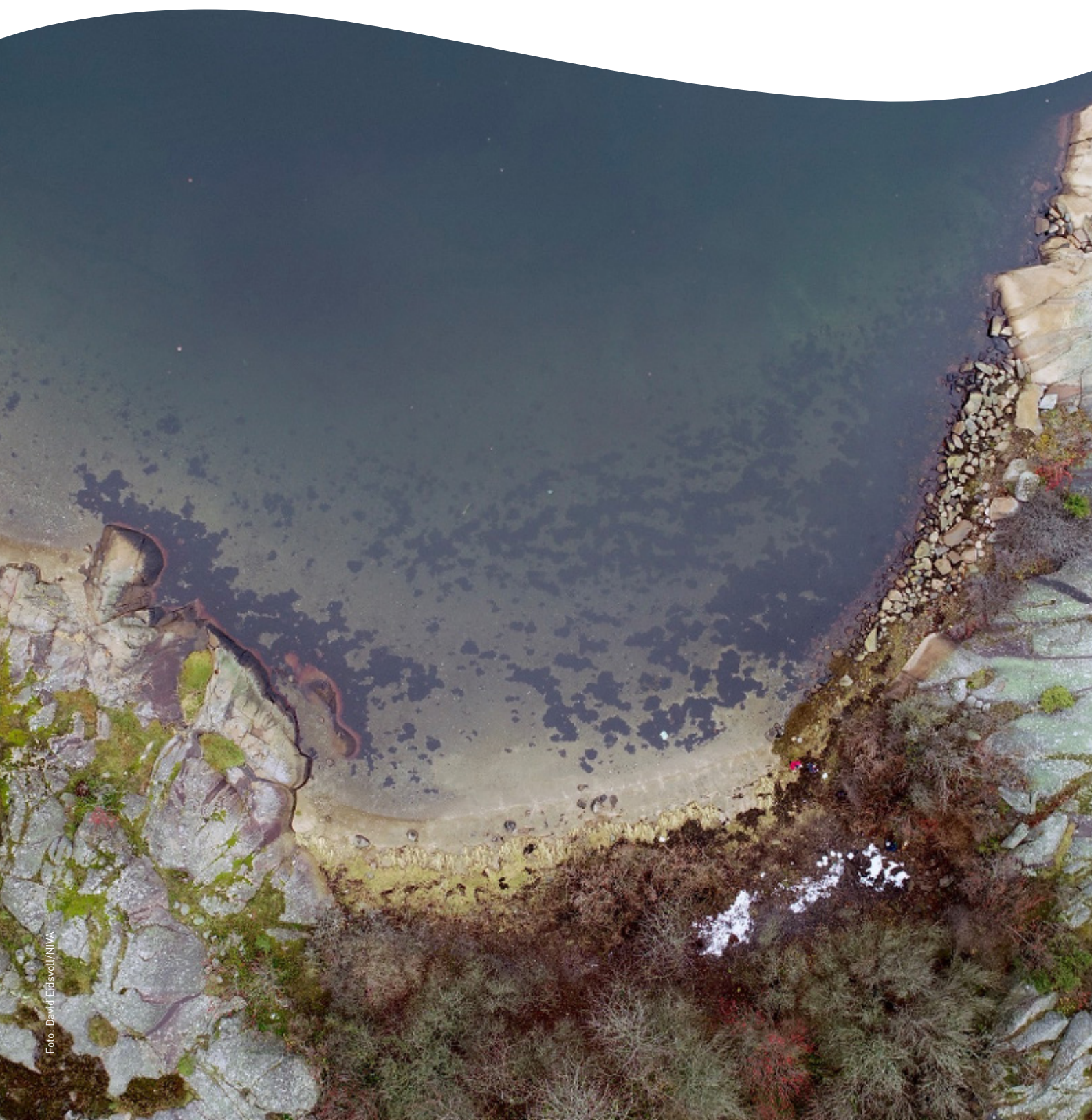


Undersøkelse av giftigheten til plastinfiltret jordmasser samlet inn fra Fredagshølet, Hvaler



Hovedkontor

Gaustadalléen 21
0349 Oslo
Telefon (47) 22 18 51 00

NIVA Region Sør

Jon Lilletuns vei 3
4879 Grimstad
Telefon (47) 22 18 51 00

NIVA Region Innlandet

Sandvikaveien 59
2312 Ottestad
Telefon (47) 22 18 51 00

NIVA Region Vest

Thormøhlensgate 53 D
5006 Bergen
Telefon (47) 22 18 51 00

NIVA Danmark

Njalsgade 76, 4. sal
2300 København S, Danmark
Telefon (45) 39 17 97 33

Internett: www.niva.no

Tittel Undersøkelse av giftigheten til plastinfiltrert jordmasser samlet inn fra Fredagshølet, Hvaler.	Løpenummer 7574-2021	Dato 01.02.2021
Forfatter(e) David Eidsvoll, Inger Lise Nerland Bråte, Liv-Marit Hansen, Nicolay Moe	Fagområde Forurensninger	Distribusjon Åpen
	Geografisk område Oslofjorden	Sider 22 + Vedlegg

Oppdragsgiver(e) Handelens Miljøfond (HMF)	Oppdragsreferanse Sjur Kvifte Nesheim
	Utgitt av NIVA Prosjektnummer 200049

<p>Sammendrag</p> <p>Ni prøver av jordmasser fra Fredagshølet på Seilø vest for Vesterøy i Hvaler kommune, i Ytre Hvaler Nasjonalpark ble sortert for plastfragmenter. Jordprøvene inneholdt mellom 0,5 – 25% volum plast per prøvepunkt. Plastfragmentene bestod av i hovedsak av polyetylen (PE; 74%) og polypropylen (PP; 21%), mens andre plasttyper utgjorde (5%). Det ble utført tre OECD tester, hver til sitt trofiske nivå i næringskjeden, for å undersøke eventuelle toksiske påvirkninger av plastinfiltrerte jordmasser; en 72 timers algetest for virkning på algevekst, en 48 timers akutt dafnie-test for immobilisering/død og en kronisk 28-dagers fjærmygglarvetest for utvikling fra egg via larve til flue. Denne studien har ikke avdekket noen toksisk effekt av ekstrakter av plast fra plastinfiltrert jord på de testede organismene. På dette grunnlaget er det ikke grunn til å tro at den plastinfiltrerte jorden fra Fredagshølet utgjør fare for toksiske effekter. Dette utelukker ikke at den plastinfiltrerte jorden kan ha negativ innvirkning på økosystemet på andre måter ikke dekket av denne studien. Studien har synliggjort et behov for å standardisere vurderings- og beslutningsverktøy for oppryddingstiltak.</p>

Fire emneord	Four keywords
<ol style="list-style-type: none"> Marin forøpling Toksisitet Plast Effects 	<ol style="list-style-type: none"> Marin litter Toxicity Plastics Effects

Denne rapporten er kvalitetssikret iht. NIVAs kvalitetssystem og godkjent av:

Inger Lise Nerland Bråte
Prosjektleder

Marianne Olsen
Forskningsleder

ISBN 978-82-577-7309-0
NIVA-rapport ISSN 1894-7948

© Norsk institutt for vannforskning. Publikasjonen kan siteres fritt med kildeangivelse.

**Undersøkelse av giftigheten til plastinfiltrert
jordmasser samlet inn fra Fredagshølet, Hvaler**

Forord

I desember 2019 søkte NIVA og Oslofjordens Friluftsråd (OF) støtte til prosjektet «Toksitetsanalyse av plast-forurensede jordvoller i Oslofjorden» fra Handelens Miljøfond (HMF). Formålet med HMF sin utlysning var å bidra til økt kunnskapsgrunnlag for å redusere plastforsøplingen i Oslofjorden.

Prosjektet er finansiert av Handelens Miljøfond, og er utført i samarbeid med Oslofjordens friluftsråd (OF). Skjærgårdstjenesten har bidratt med strandrydding, innsamling av materiale og transport. Ryddeaksjonen den 21/4 i Fredagshølet (dagen vi hentet prøvene) er registrert i rydde.no med aksjonskode 92aa og URL-kode 35166.

Kontaktpersoner hos Handelens Miljøfond har vært Hanne M. Hjelmungen Lorvik. Kontaktpersoner fra OF har Liv Marit Hansen og Nicolay Moe.

Rapporten er skrevet av David Pettersen Eidsvoll og Inger Lise Nerland Bråte. Forskningsleder Marianne Olsen har kvalitetssikret rapporten.

Alle takkes for samarbeidet.

Oslo, januar 2021
Inger Lise Nerland Bråte

Innholdsfortegnelse

1	Introduksjon.....	6
2	Metode	10
2.1	Studieområdet	10
2.2	Innsamling av materiale og plastanalyse.....	11
2.2.1	Mengde plast – innsamling av materiale	11
2.2.2	Plastmengde og plasttype (FTIR).....	12
2.3	Toksisitetstester	12
3	Resultater.....	14
3.1	Plastanalyse	14
3.1.1	Mengde og type plast.....	14
3.2	Toksisitetstester	15
3.2.1	Algetest.....	15
3.2.2	Dafnie test	16
3.2.3	Fjærmygglarve test.....	17
4	Diskusjon.....	19
4.1	Plastanalyse	19
4.2	Toksisitetstester	19
5	Konklusjon	20
6	Referanser.....	21

Sammendrag

Marint avfall domineres av plast. Plast brytes sakte ned i havmiljøet og fører til plastakkumulering i ulike deler av det marine miljøet, for eksempel på strender. Noen bukter akkumulerer mer plast enn andre med påvirkende faktorer som f.eks. nærhet til kilder, strømninger, vind, vegetasjon og topografi. I hvilken grad avfallet kan fjernes avhenger av fremkommelighet for rydding av stranden. Plastforurensing har uønskede påvirkninger på miljøet. Samtidig mangler det fortsatt kunnskap om påvirkninger plastforsøplingen har på økologien.

På Seilø vest for Vesterøy i Hvaler kommune, i Ytre Hvaler Nasjonalpark (YHN), ligger Fredagshølet som er en populær naturhavn. Det er også et område det marint avfall akkumuleres, som følge av vind og strømforhold. Strandrydding i Fredagshølet er en del av et større prosjekt for naturrestaurering i regi av Hvaler kommune og standen ble ryddet, såkalt nullstilt, ca. 6 mnd før dette prosjektet hentet prøver fra stranden. OF deltar i strandryddingen sammen med YHN, Statens naturoppsyn (SNO), Skjærgårdstjenesten og Senter for oljevern og marint miljø (SOMM), med formål å undersøke hvordan man best mulig kan rydde plast i sårbare og utilgjengelige områder. Flere ulike rydde-metoder prøves ut, inkludert plukking for hånd, rydding med spade og sortering med vannbad og sikting /skilling av massene, og rydding med minigraver.

Finansieringen av arbeidet dekkes av midler som Hvaler kommune har mottatt fra Østfold fylkeskommune til Naturrestaureringsprosjektet, OF bidrar med egne midler til prosjektet i form av egeninnsats, og SOMM bidrar. Finansieringen dekker imidlertid kun strandrydding og metodeutvikling i felt, dvs. testing av ulike metoder for å få ryddet vekk mest mulig av det marine avfallet ute på stranden. Vurdering av mulige skadevirkninger ved å la de plastinfiltrerte massene ligge, inngår ikke i rydde-prosjektet.

Denne studien, finansiert av Handelens Miljøfond (HMF) bygger videre på erfaringene fra Samuelskilen (Bråte et al. 2019). I dette studiet har vi testet plastinfiltrerte jordmasser fra Fredagshølet i Ytre Hvaler nasjonalpark, med optimaliserte metoder for å undersøke mengder av plast og giftigheten forbundet med de plastinfiltrerte jordmassene. Prosjektet er ledet av NIVA i samarbeid med OF og YHN, og det er utført toksisitetstester på tre trofiske nivå i næringskjeden, med et ekstrakt av plastinfiltrert jord fra Fredagshølet. I 2006 konkluderte OSPAR-konvensjonen at man bør utføre toksisitetstester på tre eller flere bioassays. Vi har testet følgende arter på jordmassene fra Fredagshølet:

- 72 timers algetest (ferskvann; *Raphodictalis subcapitata* og marin; *Skeletonema pseudocostatum*) for å se på veksthemming
- 48 timers test med vannloppe (ferskvann; *Daphnia magna*) eller hoppekreps (marin; *Tisbe battagliai*) for å se på overlevelse
- 28 dagers test med fjærmygglarve (ferskvann; *Chironomidae*) eller fjæremark (marin; *Arenicola marina*) for å se etter effekter på utvikling, inkludert overlevelse, kjønnsratio og utviklingsrate.

Ni prøver av jordmasser fra Fredagshølet i Ytre Hvaler Nasjonalpark inneholdt fra 0,5 – 25% volum plast per prøvepunkt. Plasten i de ni prøvepunktene fra Fredagshølet bestod av i hovedsak av polyetylen (PE; 74%) og polypropylen (PP; 21%). Alle andre plasttyper (5%) ble samlet i en felles kategori. Denne studien har ikke avdekket noen toksisk effekt av ekstrakter av plast fra plastinfiltrert jord på de testede organismene.

1 Introduksjon

Formålet med prosjektet har vært å undersøke giftigheten til plastinfiltrerte jordmasser som befinner seg i Fredagshølet på Seilø vest for Vesterøy i Hvaler kommune, i Ytre Hvaler Nasjonalpark. Med støtte fra Handelens Miljøfond har NIVA i samarbeid med Oslofjorden Friluftsråd i 2020 gjennomført toksisitetsanalyser av jordmasser fra Fredagshølet.

Plastforsøpling er et stort miljøproblem som gir synlige utslag blant annet i form av forsøplede strender. Plastforsøplingen påvirker stredende estetisk som igjen påvirker strandens rekreasjonsverdi, men den representerer også en risiko for konkrete miljøeffekter og dårligere miljøtilstand. Mye av plasten som ender i havet vil over tid trolig havne på havbunnen (Booth et al., 2017), men fortsatt er det store mengder plastsøppel som flyter i land på norske strender. Strandrydding er derfor et viktig tiltak for å redusere plastforsøplingen og hindre at søppel på avveie vaskes tilbake til havet, men det er meget tidkrevende. Ifølge ryddeportalen ryddenorge.no deltok i 2020 mer enn 30 000 frivillige med å rydde totalt 200 tonn avfall (hvor veldig store deler er plast) fordelt på over 4000 aksjoner langs kyst, vassdrag og innsjøer¹.

Det foreligger imidlertid fortsatt lite kunnskap og dokumentasjon på miljøeffektene av plastforsøpling i seg selv og enda mindre på effekten av rydding. Dagens kunnskapsnivå om de økonomiske, sosiale og økologiske effektene av plastforsøpling og opprydding står ikke i forhold til den enorme innsatsen som legges ned av oppryddingstiltak, og for lokale forvaltere og NGOer er det et stort behov for mer kunnskap som grunnlag for prioritering og beslutning om hvor, når og hvordan rydding bør foregå. Det blir særlig tydelig i områder som er vanskelig tilgjengelige for frivillig rydding, eller hvor plastforsøplingen er infiltrert med jordmasser slik at frivillig manuell rydding er vanskelig. I slike tilfeller kan det være aktuelt å vurdere profesjonell rydding og maskinell rydding. Internasjonalt er profesjonell maskinell rydding særlig tatt i bruk for å effektivisere rydding av store turiststrender, men kunnskapen om de mulige negative effektene av maskinell rydding er også mangelfull.

For å kunne fatte en faglig begrunnet beslutning om opprydding bør de negative effektene av plastforsøplingen forstås bedre. I tillegg må de mulige negative effektene av ryddetiltakene i seg selv forstås bedre. Ved maskinell rydding med gravere som er store inngrep i økologien, må risikovurderingen som ligger til grunn både vurdere effekt av plastforsøpling samt romme påvirkninger selve ryddingen kan ha. Målet er å ivareta habitat og organismer som lever på stedet som skal ryddes, ikke nødvendigvis å fjerne all plast for enhver pris.

Den totale påvirkningen plastforsøpling har på miljøet og organismene som lever i og av økosystemet er i stor grad ukjent. Det er ikke kjent hva som er den viktigste parameteren for miljøpåvirkning av plast; type plast (polymer), massebidraget (vekt), antall objekter, fragmenter eller partikler, volum eller kjemiske stoffer tilsatt plasten. Det er ikke utenkelig at jordas fysiske egenskaper, for eksempel temperatur eller kapasiteten til å holde på vann (permeabilitet), kan påvirkes av høyt plastvolum i jordmassene. Endring i permeabilitet kan også indirekte føre til endring i jordtemperatur, med mulige konsekvenser for dyr som har dette som habitat, f.eks. på utvikling. Spesielt for områder som er hardt rammet av plastforsøpling kan påvirkningen potensielt være betydelig. I slike akkumulasjonsområder er det gjerne en blanding av både gammel akkumulert plast og mer nyprodusert plast.

¹ <https://ryddenorge.no/>

Plast består av hydrokarbonforbindelser, men også såkalte additiver som er kjemiske stoffer som tilsettes til platen for å gi platen de riktige egenskapene (myknere, pigmenter, flammehemmere, UV-stabilisatorer m.m.). Det finnes mer enn 6000 additiver i plast og noen av disse er å betrakte som miljøgifter. Miljøgifter er kjemiske stoffer som utgjør en fare for helse og miljø som for eksempel bisfenol A, triklosan og polybromerte difenyletere (PBDE) (Hahladakis et al., 2018). Det er stadig bedre regulering av miljøgifter i plast, og jo mer vi lærer om skadevirkning av ulike stoffer fra plastmateriale, jo flere stoffer blir regulert. Stadig nye reguleringer innføres og i 2011 ble det f.eks. forbudt med bisfenol A i tåteflasker. Likevel kan det ikke utelukkes at plastavfall inneholder potensielt skadelige miljøgifter, og gammel plast finnes fortsatt i naturen og kan derfor være en kilde til miljøgifter som senere er regulert.

Det er et økende behov for empiriske data på potensielle lekkasjer av kjemikalier fra plast som blir liggende i miljøet og dens effekt på omkringliggende økologi. Til dette formålet kan man benytte etablerte toksikologiske metoder for å vurdere skadevirkning av plastinfiltrerte jordmasser på en bestemt lokasjon. Slike resultater vil styrke vurdering av behovet for opprydding og gi en lokal risikovurdering av plastinfiltrert jord.

Risikovurdering er en vurdering av stoffets potensielle skadevirkninger sammen med eksponering for stoffet i miljøet. Potensiell fare + eksponering = Risiko. For å teste om et stoff eller en stoffblanding er potensielt skadelig for miljøet gjennomføres toksisitetstester. Dette gjøres et standard prosedyrer i laboratorier og det er anbefalt at man utfører laboratorietester på flere ulike testorganismer. Dette er fordi stoffer kan fremkalle forskjellige effekter i ulike organismer, og fordi det er ønskelig å forstå effektene på ulike nivåer i en næringskjede for å kunne si noe om den generelle giftigheten i et økosystem. Det er også slik at ulike organismer har ulik følsomhet ovenfor stoffer, så det er anbefalt at man tester de antatt mest sensitive organismene for å avdekke eventuelle miljøeffekter.

Toksisitetstester vil avdekke den potensielle faren stoffet har på organismer. Ofte brukes såkalte «testbatteri», dvs. et sett med toksisitets-tester, for å dekke flere taksonomiske grupper og miljøer (som ferskvann, saltvann, jord og sediment). Det er anbefalt av Organisasjonen for økonomisk samarbeid og utvikling (Organization for Economic Cooperation and Development; OECD) via deres retningslinjer for testing av kjemikalier² å bruke flere av deres 150 testmetoder sammen for å undersøke påvirkning på miljøet. Man kan teste giftigheten til et stoff over ulikt tidsspenn; såkalt akutt toksisitet (ofte 24-96 timer) eller kronisk (fra 21 dager til opp til år) toksisitet. Varigheten avgjøres av blant annet organismens levetid og mest relevant eksponering. Akutte toksisitetstester «hermer» et engangsutslipp med som regel en relativt høy konsentrasjon, mens kronisk eksponering representerer en jevn eller puls-vis eksponering over et lenger tidsløp, slik som for eksempel diffus avrenning. Mikroalge-, vannloppe- og fjærmyggtester er tre av disse OECD testene som benyttes til toksisitetsanalyser. Disse tre organismene representerer tre forskjellige trofiske nivå, fra planter til rovdyr. Ett trofisk nivå kan sies å være et trinn i forflytningen av energi gjennom en mulig næringskjede, og kan derfor representere et økosystem. Algene er energiproducentene og første trinn. Vannloppene (Dafnier) nærer seg av alger, og fjærmygglarver er rovdyr som nærer seg av organismer som f.eks. dafnier.

Mikroalger er viktige primærprodusenter på bunnen av næringskjeden, og selv liten påvirkning her kan få store konsekvenser på et økosystemnivå (Prata et al., 2019). Derfor er det viktig å undersøke om plast negativt påvirker mikroalgeveksten. Grønnalgen *Raphidocelis subcapitata*, også kalt *Selenastrum capricornutum* og *Pseudokirchneriella subcapitata*, er en ferskvannsalge som brukes

² <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm>

som testorganisme³. Den er anbefalt av OECD siden den vokser fort og ofte er mer sensitiv for ulike stoffer enn andre alger, figur 1.



Figur 1: Eksempel på algetest. Jo grønnere medium, jo flere algeceller og dermed mer algevekst. Foto: NIVA.

Dafnier, vannlopper, ofte arten *Daphnia magna* (figur 2) eller *Daphnia pulex*, er også en mye brukt ferskvanns testorganisme anbefalt av OECD. Dafnier er filtrerende planktonisk krepsdyr som finnes i innsjøer, dammer og elver⁴. De livnærer seg blant annet av alge- og soppceller, og de er veldig viktige som f.eks. mat til ferskvannsfisk. Viktige grunner til at dafnier er mye brukt som testart er at de har en bred utbredelse i mange ulike habitater, de har en kort livssyklus som gjør de lette å studere, samt at de er relativt enkle å holde under laboratorieforhold (Persoone et al., 2009).



Figur 2: Eksempel på dafnie (*Daphnia magna*). FOTO: NIVA/You Song

Utvikling av den sedimentlevende ferskvanns fjærmygglarven (som arten *Chironomus riparius*), figur 3, via puppe til flue, er også en mye brukt toksisitetstest for å se på effekter av stoffer via sedimenteksponering. Fjærmygg (Chironomidae) er en meget artsrik familie av mygg som finnes i alle ferskvannsmiljøer (samt også i brakkvann- og noe i saltvannssystemer) rundt omkring i verden og de er ofte svært tallrike. Det kan f.eks. være så mange som 100 000 fjærmygglarver per kvadratmeter

³ M.D. Guiry in Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2021. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 13 January 2021.

⁴ https://animaldiversity.org/accounts/Daphnia_magna/

sediment. De er svært viktige i ferskvannøkosystemene blant annet som føde for fisk. I Norge er det funnet rundt 600 arter fjærmygg⁵.



Figur 3: Utvikling av fjærmygg (*Chironomus riparius*) fra egg, via larve og puppe, til ferdig flue. Fluen er en hannflue (de har børster på hodet som hunnfluen ikke har). Foto: NIVA/Ailbhe Macken

I dette prosjektet ble det utført tre OECD tester for å se på påvirkningen av plastinfiltreerte jordmasser; en 72 timers algetest som studerte algevekst, en 48 timers akutt dafnietest som studerte immobilisering/død og en kronisk 28-dagers fjærmygg larvetest som så på utvikling fra egg via larve til flue.

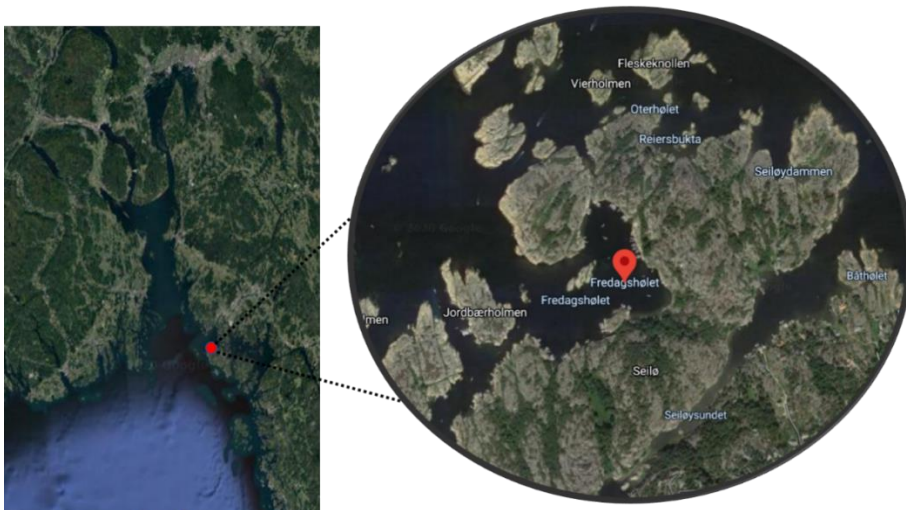
Prøver av jordmasser fra Fredagshølet ble innhentet i April 2020. Med de foreslåtte undersøkelsene ønsker vi å oppnå en bedre faglig forankret forståelse for de mulige effektene som plastinfiltreert jord kan ha på biota. Basert på erfaringer fra både Samuelskilen og det omsøkte prosjektet i Fredagshølet, vil vi komme med en faglig begrunnet anbefaling om maskinell rydding ut fra et toksikologisk perspektiv.

⁵ <https://www.fhi.no/nettpub/skadedyrveilederen/fluer-og-mygge/fjarmygge/>

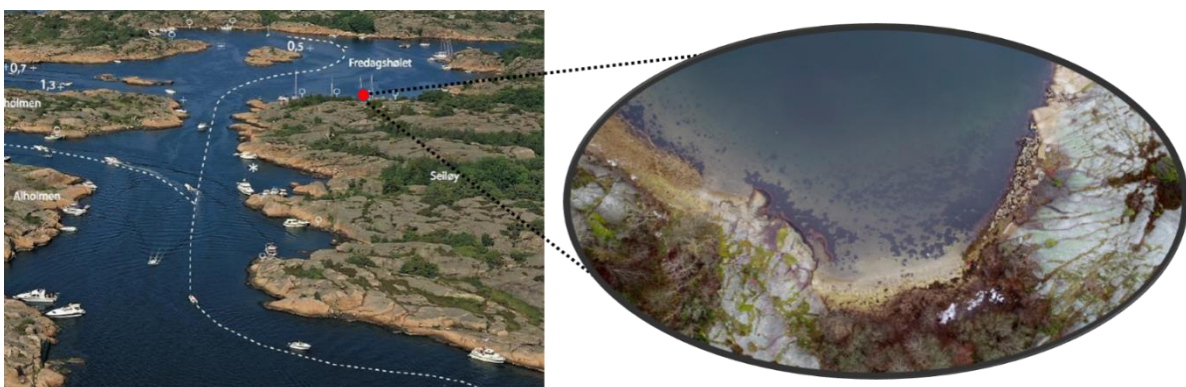
2 Metode

2.1 Studieområdet

Fredagshølet, figur 4 og 5, ligger i Ytre Hvaler nasjonalpark i Østfold, og er et fredet naturområde. Dette er en kjent naturhavn, men den er også dessverre kjent for mye plastforsøpling, figur 6. Området ryddes jevnlig på overflaten som del av naturrestaurering i regi av Hvaler kommune, men det kommer inn nytt plastavfall kontinuerlig. Over tid har plast blitt pakket inn i jordmassene og vegetasjonen, og selv om man har ryddet overflaten for plast fortsetter plasten å tyte ut fra de lavere lagene. Stranden ligger slik til at det er et naturlig akkumuleringsområde for plast som kommer fra havet. Nettopp denne vinteren (2019/2020) hadde fremherskende vindretningen vært noe annerledes enn normalt på grunn av mye pålandsvind fra sør. Denne vindretningen gjør Fredagshølet mer utsatt for plastpåslag enn andre vindretninger.



Figur 4: Kart over Oslofjorden til venstre med Fredagshølet i rødt, med mer detaljer for beliggenhet til høyre.



Figur 5: Dronefoto over Fredagshølet.

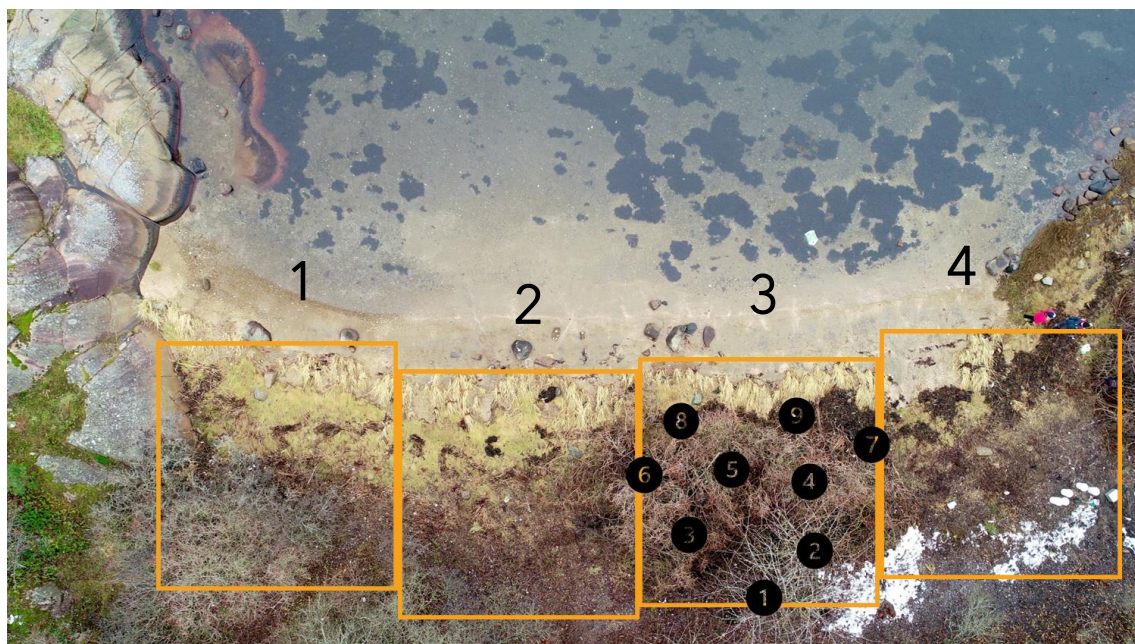


Figur 6: Prøvetakning av strandsoner. Prøvene ble fraktet ut av strandsonen og til laboratoriet i bøtter. Av bildet kan man tydelig se plastavfall i Fredagshølet.

2.2 Innsamling av materiale og plastanalyse

2.2.1 Mengde plast – innsamling av materiale

Fredagshølet ble delt inn i fire soner (figur 7). Sone 1 vil ikke bli rørt, og vil ikke få noen behandling. I sone 2 vil det bli gjort overflaterydding. Sone 3 er området som vurderes å ryddes maskinelt, og i sone 4 vil det bli gjort finrydding. Innenfor sone 3 ble ni ulike jordprøver tatt for å teste for plastinnhold og påvirkning på organismer. De ni prøvepunktene ble valgt tilfeldig og med formål om å dekke både området nærmest og lengst fra vannet. En jordprøve fra hvert prøvepunkt ble gravd ut med spade og lagt i en bøtte med lokk. Prøvene ble transportert tilbake til lab og frosset ved -20°C for oppbevaring til videre analyser ble utført.



Figur 7: Dronebilde av Fredagshølet med fire ulike soner av stranden. Sone 3 skal vurderes å ryddes maskinelt og er der hvor prøvene ble tatt. Ni prøvetagningspunkter er markert i sone 3.

2.2.2 Plastmengde og plasttype (FTIR)

Plastbiter ble analysert med Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) instrument (ATR-FT-IR Agilent Cary 630), en type infrarød spektroskopi. For alle analytiske tilnærmingene ble spektrere produsert med minimum 4 co-skanninger og en oppløsning på 4 cm⁻¹. Polymeridentifikasjon ble oppnådd ved å sammenligne FT-IR-spektrene med kommersielle og interne polymerbiblioteker. Alle spektra er også manuelt inspisert.

2.3 Toksisitetstester

Det er utført toksisitetstester på tre trofiske nivå i næringskjeden; alger, vannlopper og fjærmygglarve. Ettersom forskjellige stoffer kan fremkalle forskjellige effekter i samme testorganisme, og siden ikke alle organismer er like utsatt/følsomme, er flere arter valgt som representerer for hvert sitt trofiske nivå.

For samtlige eksponeringer ble elutriat ekstrakter fremstilt fra jordmassene ved enkle modifikasjoner av en standard elutriat test (Keely and Engler, 1974; USEPA, 1977; Davoren, 2005). Dette ble gjort ved at en blanding av jordmasser fra hvert prøvepunkt ble tilsatt Isklar flaskevann (1 del jord til 4 deler vann), ristet ved 200 rpm i 1,5 time før prøven ble sentrifugert ved 1200 xg i 30 minutter ved 4°C. Supernatanten (elutriatet) ble deretter filtrert med et 0.2 µm filter før brukt i eksponeringstestene.

Toksisitet med ferskvannsalgen *Raphidocelis subcapitata* undersøkes ved veksthemmingstest (ISO 8692:2012). Algenes veksthastighet måles i en konsentrasjonsgradient 0,01%, 0,1%, 1%, 10% og 100% av elutriatet i et vekstmedium. Fra en responskurve som viser veksthastighet som funksjon av fortyningsserien kan konsentrasjonen (i %) som gir 50% hemming av algenes vekst (EC50) beregnes. En NOEC (no effect concentration) og en LOEC (lowes effect concentration) kan også beregnes.

Det ble utført to akutte toksisitetstester med dafnier (*D. magna*). Testene ble utført i overenstemmelse med OECD 202 guidelines (OECD, 2004). Det ble benyttet en konsentrasjonsgradient for begge testen: 0,01%, 0,1%, 1%, 10% og 100% av elutriatet. 20 organismer ble fordelt over fire replikater for hver konsentrasjon med fem *D. magna* i hvert begerglass, pluss kontrollgruppe. Begerglassene ble fylt med 50 ml testmedium. Antall immobiliserte og døde dafnier ble tallet etter 24 og 48 timer.

Det ble utført kronisk 28 dagers toksisitetstest på fjærmygglarver i overenstemmelse med OECD 218 guideline (OECD, 2004). Utviklingsraten ble bestemt (antall dager det tok tar larver å utvikle seg til voksent myggfluer) på 20 larver som ble plassert i sediment fra prøvepunkt 1, 2, 5 og 8, pluss to kontrollgrupper. Det ble brukt fire replikater (A, B, C, D) per prøvepunkt og for de to kontrollgruppene.

For algetesten (ferskvannsalgen *Raphidocelis subcapitata*) og Vannloppe-testen (ferskvann *Daphnia magna*) ble jordmasser fra prøvepunkt 1 med høyt plastvolum (20-25%) og 8 med lavt plast volum (0,5%) testet. Prøvepunkt 8 var nærmest vannet, mens prøvepunkt 1 var lengst vannet. For fjærmygglarvene ble prøvepunkt 1 (20-25% plast volum) 2, 8 (0,5-1% plast volum) og 5 (6% plast volum) testet.

3 Resultater

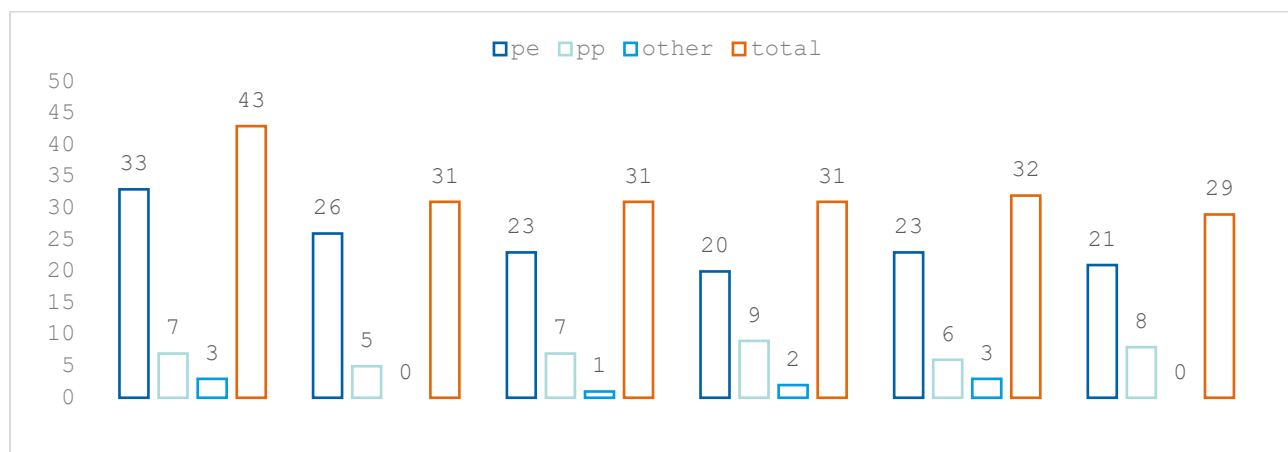
3.1 Plastanalyse

3.1.1 Mengde og type plast

Et utvalg på 197 biter ble analysert (tabell 1, figur 8) for polymersammensetning (plasttype).

Tabell 1: Resultater etter FTIR plastanalyser: Polyethylene (PE), polypropylene (PP) og alle andre plasttyper (other).

Prøvepunkt	pe	pp	other	total
2	33	7	3	43
6	26	5	0	31
4	23	7	1	31
8	20	9	2	31
7	23	6	3	32
5	21	8	0	29
Total	146	42	9	197



Figur 8: Resultater etter FTIR plastanalyser: Polyethylene (PE), polypropylene (PP) og alle andre plasttyper (other). Kolonnen «total» er all plast per prøvepunkt.

Hver prøve fra hvert prøvepunkt ble veiet, fraksjonert og veiet igjen: totalvekt, samlet vekt av røtter og stein, vekt av plast og vekt av resterende masser er oppgitt i tabell 2.

Tabell 2: Oversikt over samtlige prøvepunkt og prøvens totalvekt samt delvekt på røtter og stein, plast og resten (alt annet). I tillegg er det estimert det relative volumet i plast til hver prøve.

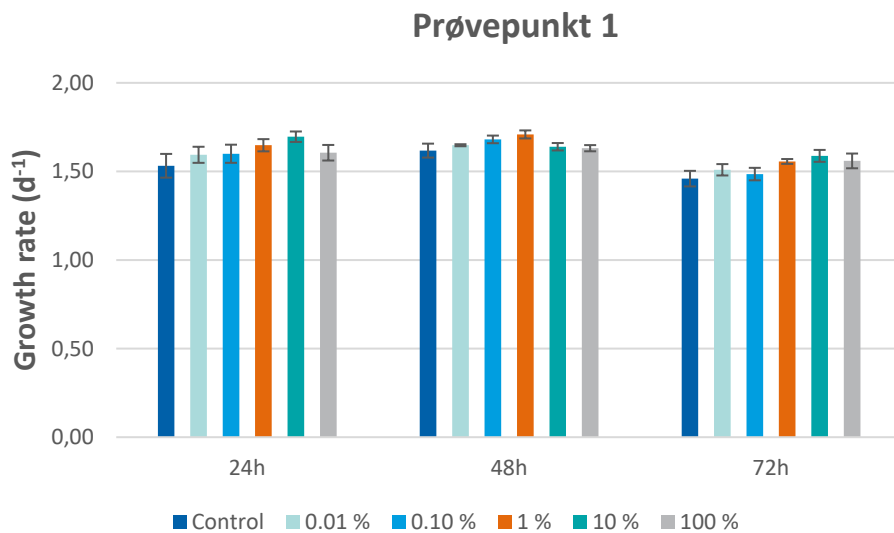
Prøvepunkt	1	2	3	4	5	6	7	8	9
totalvekt	4963	5468	5468	5643	5595	5683	5520	5640	6806
røtter og steiner over 5mm	480	1059	1059	1293	1277	1214	927	1587	1111
plast	424	6	6	88	65	147	62	2	19
resten	3971	4392	4392	4206	4166	4237	4517	4045	5675
relativ mengde plast	20-25%	1 %	1 %	10 %	6 %	25 %	6 %	0,5%	1 %

3.2 Toksitetester

3.2.1 Algetest

Det ble utført to algetester med *Raphidocelis subcapitata* i overenstemmelse med ISO 8692. Det ble benyttet en konsentrasjonsgradient for begge testene: 0,01%, 0,1%, 1%, 10% og 100%. Algenes vekstrate ble analysert etter 24, 48- og 72-timers eksponering.

Resultatene fra algetestene fra **prøvepunkt 1** etter 24, 48 og 72 timer viste ingen signifikant forskjell i inhibering av vekstrate i forhold til kontroll (Figur 9).



Figur 9. Algenes vekstrate for alle konsentrasjonene pluss kontroll ved 24, 48 og 72 timer (d^{-1} ; mean \pm standard error of mean, SEM) til *Raphidocelis subcapitata* exposed to elutriate fra prøvepunkt 1.

Resultatene fra algetestene fra **prøvepunkt 8** etter 24, 48 og 72 timer viste ingen signifikant forskjell i inhibering av vekstrate i forhold til kontroll (Figur 10). Her kan det observeres en liten nedgang i vekstrate for 100% konsentrasjonen etter 24 og 48 timer, men ikke etter 72 timer. Det kan også observeres en liten økning av vekstrate i noen av de intermediære konsentrasjonene (1% og 10%).

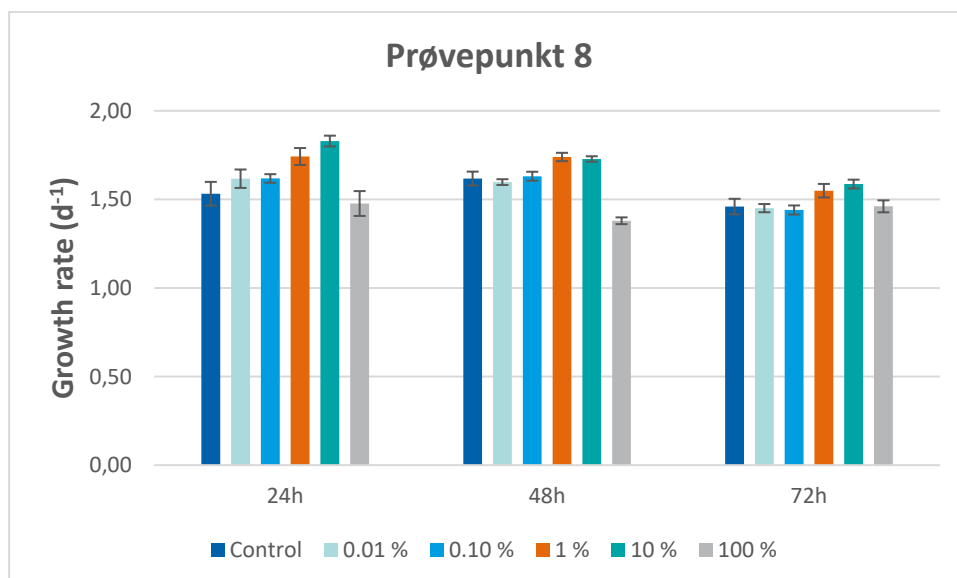


Fig.10. Algenes vekstrate for alle konsentrasjonene pluss kontroll ved 24, 48 og 72 timer (d^{-1} ; mean \pm standard error of mean, SEM) of *Raphidocelis subcapitata* exposed to elutriate of sample 8.

Se vedlegget for utfyllende detaljer om tester og resultater.

3.2.2 Dafnie test

Resultatene fra begge dafnie-testene, både for prøvepunkt 1 og 8, viste ingen observert dødelighet (tabell 3 og 4) etter 24 eller 48 timers eksponering.

Tabell 3. Tabellen viser resultatene fra testen av *Daphnia magna* ved 24 og 48 timers eksponering for elutrat fra prøvepunkt #1.

Test substans:		Elutrat fra prøvepunkt #1										
Dateo:		Start: 16/06/2020 Slutt: 18/06/2020										
Konsentra sjon (%)	24 timer (overlevelse)				48 timer (overlevelse)				24 t total overlevelse	48 t total overlevelse	24 t % immobilisering	48 t % immobilisering
	1	2	3	4	1	2	3	4	/20	/20		
Control	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	0	0
100	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	0	0
10	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	0	0
1	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	0	0
0.1	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	0	0
0.01	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	0	0

Tabell 4. Tabellen viser resultatene fra testen av *Daphnia magna* ved 24 og 48 timers eksponering for elutriat fra prøvepunkt #1.

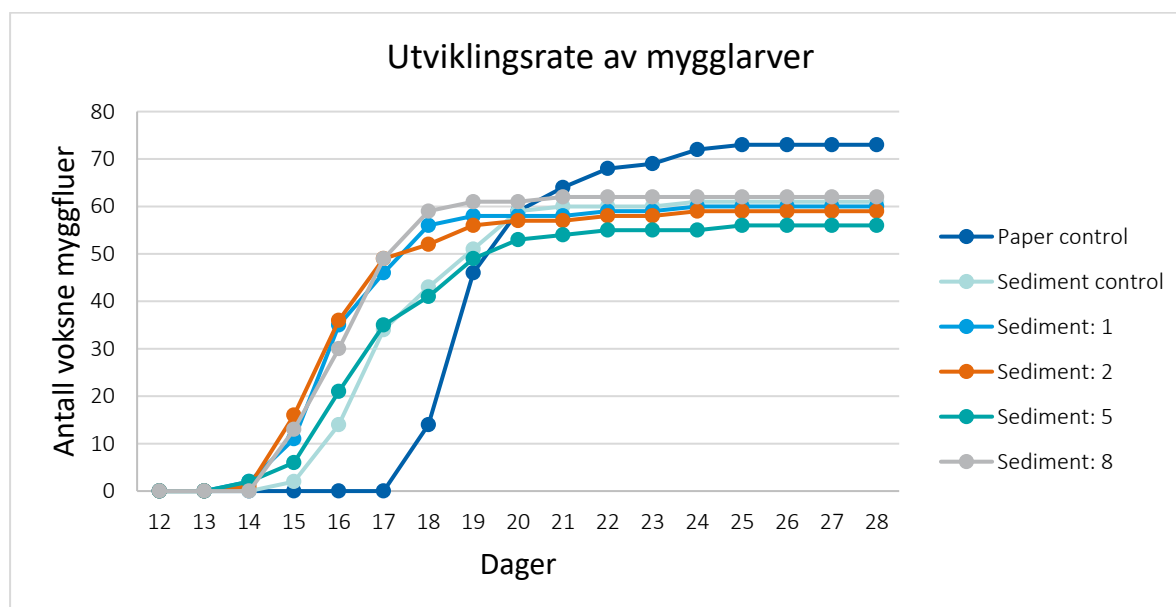
Test substans:		Elutriat fra prøvepunkt #8											
Dato:		Start: 16/06/2020 Slutt: 18/06/2020											
Konsentrasjon(%)	24 timer (overlevelse)				48 timer (overlevelse)				24 t total overlevelse	48 t total overlevelse	24 t % immobilisering	48 t % immobilisering	
	1	2	3	4	1	2	3	4	/20	/20			
Control	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	0	0	
100	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	0	0	
10	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	0	0	
1	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	0	0	
0.1	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	0	0	
0.01	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	0	0	

Siden det ikke var noen mortalitet i noen av konsentrasjonene hverken fra prøvepunkt 1 eller 8 er det ikke mulig å kalkulere EC₅₀ verdier ved bruk av statistiske metoder. Det samme gjelder for NOEC/LOEC verdier.

Se vedlegget for utfyllende detaljer om tester og resultater.

3.2.3 Fjærmygglarve test

Resultatene fra kontrollgruppene viste at gjennomsnittlig utviklingsrate var mellom 15,5 dager for sediment-kontrollen og 18 dager for papir-kontrollen (figur 11). Gjennomsnittlig utviklingsrate i alle behandlinger varierte fra 14,5 til 15,3 dager.



Figur 11. Kumulativ klekking av voksne individer fra mygglarver over tid eksponert for sediment fra prøvepunkt 1, 2, 5 og 8, papirkontroll og sediment kontroll.

Oppsummerte resultater for mygglarver (se tabell 5):

- Det er ikke observert noen effekt av eksponeringen på noen av prøvepunktene i forhold til kontroll.
- Det er observert en økning i utviklingsrate under eksponering for prøvepunkt 2 (14% økning), 8 (13,86 økning) og 5 (8,9% økning) i forhold til kontroll.
- Det er observert en endring i kjønnsratio for prøvepunkt 1 og 5 (se tabell 9 i vedlegg).

Tabell 5: Oversikt over resultater fra 28 dagers fjærmygglarve-test.

Treatment	Replicate	Time to first emergence (days)	Emergence ratio	Mean development rate (days ⁻¹)	Number of emerged animals after 28 days
pPaper control	A	18	0.85	0.0530	17
	B	18	1.00	0.0531	20
	C	18	0.95	0.0525	19
	D	18	0.85	0.0517	17
	Mean	18.0	0.91	0.0526	18.3
					Total: 73
Sediment control	A	15	0.75	0.0590	15
	B	16	0.80	0.0546	16
	C	16	0.85	0.0469	17
	D	15	0.85	0.0598	17
	Mean	15.5	0.81	0.0551	16.3
					Total: 65
Sample 1	A	14	0.90	0.0667	18
	B	16	0.35	0.0645	7
	C	16	0.85	0.0545	17
	D	15	0.95	0.0618	19
	Mean	15.3	0.76	0.0619	15.3
					Total: 61
Sample 2	A	15	0.80	0.0621	16
	B	15	0.75	0.0639	15
	C	14	0.75	0.0618	15
	D	15	0.65	0.0643	13
	Mean	14.8	0.74	0.0630	14.8
					Total: 59
Sample 5	A	14	0.65	0.0605	13
	B	15	0.70	0.0604	14
	C	15	0.65	0.0596	13
	D	14	0.80	0.0594	16
	Mean	14.5	0.70	0.0600	14.0
					Total: 56
Sample 8	A	15	0.75	0.0632	15
	B	15	0.75	0.0621	15
	C	15	1.00	0.0617	20
	D	15	0.60	0.0633	12
	Mean	15.0	0.78	0.0626	15.5
					Total: 62

Se vedlegget for utfyllende detaljer om tester og resultater.

4 Diskusjon

4.1 Plastanalyse

Det var stor variasjon i plastinnholdet i de ni prøvepunktene. I prøvepunkt 8 var så mye som 20-25 % av volumet plast mens i prøvepunkt 1 utgjorde plast 0,5 % av volumet. Noen områder av stranda får altså mer plast enn andre, den legger seg ikke likt og det øverste laget beveger seg nok noe avhengig av vær og vind.

Av 197 plastbiter som ble analysert med FT-IR var 74% PE og 21% PP (tabell 1.) Dette er to av de mest produserte plasttypene. Begge er lettere enn sjøvann slik at de flyter i havet og det kan være del av forklaringen på at disse plasttypene dominerer strandsonen. Den samme dominansen av PE og PP ble også nylig sett på strandsøppel fra Akerøya og Nordre Langåra i Oslofjorden (Bråte et al., 2019) og ved analyser av plastinfiltrede jordmasser fra maskinell rydding av Samuelskilen på Mellom-Bolæren, Færder nasjonalpark (Bråte et al. 2019). Det er verdt å merke seg at Fredagshølet var ryddet, såkalt nullstilt, seks måneder før prøvetakningen til dette studiet. Ryddingen ble gjennomført av Oslofjordens Friluftsråd og Skjærgårdstjenesten. Samtidig vil det være naturlig å anta at PE og PP har vært dominerende de foregående år på bakgrunn av resultatene og den gjennomgående dominansen av PE og PP. Hvor langt tilbake i tid dette kan antas å være akkumulert gir ikke denne studien svar på.

I en nylig litteraturgjennomgang har Zielinski m.fl. (2019) anbefalt å redusere frekvensen av mekanisk rydding på turiststrender og heller rydde manuelt for å unngå påvirkning på økosystemet. De henviser til at flere studier rapporterer at biodiversitet er mye høyere på strender som ryddes sjelden sammenlignet med strender som ryddes flere ganger ukentlig. En tilsvarende studie finnes ikke for forholdene langs norskekysten. Det foreligger heller ikke noe standardisert verktøy for å gjøre denne typen vurderinger av ulike oppryddingsalternativer.

4.2 Toksisitetstester

Resultatene fra dette studiet er i samsvar med en studie av Zimmermann m. fl. (2019) som har vist ingen-, lav- til variabel toksisitet på PE. I Zimmermann sin studie av åtte av de mest vanlige polymertypene inneholdt 74% av plastekstraktene kjemikalier som utløste en effekt (toksisitet (62%), oksidativt stress (41%), cytotoksisitet (32%), østrogenisitet (12%) og antiandrogenisitet (27 %)). Ekstrakter av polyvinylklorid (PVC) og polyuretan (PUR) induserte høyest toksisitet, mens polyetylentereftalat (PET) og high density polyetylen (HDPE) forårsaket ingen eller lav toksisitet. Toksisitetene til low density polyetylen (LDPE), polystyren (PS) og polypropylen (PP) varierte.

I vår studie var det stor variasjon i plastinnholdet i de ni prøvepunktene. Til tross for at 20-25 % av volumet ved prøvepunkt 1 var plast mens plast utgjorde kun 0,5 % av volumet i prøvepunkt 8, kunne vi ikke se høyere toksisitet i jordprøve 1 i forhold til 8. Ingen av testene viste målbar toksisk effekt i forhold til kontroll.

5 Konklusjon

Denne studien har ikke avdekket noen toksisk effekt av ekstrakter av plast fra plastinfiltrert jord på de testede organismene. På dette grunnlaget er det ikke grunn til å tro at plastinfiltrert jord utgjør fare for toksiske effekter. Dette utelukker ikke at plastinfiltrert jord kan ha negativ innvirkning på økosystemet på andre måter.

Studien har synliggjort et behov for å standardisere vurderings- og beslutningsverktøy for oppryddingstiltak.

6 Referanser

Andy M. Booth, Stephan Kubowicz, CJ Beegle-Krause, Jørgen Skancke, Tor Nordam, Eva Landsem, Mimmi Throne-Holst, Susie Jahren, 2017. Microplastic in global and Norwegian marine environments: Distributions, degradation mechanisms and transport, Miljødirektoratet rapport nummer M918, 147 sider.

<https://www.miljodirektoratet.no/globalassets/publikasjoner/M918/M918.pdf>

Inger Lise Nerland Bråte, Liv-Marit Hansen, David Eidsvoll, Nicolay Moe, Nina Tuscano Buenaventura. OSPAR-metodikk og plastanalyse av strandsjøppel fra Nordre Langåra og Akerøya. ISBN 978-82-577-7175-1. NIVA-rapport ISSN 1894-7948

Inger Lise Nerland Bråte, Liv-Marit Hansen, David Eidsvoll, Ana Catarina Almeida, Nicolay Moe. Maskinell rydding av plastinfiltrerte jordmasser fra Samuelskilen på Mellom-Bolæren, Færder nasjonalpark. ISBN 978-82-577-7179-9. NIVA-rapport ISSN 1894-7948.

John N. Hahladakis, Costas A. Velis, Roland Weber, Eleni Iacovidou, Phil Purnell. An overview of chemical additives present in plastics: Migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 344, 2018

Keely, J.E. and Engler, R.M. (1974). Dredged material research program. Miscellaneous Paper D-74-14. US, Army Engineer Waterways Experiment Station, Vicksburg, Mississippi.

Lisa Zimmermann, Georg Dierkes, Thomas A. Ternes, Carolin Völker, and Martin Wagner. Benchmarking the in Vitro Toxicity and Chemical Composition of Plastic Consumer Products. *Environmental Science & Technology* 2019 53 (19), 11467-11477. DOI: 10.1021/acs.est.9b02293

M. Davoren, S. N. Shuilleabháin, J. O'Halloran, M. Hartl, D. Sheehan, N. O'brien, et al., 2005. A test battery approach for the ecotoxicological evaluation of estuarine sediments. *Ecotoxicology* Vol. 14 Issue 7 Pages 741-755

OECD 202 (2004) OECD guideline for testing of chemicals. *Daphnia* sp., Acute Immobilisation test. Adopted 13 April 2004.

OECD 218 (2004) OECD guideline for testing of chemicals. Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment. Adopted 13 April 2004.

Prata, J. C., da Costa, J. P., Lopes, I., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (2019). Effects of microplastics on microalgae populations: A critical review. *Science of The Total Environment*, 665, 400–405.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.132>

Persoone, R. Baudo, M. Cotman, C. Blaise, K. C. Thompson, et al.. Review on the acute *Daphnia magna* toxicity test - Evaluation of the sensitivity and the precision of assays performed with organisms from laboratory cultures or hatched from dormant eggs. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, EDP sciences/ONEMA, 2009, 393, 29 p. 10.1051/kmae/2009012 . hal-00861151

USEPA. (1977). Dredged material sample collection and preparation. Appendix B. In *Ecological evaluation of proposed discharge of dredged material into ocean waters* (Vicksburg Mississippi

Environmental Protection Agency/Corps of Engineers Technical Committee for Dredged and Fill Material. Environmental Effects Laboratory U.S. Army Engineer Waterways Experiment Station).

Vannundersøkelse Prøving av hemming av algevekst i ferskvann med encellede grønnalger (ISO 8692:2012)

Zielinski S, Botero CM, Yanes A. To clean or not to clean? A critical review of beach cleaning methods and impacts. *Mar. Pollut. Bull.* 2019;139:390–401. doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.12.027.

Vedlegg A. Materialer og metoder

Algal test of *Raphidocelis subcapitata*

Elutriate extraction

Elutriate extracts were prepared with modifications from the Standard Elutriate Test (Keely and Engler, 1974; USEPA, 1977; Davoren, 2005). 2 samples were chosen, number 1 and number 8, in order to have one nearest (8) and furthest (1) from the beach. For each sample, an algal test was done. 400 ml of ISO 8692 media was added to 100 g sub-sample of sediment in a 1:4 (w/v) ratio, based on sediment dry weight. The slurry was shaken at 200 rpm for 1.5 h and then centrifuged at 1200xg for 30 min at 4°C (Appendix I – figures of the elutriated samples after centrifugation).

Supernatant was collected as elutriate and salinity and pH were measured following filtration through a 0.2 µm filter.

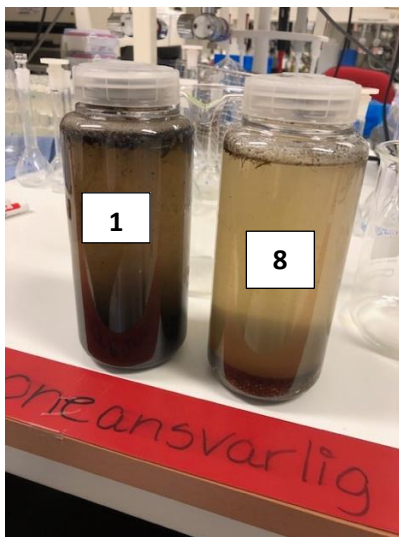


Figure 1: Elutriate of sample 1 and 8

Two algal tests were performed with *Raphidocelis subcapitata* (previously named as *Pseudokirchneriella subcapitata*) according to ISO 8692. A range finding concentration test was used for both tests: 0.01%, 0.1%, 1%, 10% and 100%. The algal growth rate was analysed after 24, 48- and 72-hours exposure. Data is expressed as growth rate (d^{-1} ; mean \pm standard error of mean, SEM).

The average specific growth rate from start to finish is calculated with the formula:

$$\mu = \frac{\ln(n_s) - \ln(n_0)}{t_s} \times 24 \text{ days}^{-1}$$

where:

n_0 = cell density at the start

n_s = cell density at the end

t_s = number of hours to test end

Table 1. Growth rate (d^{-1} ; mean \pm standard error of mean, SEM) of *Raphidocelis subcapitata* exposed to elutriate of sample 1.

	24h		48h		72h	
	Average	SD	Average	SD	Average	SD
Control	1.532	0.067	1.618	0.039	1.459	0.044
0.01 %	1.594	0.045	1.648	0.006	1.509	0.032
0.10 %	1.600	0.051	1.681	0.021	1.485	0.035
1 %	1.648	0.034	1.709	0.023	1.556	0.014
10 %	1.696	0.030	1.639	0.021	1.588	0.034
100 %	1.606	0.044	1.631	0.017	1.559	0.042

Regarding the physico-chemical data (Table 2), pH for the 100% elutriate was slightly lower when compared to the other tested concentrations. No salinity was observed.

Table 2. Physico-chemical data of algal growth inhibition test with *Raphidocelis subcapitata* exposed to elutriate of sample 1. Both pH and salinity were measured and the start and end of the test.

	Start		End	
	pH	Salinity	pH	Salinity
Control	7.864	-	7.12	-
0.01 %	7.998	-	7.37	-
0.10 %	8.000	-	7.374	-
1 %	7.943	-	7.304	-
10 %	8.061	-	7.319	-
100 %	7.188	-	6.372	-

Table 3. Growth rate (d^{-1} ; mean \pm standard error of mean, SEM) of *Raphidocelis subcapitata* exposed to elutriate of sample 8.

	24h		48h		72h	
	Average	SD	Average	SD	Average	SD
Control	1.532	0.067	1.618	0.039	1.459	0.044
0.01 %	1.617	0.052	1.598	0.016	1.451	0.023
0.10 %	1.618	0.024	1.631	0.025	1.440	0.026
1 %	1.742	0.048	1.739	0.024	1.549	0.038
10 %	1.829	0.030	1.728	0.016	1.586	0.025
100 %	1.477	0.070	1.379	0.019	1.461	0.034

Regarding the physico-chemical data (Table 4), pH was slightly higher for the 100% elutriate. No salinity was observed.

Table 4. Physico-chemical data of algal growth inhibition test with *Raphidocelis subcapitata* exposed to elutriate of sample 1. Both pH and salinity were measured and the start and end of the test.

	Start		End	
	pH	Salinity	pH	Salinity
Control	7.864	-	7.12	-
0.01 %	7.894	-	7.351	-
0.10 %	8.051	-	7.16	-
1 %	8.109	-	7.218	-
10 %	8.053	-	7.389	-
100 %	8.502	-	8.224	-

***Daphnia magna* test**

Elutriate extracts were prepared from samples 1 and 8, similarly to the microalgae testing, with minor modifications. A slurry containing 200g of each sediment sample added to 800 mL of Isklar bottled water (1:4 w/v ratio d.w.) was shaken at 200 rpm for 1.5 h. Samples were then centrifuged at 1200xg for 30 min at 4°C and the resulting supernatant (elutriate) filtered with a 0.2 µm filter.

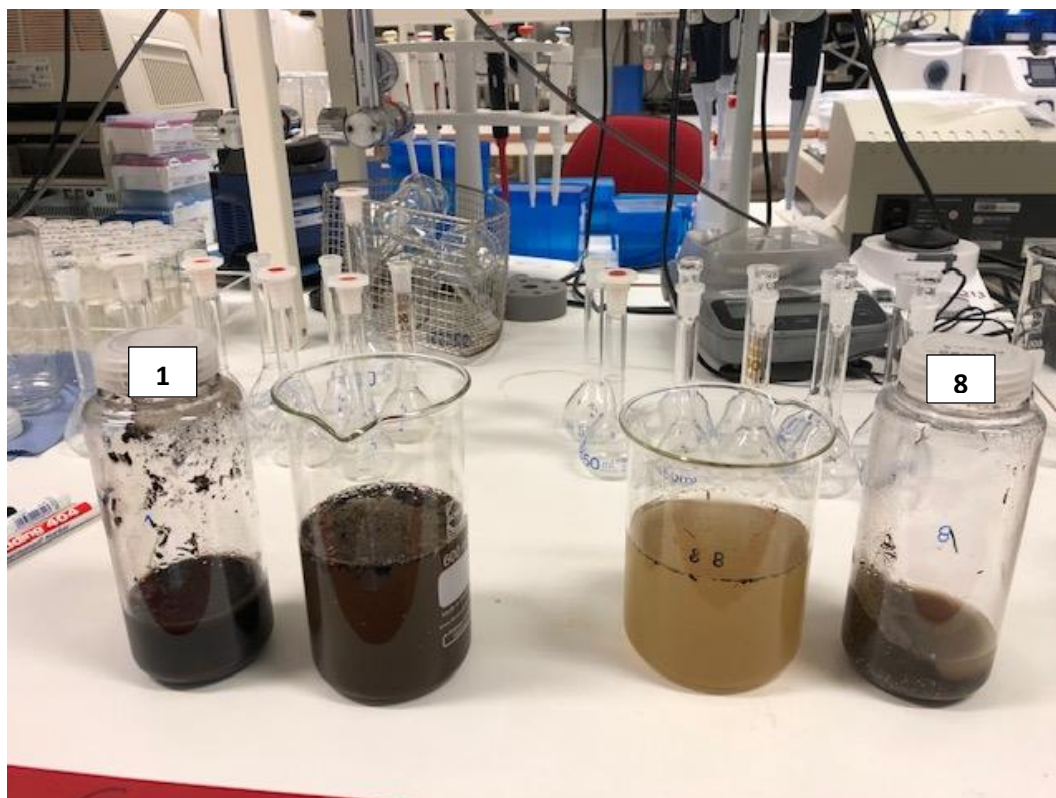


Figure 2: Elutriates of samples 1 and 8

48-hour acute test

Daphnia magna acute tests were performed according to the OECD 202 guidelines (OECD, 2004). Twenty organisms, divided into four replicate vessels, each containing five *D. magna*, were employed for the control and each concentration tested. Exposures were performed in glass beakers filled with approximately 50 ml of test medium (Isklar water) and the filtered elutriates at the following concentration range: 100%, 10%, 1%, 0.1% and 0.01%. *D. magna* neonates with less than 24 h were used to initiate the test. After 24 h and 48 h of the beginning of the test, daphnids were observed for immobilisation and the number of organisms immobilised was recorded. Organisms that did not move following gentle agitation of the test beakers were considered immobile. The exposure beakers were placed in a climate controlled room (20 ± 2 °C) with a photoperiod providing 16 hours light: 8 hours dark. Daphnids were not fed during the exposure period. pH, dissolved oxygen, temperature and salinity were measured at the beginning and end of the test in the control and all elutriate concentrations tested.

Table 5. Summary of EC₅₀, NOECs and LOECs obtained for *Daphnia magna* after 24 and 48 hours exposure to the elutriate samples.

Test substance	Elutriate sediment #1		Elutriate sediment #8	
	Concentration (%)	95% Confidence intervals	Concentration (%)	95% Confidence intervals
24 h LC ₅₀	> 100	NA	> 100	NA
24 h LOEC	> 100	NA	> 100	NA
24 h NOEC	≥ 100	NA	≥ 100	NA
48 h LC ₅₀	> 100	NA	> 100	NA
48 h LOEC	> 100	NA	> 100	NA
48 h NOEC	≥ 100	NA	≥ 100	NA

Where:

EC₅₀: Nominal and measured concentrations that results in 50 % mortality.

LOEC: Lowest observed effect concentration based on nominal and measured concentrations.

NOEC: No observed effect concentration based on nominal and measured concentrations.

NA: Not applicable

On Table 6 and 7 are the physical parameters recorded at the start and end of the test for the control and all concentrations tested for elutriates from sediments #1 and #8. No salinity was measured in any of the samples. No significant alterations in pH and DO were recorded between the Isklar water control and the elutriate samples at the concentrations tested.

Table 6. pH, dissolved oxygen (DO) and temperature at the start and end of the test for elutriate sample collected from sediment #1.

Test substance:	Elutriate from sediment #1					
Date:	Start: 16/06/2020 End: 18/06/2020					
Concentration (%)	pH		DO (mg/L)		Temperature (°C)*	
	Start	End	Start	End	Start	End
Control	7.440	7.563	8.66	8.68	Max	Max
100	6.578	7.166	8.52	8.62	22.0	22.3
10	7.420	7.563	8.70	8.67		
1	7.543	7.601	8.68	8.75	Min	Min
0.1	7.566	7.631	8.68	8.74	19.6	19.6
0.01	7.581	7.661	8.69	8.72		

* Measurement taken from max/min thermometer probe in separate liquid vessel correction factor -0.7°C at 20°C.

Table 7. pH, dissolved oxygen (DO) and temperature at the start and end of the test for the elutriate sample collected from sediment #8.

Test substance:	Elutriate from sediment #8					
Date:	Start: 16/06/2020 End: 18/06/2020					
Concentration (%)	pH		DO (mg/L)		Temperature (°C)*	
	Start	End	Start	End	Start	End
Control	7.440	7.563	8.66	8.68	Max	Max
100	8.228	7.953	8.63	8.36	22.0	22.3
10	7.570	7.602	8.66	8.53		
1	7.520	7.583	8.66	8.61	Min	Min
0.1	7.484	7.612	8.65	8.71	19.6	19.6
0.01	7.438	7.524	8.64	8.72		

* Measurement taken from max/min thermometer probe in separate liquid vessel correction factor -0.7°C at 20°C.

Prolonged exposure of *Chironomus riparius*

The effects of the prolonged exposure of sediment samples (1, 2, 5 and 8) to the sediment-dwelling larvae of the freshwater dipteran *Chironomus riparius* were assessed. The measured endpoints are the total number of adults emerged, the time to emergence, emergence ratio, developmental rate and sex ratio. The test was performed according to the OECD test guideline 218.

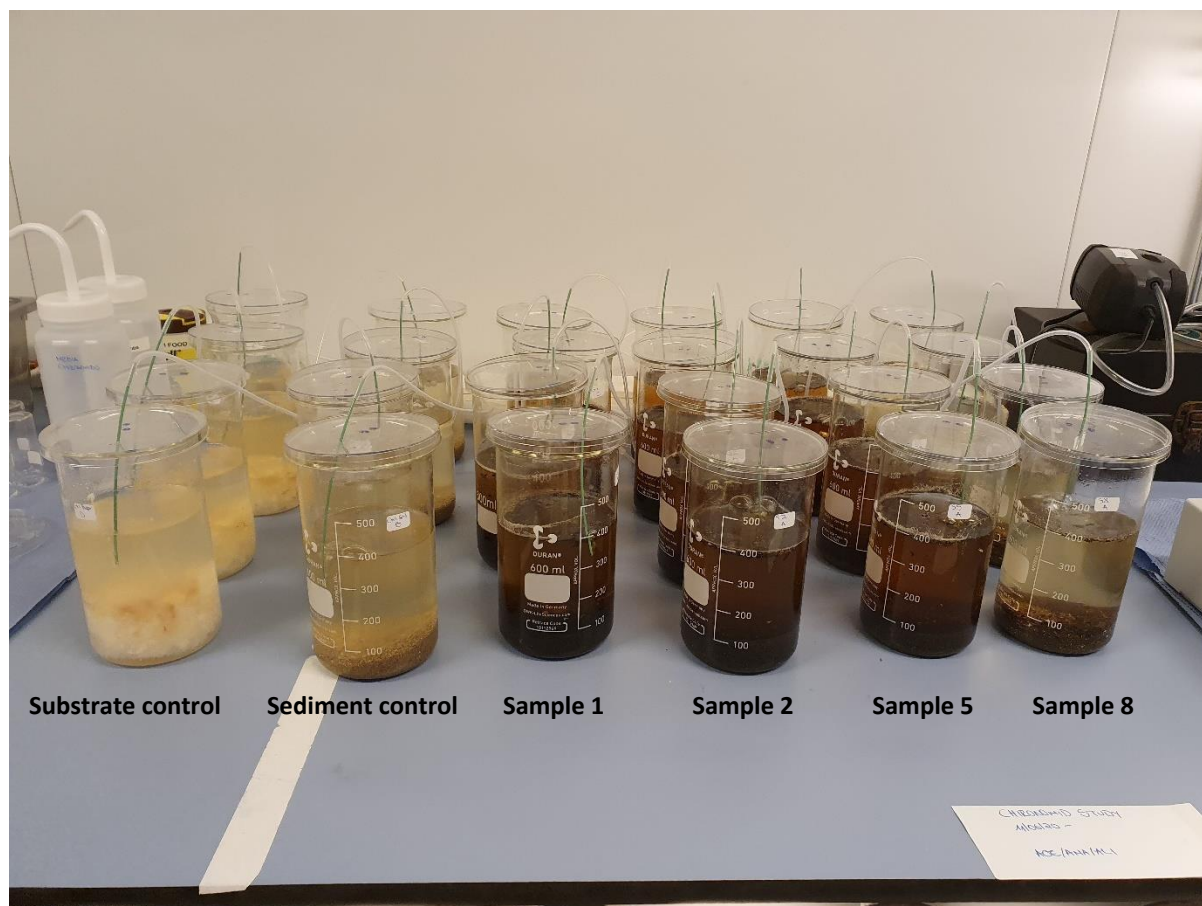


Figure 3 Experimental set up of Chironomid exposure.

Test sediments and controls

The sediment samples 1, 2, 5 and 8 (100% concentration, one concentration) were tested. They were stored at -20 °C upon arrival and defrost overnight prior to use. Two different types of controls were used, a sediment/sand control (sediment obtained from Topsy Baits BV, NL) and a substrate control (paper substrate) that is used for the *C. riparius* continuous laboratory cultures. The test vessels were 600 ml glass beakers. The vessels were fitted with lids, acting as traps to retain emerged adults, consisting of fitting petri dish lids with holes for ventilation. The nominal dry weight of sediment in each replicate vessel was 100 g, providing an initial sediment depth of approximately 2 cm. Overlying water was provided to a depth of approximately 8 cm (a volume of 400 ml), to give a sediment to water depth ratio of 1:4. Aeration, supplied by a capillary tube positioned to minimise disturbance of the sediment, was provided to each vessel (Appendix II).

The test system was maintained at 20 ± 2 by housing the test vessels in a temperature-controlled room. The photoperiod was controlled to provide 16 hours light:8 hours dark.

Experimental design and 28-day Chironomid toxicity test

Figure 3: Four test replicate vessels (nominated as A to D) were employed for each of the controls and test samples, each containing a nominal 20 larvae. The test system was allowed to stabilise and equilibrate at the test temperature of 20 ± 2 °C for a total of 2 days before starting the test exposure. Gentle aeration (as to be

employed during the animal exposure) was provided during the stabilisation period, after a settlement period of approximately 24 hours.

At the start of the test, a nominal 20 larvae, < 48 hours post hatch, were randomly allocated to each test replicate vessel. Test replicate vessels were visually assessed a minimum of 3 times per week, throughout the exposure period. Adults that emerged were counted daily, sexed by visual observation, and removed. The overlying water was not renewed during the test, but volumes removed for dissolved oxygen and pH determinations after the start of the test were replaced with fresh medium. Any evaporative losses were replaced during the study with distilled water. The test exposure duration was 28 days. The test organisms were fed once daily, with finely ground TetraMin® Tropical Fish Flakes, prepared as a suspension in reverse-osmosis water.

The pH and dissolved oxygen (DO) concentration of the dilution water were measured prior to addition to the sediment (Day -2). On Day 0, the pH and DO concentration of samples from one replicate of each treatment were determined and once per week thereafter. The temperature of the room was measured by thermometer at least once per week. The light intensity readings were taken in a central position, at overlying water surface level, on exposure Day 28.

Samples for total organic carbon (TOC) measurements we kept for all sediment samples and control, samples of overlying water at the end of test were also kept for water hardness and ammonia measurements. These samples are not yet analyzed.

Table 8. Overview of time to first emergence, emergence ratio, mean developmental rate, and number of emerged animals after 28 days of exposure to sediment samples 1, 2, 5 and 8.

Treatment	Replicate	Time to first emergence (days)	Emergence ratio	Mean development rate (days ⁻¹)	Number of emerged animals after 28 days
Paper control	A	18	0.85	0.0530	17
	B	18	1.00	0.0531	20
	C	18	0.95	0.0525	19
	D	18	0.85	0.0517	17
	Mean	18.0	0.91	0.0526	18.3
					Total: 73
Sediment control	A	15	0.75	0.0590	15
	B	16	0.80	0.0546	16
	C	16	0.85	0.0469	17
	D	15	0.85	0.0598	17
	Mean	15.5	0.81	0.0551	16.3
					Total: 65
Sample 1	A	14	0.90	0.0667	18
	B	16	0.35	0.0645	7
	C	16	0.85	0.0545	17
	D	15	0.95	0.0618	19
	Mean	15.3	0.76	0.0619	15.3
					Total: 61
Sample 2	A	15	0.80	0.0621	16
	B	15	0.75	0.0639	15
	C	14	0.75	0.0618	15
	D	15	0.65	0.0643	13
	Mean	14.8	0.74	0.0630	14.8
					Total: 59
Sample 5	A	14	0.65	0.0605	13
	B	15	0.70	0.0604	14
	C	15	0.65	0.0596	13
	D	14	0.80	0.0594	16
	Mean	14.5	0.70	0.0600	14.0
					Total: 56
Sample 8	A	15	0.75	0.0632	15
	B	15	0.75	0.0621	15
	C	15	1.00	0.0617	20
	D	15	0.60	0.0633	12
	Mean	15.0	0.78	0.0626	15.5
					Total 62

Values displayed in bold are significant at the level $\alpha=0.05$

An increase in the presence of adult males upon treatment to sediment sample 1 (61.5% males) was observed while a decrease in the presence of males (35.5% males) was found in the case of sediment sample 5, which was

statistically significant compared to sediment control (Table 9). No statistically significant differences were seen in the case of sediment sample 2 and 8.

Table 9. Sex ratio data obtained for emerged organisms

Treatment	Sex ratio (%)	
	Male (%)	Female (%)
Paper control	63.3	36.7
Sediment control	44.7	55.3
Sample 1	61.5	38.5
Sample 2	42.4	57.6
Sample 5	35.5	64.5
Sample 8	48.5	51.5

Values displayed in bold are significant at the level $\alpha=0.05$

The pH in controls ranged from 7.05 to 8.86 which is within the validity criteria (pH 6-9) (Table 10). A decrease in pH over time was observed for samples 1 and 2 with values ranging between 5.69 to 8.04.

The DO values were within the validity criteria for all treatments except for the paper control where low values were measured on day 28 (2.74-4.33), however this does not affect the results as most animals emerged before day 21.

The temperature and light intensity during the test duration ranged from 19.6 to 21.4 and from 546 to 610 lux, respectively.

Table 10. Overview of physicochemical parameters measured during the exposure period.

	DO (mg/L)							
	0	7d	14d	21d	28d (all replicates)			
Sediment control	8.81	8.86	7.82	8.65	8.69	8.03	8.79	8.73
Paper control	8.8	7.42	5.91	8.41	2.74	2.87	2.95	4.33
Sample 1	8.77	8.71	7.9	8.88	8.87	8.72	8.91	9.06
Sample 2	8.89	8.93	8.2	8.93	8.28	9.09	8.99	9.08
Sample 5	8.92	8.95	8.24	9.02	8.31	8.63	9.08	8.9
Sample 8	8.78	8.8	8.32	8.75	8.91	9.14	8.82	8.55

	pH							
	0	7d	14d	21d	28d (all replicates)			
Sediment control	8.4	7.55	8.62	8.7	8.65	8.5	8.7	8.65
Paper control	8.025	7.55	7.48	8.1	7.08	7.15	7.24	7.45
Sample 1	7.43	7.74	8.04	6.99	7.76	7.13	6.82	5.91
Sample 2	7.24	7.64	7.99	6.33	6.9	5.95	5.94	5.69
Sample 5	7.88	8.07	8.09	7.53	7.4	7.44	7.26	7.43
Sample 8	8.52	8.58	8.43	8.53	8.58	8.56	8.54	8.45

Temperature	N.D.	21.4	21	19.6 - 20.8	19.8 - 20.5			
light intensity (lux)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	546 - 610			
TOC	N.A.	-						
alkalinity	-				N.A.			
ammonia	-				N.A.			

N.D.: not determined

N.A: not analysed yet, to be decided if the analyses will be performed based on budget, quote requested (prøvemottak).

NIVA: Norges ledende kompetansesenter på vannmiljø

NIVA gir offentlig vannforvaltning, næringsliv og allmennheten grunnlag for god vannforvaltning gjennom oppdragsbasert forsknings-, utrednings- og utviklingsarbeid. NIVA kjennetegnes ved stor faglig bredde og godt kontaktnett til fagmiljøer i inn- og utland. Faglig tyngde, tverrfaglig arbeidsform og en helhetlig tilnæringsmåte er vårt grunnlag for å være en god rådgiver for forvaltning og samfunnsliv.



Norsk institutt for vannforskning

Gaustadalléen 21 • 0349 Oslo
Telefon: 02348 • Faks: 22 18 52 00
www.niva.no • post@niva.no