

Testing av toksisiteten av marine
sediment med fjæremark,
Arenicola marina

Masteroppgave

Eivind Bøe

Forord

Denne oppgaven ble utført ved biologisk institutt ved universitetet i Oslo og ved Norsk institutt for vannforskning (NIVA). Arbeidet er veiledet av professor Ketil Hylland (NIVA og universitetet i Oslo) og amanuensis Thorvin Andersen (Universitetet i Oslo). Jeg vil rette en stor takk til dem.

Jeg vil også takke for et meget godt samarbeid med NIVAs forskingsstasjon på Solbergstrand. Uten deres praktiske hjelp under forsøket ville det hele godt meget tregt. Så takk Oddbjørn Pettersen, Sigurd Arne Øxnevad og Per Ivar Johannessen. Stor takk også til Anders Ruus for sin vilje til å dele erfaringer og kunnskap og Åse K. Gudmundson Rogne for sin pedagogiskriktige framgangsmåte i metodeopplæringen.

Jeg vil også rette en stor takk til min nyervervede datter, Ylva, som kom som et skudd inn i min tilværelse under siste hovedfagssemester. Du har gitt meg lite søvn, men bidratt til å holde mitt humør oppe i de travle ukene før innlevering.

Til alle medstudenter under studietiden: Takk for 5 supre år på Blindern.

Oslo, desember 2005

Eivind Bøe

Sammendrag

Sediment har gjennom antropogen kontaminering blitt sterkt påvirket og i flere havneområder er det sterkt forurenset. Forurenset havbunn vil påvirke livet som lever i og over den. Finnes det gode alternativer til å teste toksisiteten av marint sediment? Man er ute etter en enklere metode som kan kvantifisere toksisiteten til disse sedimentene. Det har lenge vært i bruk ulike bioakkumuleringsforsøk for å se på biotilgjengeligheten og akkumuleringen, men disse sier lite om individets respons. Ved å trekke inn flere endepunkter i disse testene vil en kunne få et bedre helhetsbilde av sedimentets tilstand og få mer nøyaktig bilde av responsen.

Målet med arbeidet var å etablere metoder for testing av toksisiteten av marine sediment, med ulike endepunkter - mortalitet, fødeinntak, nedgravningsevne og biomarkører. Forskjellige arter vil reagere ulikt på de samme effektene, *Arenicola marina* har vist seg i tidligere forsøk å reagere på oksidativ stress og fødeinntaket kan bli redusert i hydrokarbonholdig sediment. Metabolisme av PAH er også bevist. Glutathion reduktase ble brukt som en biomarkør for oksidativ stress forårsaket av PAH og PCB. De ulike metallene vil kunne gi en økt indusering av cysteine-rike proteiner (metallotionein). De ulike biomarkørene ble valgt ut grunnet funn av PAH, PCB og ulike metaller i sedimentet. Hersediment testen ble utført på NIVAs forskingsstasjon i Drøbak. Det eksponerte sedimentet var fra Tromsø havn og kontroll sediment fra Rambergbukta, som ligger på vestsiden av Jeløya i Oslofjorden. Testen gikk over 10 dager.

Det var klare effekter av miljøgifter i sediment på fødeinntak og nedgravings evne hos fjæremark. Sedimentets partikkelsammensetning og innholdet av løst organisk materiale påvirket også disse effektene. Noen av sedimentene ga økt dødelighet, men det var stor variabilitet mellom test akvariene. Det ble også observert dødelighet i kontroll sedimentet. Biomarkør-resultatene viste også stor variabilitet mellom individene, men det var forskjeller som tilsynelatende kunne tilskrives miljøgift-belastning. Det viste seg at eksponeringsperioden ble under gyteperioden for fjæremark (oktober-november), noe som vil ha påvirket resultatene.

Innholdsfortegnelse

1. Innledning	6
2. Material og metoder	11
2.1 Organismer	11
2.1.1 <i>Arenicola marina</i>	11
2.1.2 <i>Corophium volutator</i>	12
2.2 Sediment	12
2.2.1 <i>Kontrollsediment</i>	12
2.2.2 <i>Sedimentkarakterisering</i>	14
2.3 Tromsø havn	15
2.4 Arendal/Kristiansand	17
2.5 Hersedimenttest	17
2.5.1 <i>Arenicola marina</i>	17
2.5.2 <i>Corophium volutator</i>	18
2.6 Fødeinntak (fødeinntak rate)	18
2.7 Dødelighet	19
2.8 Disseksjon og opparbeiding	19
2.8.1 <i>Disseksjon og coelomvæske</i>	19
2.8.2 <i>Opparbeiding</i>	19
2.9 Biokjemiske analyser	20
2.9.1 <i>Protein</i>	20
2.9.2 <i>Glutathion reduktase</i>	20
2.9.3 <i>Metallotionein</i>	21
2.10 Kvalitetskontroll	22
2.10.1 <i>Metallotionein</i>	22
2.10.2 <i>Glutathion reduktase</i>	22
2.11 Statistiske analyser	22
3. Resultater	24
3.1 Adferd og dødelighet	24

3.1.1 <i>Arenicola marina</i>	24
3.1.2 <i>Corophium volutator</i>	26
3.2. Fødeinntak hos fjæremark.....	28
3.3 Biomarkører	31
3.3.1 <i>Glutathion reductase</i>	31
3.3.2 <i>Metallothionein</i>	35
3.4 Sammenhenger mellom ulike responser	36
3.4.1 <i>Fødeinntak mot død</i>	37
3.4.2 <i>Sammenhenger mellom GR aktivitet i ulike vev</i>	37
3.4.3 <i>Sammenhenger mellom effekter og miljøgifter eller miljøfaktorer</i>	38
4. Diskusjon.....	46
4.1 <i>Adferd og dødelighet</i>	46
4.2 <i>Subletale responser</i>	49
4.2.1 <i>Effekter av PAH og PCB på GR aktivitet</i>	49
4.2.2 <i>Effekter av metaller</i>	50
4.3 <i>Samvariasjon</i>	51
4.4 <i>Responser i forhold til miljøgift-nivå i sediment</i>	52
4.5 <i>Økologiske konsekvenser og konsekvenser for risikovurdering av sediment</i>	54
4.5.1 <i>Økologiske konsekvenser</i>	54
4.5.2 <i>Konsekvenser for risikovurdering av sediment</i>	54
5. Konklusjoner	58
6. Referanser	59

1. Innledning

Antropogene utslipp har helt siden den industrielle revolusjon tilført nye og skadelige stoffer til naturen. Både luft, vann, jord og sediment har fått en økt tilførsel av giftstoffer fra ulike kilder. Forbrenningsprosesser, metallindustri, bruk av pesticider, matproduksjon, legemidler og avfallshåndtering er noen av dem. De fleste av disse utslippene ender opp i havet, hvor mye av det blir lagret i sedimentet som et resultat av geokjemiske og fysiske prosesser. Her blir stoffene oppkonsentrert og kan nå konsentrasjoner som kan være skadelige for de ulike organismene som lever i sedimentet og i vannet over.

Havnebassenger er spesielt utsatt, grunnet mye industri, stor båttrafikk, snødumping, avrenning fra elver og andre punktkilder. Aktiviteter som skipsfart, mudring, utfylling og dumping, medfører oppvirvling og omrøring av sedimentene i havneområder. Derfor er havneområder spesielt utsatt for resuspensjon av miljøgifter som finnes i bunnsedimentene. I tillegg forårsaker sjødyr på og i bunnsedimentene omrøring. Dermed hjelper det lite at nytilførte partikler eventuelt er renere enn det materialet som er der fra før. På grunn av oppvirvling og omrøring vil tidligere tiders forurensninger stadig være tilgjengelige, noe som gjør det vanskelig å få "friskmeldt" forurensede områder. Det kan derfor være nødvendig med tiltak som kan forbedre miljøtilstanden i forurensede havneområder. Ulike havner i Norge blir i dag undersøkt for hvor påvirket de er av antropogene utslipp. Tromsø havn er en av de første havnene som har blitt grundig undersøkt. Sedimentets tilstand blir undersøkt både ved å bestemme konsentrasjonen av ulike stoffer og ved å undersøke de biologiske effektene av disse.

Man er opptatt av å finne ut hvor skadelig disse konsentrasjonene er for infauna. Infauna er arter som lever i substrater, oftest brukt i sammenheng med bløtbunns organismer. Undersøkelser på bunnlevende organismer er viktige fordi de befinner seg nederst i næringskjeden. Disse artene er matpreferanser for predatorer, som fisk og fugl. Noen av disse stoffene kan være giftige for individet selv ved lave konsentrasjoner eller de kan oppkonsentreres i organismene til skadelige konsentrasjoner. Hvis stoffene også er persistente, kalles de med en fellesbetegnelse for miljøgifter (SFT 2003). Mange av stoffene har også evnen til å bli med videre opp i

næringskjeden og bli biomagnifisert til skadelige nivåer. Siden fisk er en matressurs for mennesker vil også faren for human eksponering for disse stoffene utgjøre en trussel.

In vivo testing av sediment er tidkrevende og reproducerbarheten og resultatene blir ikke gode nok. Vanlig prosedyre er å samle inn sedimentprøver fra havnen og teste toksisitet under kontrollerte betingelser. Slike helsediment-tester kan ha ulike endepunkter som død, forskjellige adferdsmønstre og ulike biomarkører. Organismene som benyttes må ha vid utbredelse, stor forekomst, være relativt stasjonære, ta opp miljøgifter og kunne leve i forurensede miljøer. Dette vil si at organismen skal representere området den kommer fra og at den er lett tilgjengelig. En slik organisme kalles for en indikatorart (Stich 1976; Goksøyr 1996). Organismene som ble brukt i denne oppgaven var flerbørstemarken *Arenicola marina* og krepsdyret *Corophium volutator* som begge er vanlige arter i store deler av nord Europa. *Arenicola marina* ble kjøpt fra England. Det er en vanlig art å bruke i sedimenttester i Europa (Pocklington 1992; Bat 1998). Den er både lett å skaffe og holde i akvarier, i tillegg er den relativt robust.

Arenicola marina har vist i tidligere forsøk at den tar opp og akkumulerer miljøgifter og i noen grad metaboliserer disse (Kaag 1998; Christensen 2002). Av toksiske stoffer som ble funnet i havnebassenget i Tromsø var det de ulike PAHene, PCBene og metallene som var av særlig interesse. Vi regnet med at disse ville gjøre utslag på de ulike endepunktene.

PAH stammer fra forbrenningsprosesser og ulike naturlige oljeprodukter. Noen av dem er persistente, toksiske og karsinogene. På grunn av hydrofob karakter vil PAHer som oftest bli akkumulert i sediment (Neff 1985). I infauna, som både har sin livssyklus og sine matpreferanser i sedimentet, kan eksponeringen gjennom porevannet og gjennom fødeinntaket bli særs høy (Landrum 1989). PAHer har vist seg å påvirke antioksidantforsvaret i ulike evertebrater.

PCB er en av de andre giftstoffene som ble funnet i Tromsø havn. Disse stoffene har blitt produsert siden 1930. Stoffet ble hovedsakelig produsert i perioden fra 2. verdenskrig til 1975, i en mengde på ca 1200000 tonn (Bjerregaard 2000). PCBs virkning på organismer er mange og kompliserte: Immuntoksiske effekter, hudskader, leverskader, karsinogenisitet samt østrogen- og antiøstrogene effekter er påvist. Bioakkumulering av PCB i bentiske evertebrater utgjør en

potensiell risiko for biomagnifisering til høyere trofiske nivåer, hvor især toppredatorene i næringskjeden utsettes for de største konsentrasjonene. Dette grunnet dens hydrofobe karakter. Evertebratene utgjør det første ledd i PCBs vei til opphopning i de øverste trofiske ledd i næringskjeden. PCB-opptak i levende organismer bestemmes av kongenernes høye lipofilisitet, og opptaket er passivt. PCB-kongenere med høyt klorinnhold tas opp langsommere enn isomerer med færre kloratomer. Forskjellige strategier for fødeopptak har vist seg å bety mye for organismens PCB-akkumulering. I et studie av Kaag (1998) ble børstemarken *Arenicola marina* og blåmuslingen *Mytilus edulis* utsatt for forskjellige konsentrasjoner av PCB-kontaminert sediment. Dette eksperiment viste at akkumulert PCB i den sedimentspisende *A. marina* var positivt korrelert med PCB-mengden i sedimentet. Det kunne ikke påvises en sammenheng for den filtrerende *M. edulis*, som hadde samme PCB-nivå uavhengig av PCB-innhold i sedimentet. Sedimentpartikler er altså en viktig opptaksvei for lipofile fremmestoffer som PCB i det akvatiske miljø. PCB har vist seg å gi utslag på biomarkøren glutation reduktase aktiviteten i rotte (Kamohara 1984), men det ble ikke funnet noen sammenheng hos muslingen *Perna viridis* (Cheung 2002).

Metaller fra antropogene kilder ankommer havet via elver og bunnfall, atmosfærisk nedfall, dumping, marin boring, graving og fra skip (Luoma 1981). Som nevnt over vil havneområder være spesielt utsatt pga, mye industri og stor båttrafikk. Det er fire hovedkategorier til opptak av tungmetaller hos infauna. Opptak av løste metaller i det overliggende vannet eller i porevannet, eller en blanding av disse. Inntatte partikler fra det overliggende vannet, overflate eller de dypere sedimentene. Partikler inntatt ved pinocytose over kroppsveggen og opptak av absorberte metaller fra direkte kontakt med partikler. For tungmetaller vil ofte konsentrasjonen i sedimentet vanligvis ligge over konsentrasjonen i det overliggende vannet. Tilgjengelige metaller i porevannet og sammensetningen av disse vil være forskjellige fra det overliggende vannet. I et typisk havneområde vil topplaget i sedimentet være oksidert, mens de dypere redusert. Når materiale blir begravd vil reduksjonen av Fe og Mn oksidering føre til utlekking og frigivelse av de assosierte tungmetallene (Bryan 1985). Red-oks reaksjoner og nedbryting av organisk materiale vil også få metaller som kobber og kadmium til å lekke fra sedimentet (Gerringa 1991), i tillegg vil oksygengradienten påvirke tilgjengeligheten. Det er vist at Cd og Zn opptaket til sedimentet er relatert til partikkelstørrelse; jo mer små partikler og organisk materiale det er i

sedimentet, jo mer vil bli absorbert. Det er også vist at opptaket og toksisiteten av kobber vil øke ved lavere salinitet, da den vil utkonkurrere med Ca og Mg opptakssteder (Wright 1987). Kalsium og Mg vil også konkurrere med kobber om binding steder i organiske ligander (Turner 1987). Ved en økning av saliniteten vil det bli en reduksjon av ledige bindingsteder for kobber, men med en økt konsentrasjon av de frie ionene.

Kadmium er en anerkjent skadelig miljøgift og det har blitt funnet i relativt høye konsentrasjoner i Tromsø havn, og siden 1974 har det vært nektet utslipp av EEC. Selv om det ikke er vist noen positive biologiske effekter av stoffet, har det blitt vist at flere marine evertebrater har lagret det til meget høye konsentrasjoner uten noen negativ innvirkning (Pringle 1968). Hvorfor dette skjer, er fremdeles uvisst, men det er flere teorier om at metallotionein (MT) eller metallothionein-liknende proteiner spiller en stor rolle i akkumuleringen, transporten og detoksifiseringen av ikke-essensielle metaller hos evertebrater. Metallotionein er en gruppe proteiner som har lav molekylvekt, er varmestabile og har et meget høyt cystein-innhold (~30 %)(Hylland 1994). Bly er en annen miljøgift funnet i Tromsø havn. Dette metallet blir akkumulert utenfor cellene i innvertebrater i karbonat rike granuler som karbonat granuler med bundet bly (Bryan 1986). Kobber har blitt funnet i høye konsentrasjoner i parapodia og i epidermis i *Nereis virens*, og en tese har blitt foreslått der epidermis kan være hovedområde for regulatorisk aktivitet (Bryan 1971). Det er også blitt vist for kobber at det er det mest skadelige metallet for *Arenicola marina*, mer skadelig en både kadmium og sink (Bat 1998).

I evertebrater har det tidligere blitt benyttet ulike biomarkører. Både glutathion reduktase og metallotionein har begge tidligere vært brukt som indikatorer på oksidativt stress og metalleksponering (Hylland 1996; Amiard 2005; Nunes 2006). Glutathion reduktase er en av komponentene i antioksidantforsvarssystemet og blir brukt til å kvantifisere oksidativt stress. Metallotionein har en særlig stor evne til å binde metaller, men antas også å ha en rolle som antioksidanter (Hogstrand 1991; Viarengo 2000). Som biomarkør har MT vært brukt de siste 10 årene som en indikator på metall påvirkning. De fleste testene har blitt gjort på fisk og muslinger.

Denne oppgaven hadde som hovedmål å undersøke effekten av ulike miljøgifteffekter fra sediment fra Tromsø havn på *Arenicola marina* og *Corophium volutator*. Dette innebar å undersøke ulike endepunkter og se på sammenhengen mellom disse:

- Vil kontaminert sediment fra Tromsø havn påvirke adferd og dødelighet hos *Arenicola marina* og *Corophium volutator*?
- Vil kontaminert sediment fra Tromsø havn påvirke biomarkør-responser i ulike vev hos fjæremark, *Arenicola marina*?
- Vil de ulike parametrene gi et bedre grunnlag for risikovurdering av marine sediment?

2. Material og metoder

Forsøkene og analysene som ble gjort i denne oppgaven ble utført på NIVAs forskningsstasjon på Solbergstrand og på laboratoriet ved NIVA i Oslo.

2.1 Organismer

2.1.1 *Arenicola marina*

Flerbørstemarken fjæremark, *Arenicola marina*, ble importert til Norge fra Storbritannia, og den gikk i referanse sediment fram til forsøksstart. Marken ble først klassifisert av *Linnaeus* i 1758 og arten har en fast, sylindrisk form som er delt inn i en thoracic (respirasjonsdel) og abdominal region. *A. marina* har et lite hode uten øyne og med en kraftig snabel (proboscis).

Respirasjonsregionen består av 19 segmenter hvorav de 13 siste inneholder buskete gjeller.

Abdominale regionen er smalere og har mange segmenter, men mangler både gjeller og børster.

Hvert segment er delt av 5 ringer (annuli). Fargen kan variere fra rosa, mørk-rosa, rød, sort,

grønn og mørk brun ofte avhengig av alder og årstid. *Arenicola marina* lever i bløtbunns

områder og graver seg ned i U eller J formede kanaler ned i sedimentet, opptil 20-40 cm dypt.

Gytetiden er på høsten, i motsetning til de fleste andre børstemarker. Marken har et

karakteristisk utblåsningshull ("blow hole") hvor spagetti lignende avføring (fødeinntak) blir lagt igjen på havbunnen. Den lever av detritus og mikroorganismer i det fordøyde sedimentet.

Børstemarken egner seg godt til toksisitetstesting. Den er lett å skaffe, holde, og marken er relativt robust. Børstemarken kan deles opp i ulike vev (ved disseksjon). Dette muliggjør testing av samme respons i ulikt vev, kontra hele organismen. *A. marina* lever i et komplekst miljø.

Fjæremarken blir påvirket av de ulike miljøfaktorer i overflatevannet og i sedimentet, og har i

tidligere forsøk vist ulike responser av PAH (McElroy 1985; Christensen 2002), metaller (Zauke

2003) og av PCB (Kaag 1998). Fjæremarken egner seg godt til adferdstesting. Den har som

nevnt over et karakteristisk utblåsningshull med fødeinntak. Mengde fødeinntak kan lett

observeres og unormal adferd kan bli registrert. Nedgravingsadferd og dødelighet kan også

observeres enkelt. Disse faktorene gjør *Arenicola marina* interessant å bruke under dette

forsøket.

2.1.2 *Corophium volutator*

Corophium volutator ble samlet inn i Rambergbukta, som ligger på Jeløya i Oslofjorden. Amfipoden lager en semi-permanent U-formede tunneler på mudderflater. Arten kjennetegnes ved sin segmenterte, dorso-ventrale flate kropp. Den har et lite hode med to par antenner stikkende fremover, hvorav de bakerste er lange og tykke. Ved forflytting i vannet vil den svømme som en reke, med enden først. De ble samlet inn på en tidevannsflate. De 15 øverste cm ble gravd opp med en spade, sedimentet ble deretter silt og individene ble liggende igjen i silen. Grunnet problemer under innsamlingen av organismen, fikk vi ikke tak i nok individer til å kjøre testen på alle sedimentene. Men de som ble samlet gikk i referanse sediment fram til forsøksstart. Arten er en mye brukt art i sedimenttesting, både for metaller (Bat 1998), og for ulike hydrokarboner (Brils 2002). *C. volutator* egner seg godt til adferdstesting, da den vil forlate sedimentet og bevege seg i vannmassen eller på sedimentet ved unormale tilstander.

2.2 Sediment

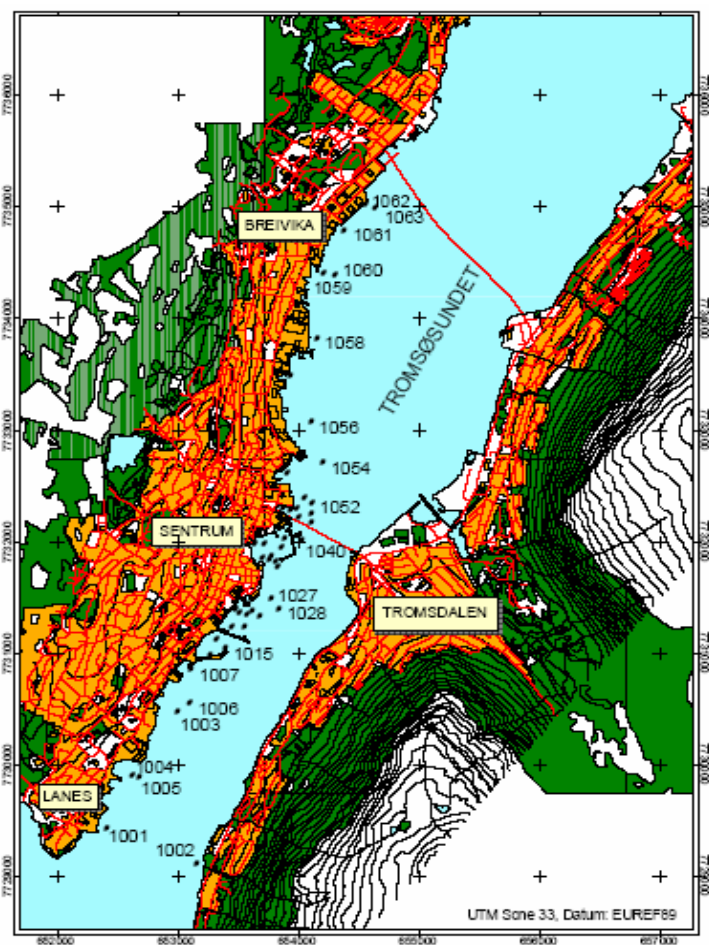
2.2.1 Kontrollsediment

Sedimentet ble samlet inn i Rambergbukta, som ligger på vestsiden av Jeløya i Oslofjorden. Dette er sediment fra en lokalitet som er godt karakterisert gjennom mange år og som inneholder kjente bakgrunnskonsentrasjoner av ulike miljøgifter (Johnsen 1996; Skei 2002). Det ble ikke gjort analyser fra kontrollsedimentet under dette forsøket, men tidligere og senere analyser viste at TOC og partikkelstørrelse lå relativt likt. Sedimentet inneholdt 4,3 µg TOC/mg sediment og 73% av partiklene var mindre enn 63 µm (Hylland, 1996). Og Ruus (2005) viste at sedimentet inneholdt 4,3-5,3 µg TOC/mg sediment og at 73% av partiklene var mindre enn 63 µm. Dette gir oss en indikasjon på hvor de ulike parametrene ligger.

Det var tatt ut sedimentprøver fra 21 ulike lokaliteter i Tromsø havn, to fra Grimstad og en fra Kristiansand. Det var 6-7 liter (to små bøtter) sediment fra 0-5 cm. Disse var oppbevart fryst på NIVAs forskningstasjon på Solbergstrand. Stasjonene fra Tromsø havn som ble brukt under denne oppgaven var: 1001, 1003, 1004, 1008, 1015, 1019, 1022, 1024, 1025, 1026, 1027, 1028,

1031, 1034, 1035, 1044, 1047, 1051, 1052, 1053, 1063 (Fig 2.2). Fra Grimstad: A50 og B50, og fra Kristiansand st.44. Disse stasjonene ble valgt grunnet deres ulike toksiske kategori, og deres varierende partikkelsammensetning. Det ble lagt vekt på sedimenter med usikker toksisitetsgrad, da disse var mest av interesse. Sedimentet hadde blitt inndelt i tre kategorier avhengig av respons i in vitro toksisitetstester (Fig 2.1): Ikke toksisk sediment (1), sediment med usikker toksisitet (2) og sterkt toksisk sediment (3)(Hylland 2004). Før igangsetting av forsøket ble sedimentene tint ved 20C° og homogenisert ved hjelp av en drill påmontert en malingsblander.

Tabell 2.1: Klassifisering av sedimentene fra Tromsø havn.



Figur 2.1. Kart med stasjoner for innsamlet sediment fra Tromsø havn.

Stasjon	Kategori	Stasjon	Kategori
1001	2	1028	1
1003	1	1031	2
1004	2	1034	2
1008	3	1035	2
1015	3	1044	2
1019	2	1047	2
1022	2	1051	2
1024	2	1052	2
1025	1	1053	2
1026	2	1063	1
1027	1		

2.2.2 Sedimentkarakterisering

Sedimentene fra de utvalgte stasjonene hadde generelt en stor andel partikler større enn 63 µm. Innholdet av total organisk karbon var gjennomgående under 1%. Stasjonene med det groveste sedimentet var 1001, 1019, 1022, 1024, 1025, 1027, 1028. Stasjonene med mest organisk karbon (over 2% TOC) var 1008, 1052 (tab.2.2).

Tabell 2.2: Tørrstoff og partikkelstørrelse fra de ulike stasjonene. (Hylland 2004)

prøvenr	tørrstoff (%)	% < 63 µm	% > 63 µm	TOC %	TOC (mg/g)
1001	64,2	8,42	91,58	0,36	3,6
1003	66,27	9,88	90,12	0,4	4
1004	68,19	14,23	85,77	0,57	5,7
1008	45,61	49,51	50,46	2,36	23,6
1015	59,81	16,07	83,93	1,26	12,6
1019	72	7,33	92,67	0,37	3,7
1022	73,44	7,45	92,55	0,51	5,1
1024	69,47	5,89	91,44	0,29	2,9
1025	63,88	5,25	94,75	0,37	3,7
1027	70	3,47	96,53	0,42	4,2
1028	65,84	3,64	96,36	0,2	2
1031	65,04	11,08	88,92	1,36	13,6
1034	61,25	19,03	80,97	1,12	11,2
1035	65,25	18,08	81,92	0,83	8,3
1044	69,5	18,8	81,2	1,82	18,2
1047	65,64	13,7	86,3	1,11	11,1
1051	66,09	26,88	73,12	1,35	13,5
1052	63,87	20,82	79,18	2,72	27,2
1053	64,14	29,42	70,58	1,5	15
1063	60,59	39,32	60,68	1,51	11,5

Det var forhøyde nivåer av tinnorganiske forbindelser i alle sediment fra Tromsø havn sammenlignet med kontroll-sedimentet. Det var også påvist forskjeller mellom stasjonene for PAHer, og for de ulike metallene.

Tabell 2.3: Sedimentene med konsentrasjon i µg/kg tørrvekt (ppm.) (Hylland 2004)

Stasjon	Cd	Cu	Hg	Pb	Tributyltinn kation	Benzo[a]pyren	Antracen	SUM 16 EPA	SUM PCB (Over Grensev.)
1001	0,077	2,87	<0,04	3,08		12,0	12,7	221	+
1003					5	1,86	0,90	21,2	
1004	0,114	6,24	<0,04	4,52		9,09	6,05	115	
1008	0,51	24,5	0,45	9,85	19	31,9	8,9	273	
1015	0,491	26	0,24	12					
1019	0,205	5,88	<0,04	4,38		7,98	5,26	98,5	
1022	0,121	16,1	0,06	10,6					
1024					19	39,2	25,9	667	
1025						1,59	1,31	19,0	
1026	0,133	7,07	0,19	4,05					
1027	0,086	10,4	0,08	10,5					
1028	0,092	4,57	<0,04	7,49	13	17,2	5,1	154	+
1031					300	358	430	6536	
1034					2000	268	113	2538	+
1035						199	178	3162	
1044	0,124	29,2	0,11	2340	200	50,6	18,8	431	+
1047	0,218	98,9	0,41	50	730	145	69,5	1581	+
1051	0,167	22,3	0,13	13,6	98				
1052	0,141	9,87	0,04	8,43	44	23,5	15,5	347	
1053					15	80,2	50,2	1402	
1063					32	34,9	20,4	598	
Kontroll	0,085	7,19	<0,04	7	<1,0	4,1	2,1	54,4	

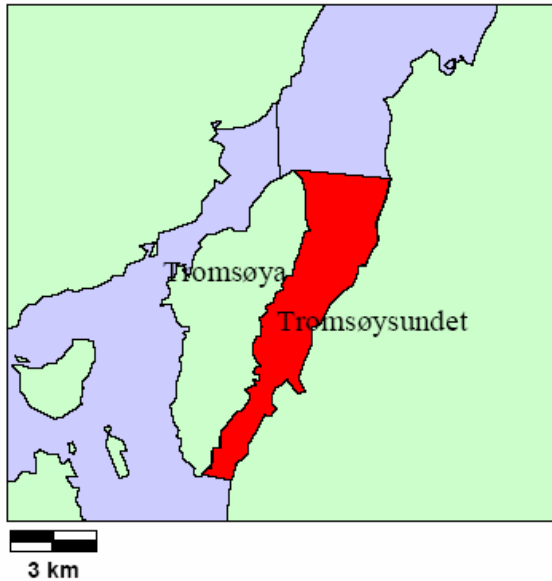
2.3 Tromsø havn

Tromsø havn er et viktig knutepunkt i Nord-Norge og videreutvikling av havnen er sentralt både for sjøtransporten og den regionale næringsutviklingen. Tromsø havn er spredt ut over et relativt stort område, og omfatter to havneanlegg: Det gamle havneanlegget i sentrum (Prostneset, ”indre havn”) og et relativt nytt og moderne anlegg i Breivika 4 km nord for sentrum. Havneområdet ligger i Tromsøsundet, et sund som ligger mellom fastlandet og Tromsøya. Det er sterk strøm i sundet, ved springflo ca. 3 knop, men under spesielle forhold opp til 5 knop (Sjøkartverk 1988), noe som fører til at det kun finnes relativt grovkornet sediment i store deler av sundet. Inne i havneområdet finnes imidlertid områder med lavere strømhastigheter og finere sediment

(deposisjonsområder). Det er videre relativt store tidevannsforskjeller i området (middels høyde forskjell mellom lav- og høyvann er 1,68 m). Trafikken i havneområdet er økende og det totale antall anløp i Tromsø havn var i 2001 på 10331 fartøyer fordelt på offentlige og private kaier. Av disse anløpene var ca. 4 000 til ”indre havn”. Størstedelen av anløpene i ”indre havn” er hurtigbåter og hurtigruta, samt fiskefartøy og mindre lystbåter. Anløp av lastefartøyene, de største cruisebåtene og hovedtyngden av de store fiskefartøyene skjer til havneområdet i Breivika. Det er ingen tyngre industri i havneområdet, men flere fiskeindustribedrifter langs Tromsøysundet, i tillegg til mekaniske verksteder, skipsverft og bunkersanlegg for olje.

Tromsø havns miljøtilstand ble kartlagt i 1997-2000 (Jørgensen 2000). Til tross for at det er relativt grovkornet sediment i store deler av Tromsøysundet og i deler av havneområdet er det målt høye miljøgift-konsentrasjoner i sedimentet (Jørgensen 2000). Det ble funnet varierende nivåer av PAH (SFTs tilstandsklasse II-V, moderat til meget sterkt forurenset) i bunnsediment fra Tromsø havneområde. De høyeste PAH-konsentrasjonene ble registrert i indre havn, i Hansjordnesbukta og utenfor Steinbergan (tilstandsklasse IV-V, sterkt til meget sterkt forurenset). Prøvene fra blåskjell viste fra sterkt til meget sterkt PAH-forurensning (IV og V). Forhøyede nivåer av PAH-metabolitter ble funnet i torsk fisket ved brohodet i Tromsø sentrum (nært indre havn). Sedimentprøver innsamlet i området fra indre havn til nord for Hansjordnesbukta var sterkt PCB-forurenset. Enkelte prøver fra det sentrumsnære området inneholdt også høye konsentrasjoner av DDT med nedbrytningsprodukter. Det ble registrert forhøyede PCB-nivåer i blåskjellprøver. Bunnsedimentprøver fra hele det undersøkte området i Tromsø var fra sterkt til meget sterkt TBT-forurenset (tilstandsklasse IV-V), mens blåskjellprøvene var fra markert til sterkt forurenset (tilstandsklasse III-IV). For alle de undersøkte tungmetallene ble det funnet markert forurenset sediment (tilstandsklasse III) i indre havn og i dypkaiområdet ved brohodet (Tromsøbrua). Ved dypkaia ved brohodet var sedimentet meget sterkt forurenset av bly (tilstandsklasse V). Tangprøver fra dette området var markert belastet av kobber.

For Tromsøysundet lyder gjeldende kostholdsrad fra Statens Næringsmiddeltilsyn (SNT; sist vurdert i 2000) ”Konsum av skjell fanget mellom Tromsøya og fastlandssiden (Tromsøysundet) frarådes”.



Figur 1. Angivelse av utstrekning (rødt) hvor kostholdsråd for Tromsøysundet gjelder. (Kilde:SNT) (Hylland 2004)

2.4 Arendal/Kristiansand

Stasjonene fra Arendal var et referansesediment innsamlet under kystovervåkingen 2003. A50 var fra området Hvaler-Langesund, og B50 var fra Tromøy-Lillesand. Disse stasjonene hadde ikke miljøgiftmålinger. A50 hadde 5,6 mg TOC/g sediment, og 64% av partiklene var mindre en 63 μm . B50 hadde 35 mg TOC/g sediment, og 93% av partiklene var mindre en 63 μm (Rygg 2003). St.44 ligger midt i vesterhavn (Kristiansand havn), vest for nikkerverket Falcon Bridge. Sedimentet ble innsamlet i forbindelse med en risikovurdering av Kristiansand havn og stasjonen var på 47 meters dyp og ca 0,5 km fra nikkerverket. Sedimentet har blitt målt til høye konsentrasjoner av nikkel, HCB (heksaklor benzen), PAH (Næs 2001).

2.5 Helsedimenttest

2.5.1 *Arenicola marina*

Dette forsøket gikk over 10 dager på NIVAs forskningsstasjon i Drøbak høst 2003 og vinter 2004. Sedimentet ble førts homogenisert med en drill påmontert en malingsblander og tilsatt test akvariene til minst 7 cm høyde og 3 replikater. Akvariene var av hard plast og hadde et volum på 600 cm^3 . Vann ble tilsatt til minst 12 cm over. Akvariepumper med jevnt lavt trykk ble koblet til karene for en stabil lufttilførsel. Karene stod 24 timer før tilsetting av mark, slik at sedimentet

fikk lagt seg. I hvert akvarium ble 5 mark tilsatt og tidspunkt for tilsetning ble notert. Pga arbeidsmengde og antall kar tilgjengelig ble forsøket kjørt 3 ganger.

Markens adferd etter tilsetning ble registrert. Evnen til å grave seg ned ble notert etter ett døgn, 3 døgn og etter 10 døgn. Fødeinntak rate ("hauger med avføring") ble notert etter mengde ved de samme intervallene. Etter 10 dager ble markene forsiktig silt fra og antall døde ble registrert. De levende ble overført til et eget kar for disseksjon senere.

2.5.2 *Corophium volutator*

Corophium-testen går ut på å måle dødelighet blant de dyrene som tilsettes vannet over det aktuelle sedimentet som skal testes. Testen ble gjennomført etter et bestemt system (alle trinn blir loggført): 250-300 mL tint/homogenisert prøve fra helsedimentene ble overført til 3 replikater begerglass (1000 mL) for hver stasjon. Sjøvann (fra 60 m dyp, utenfor NIVAs marine forskningsstasjon Solbergstrand) blir så tilsatt til et totalvolum på 800 ml. Akvariepumper (svak luftstrøm) ble brukt til å holde et konstant oksygennivå. Karene stod i 24 timer før tilsetning av amfipodene. Dette for at sedimentene skulle stabilisere seg. 20 individer ble tilsatt i hvert begerglass. Tidspunkt for tilsetning ble notert for hvert begerglass. Amfipodenes evne til å grave seg ned ble registrert ved å observere antall individer på sedimentoverflaten og i vannsøylen etter 1 dag. Eksponeringen ble avsluttet etter 4 dager. Antall individer på sedimentoverflaten og i vannsøylen ble registrert. Individuelle Corophium ble forsiktig silt fra sedimentet/vannet og antallet levende og døde registrert.

2.6 Fødeinntak (fødeinntak rate)

Arenicola marina vil legge igjen fescer på sedimentets overflate ved fødeinntak. Dette blir kalt fødeinntak. Ved normalt fødeinntak (kontrollen) ble store "spagettlignede" hauger observert, ved lavere fødeinntak (ulike stasjonene), ble mindre hauger observert. Vi satte fødeinntak rate 2 til å være normalen, og målte ved øyesyn om det var like mye, mer eller mindre i de andre stasjonene. Vi satte kategorien 1 til å være litt og 0 til ingen fødeinntak. Fødeinntaket ble observert etter 1 døgn, 3 døgn og 10 døgn. Etter hver observasjon ble haugene fjernet slik at neste avmåling skulle bli korrekt.

2.7 Dødelighet

Ved forsøkets slutt ble all marken forsiktig silt fra sedimentene og antall døde ble notert. Hvis noen døde underveis i forsøket ble de fjernet og talt som døde ved slutt.

2.8 Disseksjon og opparbeiding

2.8.1 Disseksjon og coelomvæske

De levende markene ble oppbevart i rent sjøvann (60 m dyp) i 24 timer etter fjerning fra sediment, slik at tarmen skulle tømme seg. Dette for å hindre kontaminering av prøvene. Disseksjonen foregikk på et plastveieskip under en lupe. Marken ble delt inn i tre ulike deler; epidermis med børster, epidermis uten børster og tarmsystemet. Hvert individ ble åpnet med en skalpell og tarmsystemet ble overført med pinsett til et kryorør. Vev med børster og vev uten børster ble så separert og lagt på separate kryorør. Alle rør ble merket med stasjonsnummer, replikatnummer og individnummer før de ble sjokkfryst på flytende nitrogen. Alle prøvene ble oppbevart ved -80°C .

2.8.2 Opparbeiding

De ulike vevene fra *Arenicola marina* ble opparbeidet etter metode beskrevet av Dignam (1990) hvor de blir opparbeidet til ulike subcellulære fraksjoner (PMS, cytosol eller mikrosomer). En vil da få et "gjennomsnitt" av alle celletypene i vevene og det kan være et problem med frigivelse av innhold i lysosomer og peroksisomer til cytosol. Alle rør ble skylt med dH_2O før opparbeiding. Prøvene ble tint på is før de ble innveid på en engangs plast veiebeger. Deretter ble de overført til homogeniseringsrør og fylt opp til 5 ml ($<0,5$ g opp til 2,5 mL) med iskald homogeniseringsbuffer. Prøvene ble så homogenisert med Potter-Elvehjem Teflon® homogeniseringssett ved 750-1250 rpm, minst 10 ganger opp-ned og sentrifugert ved $10.000 \times g$ i 30 min ved 4°C . Supernatanten ble så overført til engangsrør, fett og pellet (bestående av hele celler og cellekjerner, ble ekskludert), så ble supernatanten sentrifugert ved $50.000 \times g$ i 2 timer. Supernatanten, som inneholder cytosol, ble suget av med pasteurpipette, fordelt på eppendorfrør og frosset ned til -80°C . Pelleten, som består av mikrosomer, ble resuspendert i iskald 2,0 ml

mikrosomal buffer, homogenisert 5 ganger på is med glasspistill, og fordelt på eppendorfrør som ble frosset ned til -80°C.

2.9 Biokjemiske analyser

2.9.1 Protein

Metoden er en modifisert Lowry (1951). Essayet er en 2-steps kolorimetrisk metode som er basert på reaksjonen mellom alkaline kobber tartrate løsningen og Folin reagensen. Farge utviklingen er gir oss mengden av aminosyrene tyrosin og tryptophan, men også cystine, cysteine og histidine er med i totalen. Som standard blir det laget en standard rekke av bovint serumalbumin ved konsentrasjon: 125-250-500-1000-1430 µL.

Av utstyr blir det brukt: Eppendorfrør, pipettespisser, 96 brønners mikrotiterplater, vortexer og en plateleser m/filter på 750 nm. Løsninger som blir brukt: 0,1M Tris-buffer pH 8, Reagens A¹¹: alkaline kopper tartrate løsning, Reagens B¹: fortynnet Folin reagens.

Alle stegene i prosedyren ble utført på is. 10 µL av standard/blank/prøven ble tilsatt i en ren, tørr 96 brønners mikrotiterplater. 25 µL reagens A og 200 µL av reagens B ble tilsatt før platene ble ristet i 5 sekunder. Mikrotiter platene ble innkubert i 15 minutter før avlesning ved 750nm.

WSOFTMAX[®] regnet ut en standard kurve fra standardene og de ukjente prøvekonsentrasjonene ble kalkulert fra denne lineære kurven og dens absorbans.

2.9.2 Glutation reduktase

Optimalisering av Glutation reduktase analysen

De ulike vevene inneholdt ulik mengde av glutatation reduktase, derfor ble det brukt ulikt volum av prøvene under forsøket. Prøvene med de høyeste konsentrasjonene (prøver fra vev med børster) ble det brukt 50 µL og de med minst 200 µL (vev uten børster). Dette for at verdiene skulle gi riktig utslag i forhold til standarden og ikke komme utenfor standardkurven.

¹ Reagens A, B og bovine gamma globulin ble kjøpt som et kommersielt produkt fra BioRad (Kit. No 5000-0111)

Glutation reduktase analyser

Prinsippet med metoden er å måle forbruket av NADPH ved redusering av GSSH til GSH ved glutation reduktase i prøven. Det ble brukt en plateleser Thermomax Microplate reader (Molecular Devices) ved 340 nm, med referansekuvette; kuvetter (kvarts) og automatpipetter. Løsninger som ble brukt er; 0,1M Na-fosfat; $\text{HNa}_2\text{PO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ 35,814 g/mol/L, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 13,8 g/mol/L, pH 7,6, GSSG-løsning (620 mg → 50 mL buffer), NADPH-løsning (80 mg → 10 mL buffer), EDTA-løsning (95 mg → 100 mL). Alle stegene i metoden ble utført på is og ulikt vev krevde ulikt prøvevolum. Steg 1: 200 μL EDTA + 20 μL NADPH, 10-200 μL prøve ble fortynnet opp til 2 mL i 5 mL rør. Steg 2: Løsningen ble fordelt i 8 brønner (200 μL i hver). Steg 3: 25 μL GSSG ble tilsatt i prøvebrønnene. Steg 4: Forandringen ble målt ved 340 nm, umiddelbart etter GSSG tilsetningen. Som referanse ble det brukt gjeller fra Al-eksponert ørret (GU). Plateleseren ble brukt med programmet WSOFTMAX[®], programmet leser av absorbansen i 3 minutter og gir ut dataene som tekstfil.

Utregningen:

$$\frac{\Delta\text{OD}_{340\text{nm}} \text{ min}^{-1} \times (1 \text{ mL})}{0,0062 \times \text{prøvevolum} (0,01-0.1 \text{ mL}) \times \text{protein}(\text{mg/mL})} = \text{nmol mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$$

2.9.3 Metallotionein

Analysen ble basert på en metode beskrevet av Olafson (1991). Cytosol fra vev med børster ble tint på is. Prøvene ble fortynnet i 0,9% NaCl 1:5. Deretter ble de denaturert på varmeblokk ved 95°C i 5 minutter. Temperaturen ble overvåket med termometer. Prøvene ble så avkjølt på is og sentrifugert ved 10000 x g i 15 minutter ved 4°C for fjerning av denaturerte proteiner. Supernatanten ble overført til nytt eppendorfrør.

Det ble brukt en Metrohm 663 VA Stand polarograf fra Metrohm, samt en $\mu\text{Autolab}$ typeII potentiostat og IME663 rører fra Eco Chemie B.V. Standardprøve ble laget av metallotionein fra kanin (Sigma-Aldrich), 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ i 0,9% NaCl, og frosset ned i 0,5 ml porsjoner til -80°C. Elektrolytt (Heksamin kobolt(III)klorid 0,321 g l⁻¹; Ammoniumklorid 53,4 g l⁻¹; Ammoniakk 25% 154 ml l⁻¹; dH₂O til 1,0 l) ble laget og lagret på en lystett flaske ved 4°C i maks en uke.

Ved bruk må elektrolytten holde romtemperatur siden målingene er temperaturavhengige. En PARC glasscelle ble fylt med 10,0 ml elektrolytt og tilsatt 200 μ l 0,025% Triton-X. Standardkurve ble laget ved å tilsette henholdsvis 10 – 20 – 20 – 30 – 40 – 40 μ l standard med målinger mellom hver tilsetning. Før hver måling ble løsningen boblet med nitrogen i ett minutt. En ny beholder inneholdende elektrolytt og Triton-x ble tilsatt prøve (50-400 μ l) og boblet med nitrogen i 1 minutt. Måling ble så startet (VA Computrace).

2.10 Kvalitetskontroll

2.10.1 Metallotionein

Metallotioneinverdiene ble beregnet ut fra en standardkurve med kanin MT. Verdiene ble gitt av softwaren (VA Computrace) som μ g MT. Hver prøve ble målt i triplikater, noe softwaren ga ut et gjennomsnitt av alle tre, uten CV. Det ble kjørt en standardprøve etter hver 10 prøve for å se etter apparatdrift, dette for å holde kontroll på analysen. Ved stort avvik ble det lagd ny standardkurve og sjekket på nytt mot en intern standard. MT verdiene ble så standardisert mot protein.

2.10.2 Glutation reduktase

De ulike vevene ble optimalisert slik at de skulle befinne seg innenfor standardkurven. Ulikt vev trengte ulikt volum. Dette ble gjort ved å undersøke noen av prøvene og finne det ideelle volum for de ulike vevene.

Epidermis med børster: 100 μ l, uten børster: 200 μ l, tarm: 200 μ l. Det ble også brukt en referanse fra torsk med kjent konsentrasjon av GR.

2.11 Statistiske analyser

De statistiske analysene ble utført med Statistica® software (versjon 6.1; Statsoft). Dataene ble først sjekket for homogen varians ved Levenes test, deretter ble det benyttet en ANOVA med signifikansnivå $\alpha=0,05$ (Cowles 1982; Zar 1998). For å skille de ulike parametrene ble resultatene ettertestet med Tukey $\alpha=0,05$ (Zar 1998). Ved ikke homogene varianser ble resultatene log transformert og testet på nytt for varianslikhet og normalfordeling. Hvis

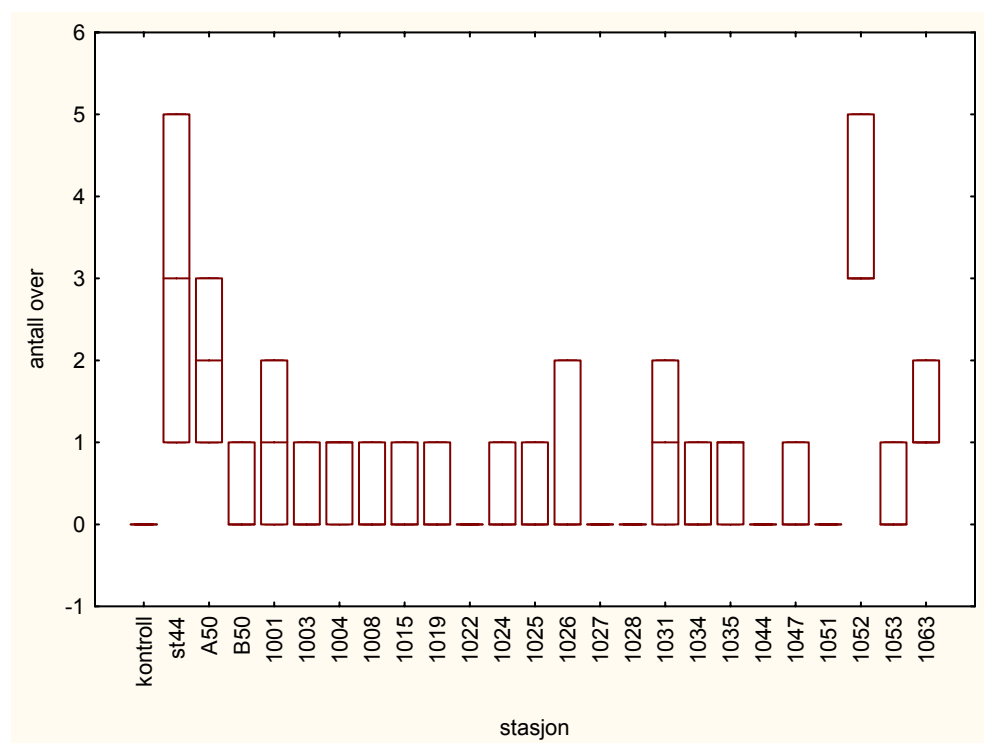
parametrene ikke hadde homogen varians ble det gjennomført en ikke-parametrisk test (Kruskal-Wallis) med signifikansnivå $\alpha=0,05$. Ved signifikants ble parametrene parvis testet (Wilcoxon), med Bonferroni-korreksjon av p-verdiene. Det vil si at p-verdien ble delt på antall tester for hver gruppe.

3. Resultater

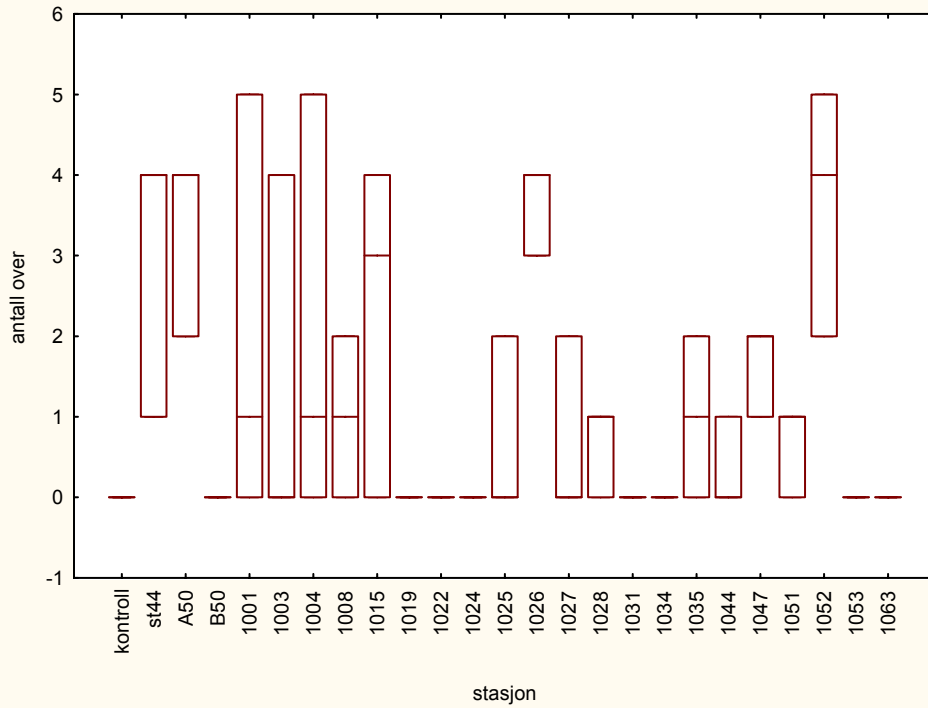
3.1 Adferd og dødelighet

3.1.1 *Arenicola marina*

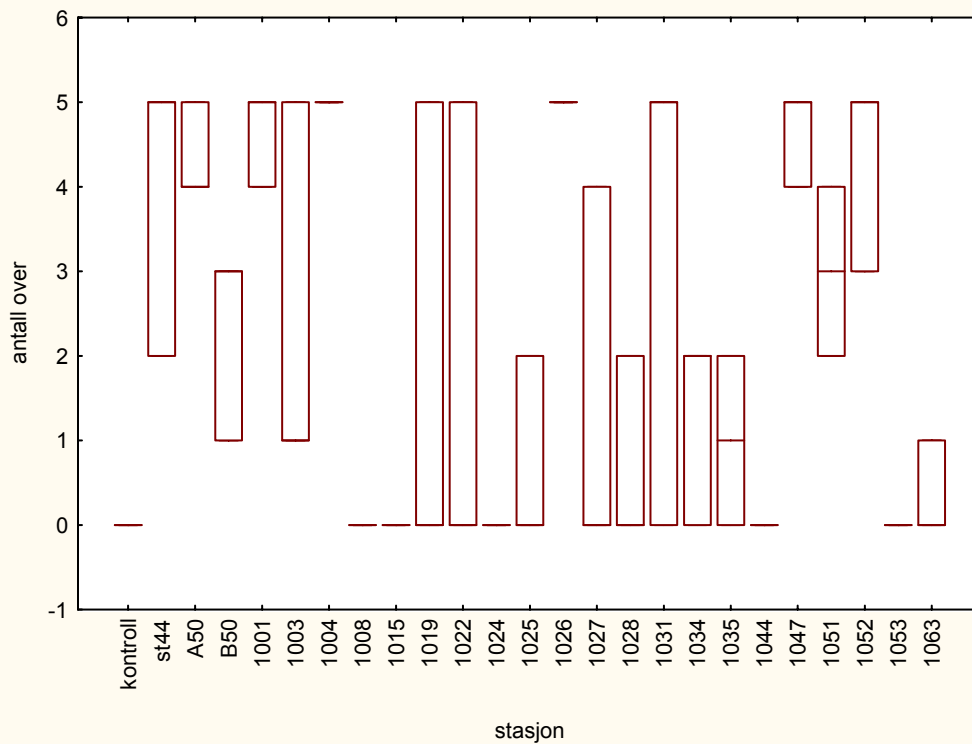
Det var klare tendenser i nedgravningsevnen til fjæremarken. I kontrollen lå *A. marina* lenge oppå sedimentet, men det var den eneste stasjonen der den holdt seg nedgravd under hele forøket. Generelt var flere av individene over sedimentet ved 10 døgn enn ved 1 døgn. Dog noen av stasjonene hadde alle over i et eller flere replikater under hele forsøket. Det var signifikant forskjell mellom stasjonene i nedgravningsevne etter ett døgn (KW-H, $p = 0,0048$; Figur 3.1.), 3 døgn (KW-H, $p = 0,0008$; Figur 3.2.) og etter 10 døgn (KW-H, $p = 0,00010$; Figur 3.3.).



Figur 3.1. *Arenicola marina* synlige på sedimentoverflaten etter ett døgn, median og kvartiler. Det var ingen individer over sedimentet fra stasjoner med ingen synlig boks (n = 3 for hvert sediment, n=9 for kontroll).

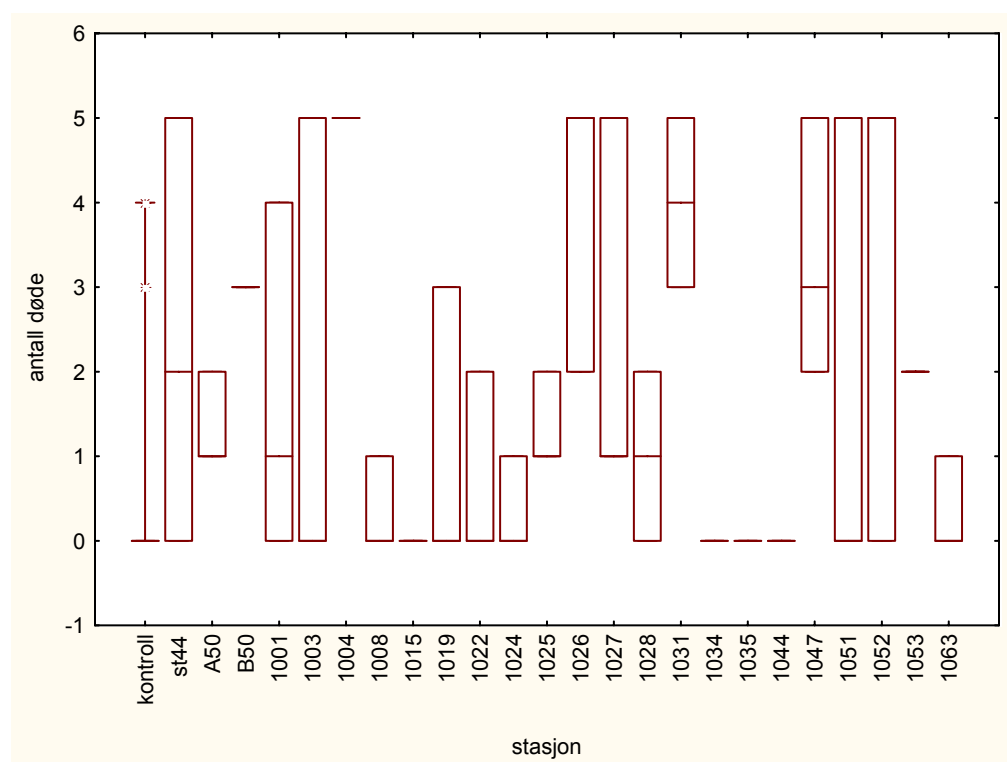


Figur 3.2. *Arenicola marina* synlige på sedimentoverflaten etter tre døgn, median og kvartiler. Det var ingen individer over sediment fra stasjoner med ingen synlig boks (n = 3 for hvert sediment, n=9 for kontroll).



Figur 3.3. *Arenicola marina* synlige på sedimentoverflaten etter 10 døgn, median og kvartiler. Det var ingen individer over sediment fra stasjoner med ingen synlig boks (n = 3 for hvert sediment, n=9 for kontroll).

Det var åpenbare forskjeller i dødelighet hos *Arenicola* holdt i de ulike sedimentene over 10 dager (Figur 3.4). Det ble observert lav dødelighet i kontrollen, men det ble observert dødelighet i den ene repikaten. I stasjon 1015, 1034, 1035 og 1044 var det ingen dødelighet. Noen av stasjonene ga en økt dødelighet i alle replikatene. I stasjon 1004 ble alle fjæremarkene observert døde. Forskjellene var signifikante mellom de ulike stasjonene (KW-H, $p = 0,0064$).

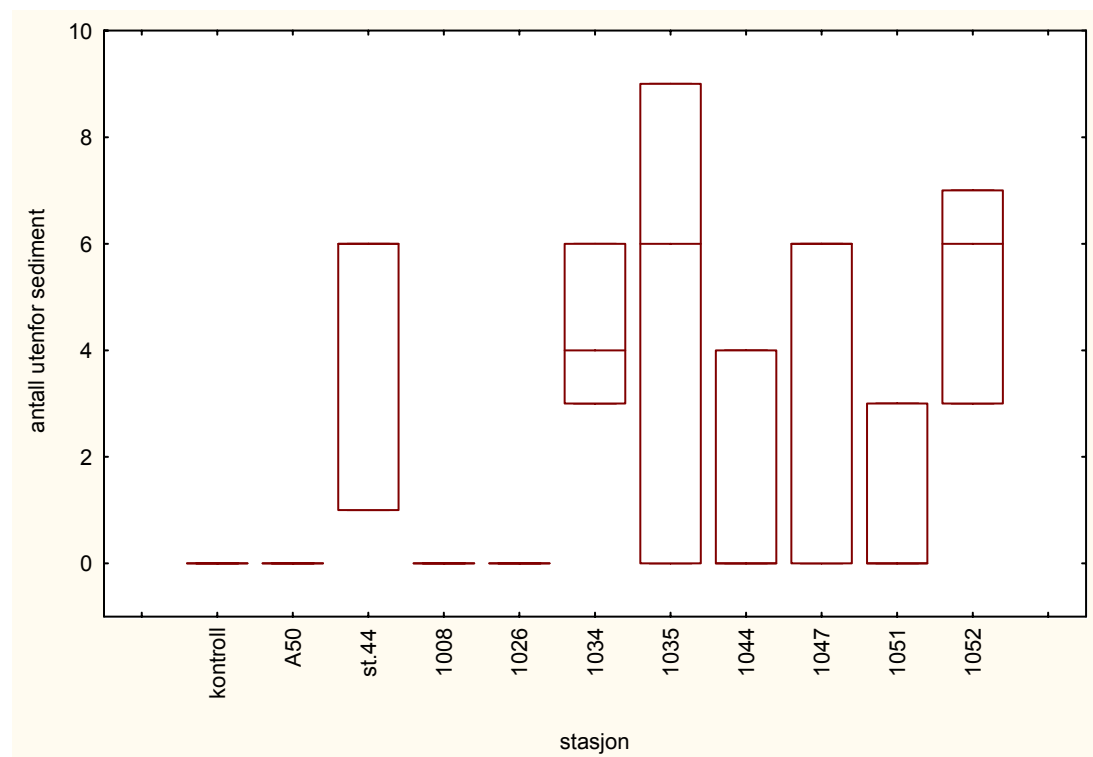


Figur 3.4. *Arenicola marina* dødelighet etter 10 dager, median, kvartiler og ekstremer (*). Det var ingen døde individer i sediment fra stasjoner med ingen synlig boks (n = 3 for hvert sediment, n=9 for kontroll).

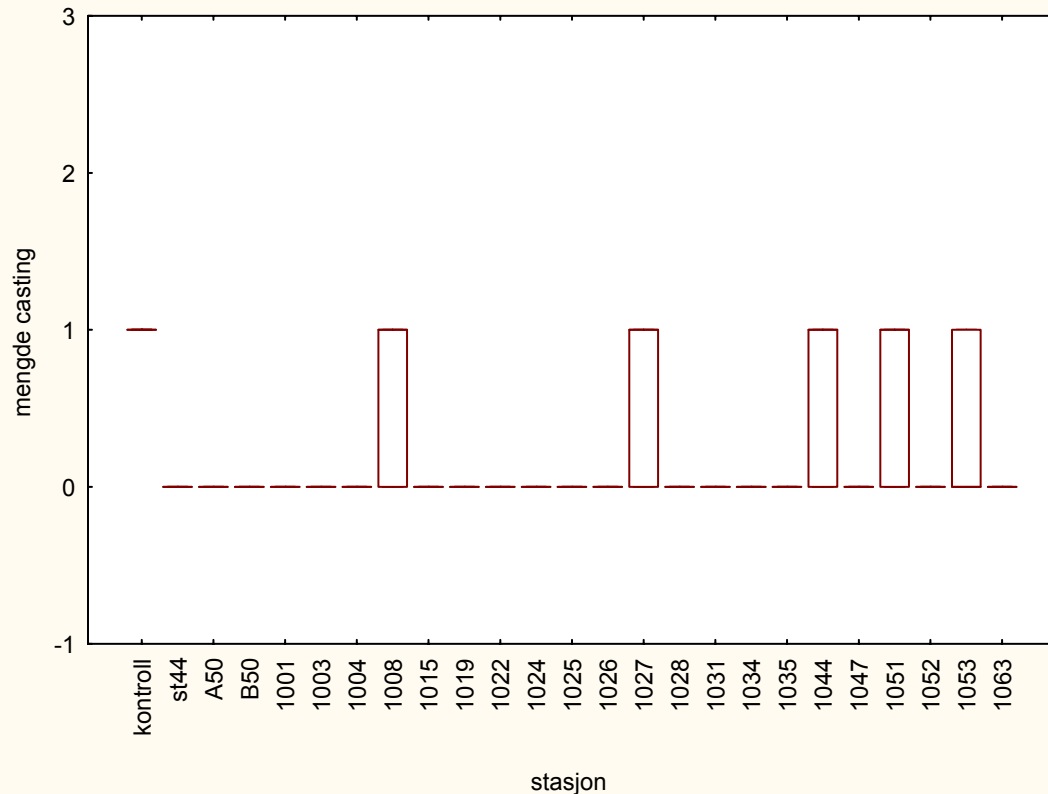
3.1.2 *Corophium volutator*

I kontrollen befant alle individene seg nedgravd under hele forsøket, men det ble observert dødelighet ved forsøket slutt. I sediment fra stasjon 1035 ble det observert flere individer i vannmassen, men en lav dødelighet. I kontrollen var det like mange døde som i stasjonen med den høyeste dødeligheten (1044). Det var signifikant forskjell mellom stasjonene der *Corophium*

befant seg utenfor sedimentet ved forsøkets slutt (KW-H, $p = 0,03$; Figur 3.5.). Det var imidlertid ikke signifikant forskjell i dødeligheten mellom stasjonene (KW-H, $p = 0,1128$; Figur 3.6.).

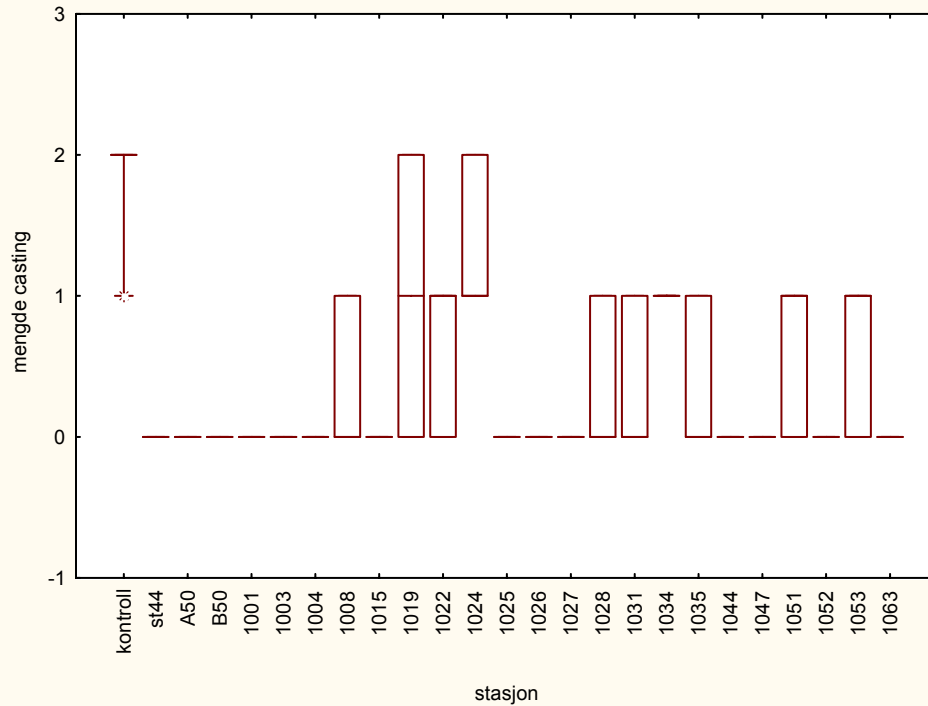


Figur 3.5. *Corophium* utenfor sedimentet ved avslutning av forsøket; median og kvartiler. Det var ingen individer synlige i sediment fra stasjoner med ingen synlig boks (n = 3 for hvert sediment).



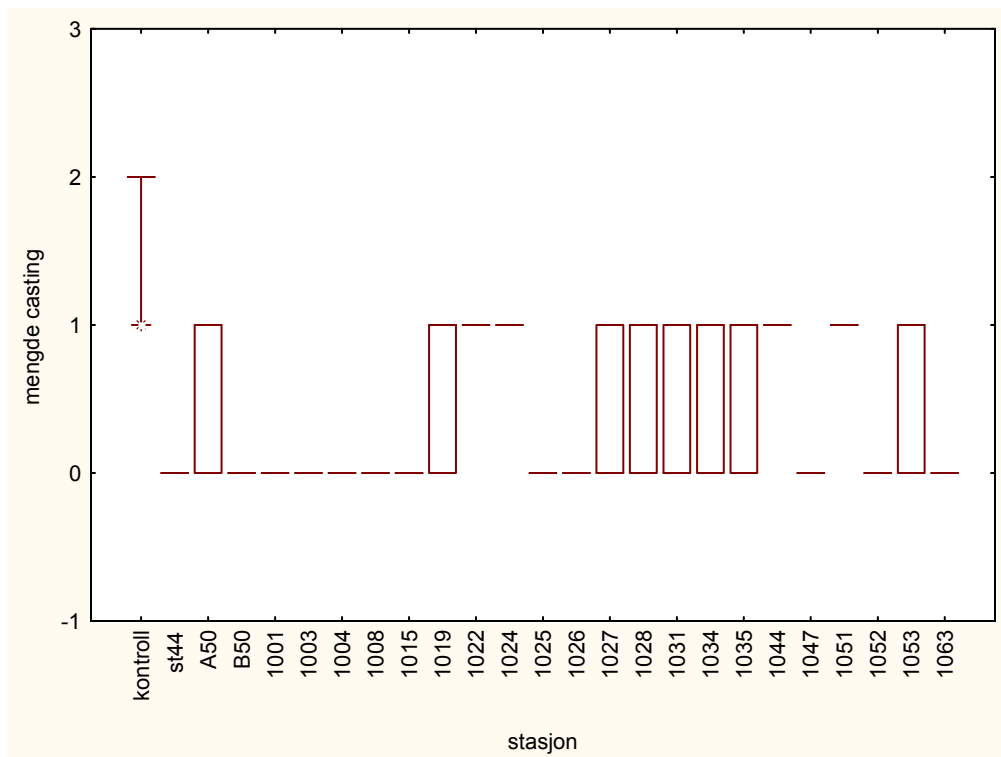
Figur 3.7. *Arenicola marina* fødeinntak etter ett døgn, median og kvartiler. Det var ingen fødeinntak fra stasjoner med ingen synlig boks (n = 3 for hvert sediment, n=9 for kontroll).

Etter 3 døgn ble det observert normal fødeinntak i to av kontroll replikatene, mens den ene replikateten lå litt lavere. Det ble observert normal fødeinntak i to av stasjonene, men kun i et eller to av replikatene. Resten av stasjonene hadde en lav eller ingen fødeinntak. Det var signifikante forskjeller mellom fødeinntak hos fjæremark holdt i de ulike sedimentene etter 3 døgn. (KW-H, $p = 0,00007$, Figur 3.8.)



Figur 3.8. *Arenicola marina* fødeinntak etter 3 døgn, median, kvartiler og ekstremere (*). Det var ingen fødeinntak fra stasjoner med ingen synlig boks (n = 3 for hvert sediment, n=9 for kontroll).

Etter 10 døgn ble det observert normal fødeinntak i to av kontroll replikatene, mens den ene replikateten lå litt lavere. Ingen av de andre stasjonene hadde et normalt fødeinntak, men flere av stasjonene hadde et lavt inntak i alle replikatene. Det var signifikante forskjeller mellom fødeinntak hos fjæremark holdt i de ulike sedimentene etter 10 døgn (KW-H, $p = 0,00003$, Figur 3.8).



Figur 3.8. *Arenicola marina* fødeinntak etter 10 døgn, median, kvartiler og ekstremer (*). Det var ingen fødeinntak fra stasjoner med ingen synlig boks (n = 3 for hvert sediment, n=9 for kontroll).

3.3 Biomarkører

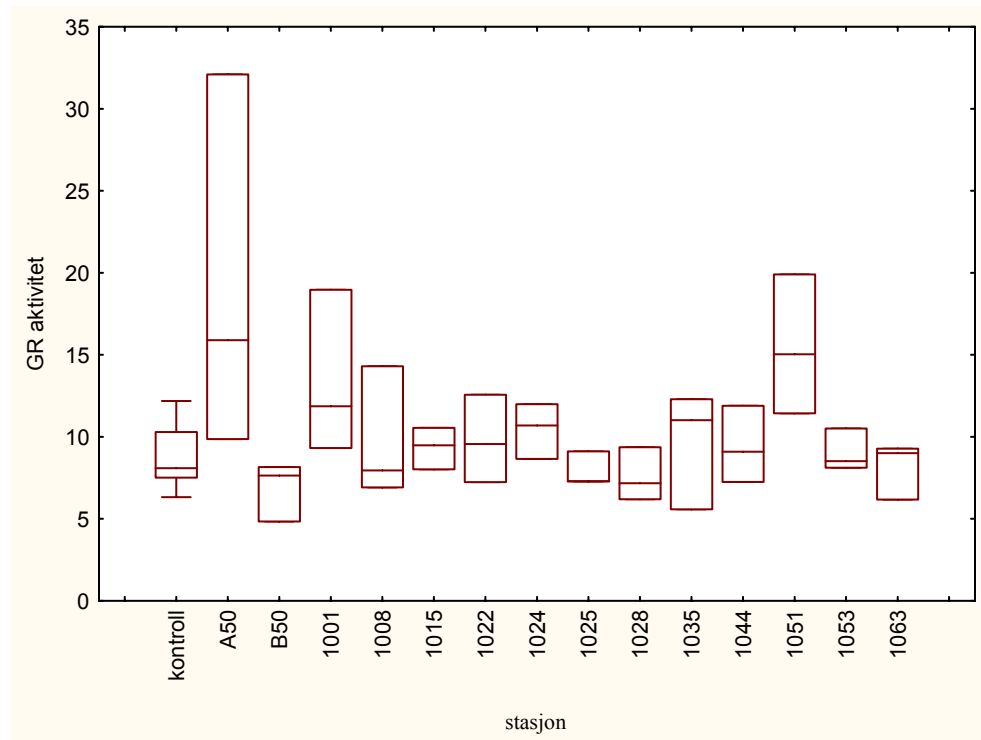
I tillegg til adferd og dødelighet ble det analysert for to biomarkører, glutation reduktase (GR) og metallotionein (MT). Disse ble analysert i ulike vev fra fjæremark. GR ble analysert fra epidermis med børster, uten børster og fra tarmsystemet. MT ble analysert fra epidermis med børster. Alle biomarkør responsene hadde en homogen varians og enveis ANOVA ble gjennomført. Noen av stasjonene som ble analysert for de ulike biomarkørene hadde på grunn av ulike faktorer kun ett eller to replikater. Disse resultatene ble utelatt i statistikken da de ikke kunne gi oss statistisk holdbarhet.

3.3.1 Glutation reduktase

Epidermis med børster

Det var store forskjeller i både verdier og variasjon i GR målt i vev med børster hos fjæremark holdt i de ulike sedimentene (Figur 3.9.). Aktiviteten av GR var lav i vev fra børstemark holdt i

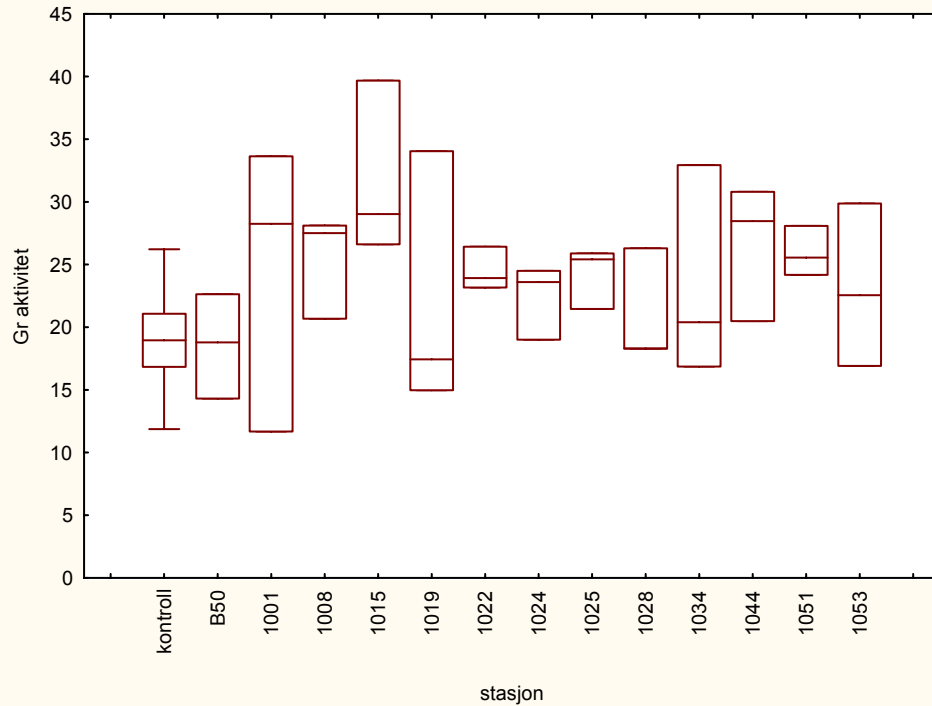
kontrollsediment, og det var signifikante forskjeller mellom GR i epidermis med børster fra fjæremark holdt i sediment fra de ulike stasjonene. En enveis ANOVA ga en $p=0,0161$. Ved ANOVA ettertest var det signifikant forskjell mellom stasjon A50 og B50 (Tukey, $p=0,05$).



Figur 3.9. Glutation reduktase aktivitet fra epidermis med børster, median og kvartiler. GR aktivitet oppgitt i GR (nmol/min/mg protein) (n = 3 for hvert sediment, n=9 for kontroll).

Tarm

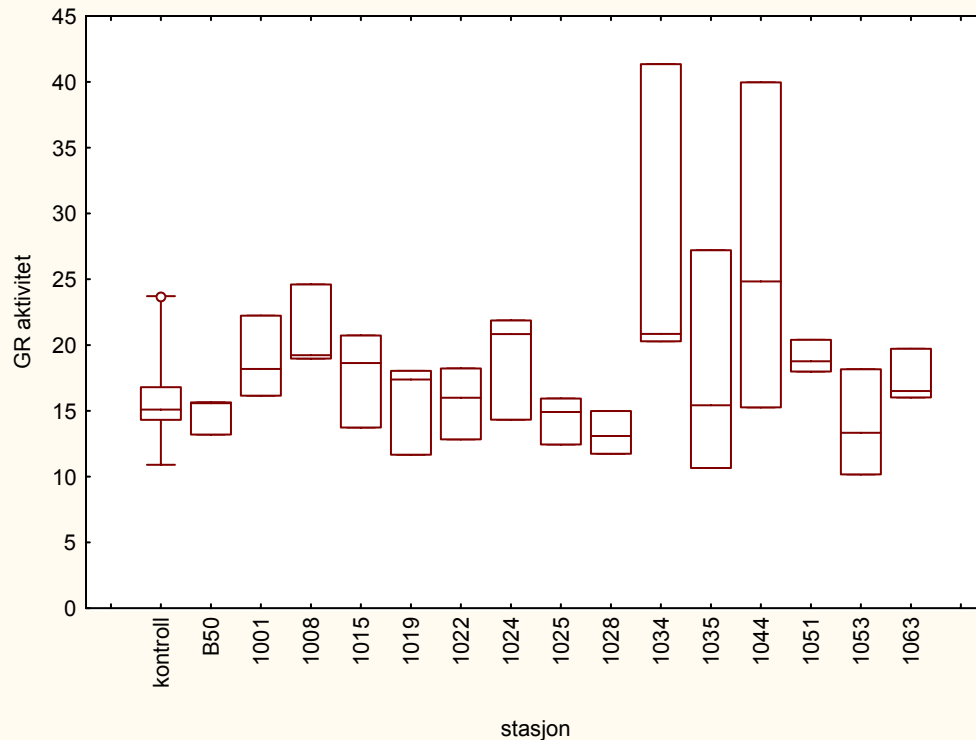
I vev fra tarm var det lav glutatation reduktase aktivitet i kontrollen. Flere av stasjonene hadde høye verdier. I stasjon 1015 var verdien relativt høy, men mengde glutatation reduktase fra vev fra tarm var ikke signifikant forskjellig mellom de ulike stasjonene, heller ikke ved log transformering av parametrene. Enveis ANOVA ga en $p=0,394$. (Figur 3.10.)



Figur 3.10. Mengde glutation reductase fra vev fra tarm mot stasjon, median og kvartiler. GR aktivitet er oppgitt i GR (nmol/min/mg protein) (n = 3 for hvert sediment, n=9 for kontroll).

Epidermis uten børster

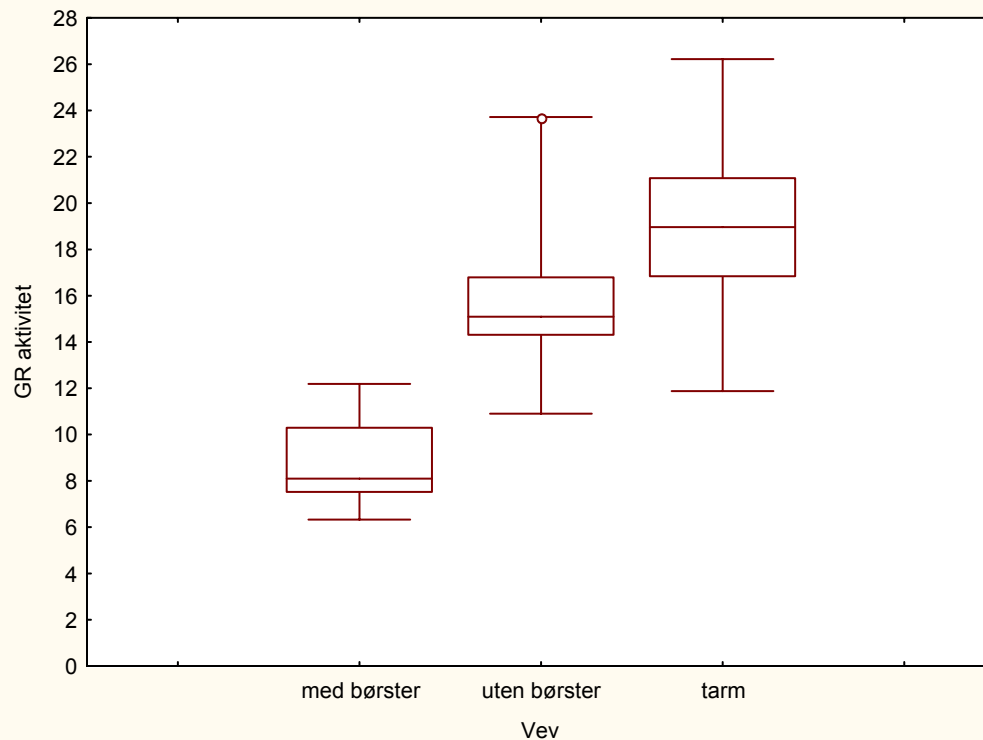
I børstemarkens vev uten børster var det også lav GR aktivitet i kontrollen. Noen av stasjonene hadde helt klart en høyere aktivitet, men i epidermis uten børster var det ingen signifikant forskjell mellom stasjonene. En enveis ANOVA ga en $p=0,0571$.(Figur 3.11.).



Figur 3.11. Mengde glutation reductase fra vev uten børster mot stasjon, median, kvartiler og ekstremer (*). GR aktivitet er oppgitt i GR (nmol/min/mg protein) (n = 3 for hvert sediment, n=9 for kontroll).

Glutation reductase aktivitet i fjæremark

Hos individene fra kontroll sedimentet var det en klar forskjell i mengde glutation reductase mellom de ulike vevene (Figur 3.12.). Det var høyest nivå i vev fra tarm, og minst i epidermis med børster. Det var en signifikant forskjell mellom de ulike vevene. En enveis ANOVA ga en $p=0,000009$.

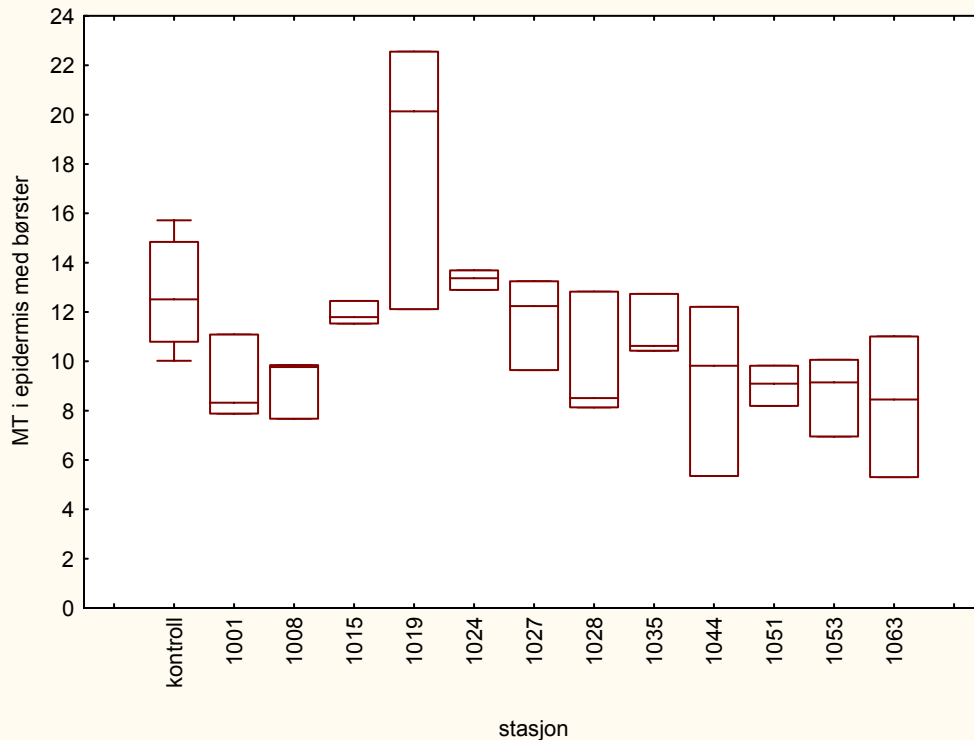


Figur 3.12. Glutation reduktase fra ulike vev mot hverandre, median og kvartiler. GR aktivitet er oppgitt i GR (nmol/min/mg protein)(n=9 for hvert sediment).

3.3.2 Metallotionein

Epidermis med børster

Resultatene viste store forskjeller mellom de ulike stasjonene når det gjaldt metallotionein mengden. MT konsentrasjonen i kontrollen var lav, og høy i stasjon 1019 (figur 3.13). Det var signifikant forskjell mellom de ulike stasjonene fra epidermis med børster for MT. En enveis ANOVA ga $p=0,005$. Ved en ANOVA ettertest av parametrene var det signifikant forskjell mellom stasjon 1019 og 1001, 1008, 1028, 1035 1044, 1052, 1053 og 1063 (Tukey, $p=0,05$).



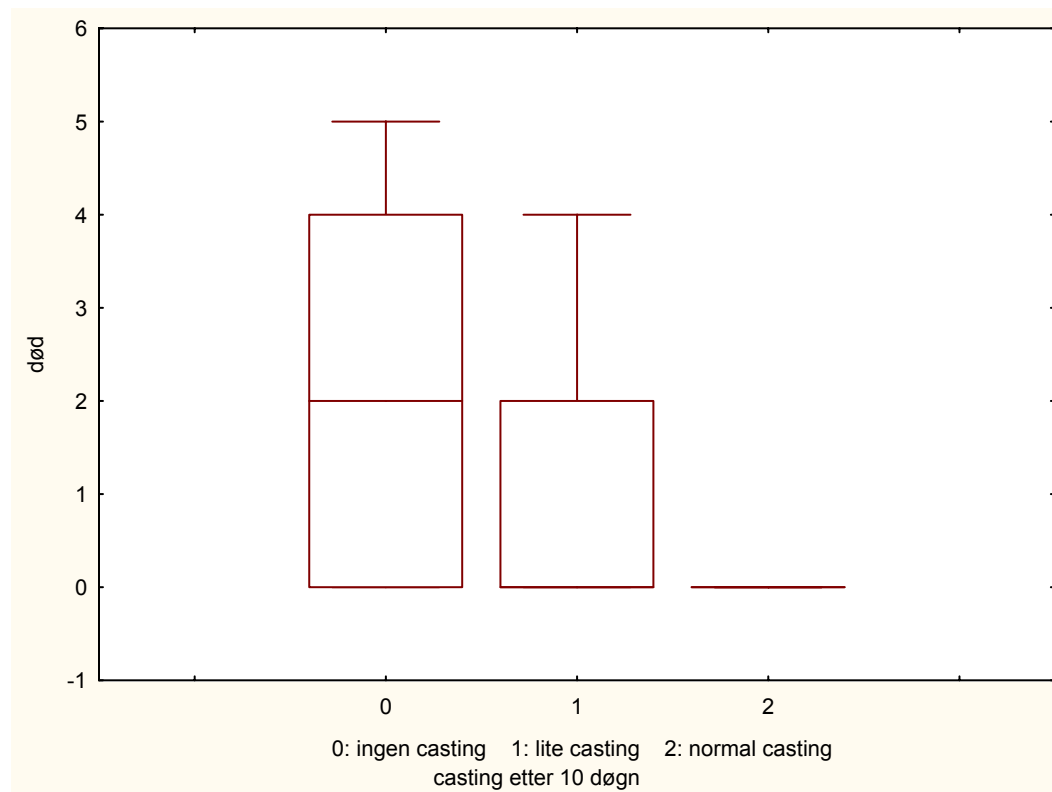
Figur 3.13. Metallotionein fra vev med børster mot stasjon, median og kvartiler; verdiene er oppgitt i µg MT/mg protein (n = 3 for hvert sediment, n=9 for kontroll).

3.4 Sammenhenger mellom ulike responser

Det ble valgt å se på ulike sammenhenger mellom de ulike responsene. De ulike miljøgiftene ble kategorisert og sammenhengen mellom disse og de ulike biomarkørene ble undersøkt. Alle parametere ble testet mot hverandre, men kun de som ga et fornuftig resultat ble presentert. Det ble valgt ut SUM 16 EPA mot glutation reduktase da vi forventet at høye konsentrasjoner av PAH vil påvirke GR aktiviteten. De ulike vevene ble undersøkt separat. Vi forventet også at høye PCB verdier ville gi utslag på GR aktiviteten. Sammenhengen mellom PCB over grenseverdi og GR aktivitet ble undersøkt for de ulike vevene. Sammenhengen mellom metallkonsentrasjonen og metallotionein fra epidermis med børster ble også testet. Det ble også undersøkt om det var sammenhenger mellom kategoriserte miljøgifter og ulike endepunkter.

3.4.1 Fødeinntak mot død

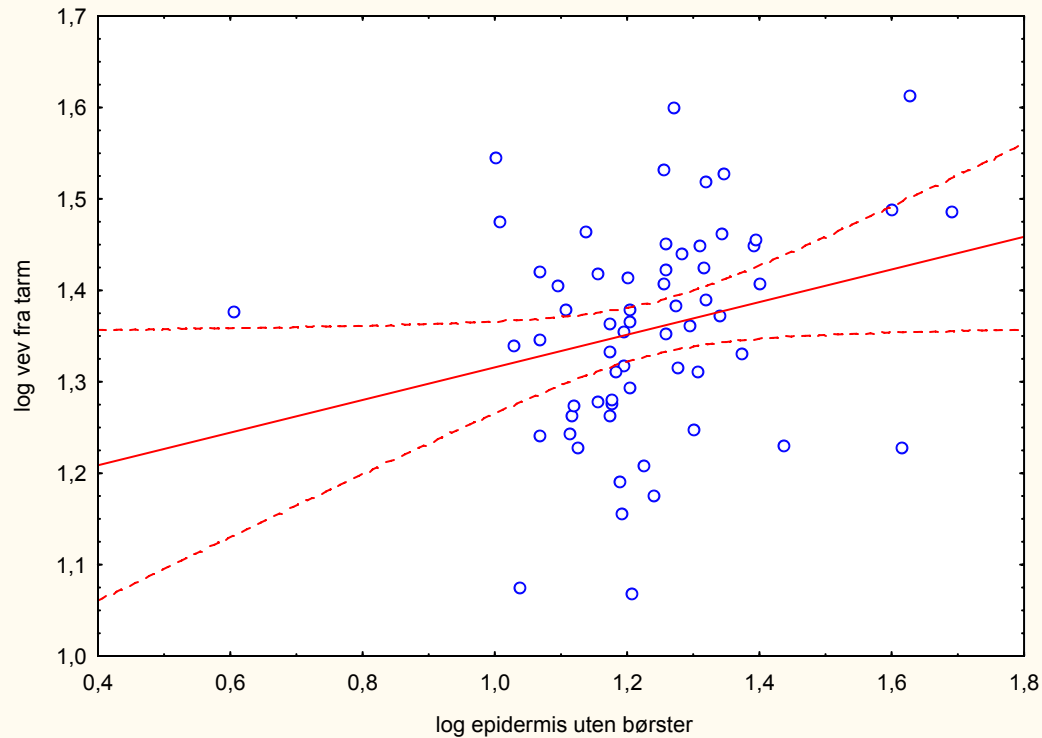
Det var en klar sammenheng mellom fødeinntak og dødelighet. Ved normalt fødeinntak var det ingen dødelighet, mens ved et redusert eller fraværende fødeinntak var dødeligheten økt. Det var signifikant forskjell mellom fødeinntak rate og dødeligheten etter 10 døgn (KW-H, $p = 0,0036$) (Figur: 3.14).



Figur 3.14 Antall døde fjæremark mot mengde fødeinntak ved 10 døgn, median og kvartiler. Det var ingen døde ved ingen synlig boks (n=7 for normal fødeinntak, n=28 for lite fødeinntak, n=45 for ingen fødeinntak).

3.4.2 Sammenhenger mellom GR aktivitet i ulike vev

Det var en signifikant korrelasjon mellom GR aktiviteten fra epidermis uten børster og vev fra tarmsystemet $p=0,026$. Ved en regresjonsanalyse fikk man en korrelasjon, $p= 0,0449$ og en $r=0,0497$ (Figur 3.15.). Det var ingen sammenheng mellom GR i epidermis med børster og de andre vevene.

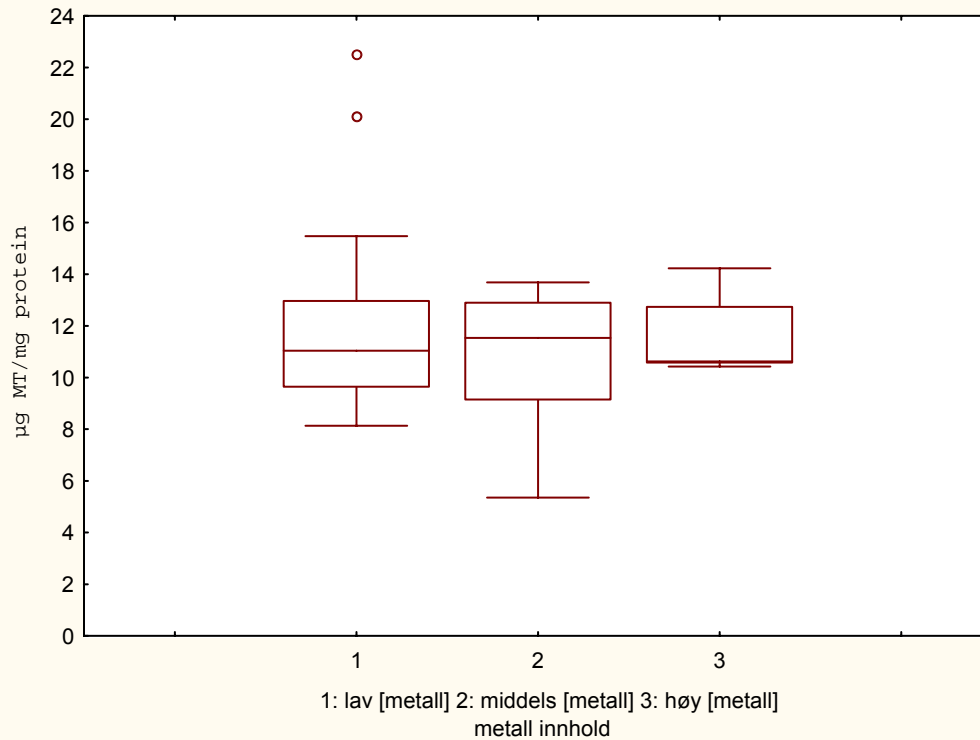


Figur 3.15. Lineær regresjon mellom GR aktivitet fra epidermis uten børster og vev fra tarmsystemet (n=64 for log epidermis uten børster og vev fra tarm).

3.4.3 Sammenhenger mellom effekter og miljøgifter eller miljøfaktorer

Metallotionein

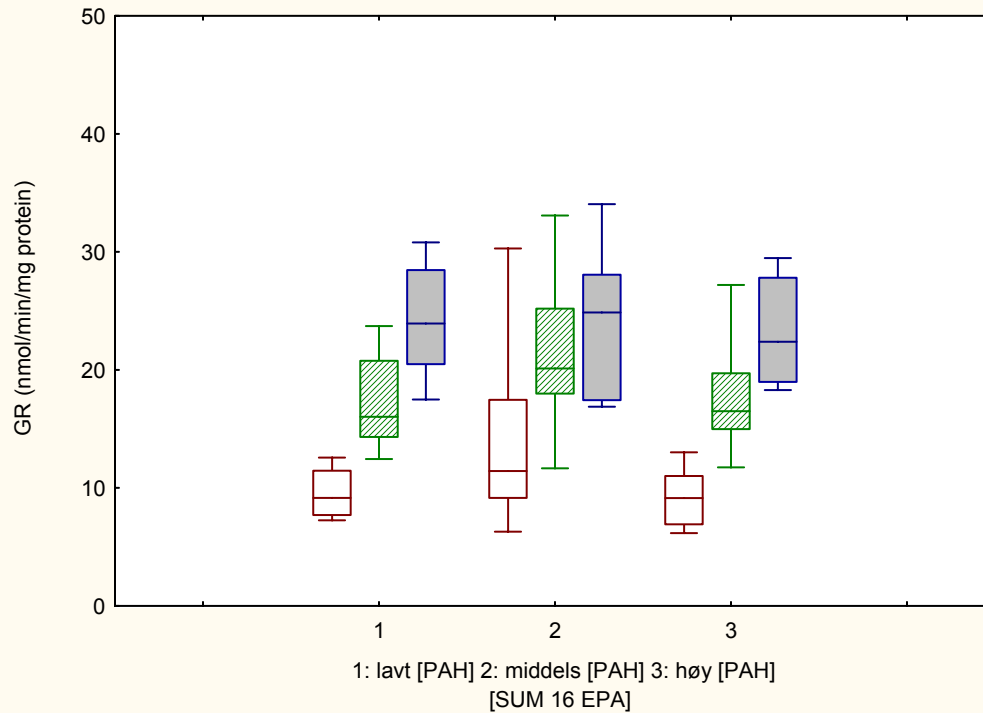
Det var ingen sammenheng mellom metall konsentrasjon (Cd, Cu, Hg og Pb) i sediment og mengde metallotionein i epidermis med børster (KW-H, $p = 0,9133$)(Figur 3.16). Metall konsentrasjonen var klassifisert etter SFT klassifiseringssystem: 1: Lav (ingen over klasse II), 2: Middels (1 av metallene over klasse II), 3: Høy (tre eller fire over klasse II).



Figur 3.16 Mengde metallotionein i vev fra børster mot metall innhold i sediment, median, kvartiler og outlier (n=43 for lavt [metall], n=24 for middels [metall], n=6 for høy [metall]).

Sum 16 EPA mot glutation reduktase aktiviteten i de ulike epidermis.

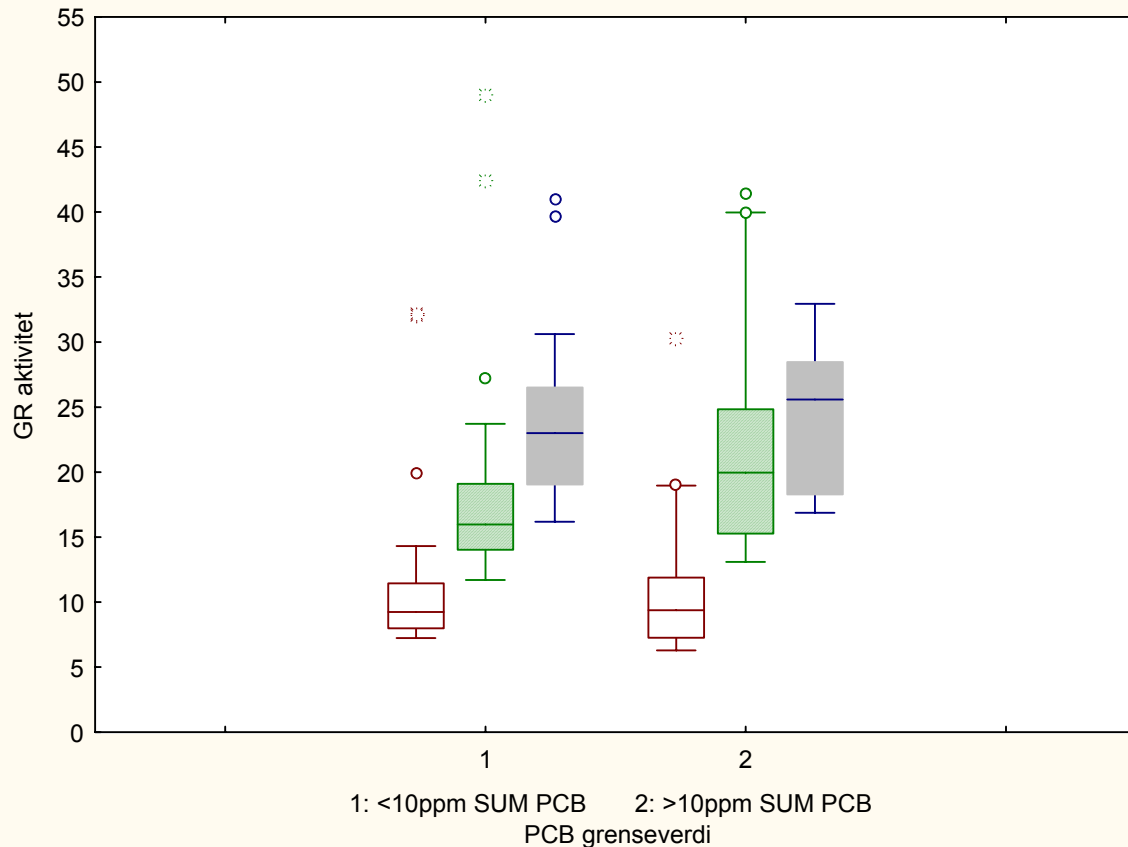
De kategoriserte PAHene ga ingen forhøyede verdier i høy konsentrasjon. Alle kategoriene hadde omtrent de samme verdiene. Det var ingen signifikante forskjeller mellom de ulike PAH konsentrasjonene i sedimentet og GR aktiviteten (Figur: 3.17.). GR i epidermis med børster: KW-H, $p = 0,1042$; GR i epidermis uten børster: KW-H, $p = 0,1967$; GR fra tarmsystemet: KW-H, $p = 0,8761$.



Figur 3.17. Aktivitet glutation reduktase fra ulike vev, mot ulike kategorier sum 16 EPA, median og kvartiler. Åpne bokser: GR aktivitet i epidermis med børster; skraverte bokser: GR aktivitet i epidermis uten børster; helfargede bokser: vev fra tarmsystemet (n=32 for hvert vev lav [PAH], n=14 for hvert vev middels [PAH], n=14 for hvert vev høy [PAH]).

PCB grenseverdi mot glutation reduktase aktivitet i ulike epidermis.

PCB konsentrasjon over og under grenseverdi ga ingen forhøyede verdier av GR aktivitet i over grenseverdi.. Begge kategoriene hadde omtrent de samme verdiene. Det var ingen signifikante forskjeller mellom de ulike kategoriene for GR aktivitet i ulike epidermis (Figur: 3.18.). GR i epidermis med børster: KW-H, p = 0,7900; GR i epidermis uten børster: KW-H, p = 0,0870; GR fra tarmsystemet: KW-H, p = 0,8195.

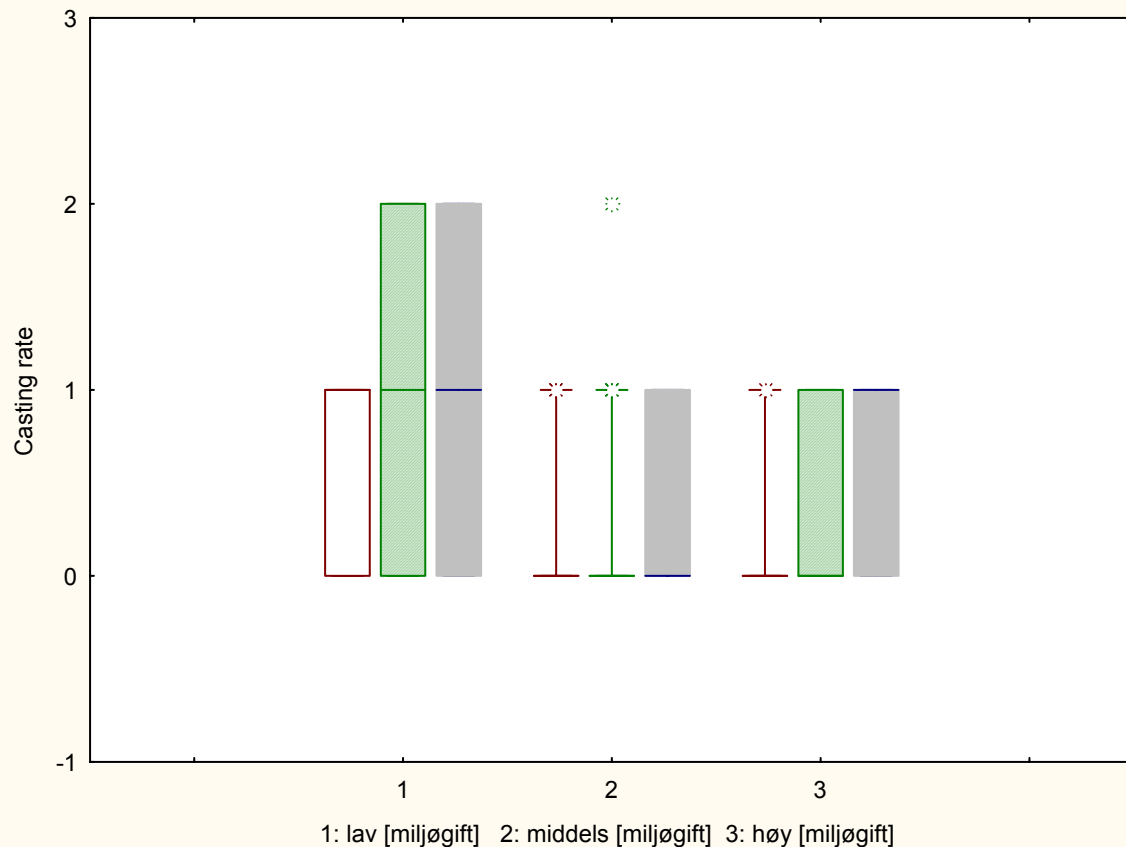


Figur 3.18. Glutation reduktase aktivitet fra ulike vev, mot over eller under grenseverdi for PCB, median, kvartiler, outliere og ekstremer (*). Åpne bokser: GR aktivitet i epidermis med børster; skraverte bokser: GR aktivitet i epidermis uten børster; helfargede bokser: vev fra tarmsystemet. (n=44 for hvert vev <10ppm SUM PCB, n=13 for hvert vev >10ppm SUM PCB).

Kategorisert miljøgifter i sediment mot ulike endepunkt

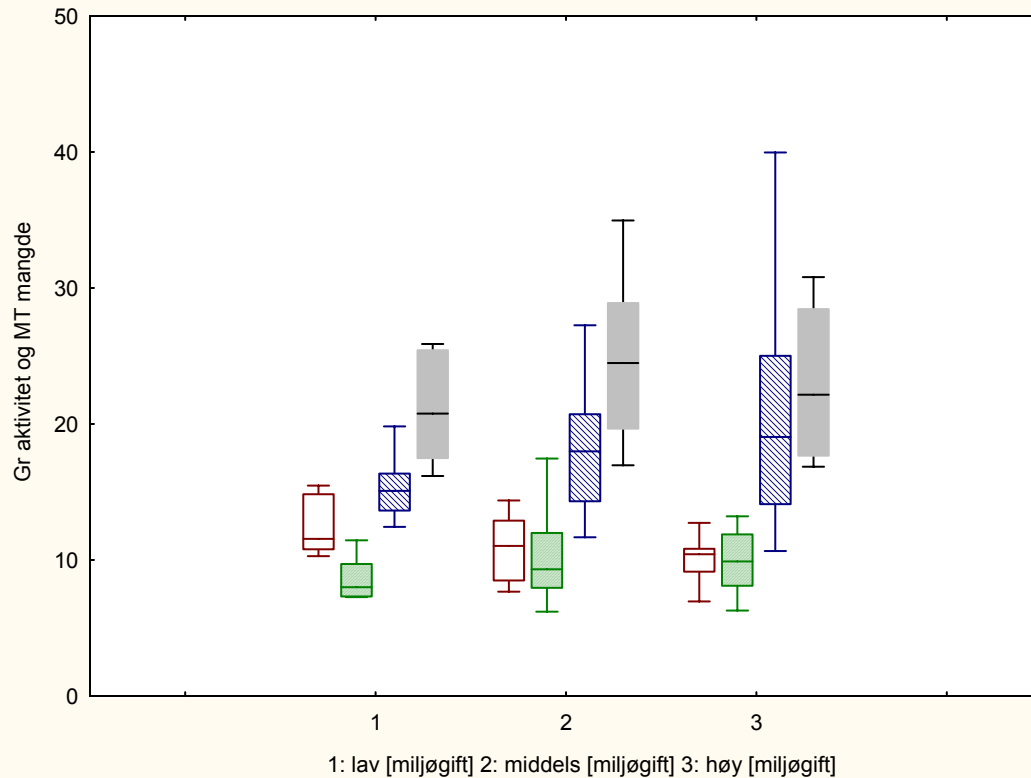
Det ble valgt å sette opp de ulike miljøgiftkategoriene mot fødeinntak og de ulike biomarkørene. Vi forventet at fødeinntaket skulle bli redusert, og at de ulike biomarkørene skulle ha en høyere aktivitet/mengde ved høy miljøgift konsentrasjon.

I kategorien høy [miljøgift] ble det observert lavere fødeinntak enn i kategorien lav [miljøgift]. Det var signifikant forskjell mellom de ulike miljøgiftkonsentrasjons kategorier og mengde fødeinntak ved de ulike døgnene. 1 døgn: KW-H, $p = 0,0005$, 3 døgn: KW-H, $p = 0,0043$, 10 døgn: KW-H, $p = 0,0102$ (Figur 3.19.).



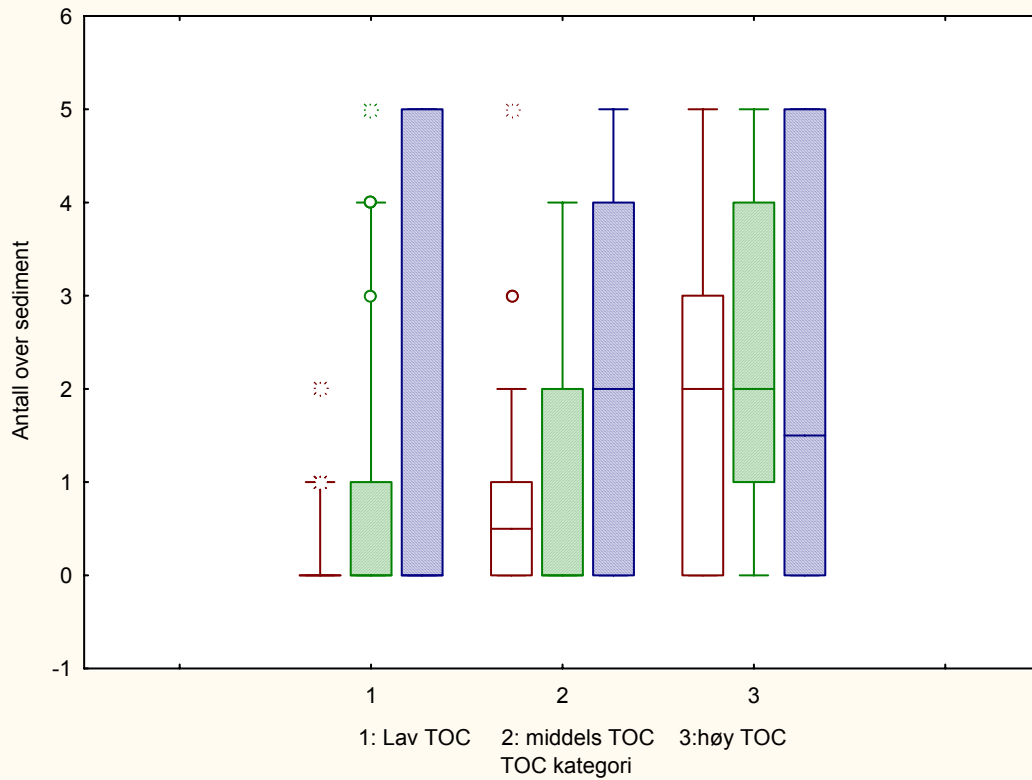
Figur 3.19. Fødeinntak rate ved ulike døgn mot kategorisert miljøgift mengde. Åpne bokser: fødeinntak rate etter 1 døgn; skraverte bokser: fødeinntak rate etter 3 døgn; helfargede bokser: fødeinntak rate etter 10 dager, median og kvartiler. Ingen synlig boks tilsier ingen fødeinntak. (n=15 for hvert døgn lav [miljøgift]), n=48 for hvert døgn middels [miljøgift], n=18 for hvert døgn høy [miljøgift]).

Det var ingen sammenheng mellom de kategoriserte miljøgiftene og de ulike biomarkørene. Verken metallotionein eller glutation reduktase fra de ulike vevene var signifikant forskjellige mellom de ulike kategoriene. Metallotionein fra epidermis med børster KW-H, $p = 0,0736$; GR fra epidermis med børster: KW-H, $p = 0,2857$; GR fra epidermis uten børster: KW-H, $p = 0,2323$; GR fra vev fra tarmsystemet: KW-H, $p = 0,0680$ (Figur 3.20.).



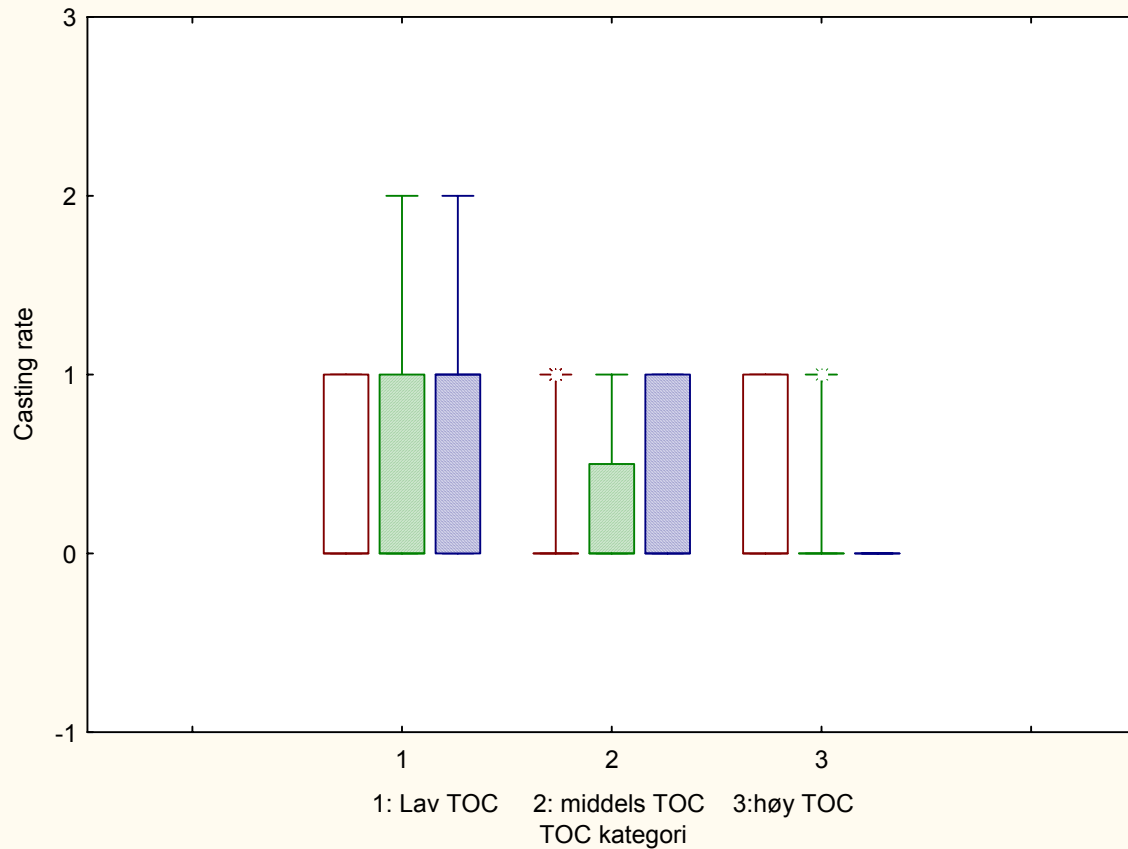
Figur 3.20. Glutation reduktase aktivitet og metallotionein mengde mot kategorisert miljøgift, median og kvartiler. Åpne bokser: metallotionein fra epidermis med børster; skraverde grønne bokser: GR aktivitet fra epidermis med børster; skraverde blå bokser: GR aktivitet fra epidermis uten børster; helfargede bokser: GR aktivitet fra vev fra tarm (n=12 for hvert vev lav [miljøgift], n=42 for hvert vev middels [miljøgift], n=16 for hvert vev høy [miljøgift]).

Total organisk karbon ble klassifisert som lav: 0-5 mg/g, middels: 5-20mg/g og høy >20mg/g. Kontrollen befant seg kategorien lav. Det ble observert flere individer over sedimentet ved høy total organisk karbon enn ved lav. Det var signifikant samsvar mellom nedgravingsadferd og organisk karbon mengde ved 1 døgn KW-H, $p = 0,0061$ og ved 3 døgn KW-H, $p = 0,0449$. Ved 10 dager var det ikke signifikant forskjell KW-H, $p = 0,7468$ (Figur 3.21.).



Figur 3.21. Nedgravingsadferd ved ulike døgn mot kategorisert total organisk karbon mengde, median og kvartiler. Åpne bokser: Nedgravd etter 1 døgn; skraverete bokser: nedgravd etter 3 døgn; helfargede bokser: nedgravd etter 10 døgn. (n=30 for alle døgn lav TOC, n=26 for alle døgn middels TOC, n=6 for alle døgn høy TOC).

Det ble observert et lavere fødeinntak i kategorien høy TOC enn i kategorien lav TOC. Det var ingen signifikante forskjeller mellom fødeinntak ved 1 og 3 dager, mot det totale organiske karbon mengden. Ved 10 dager var det en KW-H, $p = 0,0372$ (Figur 3.22.).



Figur 3.22. Fødeinntak rate ved ulike døgn mot kategorisert total organisk karbon mengde, median og kvartil. Ingen synlig boks tilsier ingen fødeinntak. Åpne bokser: fødeinntak etter 1 døgn; skraverte bokser: fødeinntak etter 3 døgn; helfargede bokser; fødeinntak etter 10 døgn. (n=30 for alle døgn lav TOC, n=26 for alle døgn middels TOC, n=6 for alle døgn høy TOC).

4. Diskusjon

4.1 Adferd og dødelighet

Arenicola marina hadde unormal nedgravingsadferd i sediment fra alle stasjonene i Tromsø havn sammenlignet med kontrollen. Det var signifikant forskjell mellom stasjonene ved alle registreringene. Stasjon 1052 og st.44 var fire eller flere fjæremarker over ved alle registrerings tidspunktene. Det var en økning i antall over ved 3 døgn og 10 døgn enn etter 1 døgn. Kun i kontrollen befant alle seg nedgravd etter 28 dager.

Både innholdet av organisk karbon, partikkel størrelse og ulike miljøgifter kan være faktorer som influerer børstemarken til å holde seg over sedimentet. *Arenicola marina* vil normalt ikke leve i sediment med gjennomsnittlig partikkelstørrelse på $<80 \mu\text{m}$ og $>200 \mu\text{m}$ fordi den ikke greier å fordøye så små eller store partikler (Hardege 1998). Ved høye konsentrasjoner av Cu, Cd og Zn er det vist at børstemarken forlater sedimentet (Bat 1998). Ved en sedimentkonsentrasjon på $100 > \mu\text{g/g}$ drivstoff olje vil marken prøve å finne et nytt habitat ved å forlate sedimentet (Prouse 1976). Dette muliggjør predasjon i det naturlige miljø. Andre miljøgiftfaktorer kan også ha hatt en innvirkning på denne adferden.

I stasjonene 1001, 1019, 1024 var over 90% av partiklene $>63 \mu\text{m}$, her var 1 eller flere marker over ved 3 og 10 døgn. Stasjonene inneholdt lavt totalt organisk karbon. Dette stemmer bra ut i fra det man vet om *Arenicola marinas* normale adferd. Stasjon 1008, 1047, 1044 og 1052 inneholdt høye konsentrasjoner av kobber og flere av børstemarkene befant seg utenfor sedimentet. Som nevnt over vil *Arenicola marina* kunne rømme sedimentet ved høye metall konsentrasjoner. Resultatene fra nedgravingsadferden vil igjen påvirke fødeinntaket.

Arenicola marina hadde et tilnærmet normalt fødeinntak i kontrollen, mens det var klart redusert fødeinntak i stasjonene: 1001, 1003, 1004, 1008, 1015, 1025, 1026, 1047 og 1052. Det var signifikant forskjell mellom de ulike stasjonene ved alle registreringspunktene. Normalt vil børstemarken starte næringsopptaket straks den er gravd ned og holde den på et jevnt nivå.

Det er flere faktorer som kan påvirke unormalt fødeinntak. Et viktig punkt er: Børstemarken som ikke befinner seg i sedimentet (av ulike årsaker) tar ikke opp føde, ergo ingen fødeinntak. Som nevnt over vil flerbørstemarkens adferd blant annet bli hemmet av grovt sediment, da partikler >2 mm ikke blir festet til proboscis papillae og derfor ikke blir fordøyd (Zebe 1996; Riisgård 1998). Stasjon 1001, 1019 og 1024 hadde grovt sediment, og fjæremarken hadde også et lavt fødeinntak i disse sedimentene. Mengde tilgjengelig mikroorganismer (bakterier), meiofauna og bentiske kiselalger vil også påvirke fødeopptaket, da dette er hovednæringskilden (Retraubun 1996). Dette er noe vi ikke hadde kontroll over i forsøket, men siden sedimentet hadde vært frosset vil det ikke være levende organismer i det. Marken kan også ta opp løst organisk materiale som fettsyrer gjennom kroppsveggen (Zebe 1996), men denne faktoren vil ikke påvirke mengde fødeinntak i stor grad. I stasjonene med flere individer over sedimentet, var fødeinntaket lavt eller fraværende. I stasjon 1019 og 1027 var flere av individene over, men de som var nedgravd hadde et tilsynelatende lavt fødeinntak. Dette kan skyldes ulik toleranse blant individene for de ulike miljøgiftene som sedimentet var kontaminert med og/eller det lave innholdet av organisk karbon og partikkelsammensetningen.

Arenicola marina er relativt tolerant for lave oksygen konsentrasjoner og den kan ha anaerobisk respirasjon (Zebe 1996). Arten har i laboratorietester vist seg å overleve i 90 timer ved 10 mmol/l sulfid (Zebe 1996). Noen av stasjonene hadde en sterk H₂S lukt, noe som kan tyde på at det var anaerobiske forhold i sedimentet. Selv om alle akvariene hadde kontinuerlig vanngjennomstrømning, vil det kunne bli dannet anaerobiske tilstander i tunnelen rundt marken av kjemoautotrofe bakterier (Zebe 1996).

Det var en signifikant forskjell mellom dødelighet på de ulike stasjonene. Det var økt dødelighet for børstemark som ble holdt i sediment fra stasjon 1004, 1026, 1027, 1047 og 1052. Det ble også observert dødelighet i det ene kontroll akvariet (av tre). Disse stasjonene var av ulik grad påvirket av miljøgifter. Stasjon 1047 inneholdt mye kobber (98,9 ppm.), *Arenicola marina* har en LC₅₀ på 20 µg Cu/g (Bat 1998), stasjonen inneholdt også tributyltinn (TBT) i en konsentrasjon på 730 ppm. Stasjonene 1004, 1026, 1027 og 1052 inneholdt lave verdier av alle metallene som var testet, samt lave verdier av PAHer. Dødeligheten her kan skyldes den lave total organisk karbon konsentrasjonen (1004, 1026, 1027). Fjæremarken er generelt robust ovenfor metaller og

hydrokarboner og vi forventet ikke å få høy dødelighet. Da dette inntraff, kan det antakelig tilskrives de ulike miljøgiftene (Cd, Cu, Pb og PAH), børstemarkens tilstand og/eller sedimentets sammensetning (grovt sediment og lav TOC).

Corophium volutator testen ble som nevnt under material og metode kun utført på noen av sedimentene da innsamling av flere individer ikke lot seg gjennomføre. For de sedimentene der testen ble gjennomført var det forskjellig adferd. I kontrollen befant alle seg nedgravd, som er dens naturlige adferd. Det var signifikant forskjell mellom stasjonene. I stasjon st.44, 1034, 1035, 1044, 1047, 1051 og 1052 var flere av individene enten på overflaten eller i vannmassen. I stasjon 1052 var sedimentet grovt og de mindre amfipodene hadde problemer med å komme ned i massen, men i de andre stasjonene kunne det tyde på at de ulike miljøgiftene påvirket adferden.

Feltundersøkelser har beskrevet *Corophium volutator* som en art med lav mobilitet og den reiser kun over korte avstander, generelt krabber den heller en å svømme over sedimentet for å hindre predasjon. *C. volutator* har en LC_{50} for kobber på 37 $\mu\text{g/g}$ (Bat 1998). Brils (2002) foreslo at lette fraksjoner (C10-C19) av olje er mer toksisk for amfipoden enn tyngre fraksjoner (C19-C40), og 0,1 g/kg av de lette fraksjonene var ga en høy mortalitet, mens 9 g/kg av de tyngre ga samme mortalitet.

Stasjon 1034, 1035 og 1047 inneholdt alle høye verdier av PAH. Dette kan ha påvirket adferden, men konsentrasjonen var tydeligvis ikke høy nok til å influere dødeligheten i noen særlig grad. Den unormale adferden kan også være en faktor som vil spille inn på dødeligheten i det naturlige miljø, da predasjon vil forekomme. Den eneste stasjonen med like mange døde som kontrollen var 1044, dette kan komme av den høye konsentrasjonen av bly (2340 ppm.). Stasjon 1047 hadde en konsentrasjon på 98,9 ppm. Cu, men det var ingen stor effekt på individene, kun to døde. Som nevnt over var det like mange døde i kontrollen som i stasjonen med høyest dødelighet 1044. Dødeligheten i kontrollen kan ha skjedd under utsiling av individene, organismen er følsom for mekanisk stress og det skal ikke mye til før den dør.

4.2 Subletale responser

4.2.1 Effekter av PAH og PCB på GR aktivitet

Det var store variasjoner mellom de ulike stasjonene for glutation reduktase aktivitet. Vi forventet å finne høyere GR aktivitet i sediment med høy PAH og PCB konsentrasjon. Det var tatt GR målinger fra alle stasjoner på de ulike vevene, men noen av stasjonene ble utelatt i statistikken på grunn av for få målinger. Da man ville fått store unøyaktigheter i resultatene. Stasjon 1031, 1034, 1035, 1047 og 1053 inneholdt alle høye konsentrasjoner av PAH. Og stasjon 1001, 1028, 1034, 1044 og 1047 var alle over grenseverdien på 10ppm SUM PCB. Stasjoner med tilsynelatende forhøyd GR aktivitet i et eller flere av vevene var: A50, 1001, 1008, 1015, 1024, 1034, 1035, 1044, 1051 og 1063. Stasjon 1001 hadde forhøyede GR verdier fra alle vevene. Det var signifikante forskjeller mellom stasjonene og GR aktiviteten fra epidermis med børster.

Arenicola marina blir eksponert for de ulike miljøgiftene fra flere hold. Det er blant annet vist i tidligere forsøk at fordøyelsessystemet kan være hovedveien til opptak av lipofile stoffer (Fowler 1978; Landrum 1983; Landrum 1989), mens andre opptak er additive (Jarvinen 1978). Opptak over epidermis gjennom porevannet er blitt foreslått som en annen kilde til opptak (Kaag 1996). Sedimentets partikkelsammensetning og organiske karboninnhold vil også ha en innvirkning på opptaket. Lipofile miljøgifter er for det mest bundet opp i organisk materiale og finere fraksjoner i sedimentet, og det er disse fraksjonene som blir fortært av fjæremarken (Lee 1990; Harkey 1994). Det er blitt foreslått at svært hydrofobe PAHer, som benzo[a] pyrene er stekt assosiert til små partikler, og blir tatt opp i tarmen. Mens naftalen, som er mer hydrofil går over epidermis fra porevannet rundt marken (Lyes 1979; Landrum 1989; Weston 1990).

Akkumulering av ulike PAH og PCB er relatert til økningen av log K_{ow} til ca 5-6 og ulike kongener, over dette vil opptaket reduseres (Oliver 1984; Oliver 1987; Landrum 1989). Pyrene som har en log K_{ow} på 5,18 og vil bli akkumulert rask. Den vil også oppnå en likevekt med miljøet i løpet av 4-5 dager. *Arenicola marina* har også evnen til å redusere mengden pyrene ved å skille det ut (Christensen 2002). Også andre studier viser metabolisme av PAH (Payne 1979; Christensen 2002; Giessinga 2003). Weston (1990) fant en økning i akkumuleringen av benzo[a]pyrene i børstemarken, *Abarenicola pacifica*, holdt i sediment med lavt organisk karbon

innhold (<1%), som han tilegnet det økte fødeinntaket. Lake (1990) fant også en lavere akkumulerings faktor i sediment med høyt organisk innhold. Dette kan ha hatt en innvirkning på PAH opptaket, selv om Cadée (1976) viste at fødeinntaket til *A. marina* økte med økt mattilgang.

Vi forventet å finne de høyeste verdiene av GR aktivitet i tarmsystemet, da antioksidantforsvarssystem har sitt hovedsete i leveren. Vev fra tarm var signifikant høyere en epidermis med og uten børster. Dette kan også si noe om at fjæremarken tar opp de fleste lipofile-stoffene gjennom fordøyelsen og ikke over epidermis. Både høy PCB og PAH konsentrasjon hadde en tilsynelatende innvirkning på GR aktiviteten. Stasjon 1001 lå over grenseverdien for PCB og hadde forholdsvis høye GR verdier i alle vevene. Stasjon 1034 og 1035 hadde begge høy PAH konsentrasjon, her var det tilsynelatende høy aktivitet av GR. Stasjon 1044 som lå over grenseverdi for PCB hadde også en forhøyet aktivitet av glutation reduktase. Det er åpenbart faktorer som påvirker GR i fjæremark som ikke ble undersøkt her.

4.2.2 Effekter av metaller

Nivåene av metallotionein var signifikant forskjellige. Men det var kun forhøyet mengde i stasjon 1019. Ingen av stasjonen var signifikant forskjellig fra kontrollen (Tukey, $p > 0,05$). Stasjon 1019 hadde det høyeste nivået og hadde en median på 20 $\mu\text{g MT/mg protein}$. Den var som nevnt i resultat kapitlet signifikant høyere en stasjon: 1001, 1008, 1028, 1035 1044, 1052, 1053 og 1063.

Toksisiteten til ulike tungmetaller avhenger av ulike faktorer når de er i løsning: metallens form i løsning; organisk, uorganisk; tilstedeværelse av andre metaller eller gifter; antagonisme, ingen interaksjon, synergisme; organismens kondisjon; livs stadium, alder og størrelse, aktivitet osv. (Johnston 1976). Det er vist at opptaket av metaller i infauna kan skje både ved fødeinntak og over epidermis (nevnt over). Konsentrasjonen av et metall i organismen vil ofte korrelere med mengden metall i sedimentet, men andre metaller kan påvirke opptaket (Bryan 1974). Luoma (1978) viste at opptaket av bly var negativt korrelert ved interaksjon med jern. De kom også fram til at den geokjemiske karakteren til sedimentet vil spille en stor rolle for opptaket. Kobber er vist å være det mest skadelige metallet for *Arenicola marina*, mer skadelig en både kadmium og sink (Bat 1998).

Induksjon av metallbindende proteiner i vev fra pattedyr, følger ofte eksponeringsgraden av de ulike metallene Cu, Zn, og Cd. Det er også vist i flere forsøk på innvertebrater at de ulike metallene (nevnt over) gir en induksjon av metallotioneiner (Amiard 2005). Selv om man skal være forsiktig med å trekke konklusjoner mellom arter har den Cd resistente anneliden *Limnodrilus hoffmeisteri* vist å akkumulere Cd, Cr og Ni og indusere metallotionein-like proteiner og metall rike granuler for Cd lagring og detoksifisering, mens ikke resistente marker bare produserte MT (Wallace 1998). Flere forsøk har gitt indikasjoner på at fordøyelsessystemet har det høyeste nivået av MT i bløtdyr (Cosson 2000), men i ulike tilfeller kan det være mer interessant å se på epidermis grunnet opplagring av metaller i dette vevet (Amiard 1998; Geffard 2002b).

I stasjon 1019 var det klare indikasjoner på at metaller hadde hatt en innvirkning, dog stasjonen ikke hadde de høyeste konsentrasjonene av de ulike metallene. Interaksjonen mellom de ulike metallene og sediment sammensetningen kan ha spilt inn på dette resultatet. Det var en meget stor konsentrasjon av bly i stasjon 1044, men dette hadde ingen effekt på MT verdien, som lå på samme nivå som kontrollen. Dette passer også godt med tidligere forsøk, Rainlet (1998) fant ingen induksjon av MT i *Corbicula fluminea*s myk vev ved bly konsentrasjoner på 160, 640 g l⁻¹. I sediment fra stasjon 1051 var det relativt høye konsentrasjoner av både bly og kobber, dette ga også utslag på MT verdiene.

4.3 Samvariasjon

Fødeinntaket etter 10 dager hadde en signifikant sammenheng med dødeligheten. I stasjoner med lav eller ingen fødeinntak var det en høyere dødelighet enn i stasjoner med normal fødeinntak. Dette var som forventet, da normal fødeinntak fører til næringsopptak og overlevelse. Det var også en signifikant forskjell mellom de ulike toksisitetsskategoriene og fødeinntaket. Andre faktorer kan også spille inn på dødeligheten (nevnt over).

Epidermis uten børster og vev fra tarmsystemet hadde en svak positiv korrelasjon for glutation reductase aktiviteten. Dette kan forklares ved at responsen ikke er vevspesifikk, men påvirker begge vev.

4.4 Responser i forhold til miljøgift-nivå i sediment

Det var ingen signifikant sammenheng mellom de kategoriserte metall konsentrasjonene og mengde MT induert i epidermis med børster. I høy metall konsentrasjon var det ingen verdier under 10 µg MT/mg protein og ingen over 15 µg MT/mg protein. En av grunnene til dette kan være at ingen av stasjonene hadde et veldig høyt metall innhold. Kun en stasjon inneholdt mye bly, men som nevnt over er ikke bly en god indikator på metallotionein induering. Vi hadde ingen målinger på jernkonsentrasjonen i noen av stasjonene. Hvis denne var høy kan den ha regulert opptaket av bly. Noen av stasjonene hadde et forhøyet kobber og kadmium innhold, men den samlede kategoriseringen av metall mengde plasserte dem under klasse 2 (middels innhold). Vi kan vanskelig si noe sikkert om sammenhengen mellom høyt metallinnhold og metallotionein induering i *Arenicola marina*.

Ved kategorisering av PAH mengden mot glutation reduktase aktiviteten fikk vi ingen signifikant forskjeller mellom de ulike kategoriene. Selv om mengden i høy [PAH] kategori lå høyt (>2500 ppm.), ga dette ingen forskjeller. Det kan ikke gis noen enkel forklaring til dette, da vi fikk forhøyede GR mengder på noen av stasjonene enkeltvis. Geokjemiske faktorer kan ha påvirket opptaket i noen av de mest kontaminerte stasjonene. Opptaket av ulike PAHer er som nevnt over også regulert av log K_{ow} til de ulike stoffene. Noen av stasjonene som hadde et høyt innhold av SUM 16PAH innehadde noen høye verdier av PAHer som lå utenfor 5-6 log K_{ow} . Fluoren som har en log K_{ow} på 4.12 hadde meget høy konsentrasjon i de stasjonene som var kategorisert som høy [PAH]. Dette er ikke nok til å avskrive dette som en miljøtrussel, ved konsentrasjoner over 1000ppm er den klassifisert som meget miljøskadelig (Crunkilton 1997). Dog opptaket av fluoren var sannsynligvis lavere enn blant annet benzo[a]pyrene, benzo[a]anthracen og pyren. Sammenhengen mellom PAH konsentrasjon og GR aktiviteten kan ikke forklares ut ifra dette forsøket. Vi forventet en klarere sammenheng, men det var tilsynelatende ingen direkte forbindelse mellom disse to parametrene.

Det var ingen sammenheng mellom PCB over/under grenseverdi og glutathion reduktase aktiviteten fra de ulike vevene. Det kunne dog se ut som det var en tilsynelatende effekt på epidermis uten børster og vev fra tarmsystemet. Men disse effektene var ikke høye nok til å tilskrives PCB. Det er vist en økning i GR aktivitet hos rotte gitt PCB-supplement i føden (Kamohara 1984), men i muslingen *Perna viridis* ble det ikke funnet noen sammenheng mellom PCB og GR aktivitet (Cheung 2002). Det er vanskelig å gi noen god forklaring til disse resultatene. Det trengs flere forøk på PCB og glutathion reduktase aktiviteten i marine evertebrater, før en kan si noe sikkert om en effekt.

Det var en signifikant sammenheng mellom fødeinntak og den samlede miljøgift konsentrasjonen. Det var et klart lavere inntak av føde i stasjoner med høy miljøgiftkonsentrasjon. Grunner til dette er nevnt over, men marken vil ofte forlate sedimentet ved høyt metall innhold og mye hydrokarboner. Levell (1976) viste at et oljeutslipp (BP1100X) vil kunne gi en reduksjon av fødeinntaket og Alastair (2001) viste at hydrokarbonpåvirket sediment vil kunne gi en reduksjon i fødeinntak. Dette stemmer godt overens med våre funn. Det er også vist at ulike metallkonsentrasjoner vil kunne gi en indirekte lavere/fraværende fødeinntak (Bat 1998). De kategoriserte miljøgiftkonsentrasjonene ga ingen signifikant forskjeller mellom de ulike biomarkørene, dog det syntes å være en tendens for glutathion reduktase aktiviteten.

Den totale mengden organisk karbon ga signifikante utslag på både nedgravings adferd og fødeinntaket. Det var flere individer over sediment ved høy enn ved lav TOC. Som nevnt i resultatkapittelet var kontrollen plassert under lav konsentrasjon, da den hadde lavt innhold av organisk karbon. De ulike miljøgiftene kan ha forårsaket sedimentflukt fra stasjoner med høy TOC (nevnt over). Longbottom og Hayward (1970; 1994) viste at fjæremarkens føde preferanse er ulikt organisk materiale. Våre resultater ga igjen signifikante bevis på at dette stemmer. Vi hadde ikke ukontaminert sediment med høy TOC, ergo kunne ikke denne parameteren la seg bevise. En høy TOC vil imidlertid kunne gi anoksiske forhold og sedimentflukt, men *A. marina* er relativt robust mot dette.

Som nevnt over viste Cadee (1976) at fødeinntaket til *A. marina* økte med økt mattilgang. Fødeinntaket var lavere i sediment med høy total organisk karbon ved 10 døgn. Kontrollen

plassert under lav, da den hadde et innhold på 4,3% TOC. Det var forventet et høyere fødeinntak i høy TOC. Sedimentflukt kan være en av årsakene til at det lave fødeinntaket.

4.5 Økologiske konsekvenser og konsekvenser for risikovurdering av sediment

4.5.1 Økologiske konsekvenser

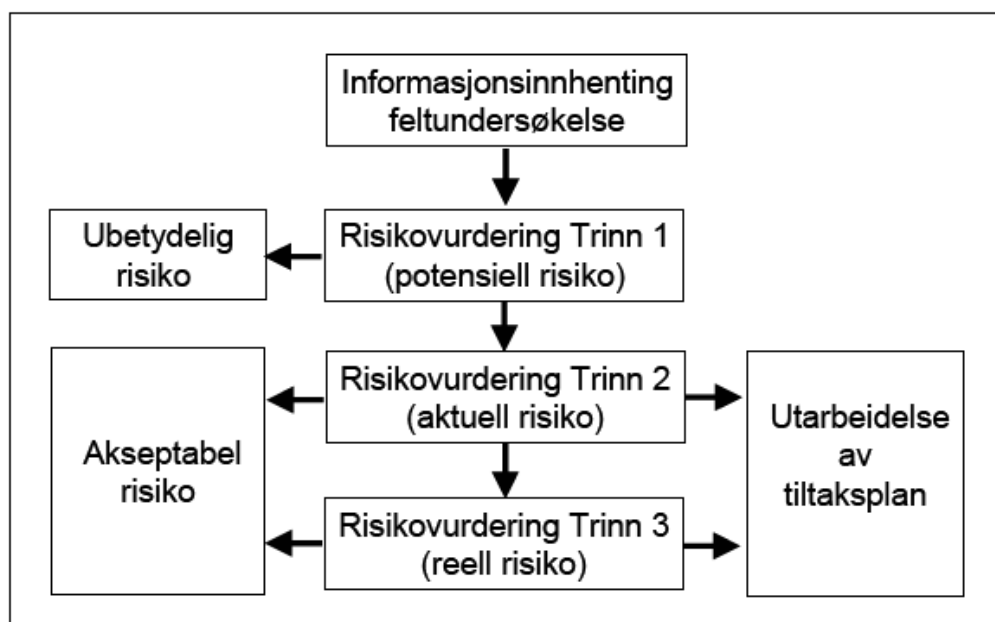
Problemstillingen rundt økologiske konsekvenser for kontaminert sediment er komplisert. Det er mange faktorer som skal taes høyde for. Alle sedimentene fra Tromsøhavn hadde miljøgiftverdier over kontrollsedimentet. Ulike interesseorganisasjoner kan mene at dette er nok til at noe burde gjøres. Et punkt som er viktig å nevne i denne sammenheng er at ulike stoffer finnes naturlig høyt i miljøet. Avrenninger fra ulike bergarter, vulkaner og andre naturlige punktkilder har alltid tilført ulike stoffer til sedimenter også før de antropogene utslippene startet. Men når konsentrasjonene blir så høye at de påvirker ulike populasjoner og økosystemer må man gripe inn. Sedimentet fra Tromsø havn inneholdt så høye konsentrasjoner av de ulike stoffene at det må tilskrives menneskelig aktivitet. De høye PAH konsentrasjonene vil kunne påvirke den naturlige artssammensetningen. Som nevnt under adferd og dødelighetsdelen kan de høye verdiene få individer til å forlate området. Dette vil kunne få konsekvenser for det naturlige økosystemet. Fjerner man en eller flere nøkkelarter fra et system vil hele systemet forandres. Og selv om en nøkkelart ikke forsvinner, kan akkumuleringen av de ulike miljøgiftene (blant annet PCB) bli lagret oppover i systemet. Dette kan igjen påvirke toppredatorene. Fugl og fisk kan oppkonsentrere høye verdier av PCB i fettvevet og affisere deres evne til reproduksjon og gi unormal adferd. De ulike metallene har også evnen til oppkonsentrasjon. Vi har ikke sett på akkumuleringen av de ulike stoffene i denne oppgaven, men dette er nøye studert.

4.5.2 Konsekvenser for risikovurdering av sediment

Når man utfører en risikovurdering av et sediment er det vanlig prosedyre å bruke ulike bioakkumuleringsforsøk. Disse metodene er godt utarbeidet, men de har en lav følsomhet, lav spesifisitet og er relativt kostbare. Ved å se på subletale og andre biokjemiske og fysiologiske

endepunkt kan en øke følsomheten og si mer om hva som er den virkelige trusselen for individene. Man kan f.eks. ikke bastant si at en høy metall akkumulering i et individ vil gi en negativ effekt. Hvis man studerer mekanismene til akkumuleringen og hva dette vil indusere i individet, kan man gi en mer nøyaktig klassifisering av effekten. Dette vil gi oss en bedre forståelse av de ulike miljøeffektene på individnivå, noe som kan hjelpe oss i utarbeidingen av en fullstendig vurdering av sedimentets tilstand.

I SFTs veileder for risikovurdering av sediment (Figur 4.1), går man inn i trinn 2 og 3 på akkumuleringsgraden, adferden og dødeligheten. Biomarkørene er fremdeles et forskningsfelt og er ikke tatt med i SFT veileder. Ved å bruke biomarkører som en indikator på aktuell eller reell risiko kan en både få et mer nøyaktig bilde av den totale risikoen. Vårt forsøk ga ulike indikasjoner på at glutation reduktase aktivitet kan bli oppregulert av de ulike miljøgiftene. For metallene var resultatene mindre tydelige. Begge disse biomarkørenes bruk i risikovurdering av sediment burde utforskes med mer kontrollerte parametere før de kan trekkes inn i en vurdering. For ulike oppdragsgivere kan bruken av disse biomarkørene også senke utgiftene ved en risikovurdering, da de ikke er fullt så kostbare som et bioakkumuleringsforsøk. Noe som muliggjør flere vurderinger av kontaminerte områder.



Figur 4.1: Veileder for risikovurdering av forurenset sediment, (TA-2085/2005)

Alle stasjonene ble kategorisert ved de ulike parametrene (Tabell 5.1). Stasjoner som viste unormal adferd og høy dødelighet, men ingen respons i GR aktivitet eller MT mengde fikk kategorien 2: usikker toksisitet. Stasjoner med normal adferd og lav dødelighet og fikk kategorien 1: Ikke toksisk. Stasjoner med unormal adferd, dødelighet og tilsynelatende høy respons for de ulike biomarkør fikk kategorien 3: Svært toksisk.

Adferd ble klassifisert i forhold til kontroll. Stasjoner med lav sedimentflukt (få over sediment under hele forsøket) og lavt eller normalt fødeinntak (fødeinntakrate 1 eller 2 under flere av registreringene) ble satt til normal. Ingen dødelighet ble satt til "ingen", 4 eller flere fjæremark døde i et eller flere replikater ble satt til "høy". "Lav" ble satt til 1-3 døde mark. GR aktiviteten ble satt til "høy" når verdiene så tilsynelatende forhøyede ut i forhold til kontrollen i et eller flere av vevene (ingen av stasjonene var signifikant høyere en kontrollen). MT verdien ble satt til "høy" når verdiene så tilsynelatende forhøyede i forhold til kontrollen (ingen av stasjonene var signifikant høyere en kontrollen).

Tabell 5.1: Adferd, dødelighet, biomarkører, [miljøgift] og vurdering av sediment.

Stasjon	Adferd	Dødelighet	Glutation reduktase	Metallotionein	[Miljøgift] 1:lav 2:middels 3:Høy	Vurdering av sediment 1:Ikke toksisk 2:Usikker toksisitet 3:Sterkt toksisk
1001	unormal	Økt	Høy	Lav	2	3
1003	unormal	Økt	Lav	Lav	2	2
1004	unormal	Økt	Lav	Lav	1	2
1008	unormal	Lav	Høy	Lav	2	3
1015	unormal	Lav	Høy	Lav	2	3
1019	unormal	Lav	Lav	Høy	2	2
1022	normal	Lav	Lav	Lav	2	1
1024	unormal	Lav	Høy	Lav	2	3
1025	unormal	Lav	Lav	Lav	1	2
1026	unormal	Økt	Lav	Lav	2	2
1027	unormal	Økt	Lav	Lav	2	2
1028	normal	Lav	Lav	Lav	3	2
1031	normal	Økt	Lav	Lav	3	3
1034	normal	Ingen	Høy	Lav	3	2
1035	normal	Ingen	Høy	Lav	2	2
1044	unormal	Ingen	Høy	Lav	3	3
1047	unormal	Økt	Lav	Lav	3	3
1051	normal	Lav	Høy	Lav	2	2
1052	unormal	Økt	Lav	Lav	2	3
1053	normal	Økt	Lav	Lav	3	2
1063	normal	Lav	Høy	Lav	2	2
A50	normal	Lav	Høy	Lav	?	?
B50	normal	Lav	Lav	Lav	?	?
44	normal	Økt	Lav	Lav	2	2
Kontroll	normal	Økt i et replikat	Lav	Lav	1	1

5. Konklusjoner

Miljøgifter i sedimentet ga klart utslag på fjæremarkens adferd. Stasjon 1001, 1003, 1004, 1008, 1015, 1019, 1024, 1025, 1026, 1027, 1044, 1047 og 1052 hadde alle en unormal adferd i forhold til kontrollen. De fleste stasjonene med unormal adferd (lavt fødeinntak og sedimentflukt) hadde også en høyere dødelighet. Det så ut som innholdet av organisk karbon, partikkelsammensetning og PAH konsentrasjonen hadde størst innvirkning på den unormale adferden og dødeligheten.

Stasjon 1001, 1008, 1015, 1024, 1034, 1035, 1044, 1051, 1063 og A50 hadde alle tilsynelatende forhøyede verdier av glutatjon reduktase aktivitet, noe som antakelig kan tilskrives hydrokarbonene. Faktorer som sedimentets geokjemiske sammensetning og biotilgjengeligheten til de ulike stoffene kan ha spilt en rolle for opptaket. Tester med mer kontrollerte parametere bør undersøkes nærmere.

De ulike metallkonsentrasjonene ga lite utslag på metallotionein. Kun stasjon 1019 fikk signifikant forhøyede verdier. Ulike interaksjoner som biotilgjengeligheten til de ulike metallene og fjæremarkens fødeinntak kan ha hatt en innvirkning. Flere tester med kontrollerbare parametere bør gjennomføres.

De ulike endepunktene ga oss indikasjoner på mulige økologisk risiko, ikke bare på populasjons nivå (adferdsendringer og dødelighet), men også ved å forstyrre næringskjeder. Resultatene ga også en pekepinn på hvordan en kan utføre en mer helhetlig risikovurdering av marine sediment.

6. Referanser

- Alastair, G., Andrew D. Briggs. (2001). "Toxicity of sediments from around a North Sea oil platform: are metals or hydrocarbons responsible for ecological impacts?"
- Amiard, J. C., C. Amiard-Triquet a, S. Barka b, J. Pellerin c, P.S Rainbowd, (2005). "Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers, Review." Aquat. Toxicol.
- Amiard, J. C., Geffard, A., Amiard-Triquet, C. (1998). "La m'etallothion'eine chez la moule *Mytilus edulis* comme biomarqueur de pollution m'etallique: variabilit'e entre sites, saisons et organes." J. Rech. Oc'eanogr **23**(1): 25-30.
- Bat, L., Raffaelli, Dave. (1998). "Sediment toxicity testing: a bioassay approach using the amphipod *Corophium volutator* and the polychaete *Arenicola marina*." Marine. Biolo. and Ecolo. **226**(2): 217.
- Bjerregaard, P. H., Jens C. (2000). "Organochlorines and heavy metals in pregnant women from the Disko Bay area in Greenland." Scie. of The Total Envir. **245**(1-3): 195.
- Brils, J. M., Huwer, S.L., Kater, B.J., Schout, P.G., Harmsen, J., Delvigne, G.A.L. *et al.* (2002). "Oil effect in freshly spiked marine sediment on *Vibrio fischeri*, *Corophium volutator*, and *Echinocardium caudatum*." Enviro. Toxicol and Chemis. **21**: 2242-2251.
- Bryan, G. W. (1974). "In pollution and physiology of marine organisms." 123.
- Bryan, G. w. (1985). "Bioavailability and effects of heavy metals in marine deposits." Wates in the Ocean **6**.
- Bryan, G. W., L.G Hummerstone (1971). "Adaption of the polychaete *Nereis diversicolor* to estuarine sediments containing high concentrastions of heavy metals." J. marine biolo. **51**: 845-863.
- Bryan, G. W. G., P. E. (1986). "Occurence, composition and function of intracellular calcium phoshate granuler in the musculature of nephtyid polyachaetes (Annelida)." J. marin. biolo. Assas. **66**: 176-199.
- Cadée, G. C. (1976). "Sediment reworking by *Arenicola marina* on tidal flats in the Dutch Wadden Sea. Neth." J. Sea Resear. **10**: 440-460.
- Cheung, C. C., Zheng, G. J., Lam, P. K., Richardson, B. J. (2002). "Relationships between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbons (polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides) and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*." Marine Pollut. Bull. **45**: 1-12.

- Christensen, M. A., Ole Banta, Gary T. (2002). "Metabolism of pyrene by the polychaetes *Nereis diversicolor* and *Arenicola marina*." *Aquat. Toxicol.* **58**(1-2): 15.
- Cosson, R. P. (2000). "Bivalve metallothionein as a biomarker of aquatic ecosystem pollution by trace metals: limits and perspectives." *Cellular Molekylar Biolo.* **46** (2): 295-309.
- Cowles, M. o. D., C. (1982). "On the origins of the .05 level of statistical significance." *Ame. Psysc.* **37**(5): 553-558.
- Crunkilton, R. L., William M. DeVita. (1997). "Determination og aqueous concentrations og polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in an urban stream."
- Dignam, J. D. (1990). "Preparation of extracts from higher eukaryotes." *Metho. in Enzy.* **182**: 194-203.
- Fowler, S. W., Polikarpov G.G., Elder D.L., Parsi P., Villeneuve J.P. (1978). "Polychlorinated biphenyls: Accumulation from contaminated sediments and water by the polychaete *Nereis diversicolor*." *Marine Biolo.* **48**: 303-309.
- Geffard, A., Geffard, O., His, E., Amiard, J.C. (2002b). "Relationship between metal bioaccumulation and metallothionein levels in larvae of *Mytilus galloprovincialis* exposed to contaminated estuarine sediment elutriate." *Marine Ecolo. Progr. Ser.* **233**: 131-142.
- Gerringa, L. J. A. (1991). "Mobility of Cu, Cd, Ni, Pb, Zn, Fe and Mn in marine sediment slurries under anaerobic conditions and at 20% air saturation." *Neth. J. of Sea Resea.* **27**(2): 145.
- Giessinga, A., M.B., Lawrence M. Mayera., Thomas, L.Synchronous. (2003). "fluorescence spectrometry of 1-hydroxypyrene: a rapid screening method for identification of PAH exposure in tissue from marine polychaetes." *Marine Enviro. Resea.* **56**: 599-615.
- Goksøyr, A., Beyer, J., Egaas, E., Grøsvik, B.E., Hylland, K., Sandvik, M. og Skaare, J.U. (1996). "Biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus*) and their use in pollution monitoring." *Marine Pollu. Bull.* **33**(1-6): 36-45.
- Hardege, J. D., Bentley, M.G. & Snape, L. (1998). "Sediment selection by juvenile *Arenicola marina*." *Marine Ecolo. P. Ser.* **166**: 187-195.
- Harkey, G. A., Lydy M.J., Kukkonen J., Landrum P.F. (1994). "Feeding selectivity and assimilation of PAH and PCB in *Diporeia* spp." *Environ. Toxicol. Chem.* **13**: 1445-1455.
- Hayward, P. J. (1994). *Animals of sandy shores.*
- Hogstrand, C. o. H., C. (1991). "Binding and detoxification of heavy metals in lower vertebrates with reference to metallothionein." *Comp. Bioc. and Phy. Phar. Toxicol & Endoc.* **100**(1-2): 137-141.

Hylland, e. a. (2004). Opprydding av forurensede sedimenter i Tromsø havn Biologiske effekter (delprosjekt 2). Oslo, NIVA.

Hylland, K., Haux, C., Hogstrand, C., Sletten, K. og Andersen, R.A. (1994). "Properties of cod metallothionein, its presence in different tissues and effects of Cd and Zn treatment." *Fish Phy. and Biochem.* **13**(1): 81-91.

Hylland, K., Skold, M., Gunnarsson, J. S., Skei, J. (1996). "Interactions between eutrophication and contaminants. IV. Effects on sediment-dwelling organisms." *Marine Pollu. Bull.* **33**(1-6): 90.

Jarvinen, A. W., Tyo R.M. (1978). "Toxicity to fathead minnows of endrin in food and water." *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **7**: 409-421.

Johnsen, T. M., Schaanning, M., Hylland, K. (1996). Kobberbelastning i forbindelse med vasking og impregnering av fiskenøter, NIVA-rapport lnr 3483.

Johnston, R. (1976). *Marine Pollut.*

Jørgensen, E. R., Velvin, R., Killie, B. (2000). Miljøgifter i marine sediment og organismer i havneområdene ved Harstad, Tromsø, Hammerfest og Honningsvåg 1997-98. *Rapport TA 786/00*, Statlig program for forurensningsovervåking: 123.

Kamohara, K., Yagi, N., Itokawa, Y. (1984). "Mechanism of lipid peroxide formation in polychlorinated biphenyls (PCB) and dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT)-poisoned rats." *Environ. Res.* **34**(1): 18-23.

Kaag, N. H. B. M., Edwin M. Foekema, Martin C.Th. Scholten, and Nico M. van Straalen (1996). "Comparison of contaminant accumulation in three species of marine invertebrates with different feeding habits." *Enviro. Toxicol. and Chemi.* **16**: 837-84.

Kaag, N. H. B. M., Foekema, E. M., Scholten, M. C. Th. (1998). "Ecotoxicity of contaminated sediments, a matter of bioavailability." *Water Sci. and Techn.* **37**(6-7): 225.

Kaag, N. H. B. M., Scholten, M. C. Th., Van Straalen, N. M. (1998). "Factors affecting PAH residues in the lugworm *Arenicola marina*, a sediment feeding polychaete." *Sea Res.* **40**(3-4): 251.

Kaag, N. H. B. M., Scholten, M. C. Th., Van Straalen, N. M. (1998). "Factors affecting PAH residues in the lugworm *Arenicola marina*, a sediment feeding polychaete." *Sea Res.* **40**(3-4): 251.

Lake, J. L., Rubinstein N.I., Lee H., Lake C.A., Heltshe J., Pavignano S. (1990). "Equilibrium partitioning and bioaccumulation of sediment-associated contaminants by infaunal organisms." *Environ. Toxicol. Chem.* **9**: 1095-1106.

- Landrum, P. F., Faust W.R., Eadie B.J (1989). "Bioavailability and toxicity of a mixture of sediment-associated chlorinated hydrocarbons to the amphipod *Pontoporeia hoyi*." *Aquat. Toxicol. and Hazard Ass.* **12**: 315-329.
- Landrum, P. F., Scavia D. (1983). "Influence of sediment on anthracene uptake, depuration, and biotransformation by the amphipod *Hyalella azteca*." *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **40**: 298-305.
- Lee, H., Boese B.L., Randall R.C., Pelletier J. (1990). "A method for determining gut uptake efficiencies of hydrophobic pollutants in a deposit-feeding clam." *Environ. Toxicol. Chem.* **9**: 215-219.
- Levell, D. (1976). "The effect of Kuwait Crude Oil and the Dispersant BP 1100X on the lugworm, *Arenicola marina* L." *Marine Ecolo. and Oil Poll.*: 131-185.
- Longbottom, M. R. (1970). "The distribution of *Arenicola marina* (L.) with particular reference to the effects of particle size and organic matter of the sediments." *Experimental Marine Biolo. and Ecolo.* **5**: 138-157.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. og Randall, R.J. (1951). "Protein measurements with the Folin phenol reagent." *Biolo. Chemi.* **193**: 265-275.
- Luoma, S. N., Bryan, G. W. (1981). "A statistical assessment of the form of trace metals in oxidized estuarine sediments employing chemical extractants." *The Scie. of The Total Envir.* **17**(2): 165.
- Luoma, S. N. a. B., G.W. (1978). "factors controlling the availability of sediment-bound lead to estuaries bivavlve *Scrobicuria plana*." *J. Marine Biolo. Ass.* **58**: 793-802.
- Lyes, M. C. (1979). "Bioavailability of a hydrocarbon from water and sediment to the marine worm *Arenicola marina*." *Marine Biolo.* **55**: 121-127.
- McElroy, A. E. (1985). "In vivo metabolism of benz[a]anthracene by the polychaete *Nereis virens*." *Marine Envir. Res.* **17**(2-4): 133.
- Neff, J. M., Boehm, Paul D., Haensly, William E. (1985). "Petroleum contamination and biochemical alterations in oysters (*Crassostrea gigas*) and plaice (*Pleuronectes platessa*) from bays impacted by the Amoco Cadiz crude oil spill." *Marine Enviro. Res.* **17**(2-4): 281.
- Nunes, B., Carvalho, F., Guilhermino, L. (2006). "Effects of widely used pharmaceuticals and a detergent on oxidative stress biomarkers of the crustacean *Artemia parthenogenetica*." *Chemos.* **62**(4): 581.
- Næs, K., Rygg, Brage. (2001). Tiltaksplan for opprydding i forurensede sedimenter i Kristiansandsfjorden. Kartlegging av konsentrasjoner i sedimentet i 2001 samt kartfremstilling av resultater fra tidligere undersøkelser. Oslo, NIVA: 43.

- Olafson, R. W. o. O., P.E. (1991). "Electrochemical detection of metallothionein." *Methods in Enzy.* **205**: 205-213.
- Oliver, B. G. (1984). "Uptake of chlorinated organics from anthropogenically contaminated sediments by oligochaete worms." *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **41**: 878-883.
- Oliver, B. G. (1987). "Biouptake of chlorinated hydrocarbons from laboratory-spiked and field sediments by oligochaete worms." *Environ. Sci. Technol.* **21**: 785-790.
- Payne, J. F., & May, N. (1979). "Further studies on the effect of petroleum hydrocarbons on mixed-function oxidases in marine organisms: pesticides and xenobiotic metabolism in aquatic organisms." *American Chem. Society Symp. Series.* **99**: 339-346.
- Pocklington, P. W., Peter G. (1992). "Polychaetes Key taxa for marine environmental quality monitoring." *Marine Pollut. Bull.* **24**(12): 593.
- Prouse, N. J. G., D.C. (1976). "Interactions between the deposit feeding polychaete *Arenicola marina* and oiled sediment." 408-422.
- Rainglet, F. (1998). "Biomarqueurs spécifiques de pollution: évaluation de l'exposition et des effets précoces des déchets solides (ordures ménagères, mâchefers) à l'égard du mollusque bivalve *Corbicula fluminea* (Müller, 1774)." 221.
- Retraubun, A. S. W., Dawson, M., Evans, S. M. (1996). "The role of the burrow funnel in feeding processes in the lugworm *Arenicola marina* (L.)." *Exper. Marine Biolo. and Ecolo.* **202**(2): 107.
- Riisgård, H. U. B., G.T. (1998). "Irrigation and deposit feeding by the lugworm *Arenicola marina*, characteristics and secondary effects on the environment. A review of current knowledge." *Vie et Milieu* **48**: 243-257.
- Ruus, A., Schaanning, Morten., Øxnevad, Sigurd., Hylland, Ketil. (2005). "Experimental results on bioaccumulation of metals and organiccontaminants from marine sediments." *Aquat. Toxicol.* **72**: 273–292.
- Rygg, B. (2003). Langtidsovervåking av miljøkvaliteten i kystområdene av Norge. Bløtbunnsamfunn. Oslo, NIVA.
- Sjøkartverk, N. (1988). "Den norske los bind 6, farvannsbeskrivelse Lødingen - Grense Jakobselv." 351.
- Skei, J., Olsgard, F., Ruus, A., Oug, E., Rygg, B. (2002). Risikovurderinger knyttet til forurensede sedimenter: Med fokus på Kristiansandsfjorden. *SFT-rapport TA-nummer 1864/2002*: 106.

- Stich, H. F., Acton, A.B. og Forrester, C.R. (1976). "Fish tumors and sublethal effects of pollutants." *Fisheries Rese. Board of Canada* **33**(9): 1993-2001.
- Turner, D. R., Varney, M. S., Whitfield, M., Mantoura, R. F. C., Riley, J. P. (1987). "Electrochemical studies of copper and lead complexation by fulvic acid II. A critical comparison of potentiometric and polarographic measurements." *The Scien. of The Total Enviro.* **60**: 17.
- Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N. og Panfoli, I. (2000). "Antioxidant role of metallothioneins: A comparative overview." *Cellu. and Molec. Biolo.* **46**(2): 407-417.
- Wallace, W. G., Lopez, G.R., Levinton, J.S. (1998). "Cadmium resistance in an oligochaete and its effect on cadmium trophic transfer to an omnivorous shrimp." *Marine Ecolo. Progr. Ser.* **172**: 225- 237.
- Weston, D. P. (1990). "Hydrocarbon bioaccumulation from contaminated sediment by the deposit-feeding polychaete *Abarenicola pacifica*." *Marine Biolo.* **107**: 159-169.
- Wright, D. A., Zamuda, Craig D. (1987). "Copper accumulation by two bivalve molluscs: Salinity effect is independent of cupric ion activity." *Marine Enviro. Rese.* **23**(1): 1.
- Zar, J. H. (1998). "Biostatistical analysis." 663.
- Zauke, G. P., Clason, B., Savinov, V. M., Savinova, T. (2003). "Heavy metals of inshore Benthic invertebrates from the Barents Sea." *The Scie. of The Total Enviro.* **306**(1-3): 99.
- Zebe, E. S., D. (1996). "The lugworm *Arenicola marina*: a model of physiological adaptation to life in intertidal sediments." *Helgo. Meeresu.* **50**: 37-68.