

RAPPORT LNR 3537-96

Bioakkumulering av
miljøgifter fra marine
sediment - etablering
av et test-system.

Hovedkontor

Postboks 173, Kjelsås
0411 Oslo
Telefon (47) 22 18 51 00
Telefax (47) 22 18 52 00

Sørlandsavdelingen

Televeien 1
4890 Grimstad
Telefon (47) 37 04 30 33
Telefax (47) 37 04 45 13

Østlandsavdelingen

Rute 866
2312 Ottestad
Telefon (47) 62 57 64 00
Telefax (47) 62 57 66 53

Vestlandsavdelingen

Thormøhlensgt 55
5008 Bergen
Telefon (47) 55 32 56 40
Telefax (47) 55 32 88 33

Akvaplan-NIVA A/S

Søndre Tollbugate 3
9000 Tromsø
Telefon (47) 77 68 52 80
Telefax (47) 77 68 05 09

Tittel Bioakkumulering av miljøgifter fra marine sediment - etablering av et test-system	Løpenr. (for bestilling) 3537-96	Dato 18/9-1996
	Prosjektnr. Undernr. O-93227 P-934233	Sider Pris 27
Forfatter(e) Ketil Hylland	Fagområde Marin økologi	Distribusjon ikke begrenset
	Geografisk område	Trykket NIVA

Oppdragsgiver(e) Statens forurensningstilsyn	Oppdragsreferanse Jon Heikki Aas
---	-------------------------------------

Sammendrag

Det har blitt etablert et oppsett for testing av biotilgjengeligheten av miljøgifter i marine sedimenter. Test-systemet kan brukes til testing av sediment innhentet fra felt og sediment innblandet en ønsket miljøgift eller blanding av miljøgifter. Test-organismer i oppsettet er børstemarken *Nereis diversicolor* og nettsnegl *Hinia (Nassarius) reticulata*. Dette er sentrale arter i økosystemet, de er lette å samle i store antall og det er mulig å holde begge i akvariesystemer over lengre tid. Alle eksponeringer foregår over 28 dager. Det benyttes vanligvis 3-4 replikate akvarier for hver sediment-type med 10-15 *Nereis* og 5 *Hinia* i hvert akvarium. Hvert akvarium er en eksperimentell enhet og alle individer av hver art fra hvert akvarium slås sammen for kjemiske analyser. Test-systemet er blitt benyttet til uttesting av biotilgjengeligheten av organiske miljøgifter i sedimenter fra Florvågen (Bergen) og Drammensfjorden i tillegg til uttesting av tilgjengeligheten av kobber (Cu) fra et notvaskeri for nøter som brukes i fiskeoppdrett. Miljøgifter som var tilstede i overkonsentrasjoner i sediment akkumulerte i *Nereis diversicolor*, deriblant polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH), polyklorerte bifenylter (PCB), kobber, DDT og dets metabolitter. Test-systemet kan forventes å gi et rimelig estimat for biotilgjengeligheten av miljøgifter i sediment.

Fire norske emneord 1. bioakkumulering 2. marine sediment 3. <i>Nereis diversicolor</i> 4. test-system	Fire engelske emneord 1. bioaccumulation 2. marine sediments 3. <i>Nereis diversicolor</i> 4. test-system
--	---



Prosjektleder
Ketil Hylland

ISBN 82-577-3083-1



Forskningsjef
Bjørn Braaten

O-93227/P-934233

**Bioakkumulering av miljøgifter fra marine
sediment**

etablering av et test-system

Forord

Etter søknad fra Jens Skei bevilget Statens forurensningstilsyn (SFT) i 1993 midler til oppbygging av et test-system for biotilgjengeligheten av miljøgifter i sedimenter. SFTs hensikt med å støtte prosjektet var å framskaffe et system som kunne kaste lys over sediment-data samlet inn under "Handlingsplan for opprydding av deponier og spesialavfall, forurenset grunn og forurensete sedimenter". Systemet skulle etableres på marin forskningsstasjon Solbergstrand (MFS). Planlegging og gjennomførelse bygde på dokumentasjon fra amerikanske EPA om tilsvarende tester i USA. Arbeidet med test-systemet ble påbegynt vinteren 1993-94 og systemet sto klart sommeren 1994. I 1994 og 1995 ble systemet brukt i ulike sammenhenger, både til uttesting av forurensete sedimenter og spekkede sedimenter. Som nevnt ovenfor var Jens Skei initiativtaker til dette prosjektet og har fulgt det opp gjennom hele prosessen. Einar Johannessen ved MFS sto sentralt i oppbyggingen av systemet og jeg vil takke Sigbjørn Andersen for viktige innspill. Noen av de presenterte resultatene har framkommet gjennom arbeidet til eller i samarbeid med hovedfags- og doktorgradsstudenter ved Biologisk Institutt, Universitetet i Oslo. Jeg vil særlig nevne Renée Bechmann og Line Andersen ved Avdeling for Marin Zoologi og Kjemi, Biologisk Institutt, UiO.

Oslo, 18 september, 1996

Ketil Hylland

Innhold

Sammendrag	5
1. Innledning	6
1.1 Målsetning	6
1.2 Krav til test-systemet	6
2. Etablering av test-systemet	8
2.1 Akvariesystemet	8
2.2 Test-sediment	10
2.3 Test-organismene	11
2.3.1 Børstemarken <i>Nereis diversicolor</i>	12
2.3.2 Nettsnegl <i>Hinia (Nassarius) reticulata</i>	13
2.4 Gjennomførelse og design av tester	14
3. Bruk av test-systemet	16
3.1 Sediment fra Florvågen, Bergen	16
3.2 Sediment fra Drammensfjorden	17
3.3 Sediment spekket med Cu fra notvaskeri	18
4. Evaluering av systemet	22
4.1 Generelt	22
4.2 Akvariesystemet	22
4.3 Test-sediment og -organismer	22
4.4 Gjennomførelse og design	23
5. Videreutvikling av test-systemet	24
5.1 Biologiske effekter	24
5.2 Etablering av et test-system for ferskvann	24
5.3 Kobling mot kjemiske og fysiske sediment-parametre	24
6. Litteraturhenvisninger	26

Sammendrag

Det har blitt etablert et oppsett for testing av biotilgjengeligheten av miljøgifter i marine sedimenter. Test-systemet kan brukes til testing av sediment innhentet fra felt og sediment innblandet en ønsket miljøgift eller blanding av miljøgifter. Systemet består av helstøpte glass-akvarier med pleksiglass skillevegger (til styring av vanngjennomstrømning) med lokk og nett på utløp. Alle akvarier i en test tilføres like mengder av filtrert vann fra 60-m dyp utenfor forskningsstasjonen på Solbergstrand, ytre Oslofjord. Vanntilførselene styres ved bruk av to nivåer av headertanker og fri flyt fra den siste headertanken til akvariene. Temperaturen i akvariene reguleres til den samme som i tilført vann ved at alle akvariene står i et vannbad som får kontinuerlig tilførsel fra akvariene.

Sediment som skal testes i oppsettet kan innsamles med grabb, corer eller box-corer. Det benyttes sediment fra 0-10 cm dyp. Sedimentet transporteres til MFS på glass- eller pleksiglass-beholdere, helst nedkjølt. Sedimentet som skal testes kan lagres under vann i inntil 4 uker før testen startes. Alt sediment må homogeniseres før uttesting, men ellers holdes all manipulering av sediment til et minimum.

Test-organismer i oppsettet er børstemarken *Nereis diversicolor* og nettsnegl *Hinia (Nassarius) reticulata*. Dette er sentrale arter i økosystemet, de er lette å samle i store antall og det er mulig å holde begge i akvariesystemer over lengre tid. Alle eksponeringer har foreløpig foregått over 28 dager, men dette må trolig forlenges ved uttesting av svært tungtløselige organiske miljøgifter (dioksiner, dibensofuraner).

Det benyttes vanligvis 3-4 replikate akvarier for hver sediment-type med 10-15 *Nereis* og 5 *Hinia* i hvert akvarium. Hvert akvarium er en eksperimentell enhet og alle individer av hver art fra hvert akvarium slås sammen for kjemiske analyser.

Test-systemet er blitt benyttet til uttesting av biotilgjengeligheten av organiske miljøgifter i sedimenter fra Florvågen (Bergen) og Drammensfjorden i tillegg til uttesting av tilgjengeligheten av kobber (Cu) fra et notvaskeri for nøter som brukes i fiskeoppdrett. Miljøgifter som var tilstede i overkonsentrasjoner i sediment akkumulerte i *Nereis diversicolor*, deriblant polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH), polyklorerte bifenyl (PCB), kobber, DDT og dets metabolitter. Test-systemet kan forventes å gi et rimelig estimat for biotilgjengeligheten av miljøgifter i sediment.

Test-systemet kan utvikles videre gjennom: (1) utvikling av effekt-mål for test-organismene, (2) tilpasning til bruk med ferskvannssediment og (3) kobling mot kjemiske og fysiske sediment-parametre.

1. Innledning

Det har vært arbeidet med biotilgjengelighetstester for miljøgifter i sediment i en rekke land, i de fleste tilfeller som verktøy i vurderinger av miljøfarligheten av mudret sediment. Den mest omfattende dokumentasjonen har blitt produsert av det amerikanske Environmental Pollution Agency, EPA (Lee et al., 1991).

Sediment-levende organismer er den delen av marine næringsnett som vil oppleve den høyeste miljøgiftbelastningen. Evertebrater som lever i sediment er den viktigste næringskilden for mange bunnlevende fisk og vil derfor bidra til transport av miljøgifter til høyere trofiske nivåer.

Toksisitetstester kan brukes til å avgjøre om et sediment er akutt eller kronisk toksisk, men gir ikke informasjon om det aktuelle sedimentet kan være en kilde til miljøgift-belastning i økosystemet gjennom bioakkumulering, biomagnifisering eller langtidseffekter. Videre er de fleste toksisitetstestene som er utviklet for marine sediment svært lite følsomme (Thain, pers. komm.).

En tilnærming til å kvantifisere hvor stor andel av miljøgiftene i et sediment som vil være tilgjengelige for organismer er å standardisere miljøgift-konsentrasjonene i forhold til parametre som partikkelstørrelse og/eller organisk innhold. Det har også vært forsøkt ulike ekstraksjonsmetoder til å finne fraksjonen av miljøgifter som antas å være tilgjengelig for organismer og modellering av de kjemiske egenskapene til aktuelle miljøgifter (se Luoma & Bryan 1981, 1982). Sedimenter fra ulike steder har imidlertid svært forskjellige egenskaper, og det har vist seg å være vanskelig å beskrive den biotilgjengelige fraksjonen med disse metodene. Det er også andre faktorer som gjør det vanskelig å bruke kjemiske metoder til bestemmelse av biotilgjengelighet: Bioakkumulering og biologiske effekter vil avhenge av faktorer som varierer gjennom året, slik som temperatur, fødetilgang og reproduksjonsfase (ICES 1994).

Det er derfor i dag enighet i de fleste forskningsmiljøer om at den beste måten å få et mål for biotilgjengeligheten til et gitt stoff eller en stoffgruppe i marine sediment er å måle akkumulering i sediment-levende organismer.

Det er videre en interessant utvikling når det gjelder en ny generasjon "kunstige" organismer, semipermeable membraner med et løsningsmiddel i, men disse metodene er foreløpig hovedsakelig uttestet til bruk i frie vannmasser.

1.1 Målsetning

Målet med prosjektet er å utvikle et enkelt system for å kunne evaluere tilgjengeligheten av miljøgifter, både uorganiske og organiske, i marine sediment for sediment-levende evertebrater. Systemet skal kunne brukes både til testing av biotilgjengeligheten av miljøgifter fra "naturlig" forurensede sediment og av miljøgifter tilsatt ved spekking.

1.2 Krav til test-systemet

Det er en rekke krav som må stilles til et slikt test-system for at det skal kunne brukes til å besvare spørsmålet om biotilgjengeligheten av en gitt miljøgift i et marint sediment.

krav til akvariesystemet

- minimale interaksjoner mellom akvariesystemet og de aktuelle miljøgiftene

- like fysiske betingelser i alle akvarier
- akseptable ytre betingelser for testorganismene
- jevne ytre betingelser i hele forsøksperioden
- enkel overvåking og prøvetaking
- enkel vask og vedlikehold
- mulighet til rensing av avløpet
- unngå pseudoreplikasjon¹

krav til test-sediment

- homogent mhp miljøgift, partikkelfordeling, organisk innhold
- fritt for makrofauna

krav til testorganismen(e)

- mulig å dyrke eller holde i akvarier i lengre tid
- ha direkte interaksjoner med sediment, helst være obligat sediment-spiser
- være økologisk viktige (næring for fisk)
- ha moderat metabolisme av aktuelle miljøgifter
- egne seg til studier av subletale effekter
- ha tilstrekkelig biomasse til de aktuelle kjemiske analysene
- være mulige å "tømme" for sediment før analyser
- mulig å innsamle i store antall

krav til gjennomførelse og design av enkelt-tester

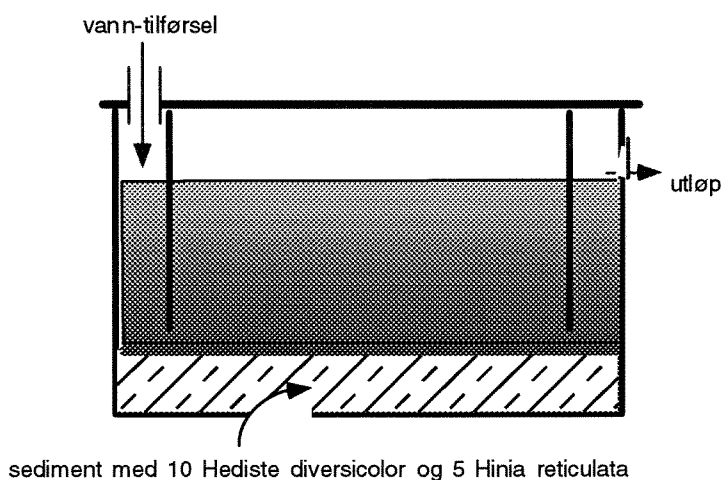
- tilstrekkelig eksponeringstid til at tilnærmet likevekt er innstilt
- tilstrekkelig antall individer av hver art til ønskede analyser
- tilfredsstillende overvåking
- tilfredsstillende kontroll/referanse - sediment
- tilstrekkelig antall replikater i forhold til aktuell hypotese

¹ pseudoreplikasjon: Bruk av replikater som ikke er uavhengige - eksempelvis å bruke enkelt-mark i et akvarium som replikater i en statistisk analyse, mens det er selve akvariet som er et replikat.

2. Etablering av test-systemet

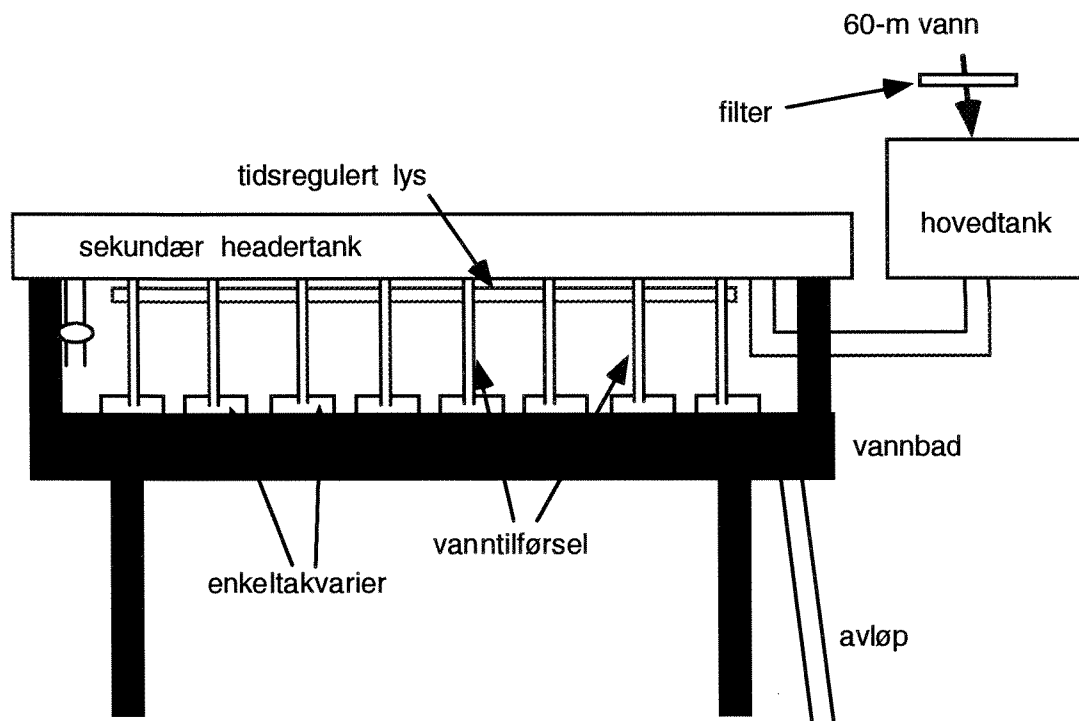
2.1 Akvariesystemet

Det ble bygd opp to bord med vannbad og to par langsgående headertanker med uttak til hver av 24 akvarier på hvert bord. Akvariene var av helstøpt glass for å minimere interaksjoner med miljøgifter. Akvariene var 15 x 20 x 22 cm og det ble frest et hull 5 cm under kanten på kortveggen til utstrømmende vann. Mellom hver bruk ble akvariene håndvasket med såpe og grundig skylt med sjøvann. For å få en tilfredsstillende vanngjennomstrømning var det nødvendig å benytte pleksiglass skillevegger (se Figur 1) som ble festet med silikon. Det var også påkrevd med et plastnett (200 μm) over utløpsåpningen for å forhindre at børstemarkene rømte. Det ble brukt en "lavtoksisk" silikon til begge formål og akvariene ble satt til gjennomstrømning i minst to dager etter hver silikonering.

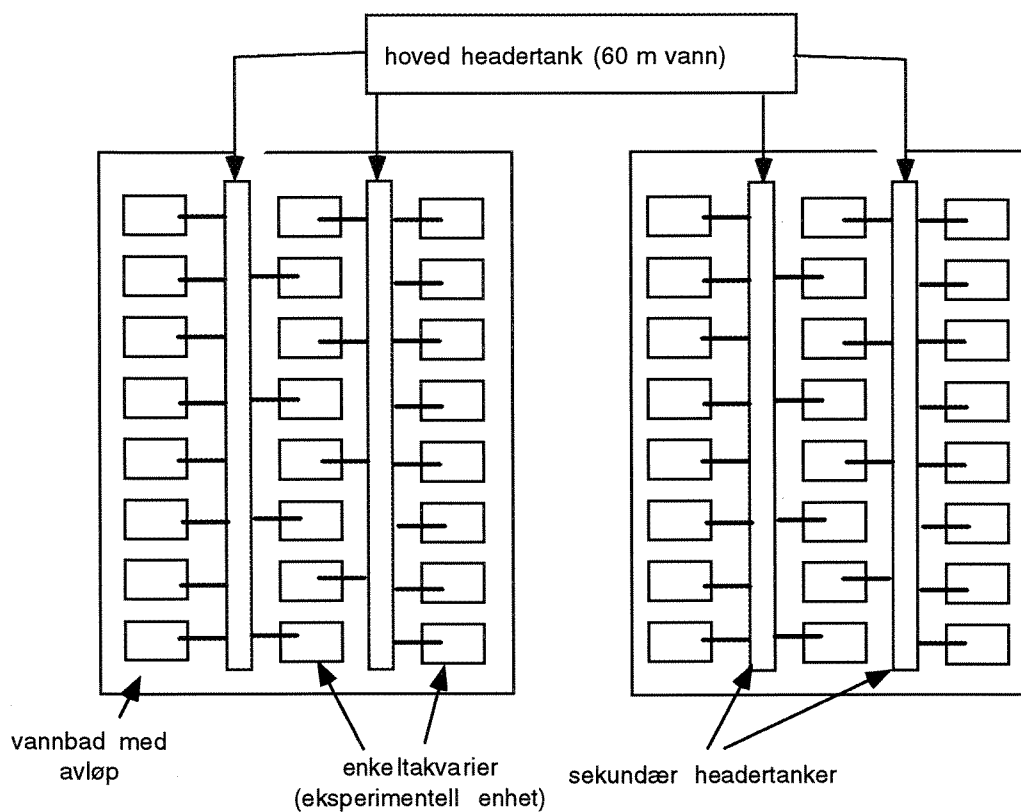


Figur 1. Utseendet til enkeltakvariene i test-oppsettet.

For å sikre lik vanntilførsel til alle akvarier og en jevn tilførsel gjennom forsøksperioden ble det etablert to headertank-nivåer (se Figur 2). Hele oppsettet fikk tilførsel fra en stor headertank som igjen tilførte vann til to separate headertanker på hvert av bordene. Det ble brukt hard PVC i tanker og myk PVC i slanger. Lik temperatur i alle akvarier under hele forsøksperioden ble etablert ved bruk av vannbad med tilførsel fra utløpet til akvariene og eventuelle ledige slanger. Både temperatur, salinitet og oksygen i sjøvann fra 60 m dyp utenfor MFS er stabilt gjennom det meste av året. Slik akvariesystemet er konstruert vil det være mulig å sette inn et karbonfilter på avløpet hvis det forventes stor lekkasje av miljøgift fra sedimentene.



Figur 2. Utseende til hver av to bord med plass til 24 akvarier (8 i tre rekker). Selve bordet er laget av tre, alle andre deler av PVC.



Figur 3. Oversikt over vanntilførsler i test-systemet.

Ved at det holdes en jevn temperatur og relativt høy vanngjennomstrømning vil test-organismene ha tilfredsstillende levevilkår, noe som også fremgår fra de foreløpige studiene. Test-organismene hentes vanligvis inn til MFS minst to uker før testen skal startes og akklimeres til 60-m vann i andre kar før de tilsettes i systemet. Bruk av små enheter gir en stor fleksibilitet og større grad av "ekte" replikater enn om alle organismer i en eksponering hadde blitt holdt i samme store kar (pseudoreplikasjon). Akvariene er enkle å håndtere og det er overkommelig å sile ut organismene fra hvert enkelt akvarium.

Identifiserte problemer og kommentarer

- (1) Tilgroing av slanger. Det ble brukt gjennomsiktige PVC-slanger i tilførselsslagen fra den siste headertanken og akvariene. Det ble etterhvert et brunt belegg i disse, noe som vil kunne gi uønsket tilførsel av organisk materiale.
- (2) Støv og vekst i headertanker; kan kontaminere vanntilførsel og tette tilførselsslanger. Innledningsvis var det midlertidige lokk på headertankene, en løsning som var utilfredsstillende siden det allikevel kunne observeres partikler i headertankene. Lokkene ble gjort permanente.
- (3) Ulik lyssetting for ulike akvarier. Innledningsvis ble oppsettet kjørt med lys fra taket i bassenget (som også kan innstilles i lys:mørke perioder). For å få lik lyssetting for alle akvariene ble det montert egne lyskilder parvis over hvert bord med tidsur. Fordelen med denne endringen er at lyssettingen også kan reguleres med hensyn på intensitet og kvalitet.
- (4) I eventuelle forsøk med plast-tilsetningsstoffer (organiske tinnforbindelser, ftalater) må det gjøres innledende tester på om bruk av PVC i tanker og slanger gir et bidrag til akkumulering av slike stoffer i test-organismene.

2.2 Test-sediment

Ved uttesting av felt-innsamlet sediment sier det seg selv at det kan være vanskelig å standardisere egenskaper som partikkelfordeling og organisk innhold. En bør imidlertid søke å innsamle et referanse-sediment som har omtrent de samme karakteristika som test-sedimentet, men uten miljøgifter. Lee et al. (1991) understreker forskjellen mellom referanse og kontroll sediment. Et kontroll-sediment inneholder svært lave nivåer av alle miljøgifter - innsamlet fra et område uten kjente miljøgift-kilder. Et referanse-sediment innsamles samtidig med og i samme område som test-sedimentet og kan derfor inneholde miljøgifter. I tillegg til referanse og kontroll sediment er det også anbefalt å benytte et standard sediment med en kjent mengde miljøgift (Lee et al. 1991). Kontroll og standard sediment skal være likt for alle tester, mens referanse sedimentet vil variere avhengig av undersøkelsesområdet. Viktigheten av at disse kravene er oppfylt vil imidlertid avhenge av de aktuelle problemstillingene. I den foreløpige bruken av test-systemet har det vært benyttet enten kontroll eller referanse sediment, ikke begge deler. Det har ikke vært benyttet standard sediment. Sediment som skal benyttes i test-systemet bør innsamles på samme måte hver gang slik at det vil være mulig å sammenligne resultater fra ulike undersøkelser (se Tabell 2).

Det er åpenbart knyttet problemer til innsamling av sediment og transport til laboratoriet, slik som tap av finmateriale, porevann, endringer i redoks-forhold, pH, samt resultater av disse på spesieringen av miljøgifter. Homogenisering og (eventuelt) siling av sedimentet vil ytterligere påvirke nivåer og spesiering av miljøgifter. I noen grad kan disse problemene avhjelpes ved at sedimentene gis en "ekvibreringsperiode" etter at de er overført til test-akvariene. Denne bør være så lang som mulig, men minst 2 uker.

Tabell 1. Behandling av sediment - tilpasset etter Lee et al. (1991).

operasjon	beskrivelse	kommentar
Innsamling	grabb, corer eller box-corer; ned til 10 cm dyp	
Målinger i felt	temperatur, salinitet og Eh	hvis relevant og praktisk mulig
Transport	i glass-beholdere	bør kjøles så sant det er mulig
Lagring	sedimentet kan lagres under 60-m vann i inntil 4 uker før testen starter	akseptabel lagringstid vil avhenge av hvilke miljøgifter som skal testes
Homogenisering	sediment homogeniseres i minst 30 min i sement-blander	
Siling	sediment siles gjennom 1 mm sil	bør unngås hvis mulig
Ekvibrering	sediment står i minst 2 uker med vanngjennomstrømning i akvariene før oppstart	

Identifiserte problemer og kommentarer

(1) Manipulering med test-sediment; som nevnt ovenfor vil det være flere problemer knyttet til håndtering av innsamlet sediment. Generelt bør all manipulering av innsamlet sediment holdes på et minimum.

(2) Spekking av sediment; Det eksisterer ikke generelt aksepterte metoder til spekking av sediment. Hvordan sediment avsettes i akvariene og hvor lang tid systemet blir kjørt med vanngjennomstrømning før organismer tilsettes vil også kunne ha stor innvirkning på resultatene. Vi har forsøkt ulike metoder, men har etterhvert kommet fram til en metode som synes å gi akseptabel homogenitet i sedimentet og forventede konsentrasjoner av den aktuelle miljøgiften.

Det brukes ulike metoder avhengig av om den aktuelle miljøgiften er organisk eller uorganisk. Organiske miljøgifter veies inn og blandes i et volum aceton. Aceton med miljøgift innblandes med tørket og knust sediment til en slurry (i avtrekk). Aceton dampes av og det tørre sedimentet med miljøgift innblandes et større volum vått sediment med omtrent samme mengde sjøvann i en stor erlenmeyerkolbe med magnetrører. Røreverket står så på i 48 timer før neste steg. Uorganiske miljøgifter innblandes direkte i sjøvann og tilsettes sedimentet i erlenmeyerkolben. Etter 48 timer overføres det kontaminerte sedimentet til en sement-blander der det innblandes med ønsket mengde vått sediment. Denne blandingen må ikke være for våt, men bør ha en konsistens som er nær naturlig sediment. Etter 30 min blanding kan det kontaminerte sedimentet overføres til akvariene.

2.3 Test-organismene

Det ble tatt utgangspunkt i marine organismer som oppfylte noen eller alle kravene skissert under seksjon 1.2 (se Tabell 2), men også tatt hensyn til vurderingene gjort i Lee et al. (1991). Det var kjent at børstemarken *Nereis diversicolor* ville være tilgjengelig og den var en av de anbefalte artene. *Nereis* er en økologisk viktig art og det finnes mye bakgrunns litteratur for denne arten (se seksjon 2.3.1). Det var imidlertid et ønske om å inkludere en art til siden det er kjent at ulike *Nereis*-arter til en viss grad kan metabolisere ulike organiske miljøgifter (McElroy, 1985; Goerke, 1984; Boon et al. 1989). Valget falt på et bløtdyr (Mollusca) siden disse generelt ikke har like aktiv metabolisme som børstemark. Første valg ble den sediment-levende muslingen *Abra alba*. Dette er en art som kan forekomme i store tettheter i områder med høy organisk belastning. Den har imidlertid kort levetid (2-3 år) og det er kjent at lokale populasjoner kan "forsvinne" i løpet av kort tid (Wikander, pers. komm.). Det er imidlertid ikke så mange sediment-levende muslinger som lever av sediment. De fleste som har slikt levevis er svært små og vil derfor gi for lite materiale til kjemiske analyser. Av de aktuelle artene i våre kyststrøk var *Abra alba* det beste alternativet. Etter fem mislykkede forsøk på å finne en tilstrekkelig stor populasjon av *Abra alba* i ulike områder av indre og ytre Oslofjord måtte imidlertid valget gjøres om. Valget falt da på

nettsnegl *Hinia (Nassarius) reticulata*, som er en vanlig art både på bløtbunn og hardbunn og som finnes fra strandsonen ned til 20-30 m. Den lever også nedgravd i sediment og beiter sannsynligvis på detritus like under sedimentoverflaten i tillegg til at den er et rovdyr og åtseleter.

Tabell 2. Oversikt over aktuelle arter til test-systemet. Plussene under "egnet" indikerer om arten er lett å samle i tilstrekkelig antall, om den er lett å holde og om den er grei å tømme for sediment etter en eksponering.

art	gruppe	frøfisk "nivå"*	sub- letal**	egnet	EPA	litteratur
<i>Nereis diversicolor</i>	polychaeta	F/D	++	++	+	+++
<i>Arenicola marina</i>	polychaeta	SSDF	+?	++		++
<i>Crangon</i>	crustacea	C/D	+	+		++
<i>Corophium volutator</i>	crustacea	C	?	++		+
<i>Carcinus maenas</i>	crustacea	C	++	++		++
<i>Abra alba/nitida</i>	bivalvia	SDF	+	(+)		++
<i>Macoma balthica</i>	bivalvia	SSDF	++	-	+	++
<i>Hinia reticulatus</i>	gastropoda	SSDF	+?	++		+
<i>Amphiura filiformis</i>	echinodermata	SF	-	(+)		+
<i>Brissa/Echinocardium</i>	echinodermata	SSDF	+?	+		(+)

*D: detritivor; SDF: overflate detritus spiser; SSDF: sediment detritus spiser; CARN: carnivore; F: funnel feeder; SF: suspension feeder; ** muligheter for bruk til subletale tester (erfaringer/forventninger).

2.3.1 Børstemarken *Nereis diversicolor*

Autøkologi

I tillegg til arter som brukes i akvakultur er kanskje børstemarken *Nereis diversicolor* den marine evertebraten som er mest undersøkt. Det dukker imidlertid stadig opp ny kunnskap når det gjelder dens autøkologi, fysiologi og biokjemi. *Nereis diversicolor* finnes hovedsakelig i tidevannssonen og kan der forekomme i svært høye tettheter. Årsaken til den begrensede utbredelsen er omdiskutert, men det er kjent at den vil utkonkurreres av sin slektning *Nereis virens* som forekommer på noe dypere vann (Miron & Kristensen, 1993). Videre synes det som om *Nereis* er utsatt for sterk predasjon av andre børstemark når den tilsettes bunndyrsamfunn fra dypere vann (egne obs.). I tidevannssonen predateres *Nereis* særlig av fugl og flatfisk. Denne arten omtales ofte som omnivor (altspisende), men det har i senere år framkommet god dokumentasjon på at kanskje den viktigste fødeveien er filtrering. *Nereis* etablerer da et slimnett nede i en U-formet gang som den så ventilerer med buktninger av kroppen (Vedel & Riisgård, 1993; Riisgård et al. 1992). Etter en periode som er bestemt av algetettheten i overliggende vann (og ytre temperatur) spiser den så hele slimnettet med innfangede alger (Riisgård et al. 1992). I hvert fall i enkelte områder kan denne typen fødeinntak utgjøre 80-100% av det totale for *Nereis* (Vedel et al. 1994). Andre mener imidlertid at den relative betydningen av denne type fødeinntak vil variere for ulike populasjoner av denne børstemarken (Esselink & Zwarts, 1989). Filtreringen kan være så effektiv at en vesentlig andel av all plankton-biomasse i et slikt område teoretisk sett kan omsettes av *Nereis*. Det er også beskrevet en annen type fødeatferd hos *Nereis*, at individer forlater røret og beiter på meiofauna, detritus og plantemateriale på sediment-overflaten. Denne typen atferd vil imidlertid i noen grad være styrt av tidevannssyklus; ved lavvann vil en *Nereis* på overflaten ha små muligheter til å overleve i et område med vadefugler (Wanink & Zwarts, 1993). Individene som benyttes i testene på MFS er innsamlet i et område med svært høy tetthet av vadefugler. I våre forsøk observerer vi da også svært sjelden individer på overflaten. Under noen betingelser kan *Nereis* også tilsynelatende spise sediment.

Dette har ikke vært funnet i forsøkene som er referert i denne rapporten, men har vært observert i andre forsøk.

Reproduksjon

I motsetning til de fleste andre Nereider danner ikke *Nereis diversicolor* frittstående epitoke stadier i tilknytning til gyting. Det har vist seg at hanner oppsøker rørutgangen til "gyteklare" hunner, trolig identifisert ved en type feromoner, og utskiller sine spermier ned i røret (Bartels-Hardege & Zeeck, 1990). Larvene klekkes og utvikles i hunnens rør og fremkommer først når de er ferdig utviklet (de fleste andre børstemark har planktoniske larver). Gytetidspunktene varierer svært mye for ulike områder og kan faktisk være spredd over hele året (Grant et al. 1989). Det er ikke kjent når denne aktuelle populasjonen gyter, men dette vil bli klarlagt i tilknytning til et NFR-prosjekt som løper i 1996.

Fysiologi og biokjemi

Nereis diversicolor har et ekstracellulært hemoglobin som gir den en rødlig farge. I perioder nær gyting brytes hemoglobinet ned til det grønne pigmentet biliverdin, noe som kan føre til at individer kan være helt grønne (denne fargen kommer altså ikke fra at den har spist mye alger). Som de fleste andre børstemark har den et indre hulrom - et coelom - fylt av kroppsvæske. I denne kroppsvæsken transporteres både næring og avfall, blant annet av noen amøboide celler som ofte omtales som coelomocytter. Mye tyder på at disse coelomocytene er sentrale i akkumulerings- og utskillellesprosesser. Hele kroppssflaten hos *Nereis* vil bidra til opptak av ioner, oksygen og miljøgifter.

I tilknytning til prosjektet om interaksjoner mellom eutrofi og miljøgifter, samt det nevnte prosjektet med støtte fra NFR har vi arbeidet med ulike biomarkører i *Nereis*. I første omgang har det vært arbeidet med ekstrakt av hele individer, noe som trolig ikke er helt optimalt. De foreløpige resultatene tyder på at selve opparbeidingsmetoden er svært viktig (særlig bruk av den riktige kombinasjonen av protease-hemmere) og at det trolig er nødvendig å gjøre analyser på utvalgte vev.

Forurensningsbiologi

I engelske estuarier er *Nereis diversicolor* svært utbredt og den har vært brukt i akkumuleringsstudier i et stort antall arbeider av Bryan og hans kolleger i Plymouth (Bryan & Hummerstone, 1971; Bryan & Hummerstone, 1973a; Bryan & Hummerstone, 1973b; Bryan, 1974; Bryan & Gibbs, 1980). Dette arbeidet har særlig omfattet metall-akkumulering, men *Nereis* har også vært brukt som akkumulerende organisme i studier av organiske miljøgifter (Pruell et al. 1993; McElroy, 1985; Goerke 1984; Fowler et al. 1978; Boon et al. 1989). Alt tidligere arbeid peker i retning av at denne arten akkumulerer de fleste miljøgifter, noe som vi også har sett i våre studier.

2.3.2 Nettsnegl *Hinia (Nassarius) reticulata*

Mindre er kjent om biologien og økologien til nettsnegl i forhold til *Nereis*. Mye av den eksisterende litteraturen omhandler bruk av denne arten som indikatorart for organiske tinnforbindelser (imposex), men det er også gjort noen grunnleggende økologiske studier (Trueman & Brown, 1992; Tallmark, 1980). Nettsnegl lever på bløtbunn dypere enn tidevannsgrensen der den hovedsakelig lever nedgravd. Voksne individer har imidlertid en ekstrem tilpasning som åtseletere og kan gjøre stor skade på fisk i garn. Dette benyttes også ved innsamling; et åpent blåskjell vil ha trukket til seg 10-15 *Hinia* i løpet av få minutter der denne arten finnes. Voksne *Hinia* vandrer til dypere vann (2-5 m) om høsten for så å returnere til grunt vann (0-1 m) i april-mai. *Hinia* blir kjønnsmodne når de er 4 år gamle og kan bli inntil 15 år (Tallmark, 1980).

Identifiserte problemer og kommentarer

(1) Valg av arter; de foreløpige resultatene med *Hinia* tyder ikke på at denne gir vesentlig tilleggsinformasjon i forhold til resultatene fra *Nereis* alene. Det bør imidlertid være minst to arter fra ulike taksonomiske grupper i slike tester og det vil bli arbeidet med å finne aktuelle erstatninger. Blant de mest aktuelle artene er sandskjell *Mya arenaria* eller en reke. Det er også mulig at vi kan kjøpe inn *Abra alba* fra Kristineberg Marine Forskningsstasjon; denne arten er vanligere lengre sør i Skagerrak og i Kattogat enn i indre og ytre Oslofjord.

(2) Nødvendigheten av å la test-organismene tømme tarmen; ved undersøkelse under lupe har det ikke vært synlige partikler i tarmen til *Nereis* så det har foreløpig ikke vært gjennomført tømming av tarmen. Dette bør unngås hvis mulig siden et døgn i "rene" omgivelser åpenbart vil påvirke miljøgift-konsentrasjonene i børstemarkens vev. Andre anbefaler imidlertid slik tømming, også for *Nereis diversicolor*, så effektene av dette bør uttestes. Igjen er det imidlertid et spørsmål om målet med testen - hvis målet er å avklare tilgjengelighet for rovdyr på høyere trofiske nivåer har det trolig liten betydning om miljøgiftene befinner seg i vev eller tarm.

2.4 Gjennomførelse og design av tester

Hver av akvariene blir sett på som en eksperimentell enhet. I den grad det er mulig blir alle akvariene i en test (både kontroll/referanse og test) satt på samme bord, selv om de ytre miljøbetingelsene skulle være identiske på begge bordene. I hvert av akvariene må det derfor være mulig å holde tilstrekkelig biomasse av de (to) aktuelle artene til at det kan gjøres kjemiske analyser. Antallet arter skal imidlertid ikke være så stort at det kan gi opphav til konkurranse eller stress. I de foreløpige undersøkelsene har det vært benyttet 10-15 *Nereis* og 5 *Hinia* i hvert akvarium, noe som stort sett vil gi omkring 3-4 g våtvekt av hver art. Etter atferden til de to artene å dømme er dette uproblematisk. Det har ikke vært vesentlig dødelighet i noen av forsøkene som har vært kjørt. Såpass lav biomasse gjør imidlertid at det kan være vanskelig å få utført analyser for klorerte miljøgifter og polysykliske aromatiske hydrokarboner på prøven fra hvert akvarium.

Generelt benyttes det 3-4 replikate akvarier for hver sediment-type. Variabiliteten i de studiene vi foreløpig har gjort har vært såpass liten mellom akvariene at dette allikevel vil gi en rimelig mulighet til å skille mellom kontroll/referanse og forurenset sediment. I de fleste tilfeller vil det også være slik at det er vesentlige forskjeller mellom sedimentene, noe som bør fanges opp selv ved såpass lav replikasjon. Færre enn 3 replikater vil gjøre det umulig å utføre statistisk testing på forskjeller mellom behandlingene. Lee et al. (1991) anbefaler 8 replikate akvarier.

Intensjonen med oppbyggingen av akvariesystemet er at det skal kunne kjøres uten vesentlig ettersyn. Det har imidlertid vært lagt inn ukentlig manuell kontroll av vanngjennomstrømning. En slik kontroll kan også automatiseres ved at det legges inn en elektronisk nivåsjekk i headertanken.

Det ble valgt å bruke 28 dagers eksponering i test-systemet, noe som også ble anbefalt av Lee et al. (1991). Dette er sannsynligvis tilstrekkelig til at noe tilnærmet en likevekt vil innstille seg når det gjelder metaller og noen PAHer, men det vil nok være utilstrekkelig for mange tungtløselige forbindelser (se Pruell et al. 1993).

Identifiserte problemer og kommentarer

(1) Biomasse til analyser; mengden vev gjør at det kjemiske laboratoriet ofte ikke har tilstrekkelig til "backup" i tilfelle noe skulle gå galt med opparbeiding og analyse av den første prøven. Dette er en utilfredsstillende situasjon og det er behov for å øke biomassen i akvariene. Det har vært gjort innledende studier med 20 *Nereis* i hvert akvarium, noe som synes å være en mulig løsning.

(2) Standard-sediment eller positiv kontroll; det har foreløpig ikke vært brukt en positiv kontroll i eksponeringsforsøkene, hovedsakelig på grunn av kostnadene. I en slik kontroll vil det imidlertid ligge et vesentlig element av kvalitetssikring og det bør innføres hvis test-systemet får bred anvendelse.

(3) Lengden av eksponering; de foreløpige undersøkelsene har alle blitt kjørt i 28 dager. Hvis målet er at en skal oppnå noe nær likevekt mellom sediment og sediment-levende organismer, noe som er nødvendig hvis de oppnådde konsentrasjonene skal sammenlignes direkte med organismer innsamlet i felt, må eksponeringstiden forlenges for noen miljøgifter. Lengden for eksponering kan settes for hver enkelt miljøgift for *Nereis* ved bruk av litteratur-verdier, men det vil være vanskeligere å ta slike avgjørelser for en eventuell ny organisme som det ikke finnes like mye dokumentasjon på. Ved en vesentlig forlenging av eksponeringsperioden bør også organismenes modifisering av test-sedimentet vurderes og de bør eventuelt overføres til nytt sediment.

3. Bruk av test-systemet

Som nevnt i innledningen kan test-systemet kunne brukes til både felt-innsamlede sedimenter (seksjon 3.1 og 3.2) og spekkede sedimenter (seksjon 3.3).

3.1 Sediment fra Florvågen, Bergen

I tilknytning til prosjekt "Miljøgiftundersøkelser i Byfjorden i Bergen og tiliggende fjorder" (Knutzen et al. 1995) ble det innsamlet sediment i et sterkt forurensnet område til uttesting for om de aktuelle miljøgiftene, særlig PCBer, PAH og kvikksølv, ville være tilgjengelig ved en eventuell rekolonisering av området med bunnfauna.

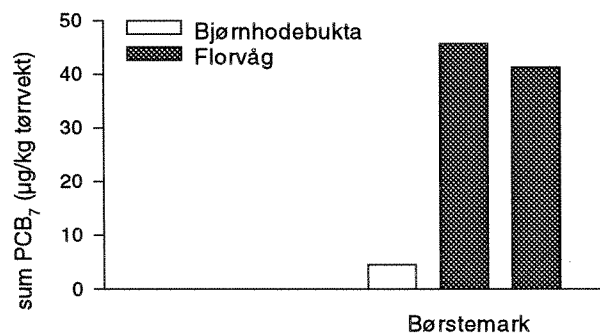
Kontroll-sediment ble innsamlet fra Bjørnhodebukta, Håøya; dette sedimentet har tidligere vært brukt som referanse-sediment og har lavt innhold av miljøgifter (se Tabell 3). Før bruk ble sedimentet silt gjennom en 1 mm sil for å fjerne makrofauna. Det silte sedimentet inneholdt 1.2 µg/mg nitrogen, 12.6 µg/mg karbon og 46% av partiklene var mindre enn 63 µm. Test-sediment ble innsamlet fra Florvågen, Bergen. Florvåg-sedimentet var fritt for synlig makrofauna og ble derfor ikke silt. Test-sedimentene ble så overført til glass-akvarier (4 replikater av hver) og akvariene tilkoblet vann fra 60 m dyp. Etter 2-4 timer med vanngjennomstrømning ble organismer tilsatt (15 børstemark og 5 nettsnegl). Børstemarkene ble veid individuelt før tilsetning. Etter 28 d eksponering ble det tatt prøver av sedimentet og organismene silt ut, veid, fordelt i prøveglass og frosset. Prøvene ble oppbevart nedfrosset før analyse. Det ble analysert for PAH i samleprøve av alle nettsnegl fra hver behandling, PAH og klororganiske stoffer i to samleprøver av børstemarken (to og to akvarier slått sammen), samt PAH og klororganiske i en samleprøve fra hvert sediment (en blandprøve av en kjerne fra hvert akvarium).

Tabell 3. Beskrivelse av testsediment.

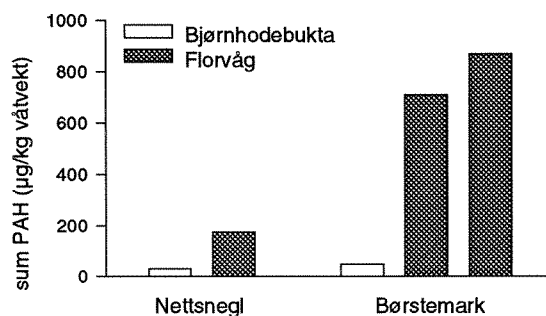
Betegnelse	sum PAH (µg/kg TV)	PCB ₇ * (µg/kg TV)	TOC (mg/g TV)
Sediment fra Bjørnhodebukta	1 758	6	18.4
Sediment fra Florvågen	84 402	964	108

* sum "seven Dutch PCB"

PCB i sedimentet fra Florvågen var tilgjengelig for opptak i børstemarken *Nereis diversicolor*, som akkumulerte PCB til 9 ganger bakgrunnsnivå (Figur 4). Det var god overensstemmelse mellom de to replikate analysene av børstemark eksponert for Florvåg-sediment. PAH i Florvåg-sediment var også tilgjengelig for begge artene - børstemarken *Nereis diversicolor* akkumulerte PAH til omkring 15 ganger bakgrunnsnivå, mens nettsnegl *Hinia reticulata* akkumulerte til omkring 6 ganger bakgrunnsnivå i løpet av de fire ukene eksponeringen pågikk (Figur 5). Også her var det god overensstemmelse mellom de to replikate analysene av børstemark (hhv 710 og 870 µg/kg våtvekt). Nettopp PAH var hovedårsaken til at det var ønskelig å inkludere en annen dyregruppe enn børstemark i test-systemet, siden disse har vist seg å kunne metabolisere PAH-forbindelser. Enkelte bløtdyr (*Mollusca*), som eksempelvis blåskjell, har en lite effektiv metabolisme av disse stoffene. Nettsnegl tilhører også *Mollusca*, men akkumulerte altså mindre enn børstemarken. De relative konsentrasjonene av de ulike PAH-forbindelsene indikerer imidlertid visse artsforskjeller, selv om også summen av de såkalte kreftfremkallende PAH-ene ga samme forholdstall mellom referanse og eksponert organisme som sum av alle PAH.



Figur 4. Konsentrasjoner av PCB (sum "seven Dutch"; µg/g tørrvekt) i børstemarken *Nereis diversicolor* etter 28 dagers eksponering for sediment fra Bjørnhodebukta (referanse) og Florvågen; hver prøve representerer 25-30 individer. Fettinnholdet i prøvene var hhv 1,2% (Bjørnhodebukta), 1,3 og 1,3% (Florvåg). Nettsnegl (*Hinia reticulata*) ble ikke analysert for PCB.

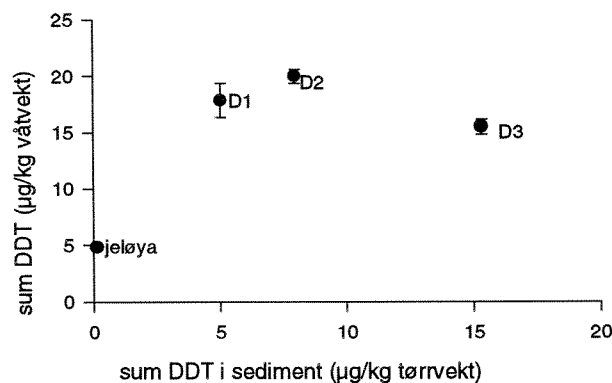


Figur 5. Konsentrasjoner av PAH (sum PAH; µg/kg våtvekt) i nettsnegl *Hinia reticulata* og børstemarken *Nereis diversicolor* etter 28 dagers eksponering for sediment fra Bjørnhodebukta (referanse) og Florvåg; hver prøve representerer henholdsvis 12-15 individer (*Hinia*) og 25-30 individer.

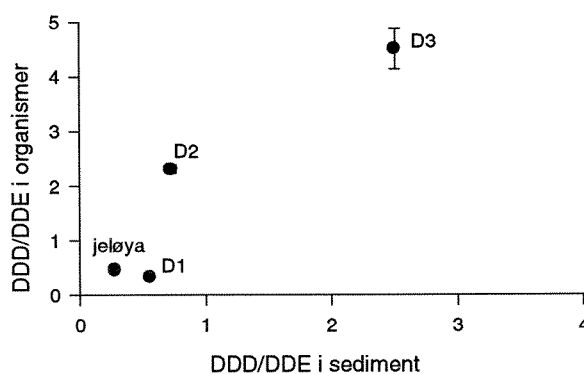
3.2 Sediment fra Drammensfjorden

I forbindelse med prosjekt O-94170 "Kartlegging av miljøgifter i sedimenter, indre Drammensfjord 1993" ble det innsamlet sediment på tre stasjoner ved utløpet av Lierelva, Drammensfjorden. Målet med undersøkelsen var å avklare hvorvidt forholdene ved de tre stasjonene (oksygen, redoks, organisk innhold) vil ha påvirket nedbrytningen av det klorerte pesticidet DDT og hvorvidt DDT og nedbrytningsprodukter fra de tre stasjonene ville være like tilgjengelig for sediment-levende evertebrater. Arbeidet ble utført av cand. mag. Line Andersen, Biologisk Institutt, Universitetet i Oslo, og inngår som en del av hennes hovedfagsarbeid (Andersen & Skei, under utarbeidelse).

Resultatene vil bli presentert mer omfattende senere, men de viser tydelig at det er store forskjeller mellom oksiske og anoksiske sediment og at samleparametre slik som sum DDT eller sum PCB ikke nødvendigvis er de beste parametrene for evaluering av miljøgift-akkumulering og -biotilgjengelighet (Figur 8 og Figur 9). Nettsnegl ble også analysert i tilknytning til dette studiet, men for denne arten var det ingen forskjeller i den relative akkumuleringen av DDD og DDE for de ulike sedimentene.



Figur 6. Konsentrasjoner av sum DDT i *Nereis diversicolor* eksponert for sediment med de angitte konsentrasjonene. D1 er et oksisk sediment, D2 og D3 anoksiske; "jeløya" er et referanse-sediment.



Figur 7. Forholdet mellom DDT-nedbrytningsproduktene DDD og DDE i *Nereis diversicolor* eksponert for sediment med de angitte forholdene. D1 er et oksisk sediment, D2 og D3 anoksiske; "jeløya" er et referanse-sediment.

3.3 Sediment spekket med Cu fra notvaskeri

Dette er resultater som har framkommet i forbindelse med prosjekt O-94200 "Undersøkelse av effekter av kobberbelastning i forbindelse med vasking og impregnering av fiskenøter", finansiert av SFT. Målet med studiet var å undersøke om Cu fra vask av nøter fra fiskeoppdrettsanlegg ville være tilgjengelig for sediment-levende organismer.

Det samme sediment som i seksjon 3.1 (innsamlet fra Bjørnhodebukta) ble brukt som basis.

Materiale fra notvaskekum på Rabben Fiskeredskap A/S ble brukt som utgangspunkt for testene. Materialet ble homogenisert (ved risting) og ulike mengder blandet inn i sediment fra Bjørnhodebukta ved bruk av sementblander. Også referanse-sedimentet ble blandet på tilsvarende måte (men uten tilsetning av Cu-holdig materiale). Test-sedimentene ble overført til glass-akvarier (4 replikater av hver) og akvariene tilkoblet vann fra 60 m dyp. Etter 2-4 timer med vanngjennomstrømning ble organismer tilsatt (15 børstemark og 5 nettsnegl). Børstemarken ble veid individuelt før tilsetning. Etter 28 d eksponering ble det tatt prøver av sedimentet og organismene silt ut, veid, fordelt i syrevaskede glass og

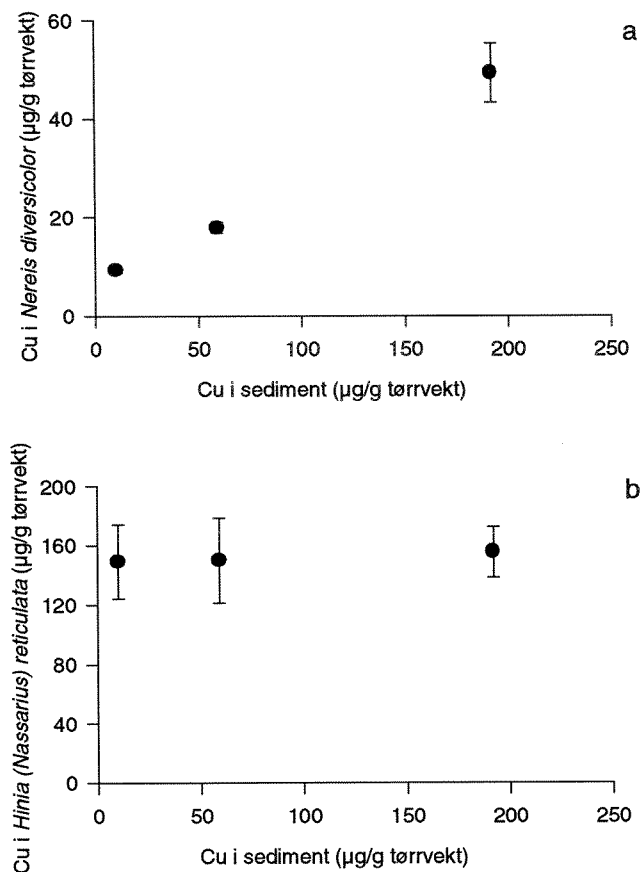
frosset. Prøvene ble oppbevart nedfrosset før analyse. Det ble analysert for Zn og Cu i tre replikater fra hver art og akvarium, samt i en samleprøve fra hvert sediment (en blandprøve av en kjerne fra hvert akvarium).

Tabell 4. Beskrivelse av basis-sediment og basis-sediment innblandet materiale fra Rabben Fiskeredskap A/S.

Betegnelse	mengde tilsatt materiale	Cu	Zn
		(mg/kg tørrvekt)	(mg/kg tørrvekt)
Bjørnhodebukta-sediment (A)	0	10,4	56,9
B	1%	192	107
C	20%	3400	900
D	0,2%	59,0	70,1
Materiale fra notvaskecum (E)	100%	56700	14200

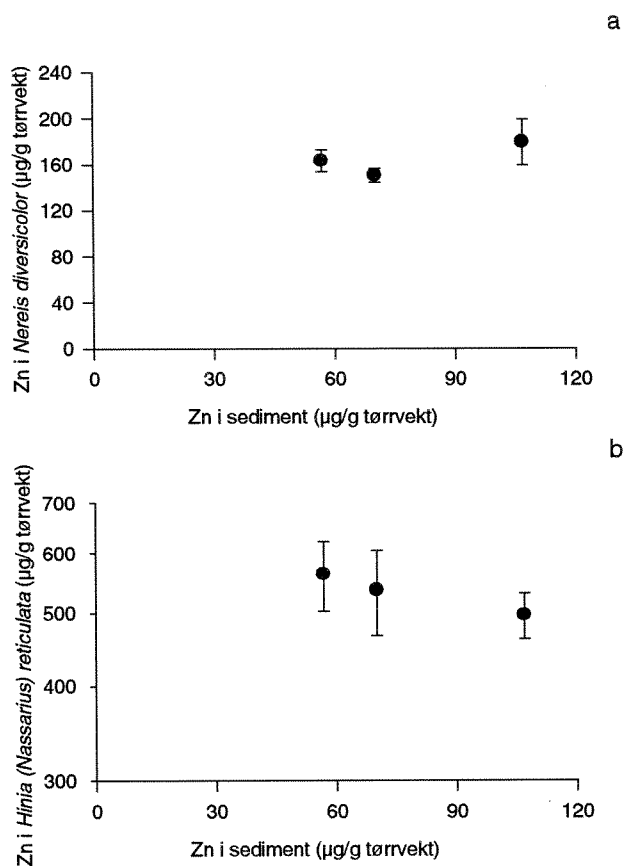
Cu fra notvask akkumulerte i børstemarken *Nereis diversicolor* (Figur 8a), men ikke i nettsnegl (Figur 8b). Selv ved den laveste konsentrasjonen (0,2% - 59 mg Cu/kg sediment) inneholdt børstemark det doble av bakgrunnsnivået etter 4 ukers eksponering. Forholdet mellom Cu i sediment og Cu i mark minket ved økende konsentrasjoner - 19x økning i sediment i forhold til 5x økning i børstemark ved den høyeste konsentrasjonen (1%). Dette kan ha tre forklaringer: *Nereis* kan regulere akkumuleringen over en viss grense, sedimentets karakteristika kan påvirke tilgjengeligheten ved høye konsentrasjoner (selv om en da ville ha forventet det motsatte resultatet) eller det tar lengre tid før en likevekt innstiller seg ved høye konsentrasjoner. Bakgrunnsnivået i børstemarken og graden av akkumulering i forhold til sediment-konsentrasjoner er overraskende likt det som har blitt funnet for *Nereis diversicolor* eksponert for gruveavledet Cu i sør-engelske estuarier (Bryan & Hummerstone 1971). Det er imidlertid verdt å merke seg at børstemark i engelske estuarier overlevde i sediment med Cu-konsentrasjoner i det samme området som ga akutt dødelighet i denne undersøkelsen (3-4000 mg/kg). Videre akkumulerte børstemark i dette 4-ukers forsøket de samme konsentrasjonene av Cu som børstemark som levde i kontaminert sedimentet i engelske estuarier. Det er flere mulige årsaker til disse forskjellene, deriblant partikkelfordeling, fødetilgang og organiske innhold i sedimentet. Det er også vist at det vil være store forskjeller i følsomhet for metall-belastning mellom ulike *Nereis*-populasjoner (Grant et al. 1989). Cu i den formen som finnes i slam fra notvask er altså svært tilgjengelig for *Nereis diversicolor*. Nettsnegl akkumulerte ikke Cu, et resultat som er i overensstemmelse med tidligere studier av denne sneglen, der det ble funnet at eksponering til 25% av 96-timers LC_{50}^2 av Cu i vann ga liten akkumulering i de fleste vev over en fire-ukers periode (Kaland et al. 1992).

² LC_{50} -verdien for Cu-eksponering av nettsnegl er >250 µg/L



Figur 8. Konsentrasjoner av Cu ($\mu\text{g}/\text{mg}$ tørrvekt) i (a) *Nereis diversicolor* og (b) *Hinia (Nassarius) reticulata* i forhold til sediment-konsentrasjoner - Cu målt i en blandprøve av alle individer fra hvert akvarium; $n=3$ akvarier, gjennomsnitt \pm standard feil.

Materialet fra notvaskeriet inneholdt også store mengder Zn, men dette akkumulerte ikke i noen av test-organismene (Figur 9). De fleste marine organismer har også evnen til å regulere akkumulering av Zn over flere størrelsesordener av eksponering (Rainbow 1992).



Figur 9. Konsentrasjoner av Zn ($\mu\text{g}/\text{mg}$ tørrvekt) i (a) *Nereis diversicolor* og (b) *Hinia (Nassarius) reticulata* i forhold til sediment-konsentrasjoner - Zn målt i en blandprøve av alle individer fra hvert akvarium; $n=3$ akvarier, gjennomsnitt \pm standard feil.

Både børstemark og nettsnegl døde innen en time etter tilsetning til sediment med 20% innblanding av materiale fra notvaskeri ($3400 \text{ mg}/\text{kg}$ Cu i sedimentet). Ved de to laveste konsentrasjonene og i kontrollen var det ingen dødelighet av børstemark. To snegl (av 20) døde ved den midlere konsentrasjonen (1% innblanding) og i kontrollgruppene, ingen ved den laveste konsentrasjonen.

Identifiserte problemer og kommentarer

(1) Antall replikater; som det vil framgå av resultatene fra undersøkelsen av Florvåg-sedimentet kan test-systemet også brukes til undersøkelser av mer "orienterende" art der det ikke er behov for statistisk testing.

(2) Metode til spekking og tilsetning av sediment i akvariene; som det ble nevnt under seksjon 2.2 finnes det ikke etablerte metoder til spekking av sediment. Når det gjelder metaller vil imidlertid metodene som brukes når sedimentet skal tilsettes i akvariene og vanninnholdet av sediment-blandingen være enda viktigere. Det vil ikke være likevekt av det tilsatte metallet mellom sediment og vannfase (dette involverer prosesser som tar måneder eller år). Ved bruk av lite vann vil en kunne oppnå den ønskede konsentrasjon i sedimentet med stor eksakthet, men det vil kunne være overkonsentrasjoner av det tilsatte metallet i porevann i forhold til den totale sediment-konsentrasjonen. Slike overkonsentrasjoner vil ha stor betydning for tilgjengeligheten av det aktuelle metallet. For Cu som i seksjon 3.3 vil trolig problemet være mindre enn for noen andre metaller siden Cu har stor affinitet for organisk materiale og trolig vil være assosiert med partikler i stor grad.

4. Evaluering av systemet

4.1 Generelt

Målet var å utvikle et enkelt system for å kunne evaluere tilgjengeligheten av miljøgifter, både uorganiske og organiske, i marine sediment for sediment-levende evertebrater. Systemet skulle kunne brukes både til testing av biotilgjengeligheten av miljøgifter fra "naturlig" forurensede sediment og av miljøgifter tilsatt ved spekking.

De foreløpige resultatene tyder på at målet er oppnådd: Det er etablert et eksponeringssystem ved Marin Forskningsstasjon Solbergstrand (MFS) der det er enkelt å tilføre sediment og organismer for uttesting. Foreløpig har det vært gjort eksponeringer med kobber (Cu), polyklorerte bifenyler (PCB), polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH) og diklordinfenyltrikloretan (DDT). Alle disse stoffene akkumulerte i børstemarken *Nereis diversicolor* til høyt over bakgrunnsnivå etter 28 dagers eksponering. Ingen av belastningene førte til økt dødelighet hos *Nereis*. Den andre organismen i oppsettet, nettsnegl *Hinia reticulata*, akkumulerte også miljøgifter fra sedimentet, men ikke til like høye konsentrasjoner som *Nereis*. Nettsnegl akkumulerte ikke kobber fra sediment.

4.2 Akvariesystemet

Det ble innledningsvis listet opp krav som bør stilles til eksponeringssystemet. Noen av kravene lå til grunn for valg av materialer og utforming av systemet; det ble valgt å benytte så mye glass som mulig for å minimere eventuell adsorpsjon av miljøgifter til eksponeringskammeret. Alle akvariene er like, mottar det samme vann og identisk mengde lys. Den lave dødeligheten i alle forsøkene viser videre at eksponeringsbetingelsene kan antas å være tilfredsstillende. Det er etablert systemer for vask og vedlikehold av akvariene. Avløpet fra akvariene kan ledes gjennom filter hvis det benyttes særlig toksiske eller radioaktivt merkede stoffer i oppsettet.

4.3 Test-sediment og -organismer

Det er en rekke krav som bør stilles til kontroll-, referanse- og test-sediment (se Lee et al., 1991). Det er imidlertid viktigst at de er rimelig homogene mhp partikkelfordeling og organisk innhold. Der det er makrofauna³ tilstede vil det imidlertid være påkrevd å sile sedimentet for å unngå uønskede interaksjoner mellom organismer i sedimentet og test-organismene. Det vil videre ofte være vanskelig å finne et referanse- og/eller kontroll-sediment som har helt de samme egenskapene som test-sedimentet.

De utvalgte organismene fyller mange av kriteriene oppstilt innledningsvis: De kan holdes under kontrollerte betingelser i månedssvis, de er begge økologisk viktige arter og lette å innsamle i store antall. Begge er videre lette å "tømme" for sediment (i den grad de inneholder sediment) og har moderat metabolisme av aktuelle miljøgifter. Både nettsnegl og *Nereis* har tilstrekkelig biomasse til at de kan analyseres for de fleste aktuelle miljøgifter⁴. Det har etterhvert vært gjort en del arbeid på subletale responser hos *Nereis* og denne arten synes å egne seg godt for slike analyser, noe som er mindre klart for nettsnegl. Et minus for begge artene er det imidlertid at ingen av dem er obligate sediment-spisere. I fremtidige forsøk vil trolig *Nereis* bli foretrukket benyttet alene siden nettsnegl tilsynelatende ikke gir tilleggsinformasjon. Det vil imidlertid bli arbeidet med mulige tilleggsarter i systemet.

³ holdes tilbake av en 1 mm sil.

⁴ innledningsvis ble det gjort forsøk på kun å benytte fordøyelseskjertelen fra nettsnegl til analyse, men dette ga for lite materiale.

4.4 Gjennomførelse og design

Noen av kriteriene som ble oppsatt for gjennomførelse og design er tilfredsstillende: Det er en tilfredsstillende overvåking av oppsettet (ingen driftsstopp i noen forsøk hittil). Det er videre tilstrekkelig biomasse av hver art til analyser og tre replikater har vært tilstrekkelig i de aktuelle problemstillingene til å kunne trekke rimelige konklusjoner. Det er imidlertid ikke gjort en uttesting av hvor lenge organismene bør eksponeres i systemet. En har her benyttet resultatene gjengitt i Lee et al. (1991) der det sies at det for de fleste miljøgifter vil være nådd noe nær ekvilibrium mellom sediment og organismer innen 28 d.

5. Videreutvikling av test-systemet

Test-systemet er nå etablert og kan benyttes til uttesting med marine sediment. Kostnadene ved tester er i hovedsak knyttet til analysene, med et mindre bidrag fra innsamling av organismer og sediment.

En videreutvikling av test-systemet kan ta en eller flere av tre hovedretninger:

1. utvikling av metoder til å evaluere helse hos / effekter på test-organismene (biomarkører)
2. etablering av et system med ferskvannsarter til testing av ferskvannssediment
3. sterkere kobling mot kjemiske og fysiske sediment-parametre i test-perioden

5.1 Biologiske effekter

I tillegg til akkumulering av miljøgifter vil det være naturlig å inkludere parametre for biologiske effekter i et slikt test-system. Det eksisterer imidlertid ingen gode metoder til å evaluere subletale effekter av miljøgifter på sediment-levende organismer. Slike metoder har da også vært etterspurt i internasjonale fora, noe som har ført til at det har blitt etablert tester for giftighet (*Corophium*, *Arenicola*). Disse har imidlertid vist seg å være lite følsomme og det er behov for bedre metoder. De aktuelle alternativene for det beskrevne systemet vil være:

(1) måle vekst (biomasse-forandring) hos *Nereis* ved plankton-stimulering; vi har tidligere observert at *Nereis* vokser svært effektivt ved tilføring av algebiomasse og at denne veksten kan påvirkes av miljøgiftbelastning. Dette er trolig det mest lovende alternativet, men vil kreve at det utvikles metoder til å dosere algene. Det er også beskrevet metodikk til å kvantifisere filtreringshastigheten til *Nereis*, noe som kunne være et annet subletalt endepunkt.

(2) måle effekter på bioturbasjon; dette vil imidlertid kreve at det innføres en ny art siden *Nereis* har begrenset aktivitet i så måte (Gerino & Stora, 1991);

(3) evaluere atferdsforandringer; slike metoder er relativt kostnadskrevenne (video, redigering) og vil trolig bare kunne benyttes for *Nereis* til visse tider på året (i tilknytning til reproduksjon);

(4) måle biomarkører i hele organismen eller i vevstyper; dette er metoder som allerede har vært under utvikling og som vi vil fortsette å arbeide med.

5.2 Etablering av et test-system for ferskvann

Det er ingen grunner til at det etablerte systemet ikke også skulle kunne benyttes for ferskvannssediment. Dette vil imidlertid kreve at det gjøres en innsats for å finne aktuelle arter og metoder til å holde disse over lengre tid. Det har tidligere vært arbeidet mye eksperimentelt med ferskvannsevertebrater ved NIVA, så dette bør være en overkommelig oppgave.

5.3 Kobling mot kjemiske og fysiske sediment-parametre

For å øke forståelsen av samvirket mellom sediment, organismer og porevann vil det åpenbart være nyttig å øke antallet sediment-relaterte måleparametre. Relevante parametre her vil være miljøgift-analyser på porevann, analyser av næringssaltsgradienter og -flukser mellom sediment, porevann og overliggende vann, innhold av organisk materiale, elektronisk overvåking av redoks, pH og sulfid. bruk av

ioneselektive elektroder for uorganiske miljøgifter, samt de fysiske egenskaperne til sedimentet (porositet, kompakthet).

6. Litteraturhenvisninger

- Bartels-Hardege, H.D. og Zeeck, E. 1990. Reproductive behaviour of *Nereis diversicolor* (Annelida: Polychaeta). *Mar Biol*, 106: 409-412.
- Boon, J.P., Eijgenraam, F., Everaarts, J.M. og Duinker, J.C. 1989. A structure-activity relationship (SAR) approach towards metabolism of PCBs in marine animals from different trophic levels. *Mar environ Res*, 27: 159-176.
- Bryan, G.W. (1974). Adaptation of an estuarine polychaete to sediments containing high concentrations of heavy metals. I J.F. Vernberg & W.B. Vernberg (Eds.), *Pollution and Physiology of Marine Organisms*. (pp. 123-135). Academic Press.
- Bryan, G.W. og Gibbs, P.E. 1980. Metals in nereid polychaetes: the contribution of metals in the jaws to the total body burden. *J mar biol Ass U K*, 60: 641-654.
- Bryan, G.W. og Hummerstone, L.G. 1971. Adaptation of the polychaete *Nereis diversicolor* to estuarine sediments containing high concentrations of heavy metals. I. General observations and adaptation to copper. *J mar biol Ass U K*, 51: 845-863.
- Bryan, G.W. og Hummerstone, L.G. 1973a. Adaptation of the polychaete *Nereis diversicolor* to estuarine sediments containing high concentrations of zinc and cadmium. *J mar biol Ass U K*, 53: 839-857.
- Bryan, G.W. og Hummerstone, L.G. 1973b. Adaptation of the polychaete *Nereis diversicolor* to manganese in estuarine sediments. *J mar biol Ass U K*, 53: 859-872.
- Esselink, P. og Zwarts, L. 1989. Seasonal trend in burrow depth and tidal variation in feeding activity of *Nereis diversicolor*. *Mar Ecol Prog Ser*, 56: 243-254.
- Fowler, S.W., Polikarpow, G.G., Elder, D.L., Parsi, P. og Villeneuve, J.-P. 1978. Polychlorinated Biphenyls: Accumulation From Contaminated Sediments and Water by the Polychaete *Nereis diversicolor*. *Mar Biol*, 48: 303-309.
- Gerino, M. og Stora, G. 1991. In vitro quantitative analysis of the bioturbation induced by the polychaete *Nereis diversicolor*. *C R Acad Sci Paris*, 313: 489-494.
- Goerke, H. (1984). Testing the fate of xenobiotics in *Nereis diversicolor* and *Nereis virens* (Polychaeta). In G. Persoone, E. Jaspers, & C. Claus (Eds.), *Ecotoxicological testing for the marine environment*. (pp. 53-66).
- Grant, A., Hateley, J.G., & Jones, N.V. (1989). Interpopulation variation in life history and metal tolerance in *Nereis diversicolor* (Polychaeta; Nereidae). In J.C. Aldrich (Ed.), *Phenotypic responses and individuality in aquatic ectotherms*. (pp. 167-175). Wicklow: JAPAGA, Ashford Co.
- ICES (1994) Report of the joint meeting of the working group on marine sediments in relation to pollution and the working group on biological effects of contaminants. C.M. 1994/ENV:2, Ref:E., 19 s.
- Kaland, T., Andersen, T., Hylland, K. (1992) Accumulation and subcellular distribution of metals in the marine gastropod *Nassarius reticulatus*. I: Ecotoxicology of metals in invertebrates, P.S. Rainbow, R. Dallinger (red), CRC Press, Boca Raton, s. 37-54.

- Knutzen, J., Skei, J., Johnsen, T.M., Hylland, K., Klungsøyr, J., Schlabach, M. (1995) Miljøgiftundersøkelser i Byfjorden i Bergen og tilliggende fjorder, NIVA-rapport 3351-95, 163 s.
- Lee, H., Boese, B.L., Pelletier, J., Winsor, M., Specht, D.T., Randall, R.C. (1991) Guidance manual: bedded sediment bioaccumulation tests. EPA/600/x-89/302, 163 s.
- Luoma, S.N. og Bryan, G.W. 1981. A statistical assessment of the form of trace metals in oxidized estuarine sediments employing chemical extractants. *Sci total Environ*, 17: 165-196.
- Luoma, S.N. og Bryan, G.W. 1982. A statistical study of environmental factors controlling concentrations of heavy metals in the burrowing bivalve *Scrobicularia plana* and the polychaete *Nereis diversicolor*. *Estuar coast Shelf Sci*, 14: 95-108.
- McElroy, A.E. 1985. In vivo metabolism of benz(a)anthracene by the polychaete *Nereis virens*. *Mar environ Res*, 17: 133-136.
- Miron, G. og Kristensen, E. 1993. Factors influencing the distribution of nereid polychaetes: The sulfide aspect. *Mar Ecol Prog Ser*, 93: 143-153.
- Pruell, R.J., Rubinstein, N.I., Taplin, B.K., LiVolsi, J.A. og Bowen, R.D. 1993. Accumulation of polychlorinated organic contaminants from sediment by three benthic marine species. *Arch environ Contam Toxicol*, 24: 290-297.
- Rainbow, P.S. (1992) The significance of trace metal concentrations in marine invertebrates. I: Ecotoxicology of metals in invertebrates, P.S. Rainbow, R. Dallinger (red), CRC Press, Boca Raton, s. 3-23.
- Riisgård, H.U., Vedel, A., Boye, H. og Larsen, P.S. 1992. Filter-net structure and pumping activity in the polychaete *Nereis diversicolor* : Effects of temperature and pump-modelling. *Mar Ecol Prog Ser*, 83: 79-89.
- Tallmark, B. 1980. Population dynamics of *Nassarius reticulatus* (Gastropoda, Prosobranchia) in Gullmar Fjord, Sweden. *Mar Ecol Prog Ser*, 3: 51-62.
- Trueman, E.R. og Brown, A.C. 1992. The burrowing habit of marine gastropods. *Adv mar Biol*, 28: 389-431.
- Vedel, A., Andersen, B.B. og Riisgard, H.U. 1994. Field investigations of pumping activity of the facultatively filter-feeding polychaete *Nereis diversicolor* using an improved infrared phototransducer system. *Mar Ecol Prog Ser*, 103: 91-101.
- Vedel, A. og Riisgaard, H.U. 1993. Filter-feeding in the polychaete *Nereis diversicolor*: Growth and bioenergetics. *Mar Ecol Prog Ser*, 100: 145-152.
- Wanink, J.H. og Zwarts, L. 1993. Environmental effects on the growth rate of intertidal invertebrates and some implications for foraging waders. *Neth J Sea Res*, 31: 407-418.

Norsk institutt for vannforskning

Postboks 173 Kjelsås
0411 Oslo

Telefon: 22 18 51 00
Telefax: 22 18 52 00

Ved bestilling av rapporten,
oppgi løpenummer 3537-96

ISBN 82-577-3083-1