de berørte testprøvene. Begge sett resultater tas i betraktning ved vurdering av resultatene.

11. RESULTATER

Resultatene fra prosessen bunnslåing og metamorfose rapporteres som EC₅₀-verdi med tilhørende 95% konfidensintervall. I tillegg illustreres resultatene i form av et konsentrasjons/respons diagram.

Observasjonsresultatene for individer med unormal utvikling gis som kommentarer.

Alle avvik fra den her beskrevne metode angis som kommentarer i rapporten.

Toxicity testing with the acorn barnacle

MATERIALS AND METHODS

Henry Hovde
Department for Marine Zoology
University of Oslo

1. Name (Scientific & common)

- Balanus improvisus DARWIN (Crustacea, Cirripedia)
- acorn or sessile barnacles

2. Biological data/characteristics and living conditions

B. improvisus is a common marine and brackish water species of Western Europe and Atlantic North America. After hatching/liberation from the parental egg-masses the larvae develop through six planktonic naupliar feeding stages to the non-feeding cyprids which after some time settle and metamorphose into the sessile adult form.

For the present purpose, animals usually are collected from the Oslofjord. In the laboratory large numbers (up to 35.000) of test animals, the c y p r i d s , are obtained by rearing larvae (hatched from dissected ripe egg-masses of adults) in 5 liters beakers through the six nauplii-stages using the diatom Skeletonema costatum (GREVILLE) CLEVE as food. Optimal temperature for rearing is 17-18°C, and suitable medium is filtered natural seawater of salinity about 33-34‰.

Once the cyprid stage is reached, the settlement of those animals not immediately used in tests, can be postponed for as long as 15 weeks and thus serve as useful stock animals for later tests. The postponement of the settlement is achieved by keeping the larvae in darkness and in low temperatured water ($\pm 1.8^{\circ}\text{C}$).

3. Types of effect

- The barnacles are particularly suitable for tests of the effects on the settlement of larvae (i.e. cyprids) and on the metamorphosis into the young adult. This is a critical phase of the life cycle.
- Also, the effects on non-settled larvae or on metamorphosed animals are closely watched (activity, lethality, morphological development).

4. Minimal requirements for testing

- Age of cyprids minimum 3 days.
- The required condition of the cyprids is that at least 90% of the animals in the controls should perform normal settlement, metamorphosis, development and still being active (cirral movement) 3 weeks after the start of an experiment.
- Preferably minimum 50 animals per experimental vial and at least two parallels at each concentration should be used.
- The desired amount of material to be tested is mixed with sea-water and shaken vigorously for three hours. The solutions are then left for some time to clear up (sedimentation/flotation) before being transferred to the experimental vessels. The supernatant is used in the experiment, and the precipitate and oil floating on the water surface are discarded.
- The duration of an experiment is approximately ten days.
- The experimental vials are closed, completely filled with "water". Static.
- Temperature 23-24°C.
- Continuous light during the testing period.

5. Criteria used / Evaluation of toxicity

- Settlement and metamorphosis.
- Behaviour (like swimming/walking activity of unsettled cyprids or cirral activity).
- Morphology (normal/abnormal development).
- Lethality at the different stages.

By routine toxicity testing the parameters: success of settlement, metamorphosis, cirral development (ecdysis) and activity is followed in an appropriate range of concentrations of testing material.

The numbers of animals successfully reaching the stage of viable, young adults in relation to the total number of animals exposed to a given concentration of test substance is determined. The mean values of each concentration tested are calculated in relation to that of the controls, and the EC-50 value is given in ppm (parts per million by weight). Also the corresponding EC-90 value is given when feasible.

Vedlegg 3Tokstester med Sørfjordvann, sink og kadmium på blåskjell og rur.METODIKK

Generelt

Biologisk testing av avløpsvann eller enkeltstoffer som slippes ut i sjøen, har oftest til hensikt å gi opplysning om effekter som må ventes i resipientene, eller å identifisere kilden til miljøeffekter som allerede er registrert.

I tillegg til akutt dødelighet er det i denn sammenheng viktig at det testes på biologiske prosesser som er utslagsgivende for organismenes evne til å lykkes i det aktuelle miljø. For blåskjell er filtrering, fødeassimilasjon, lukkereaksjon og byssusdannelse slike prosesser, i mange fjorder også osmoregulering.

Her beskrives en test på filtrering hos blåskjell og akutt dødelighet hos tanglopper.

Figurene 1 og 2 viser foto av forsøksdyrene.

Blåskjell, Mytulus edulis, filtrering.

Testen har som mål å estimere den konsentrasjon eller fortykning som ville gitt 50% reduksjon i skjellenes filtreringsrate (EC 50).

En testenheter består av et 3 liters begerglass med 2 liter testløsning lufteanordning og en nedsenket pleksiglassplate der 5 blåskjell (2-3 cm) har festet seg.

På bakgrunn av innledende forsøk velges 5 konsentrasjoner (x, 2x, 4x, 8x og 19x) og 1-2 kontrollenheter. For å sikre ensartet alder, tas skjellene fra kunstig substrat som fornyes hvert år. Skjellene gis noen dager i testakvariene til å feste seg, samt venne seg til temperatur (8-10°C) saltholdighet og fôr. Før testen startes måles filtreringsraten med 1 til 3 dagers mellomrom, og disse resultatene skal stemme overens. Deretter eksponeres blåskjellene for testløsningene, som fornyes hver dag i tilsammen 4 døgn. Filtreringsrate måles etter 1, 2, 3 og 4 døgn, for utskiftning av testløsningene.

Ved måling av filtreringsrate ble det til hvert testakvarium tilsatt $40-50 \times 10^6$ celler Phaeodactylum tricornutum pr. liter testløsning. (Fra en kultur med celletetthet $5.000-10.000 \times 10^6$ celler pr liter). Celletettheten i akvarievannet ble målt med Coulter counter ved start og etter 20, 40 og 60 minutter. For hver periode ble filtreringsratene beregnet som:

$$v = \frac{V}{n \cdot t} \ln \left(\frac{M_1}{M_2} \right)$$

der:

V = volum av akvarievannet (2l)

n = antall individer (5)

t = tid mellom tellingene (0,33h)

M1= celletetthet ved tidsintervallets begynnelse

M2= Celletetthet ved tidsintervallets slutt

Gjennomsnittlig filtreringsrate for de 3 periodene, v_m , ble brukt testparameter.

Filtreringsratene for hver testenhed oppgis som % av filtreringsraten før start. EC 50-verdien etter 1-4 døgn beregnes ved plotting eller lineær regresjon med log-transformerte konsentrasjoner.

Tanglopper, Gammarus oceanicus, dødelighet.

Målet med testen er å estimere den konsentrasjon av stoff eller prøvevann som skal til for å gi 50% dødelighet etter 1-4 døgn (LC 50).

En testenhed består av et 3 liters begerglass med 2 l testløsning og 5 individer.

En logaritmisk konsentrasjonsrekke med 5 konsentrasjoner velges på bakgrunn av innledende forsøk. I tillegg settes opp 1-2 kontrollkar.

Gammarus oceanicus tas fra tangbusker i fjæresonen (mest på blæretang) og temperatur-adaptes for testing (8-10°C) i et godt luftet stam-akvarium. Under adapteringen kan de fores med tangbiter. En dag før, og under test gis det ikke fôr. Bare friske og livlige dyr brukes. Testløsning skiftes ikke.

Resultatene presenteres som dødelighet i hver testenhed, og LC 50 beregnes for 1, 2, 3 og 4 døgn eksponering. Død regnes som inntrådt når gjellebevegelsene er opphørt.

Resultater

Blåskjell

Resultatene av måling av filtreringsrate er presentert i tabell A1 og figur A3.

Tabell A1. Filtreringsrate som % av filtreringsrate før start i de enkelte akvarier.

| Stoff | Konsentrasjon el. kar nr. | Eksponeringstid, døgn | | | |
|-----------------------------------|------------------------------|-----------------------|-----|-----|-----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Zn | 0,05 mg/l | 77 | 70 | 41 | 38 |
| | 0,10 " | 60 | 13 | 36 | 38 |
| | 0,20 " | 7 | 12 | 18 | 8 |
| | 0,40 " | 3 | 13 | 12 | 6 |
| | 0,80 " | 4 | 0 | 6 | 2 |
| | | | | | |
| Cd | 0,08 " | 136 | 112 | 115 | 104 |
| | 0,16 " | 8 | 22 | 12 | 9 |
| | 0,32 " | 7 | 5 | 2 | 4 |
| | 0,64 " | 3 | 4 | 7 | 0 |
| | 1,28 " | 4 | 2 | 4 | 2 |
| | | | | | |
| Vann fra Eitrheims vågen | 40 ml/l | 85 | 42 | 51 | 51 |
| | 80 " | 57 | 51 | 31 | 46 |
| | 160 " | 2 | 0 | 16 | 9 |
| Kontroll | kar nr. 16 | 106 | 90 | 104 | 106 |
| | " 17 | 119 | 116 | 110 | 115 |
| | " 18 | 102 | 110 | 119 | 73 |

TANGLOPPE

Pilottesten viste at forsøksdyret overlevde i ufortynnet Sørfjordvann. Sørfjordvann ble derfor ikke tatt med i hovedtesten. Resultatene for sink og kadmium er presentert i tabell A2.

Tabell A2. Dødelighet (%) hos tangloppen Gammarus oceanicus eksponert for sink og kadmium.

| Stoff | Konsentrasjon mg/l | Eksponeringstid, døgn | | | |
|----------|-----------------------|-----------------------|----|----|----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Zn | 1,5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 6 | 0 | 0 | 40 | 60 |
| | 12 | 20 | 30 | 60 | 60 |
| | 24 | 0 | 20 | 60 | 80 |
| Cd | 1,5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Kontroll | Kar nr 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Kar nr 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |

4 døgns LC 50 verdier ble estimert til følgende:

Zn: 5,3 mg/l

Cd: 21 mg/l

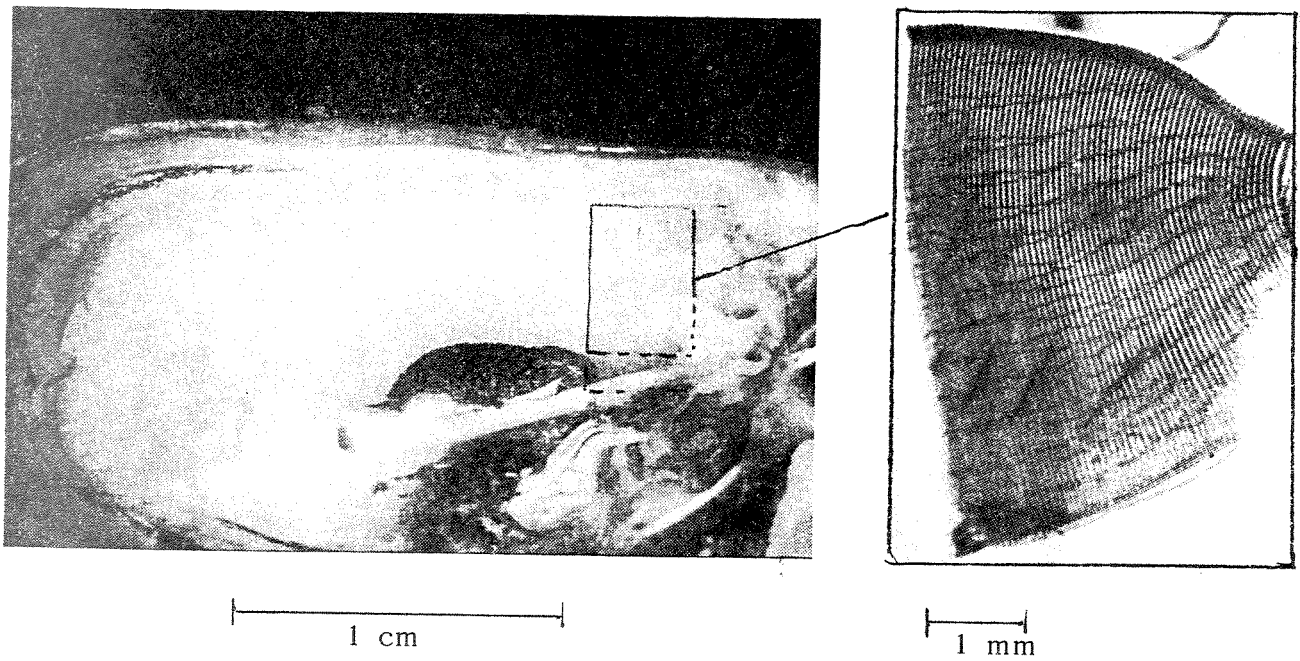


Fig. A 1. Blåskjell Mytilus edulis, juvenil, med utsnitt av filterlamell.

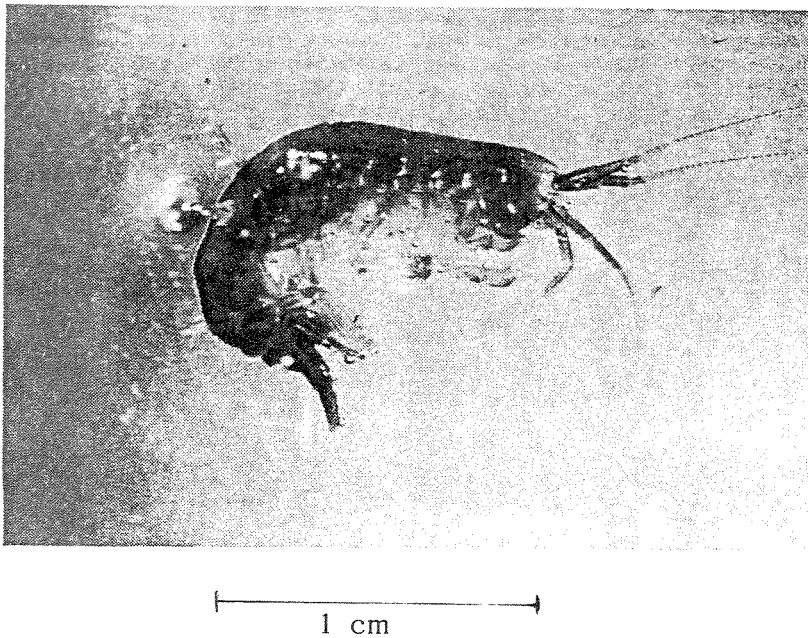


Fig. A 2. Tangloppe Gammarus oceanicus.

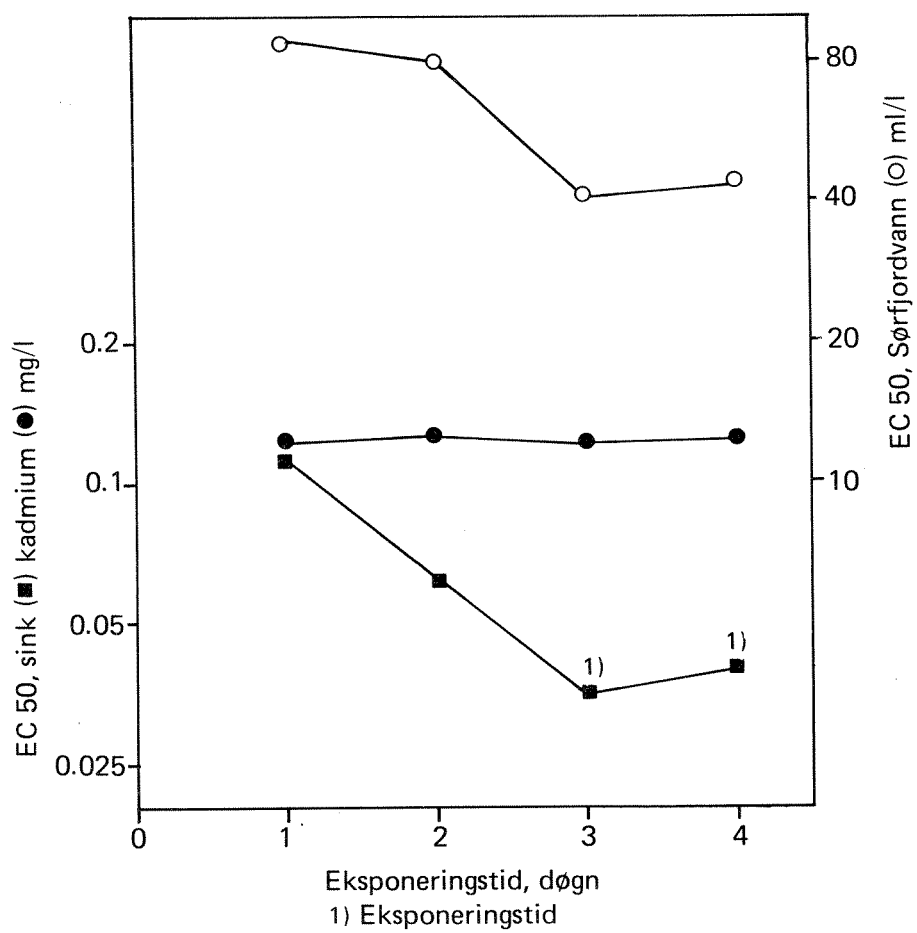


Fig. A3. Toksisitetskurver for sink, kadmium og Sørfjordvann fra Eitrheimsvågen.