

Håp for kjønnsforstyrrede snegler – overvåking av imposex og intersex viser at forbud mot TBT har hatt positiv effekt

Av Lise Tveiten, Merete Schøyen og Mats Walday

Lise Tveiten er forskningsassistent, Merete Schøyen er forsker og Mats Walday er forskningsleder ved Norsk institutt for vannforskning.

Summary

Hope for sex disturbed snails – monitoring of imposex and intersex show that banning TBT has had a positive effect.

Tributyltin (TBT) was introduced as an active agent in antifouling paint on ships in the 1960s. TBT also caused significant hormonal effects inducing male sex characteristics on female marine snails. The phenomenon is called intersex in common periwinkle (*Littorina littorea*) and imposex in netted dogwhelk (*Nassarius reticulatus*) and dogwhelk (*Nucella lapillus*). Populations of dogwhelk in several areas of the North Sea were critical reduced in the 1990s. Thus, TBT-containing paint was banned in 1990 on boats less than 25 m and on larger ships internationally from 2003. After 2008, sale and use was completely prohibited.

During 2005-2012, our results show clear improvements of intersex and imposex were observed both in time and distance from an assumed source of pollution close to Grimstad. Common periwinkle showed a more rapid improvement than mud snail, but the levels closest to the source of contamination are still so high that both common periwinkle and netted dogwhelk were in bad condition. In 2011, no signs of imposex in dogwhelk were found in the

previously contaminated coastal area outside Grimstad.

Sammendrag

Tributyltinn (TBT) er et giftstoff som har vært brukt som begroingshindrende tilsetning i skipsmaling siden 1960-tallet. TBT forårsaker kjønnsforstyrrelser hos marine snegler, hvor hunner utvikler maskuline kjønnskarakterer. Fenomenet kalles intersex hos strandsnegl (*Littorina littorea*) og imposex hos nettsnegl (*Nassarius reticulatus*) og purpursnegl (*Nucella lapillus*). Bestander av purpursnegl ble i flere områder av Nordsjøen sterkt redusert i 1980-90-årene. På grunn av skadevirkningen ble det i 1990 innført TBT-forbud for båter mindre enn 25 m og fra 2003 også for større skip. I 2008 ble omsetning og bruk totalforbudt.

I perioden 2005-2012 har våre undersøkelser vist entydig forbedring av intersex hos strandsnegl og imposex hos nettsnegl og purpursnegl over tid og med avstand fra en antatt forurensningskilde nær Grimstad. Strandsnegl har vist raskere forbedring enn nettsnegl, men fortsatt var nivåene nærmest forurensningskilden så høye at både strandsnegl og nettsnegl var i dårlig tilstand. I 2011 var bestanden av purpursnegl

friske og uten tegn til imposex i det tidligere forurensete fjordområdet.

Innledning

Undersøkelsene i Vikkilen ved Grimstad har pågått siden 2005, og hensikten har vært å få en oversikt over graden av skader forårsaket av tributyltinn (TBT), utviklingen over tid hos strandsnegl (*Littorina littorea*), nettsnegl (*Nassarius reticulatus*) og purpurnegl (*Nucella lapillus*), og gradienter fra antatt kilde og utover i fjorden (Tveiten mfl. 2012).

Tributyltinn (TBT) ble tatt i bruk som begroingshindrende tilsetning i skipsmaling på 1960-tallet og er et av de sterkeste giftstoffene som har blitt introdusert til det marine miljø. TBT nedbrytes langsomt i naturen (Berge mfl. 2006). Halveringstiden til TBT i sediment angis å være mellom 1,9 og 3,8 år avhengig av mengde oksygen og mikroorganismer (Batley 1996). TBT er meget giftig for mange marine organismer, og miljøgiften er også observert i marine pattedyr (Berge mfl. 2004). Eksempelvis får østers «immunrespons» med skallfortykning, andre muslinger får redusert vekst (Alzieu 1991), mens krepsdyr kan få endret adferd (Fent 1996). Det er imidlertid mindre kunnskap om TBT-effekter i fisk og hvordan eventuelle effekter påvirker på høyere nivå enn populasjon. Kjønnforstyrrelser som følge av påvirkning av TBT, er påvist hos mer enn to hundre arter av snegl (Titley-O'Neal mfl. 2011).

Det er utviklet internasjonale metoder for tilstandsklassifisering av hormonhermende effekter for enkelte arter (OSPAR 2004 og 2009). Disse biologiske effektene kalles imposex hos nettsnegl (*Nassarius reticulatus*) og purpurnegl (*Nucella lapillus*), og intersex hos strandsnegl (*Littorina littorea*). Begge effektene arter seg som endringer i kjønnskarakterene eller påvirkning av vev som har betydning for reproduksjonen, og i de mest fremskredne stadier medfører endringene sterilitet.

I Norge har det siden 1990 ikke vært lov til å bruke TBT-holdig bunnstoff på båter mindre enn 25 m. Fra 2003 ble det også forbudt for båter større enn 25 m og fra 2008 ble tilstedeværelse av slike bunnstoffer som ytterlag på skip forbudt.

Forbudet har hatt en positiv virkning og det er nedgang i frekvens av imposex hos purpurnegl langs hele norskekysten (Green mfl. 2012).

I Vikkilen ved Grimstad har det vært drevet skipsbygging siden 1750-årene og i lang tid var dette landets viktigste skipsbyggingsområde. I 1963 ble det anlagt en flytedokk hvor sandblåsing og påføring av bunnstoff var en stor aktivitet. Denne aktiviteten er nå avsluttet. TBT-holdig skipsmaling, som den gang var lovlig, har ført til høye konsentrasjoner i sedimentene i Vikkilen.

En sedimentundersøkelse i Vikkilen i 2005 (Næs mfl. 2005) viste at hele området var meget sterkt forurenset av TBT, og intersex-bestemmelser av strandsnegl ga klare indikasjoner på hormonforstyrrelser.

Strandsnegl, figur 1a, er den vanligste sneglearten langs hele norskekysten. Den trives godt fra åpen kyst til langt inn i fjorder, den er planteeter og lever av alger i strandkanten på hardbunn. Strandsneglen har et pelagisk larvestadie på ca. 2 uker. Det betyr at selv om en vesentlig del av populasjonen er steril så kan bestanden i et belastet område opprettholdes av tilførte larver fra andre mindre påvirkede områder. Strandsnegl tåler høyere TBT-påvirkning enn de fleste andre snegl før de utvikler intersex. Bauer mfl. (1997) har påvist skader ved 10 ng/l sjøvann.

Nettsnegl, figur 1b, er vanlig i strandsonen og lever på sand- og leirbunn på grunt vann i fjorder og utover mot åpen kyst. Sneglene er rovdyr som graver seg ned i sedimentet og dermed er utsatt for eksponering av oppkonsentrert TBT i sedimentene. Nettsnegl har også et pelagisk larvestadie (Talmark 1980). Den er mye mer følsom for TBT-påvirkning enn strandsnegl, og det er påvist skader ved konsentrasjoner på 2-3 ng/l sjøvann (OSPAR 2009).

Purpurnegl, figur 1c, finnes i bølgeeksponerte områder langs store deler av kysten og er rovdyr som livnærer seg av rur og ulike snegler og muslinger. Sneglene blir kjønnsmodne etter 3 år, de legger egg og kan bli ca. 6 år gamle. Purpurnegl er meget følsom for TBT og begynner å få skader ved så lave konsentrasjoner som 1 ng/l sjøvann (Gibbs mfl. 1987). Imposex hos pur-

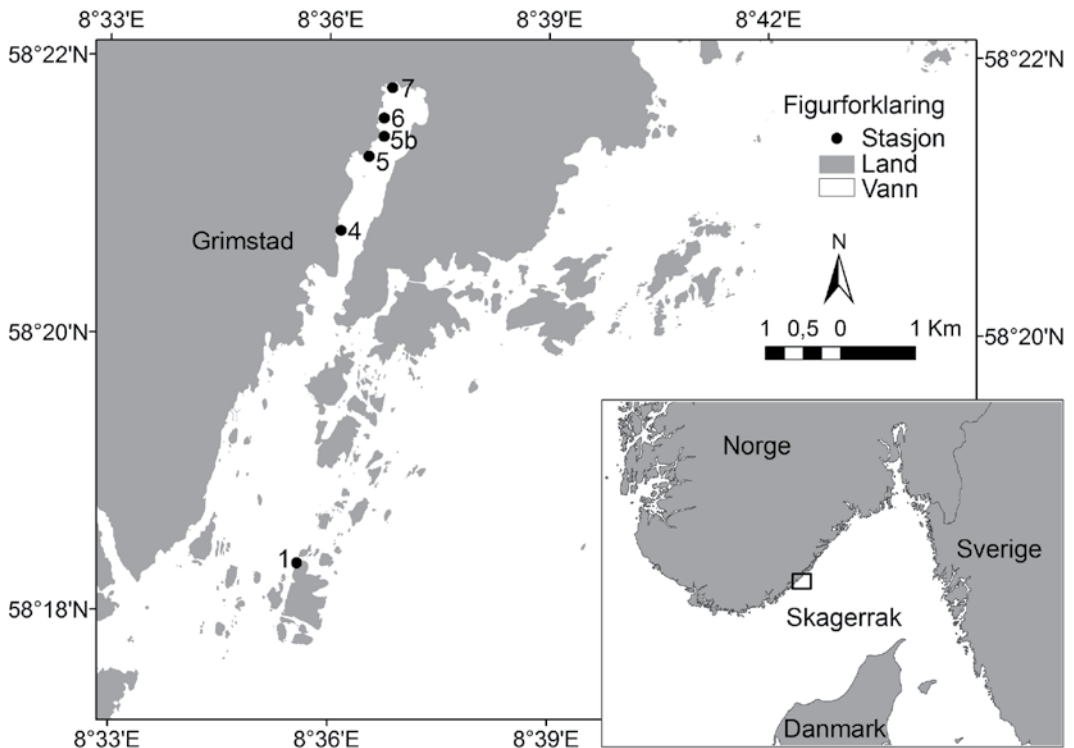


Strandsnegl
(*Littorina littorea*)

Nettsnegl
(*Nassarius reticulatus*)

Purpurnegl
(*Nucella lapillus*)

Figur 1. Foto av (a) strandsnegl (*Littorina littorea*), (b) nettsnegl (*Nassarius reticulatus*) og (c) purpurnegl (*Nucella lapillus*) (Foto: NIVA).



Figur 2. Stasjonsoversikt for snegler i Vikkilen ved Grimstad i perioden fra 2005 til 2012.

purnegl ble første gang påvist i Norge i 1991 (Harding mfl. 1992).

Materiale og metoder

Det ble innsamlet strandsnegl og nettsnegl ved 6 stasjoner i Grimstad-området, fra innerst i Vik-

kilen (stasjon 7) og sørover til Håøya i Groosefjorden (stasjon 1), figur 2. Purpurnegl ble kun innsamlet fra Håøya. Den finnes ikke naturlig i Vikkilen på grunn av lav bølgeeksponering.

Strandsnegl ble innsamlet i perioden fra 2005 til 2012, nettsnegl fra 2007 til 2012, mens pur-

pursnegl ble samlet inn i 2005 og 2011. Det ble innsamlet 50 snegl av hver art fra hver stasjon for analyse av biologiske effekter (intersex og imposex).

Sneglene ble etter innsamling oppbevart levende i kjøleskap ved + 4 °C inntil analyser av imposex og intersex ble utført på laboratoriet under lupe. Før analysene ble strandsnegl og nettsnegl bedøvet med en 7 % MgCl₂-oppløsning for maksimal avslapning av muskler i henhold til internasjonale prosedyrer (OSPAR 2002).

Intersex-stadier hos strandsnegl

Strandsnegl er særkjønnet og det er synlig forskjell på hanner og hunner. Hannen kvitter seg med penis om sommeren og utvikler en ny i løpet av 12 til 20 uker (Deutsch og Fioroni 1992). I dette tidsrommet kan det være vanskelig å skille hanner fra hunner, og det er derfor viktig med innsamling på riktig tid av året (fortrinnsvis oktober-juni).

Ved utvikling av intersex hos strandsnegl omdannes hunnens kjønnsorganer til å likne hannens ved en gradvis omdannelse av hunnens palliale eggleder (ovidukt) til en maskulin prostatakjertel samt irreversibel utvikling av sædleder og penis. Utviklingen er delt i 5 intersex-stadier, hvor egglederen gradvis sprekker opp fra kjønnsåpningen og utover i hele sin lengde, og det til sist utvikles en penis. Stadie 0 er friske individer. I stadie 1 begynner kjønnsåpningen å sprekke. I stadie 2 er eggleder splittet mer enn 2/3 på langs. I stadie 3 er hele eggleders åpning i kappenhulen splittet, og en begynnende til fullt utviklet prostatakjertel er synlig. Stadie 4 er dårligst tilstand og viser både utviklet sædleder og penis. Hunnen blir steril i stadie 2 til 4 (Bauer mfl. 1997).

Graden av intersex blir bestemt etter ISI-indeksen som beregnes som summen av verdiene av intersex-stadiene til alle hunnene delt på antall hunner. Hannen blir også påvirket ved at peniskjertlene blir markant redusert ved høye TBT-konsentrasjoner. Friske hanner kan ha opp til 40 peniskjertler, mens i belastede områder har de ingen eller få. Peniskjertelindeks (PKI) er ikke brukt i denne undersøkelsen.

Imposex-stadier hos nettsnegl

Nettsnegl er mer følsom for TBT-påvirkning enn strandsnegl. Imposex hos nettsnegl innebærer at hunnen utvikler sædleder og penis i tillegg til normale feminine kjønnskarakterer. Det er 5 imposex-stadier hos nettsnegl (Vas Deferens Stage/Sequence, VDS) hvor stadie 0 er friske individer. Stadie 1 er hunn med en liten penis eller del av sædleder. I stadie 2 ses en liten kanal på penis, eller litt lengre sædleder. Det kan også være en kort sædleder ut fra kjønnsåpningen. Stadie 4 er dårligst tilstand hvor man ser penis og sædleder helt frem til kjønnsåpningen, eller forbi kjønnsåpningen og inn under egglederen (ovidukt) (OSPAR 2002).

Graden av imposex blir bestemt ut fra sædleders utvikling (Vas Deferens Sequence Index, VDSI) som er summen av verdiene av imposex-stadiene til alle hunnene (VDS) delt på antall hunner (VDSI=VDS/antall hunner).

Imposex-stadier hos purpurnegl

Purpurnegl er svært følsom for TBT. Ved utvikling av imposex utvikler hunnen sædleder og penis i tillegg til normale feminine kjønnskarakterer. Det er 7 sædlederstadier (VDS) hvor stadie 0 er friske individer. I stadie 1 begynner sædleder å vokse fra kjønnsåpningen og i stadie 2 ses en liten penis. I stadie 3 har sædleder også startet å vokse fra penis, samtidig som penis vokser. I stadie 4 har sædlederne fra penis og kjønnsåpning vokst sammen, og i stadie 5 har sædleder vokst over kjønnsåpningen. I stadie 6 har sædleder helt stengt kjønnsåpningen og kapslet inn egg. Her kan man finne aborterte eggkapsler (Gibbs mfl. 1987).

Forekomsten av imposex kvantifiseres ved hjelp av de to indeksene «Relative Penis Size Index» (RPSI) og «Vas Deferens Sequence Index» (VDSI), hvorav VDSI er den mest brukte indeksen. VDSI beregnes som for nettsnegl.

De statistiske testene er gjort med analysen «Cumulative Link Models» med pakken «ordinal» (Christensen 2012) med programmet R.

Purpurnegl har siden 1991 blitt analysert årlig for imposex ved en rekke lokaliteter i det nasjonale overvåkingsprogrammet «Overvåking

av miljøgifter i kystområdene» som NIVA utfører for Miljødirektoratet (Green mfl. 2012). Tidligere undersøkelser har vist sammenheng mellom konsentrasjoner av TBT og graden av imposex, og sammenheng mellom avstand til potensielle TBT-kilder og graden av imposex hos purpursnegl (Walday mfl. 1997).

Resultater og diskusjon

Strandsnegl

Strandsneglundersøkelsene i Vikkilen ved Grimstad viste en positiv utvikling over tid i perioden 2005 til 2012 (Tveiten mfl. 2012). Figur 3 presenterer grad av intersex (vist som ISI-indeks) fra innerst i Vikkilen (stasjon 7) og utover Vikkilen til Håøya (stasjon 1).

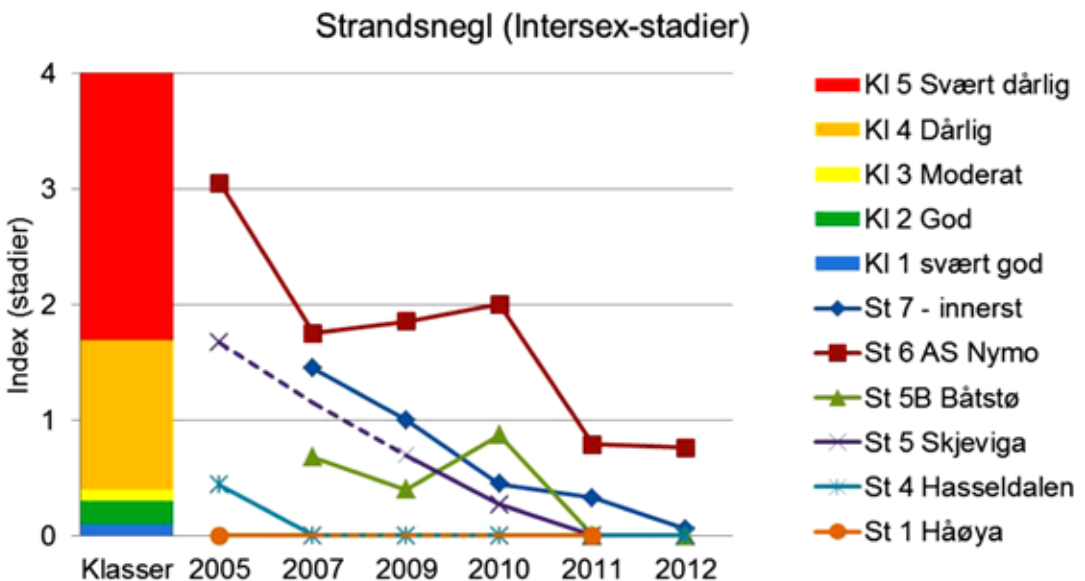
Resultatene var positive og indeksverdiene var nedadgående ved alle stasjonene over tid. Nedgangen var signifikant ved stasjonene 5, 5b, 6 og 7 ($P < 0,001$). De høyeste verdiene ble funnet på stasjon 6 ved antatt kilde til TBT-forurensningen. ISI-indeksen var 3,05 i 2005 og enkelte strandsnegl befant seg i stadie 4, noe man kun finner ved meget høye TBT-konsentrasjoner. Ved denne stasjonen ble det funnet stadier over 2 som viste at dyrene var sterile og hadde synlige skader, men det var en klar forbedring fra 2005 til 2007.

Før perioden sett over ett, så har det vært en klar positiv utvikling i intersex hos strandsnegl i hele området. Det ble påvist en signifikant nedgang av intersex i strandsnegl når hele fjorden, unntatt stasjon 1, ble vurdert samlet ($P < 0,0001$). Sneglene nærmest antatt forurensningskilde ved de to innerste stasjonene var i dårlig tilstandsklasse mens sneglene var friske utover i fjorden.

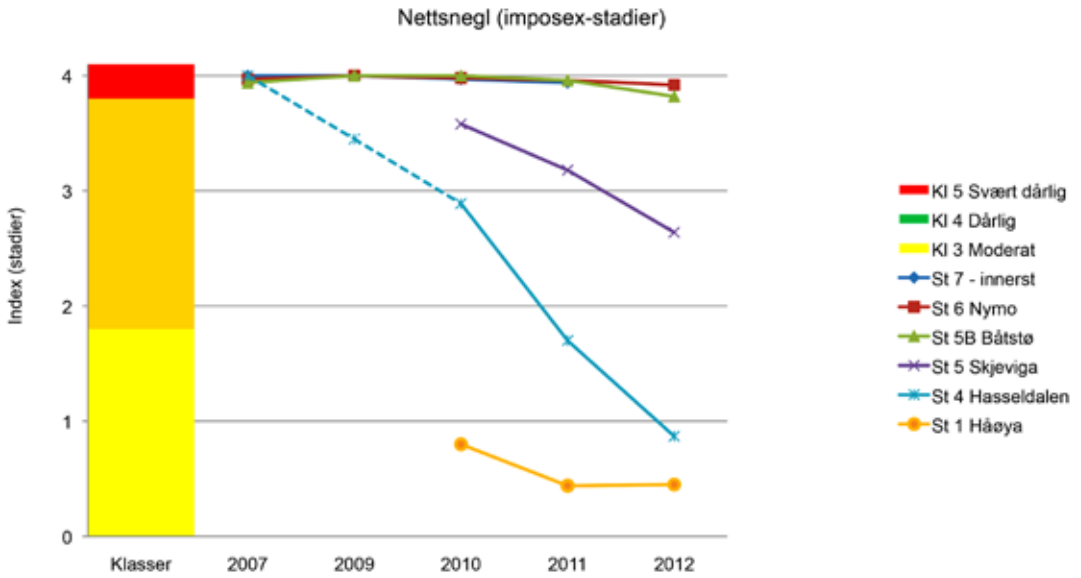
Strandsnegl er relativt lite følsom for TBT og det må høye konsentrasjoner (10 ng/l sjøvann) til før synlige effekter vises. De fleste steder i Norge hvor strandsnegl er undersøkt, har man sett ingen eller lav påvirkning. Av alle stasjoner NIVA har undersøkt, er Vikkilen det eneste området med høye nok TBT-konsentrasjoner til å kunne indusere intersex-stadie 4 (hunnsnegl med penis) i strandsnegl. Nest høyest var fra en småbåthavn i indre Oslofjord i 1999 hvor det ble funnet at sneglepopulasjonen var i intersex-stadie 2,6 (Berge mfl. 1999).

Nettsnegl

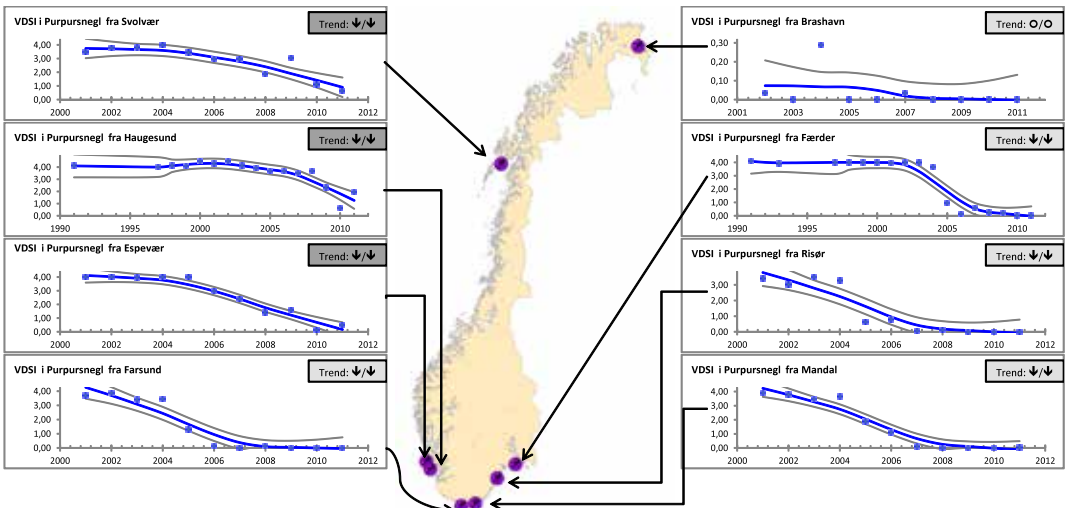
Det ble funnet høy grad av imposex hos nettsnegl ved stasjonene 5b og 6 i hele perioden fra 2007 til 2012 og det var liten forskjell mellom stasjonene, figur 4. Fra 2010 ble nettsnegl også innsamlet fra stasjoner lenger ut i fjorden (stasjonene 1, 4 og 5)



Figur 3. Intersex-stadier (vist som ISI-indeks) hos strandsnegl i Vikkilen ved Grimstad.



Figur 4. Imposex-stadier (vist som VDSI) hos nettsnegl i Vikkilen ved Grimstad.



Figur 5. Imposex-stadier (vist som VDSI) for purpursnegl langs norskekysten i perioden fra 1991 til 2011 (Green mfl. 2012).

og her var indeksverdiene tydelig nedadgående i perioden fra 2010 til 2012. Nedgangen var signifikant ved stasjonene 1 ($P < 0,01$), og stasjonene 4 og 5 ($P < 0,001$). Nivåene nærmest antatt forurensningskilde var fortsatt så høye at sneglene var i dårlig tilstandsklasse mens de var i moderat tilstand lenger ut i fjorden. Det ble påvist en signifikant nedgang av imposex i nettsnegl når hele fjorden ble vurdert samlet ($P < 0,0001$).

Purpursnegl

Purpursnegl finnes bare ved ytre stasjon 1 (Håøya) og gir derfor et bilde av den generelle TBT-belastningen i kystvannet. Purpursnegl fra Grimstadområdet ble undersøkt i 2005 og 2011. I 2005 var sneglene i VDSI-stadie 3-4 (nesten sterile). I 2011 var alle undersøkte sneglene friske (stadie 0).

Denne positive utviklingen hos purpursnegl er også funnet flere steder langs norskekysten

(Green mfl. 2012, Walday mfl. 1997). Effektene av TBT hos purpursnegl er markert mindre i dag enn tidlig på 2000-tallet. Lange tidsserier fra programmet «Overvåking av miljøgifter i kystområdene» har vist en meget positiv utvikling langs hele norskekysten med signifikante nedadgående langtidstrender av imposex ved syv av åtte sneglestasjoner, figur 5.

Konklusjon

Undersøkelsene i Grimstad-området viste klare TBT-effekter hos strandsnegl i Vikkilen i 2005 og en klar positiv utvikling i perioden frem til 2012. Selv nær en tidligere betydelig forurensningskilde for TBT bar sneglene gradvis mindre preg av dette gjennom undersøkelsesperioden. I 2012 var intersex og imposex kun sporbart ved stasjonene nærmest verftet. Hvis den positive utviklingen fortsetter er det mulig at intersex-verdiene kan være i tilstandsklasse II, god, i løpet av noen få år.

Nettsnegl viste også en positiv utvikling, særlig fra 2010. Bedringen var større ved stasjonene lengre unna verftet, enn ved stasjonene nærmere forurensningskilden. Ved ytterste stasjon 1 (Håøya) var nesten alle dyrene friske i 2012, bortsett fra noen få individer som var i imposex-stadie 2 og 3.

Graden av imposex hos purpursnegl var markant i forhold til tidlig på 2000-tallet, og i 2011 var alle purpursneglene ved Håøya utenfor Vikkilen friske.

Det er forventet at kjønnsforstyrrelse hos nettsnegl vil vedvare lengre enn hos strandsnegl, fordi nettsneglen lever nede i det TBT-forurensete sedimentet, mens strandsneglen lever på steinbunn og er i mindre kontakt med sedimentet. Resultatene fra undersøkelsen i Vikkilen ved Grimstad viste også at dette så langt er tilfelle (Tveiten mfl. 2012).

Referanser

Alzieu, C. 1991. Environmental problems caused by TBT in France: assessment, regulations prospects. *Mar. Env. Res.* 32, 7-17.

Batley, G. 1996. The distribution and fate of tributyltin in the marine environment, fra antologien 'Tributyltin: case study of an environmental contaminant' af Stephen J de Mora, p. 139-166, Cambridge University Press, 1996.

Bauer, B., Fioroni, P., Schulte-Oehlmann, U., Oehlmann, J., Kalbfus, W. 1997. The use of *Littorina littorea* for tributyltin (TBT) effect monitoring – Results from the German TBT survey 1994/1995 and laboratory experiments. *Environmental Pollution*, Vol 96, No 3, pp. 299-309.

Berge, J.A., Walday, M., Green, N.W., Brevik, E.M., Følsvik, N., Tveiten, L. 1999. Organotin in the Oslofjord – still an environmental problem?, Poster presentert på 2. Nordic marine Sciences Meeting, Hirtshals 2-4 mars 1999.

Berge, J.A., Brevik, E., Bjørge, A., Følsvik, N., Gabrielsen, G.W., Wolkers, H. 2004. Organotin in marine mammals and seabirds from Norwegian territory.

Berge, J.A., Amundsen, C.E., Eggen, T., Hylland, K., Bøe, E. 2006. Naturlig nedbrytning og biotilgjengelighet av tinnorganiske forbindelser i marine sedimenter. NIVA-rapport 4996, SFT rapp. TA-2091/2005, 72 s.

Christensen, R. H. B. 2012. Ordinal Regression Models for Ordinal Data. R package version 2012.09-11. <http://www.cran.r-project.org/package=ordinal/>.

Deutsch, U. og Fioroni, P. 1992. "The shedding of the penis in *Littorina littorea*: Some new aspects", Proceedings of the third International Symposium on Littorinid Biology, 309-311 s.

Fent, K. 1996. Ecotoxicology of organotin compounds, *Critical Reviews in Toxicology* 26, 1, 1-117.

Gibbs, P.E., Bryan, G.W., Pascoe, P.L., Burt, G.R. 1987. The use of the dog-whelk, *Nucella lapillus*, as an indicator of tributyltin (TBT) contamination. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 67: 507-523.

Green, N.W., Schøyen, M., Øxnevad, S., Ruus, A., Høgåsen, T., Beylich, B., Håvardstun, J., Rogne, Å.G., Tveiten, L. 2012. Coordinated environmental monitoring programme (CEMP). Hazardous substances in fjords and coastal waters – 2011. Levels, trends and effects. Long-term monitoring of environmental quality in Norwegian coastal waters. NIVA-rapport 6432, Klima- og forurensningsdirektoratet, Statlig program for forurensningsovervåking, SPFO rapportnr. 1132/2012, TA nr. 2974/2012, 264 s.

Harding, M.J.C., Bailey, S.K., Davies, I.M. 1992. TBT imposex survey of the North Sea. Annex 7: Norway. Scottish Fisheries working paper no 10/92.

Næs, K., Tveiten, L., Håvardstun, J. 2005. Sedimentundersøkelser i Vikkilen knyttet til fylkesvis tiltaksplan. NIVA-rapport 5040. 60 s.

OSPAR 2002. Revised Technical Annex 3 of the OSPAR Guidelines for Contaminant-specific Biological Effects Monitoring (TBT-specific biological effects monitoring). ASMO 02/13/17-E, Annex 10.

OSPAR 2004. Provisional JAMP Assessment Criteria for TBT - Specific Biological Effects, 2004-15-E.

OSPAR 2009. CEMP assessment report: 2008/2009. Assessment of trends and concentrations of selected hazardous substances in sediments and biota. OSPAR publication number 390/2009. Monitoring and Assessment Series. ISBN 978-1-906840-30-3. 80 pp.

Strand, J., Larsen, M.M., Næs, K., Cato, I., Dahllöf, I. 2006. Tributyltin (TBT). Forekomst og effekter i Skagerrak. Rapport fra Forum Skagerrak II. Uddevalla, Sweden. 39 s.

Tallmark B. 1980. Population Dynamics of *Nassarius reticulatus* (Gastropoda, Prosobranchia) in Gullmar Fjord, Sweden. Mar. Ecol. Prog. Ser. 51-62.

Titley-O'Neal, C.P., Munkittrick, K.R., MacDonald, B.A. 2011. The effects of organotin on female gastropods, Critical review. J. Environ. Monit. 13, 2360-2388.

Tveiten, L., Schøyen, M., Bakke, T. 2012. Undersøkelser av imposex og intersex i marine snegler i Vikkilen ved Grimstad i perioden 2005-2012.

Walday, M., Berge, J.A., Følsvik, N. 1997. Imposex og nivåer av organotinn hos populasjoner av purpursnegl i Norge. NIVA-rapport 3665. 28 s.

Walday, M., Følsvik N. 1998. Er norsk kystvann generelt forgiftet. KJEMI nr. 2, 1998.