

SINTEF A17477 - Åpen

Rapport

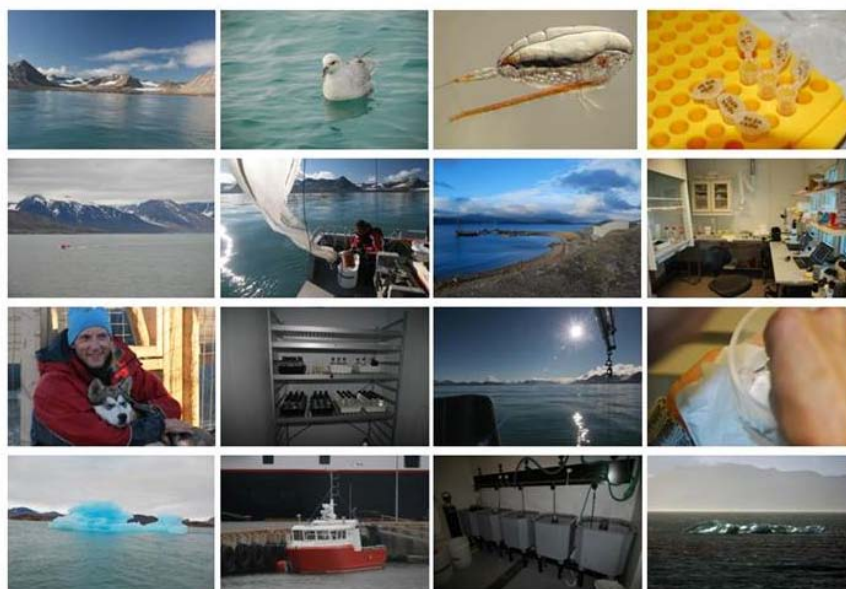
Effekter av marin diesel på hoppekreps i Kongsfjorden

Et komparativt økotoksikologisk studium

Forfatter(e)

Bjørn Henrik Hansen

Dag Altin, Siv Fiske Rørvik & Ida Beathe Øverjordet



SINTEF Materialer og kjemi

Marin miljøteknologi

2011-01-28

Rapport

Effekter av marin diesel på hoppekreps i Kongsfjorden

Et komparativt økotoksikologisk studium

EMNEORD:
Økotoksikologi
Marin diesel
Hoppekreps
Effektgrenser

VERSJON
2.0

DATO
2011-01-28

FORFATTER(E)
Bjørn Henrik Hansen
Dag Altin, Siv Fiske Rørvik & Ida Beathe Øverjordet

OPPDRAAGSGIVER(E)
Svalbards Miljøvernfond

OPPDRAAGSGIVERS REF.
Trine Krystad, Sysselmannen
på Svalbard

PROSJEKTNR
80143200

ANTALL SIDER OG VEDLEGG:
19

SAMMENDRAG

Effekter av marin diesel på hoppekreps i Kongsfjorden

Dette studiet hadde som hovedmål å fremskaffe data og grenseverdier for effekter av marin diesel hos en Arktisk hoppekreps (ishavsåte, *C. glacialis*, temperaturoptimum: 2 °C), og å sammenligne disse data med tilsvarende resultater fra en Atlantisk hoppekreps (raudåte, *C. finmarchicus*, temperaturoptimum: 10 °C). Resultatene, som er av relevans for og predikterer effekter av uhellsutslipp av marin diesel i Arktiske farvann, viste at ishavsåte tolererer det stresset som ligger i en slik eksponering bedre enn raudåte. Dette ble vist både ved bruk av giftighetstester og ved analyse av den molekylære forsvarsmekanismen og biomarkøren glutathione S-transferase (GST). Forvaltningsmessig er disse funnene viktige fordi modeller som skal beskrive potensielle effekter i miljøet benytter seg av eksperimentelle data. De grenseverdiene som ligger til grunn i dagens modeller tør høyde for potensielle effekter på ishavsåte, fordi de teoretisk beregnede grenseverdiene for eksponeringen var lavere enn de observerte. Samtidig viste resultatene at fettinnholdet i testorganismene er avgjørende for utfallet av en giftighetstest, noe som betyr at organismer, eller tidlige utviklingsstadier hos hoppekreps, kan være mer sensitive enn de vi hadde mulighet til å benytte i disse forsøkene.

PROSJEKTLEDER
Bjørn Henrik Hansen

KONTROLLERT AV
Odd Gunnar Brakstad

GODKJENT AV (STILLING, NAVN)
Forskningsjef Tore Aunaas

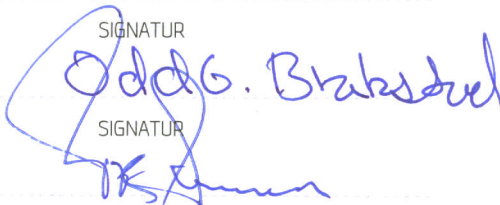
RAPPORTNR
SINTEF A17477

ISBN
978-82-14-05021-9

GRADERING
Åpen

GRADERING DENNE SIDE
Åpen

SIGNATUR


SIGNATUR


SIGNATUR


Historikk

VERSJON	DATO	VERSJONSBEKRIVELSE
1.0	2010-12-15	Endelig rapport sendt til kunde
2.0	2011-01-28	Rapport endret etter tilbakemelding fra kunde

Innholdsfortegnelse

1	Introduksjon	5
2	Materialer og metode	6
2.1	Forsøksdyr	6
2.2	Tillaging av eksponeringsløsninger	7
2.3	Akutt giftighetstesting	7
2.4	Subletale eksperimenter	7
2.5	Databearbeiding og statistiske analyser	8
3	Resultater og diskusjon	8
3.1	Kjemisk sammensetning av vannløselig fraksjon av marin diesel	8
3.2	Teoretisk beregning av giftighet	9
3.3	Akutt giftighet for WAF av marin diesel	9
3.4	Forhold mellom akutt giftighet og dyrenes fettinnhold	11
3.5	Stressresponser i hoppekreps	13
4	Oppsummerende konklusjon og forslag til oppfølging	16
5	Forslag til oppfølgende studier	16
5.1	Simulering av utslipp	16
5.2	Arktiske arters sensitivitet	17
6	Referanser	17

Effekter av marin diesel på hoppekreps i Kongsfjorden

1 Introduksjon

Økt båttrafikk langs Svalbard i forbindelse med transport, turisme og industri øker sjansen for det vil oppstå uhell med påfølgende utslipp av drivstoff som marin diesel og tungolje til det marine miljøet. Etter hvert som oljeindustrien finner oljefelt og starter prøveboring nordover i Atlanterhavet og i Barentshavet, vil det også øke sannsynligheten for uhellsutslipp av olje og drivstoff. Nylig vedtok Regjeringen et forbud mot bruk av tungolje i de tre nasjonalparkene på Svalbard, noe som medfører at tung bunkersolje er forbudt innenfor deler av Svalbards territorialfarvann. Intet annet drivstoff enn marin diesel type DMA i henhold til ISO 8217 Fuel Standard er nå tillatt brukt i nesten hele Svalbards farvann (Miljøverndepartementet, 2009). Denne forskriften ble vedtatt for å forhindre uhellsutslipp av tung bunkersolje i et sårbart miljø, ettersom utslipp av bunkersolje har et mye større skadepotensial for miljøet enn marin diesel.

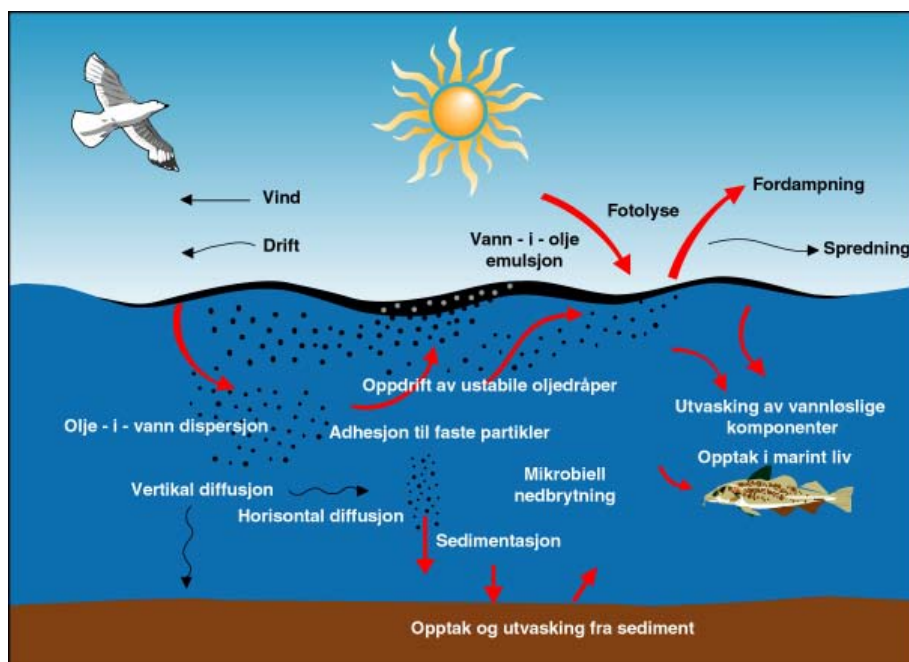


Fig. 1: Forvittringsprosesser for olje på vann.

Petrogene blandinger, som råolje, tungolje og marin diesel gjennomgår en rekke prosesser når det slippes ut i marint miljø, og disse prosessene kalles forvittringsprosesser (Fig. 1). Tungoljer er i svært liten grad dispergerbare etter utslipp i marint miljø, og en relativt liten andel av vannløselige oljekomponenter vil komme ned i vannet og forårsake skade på pelagiske organismer. Tungolje vil kunne drive mot land og forårsake tilnærmet uheldbredelig skade på fuglereservater og fuglefjell. Marin diesel derimot er mye mer dispergerbar, men samtidig består diesel av vannløselige og giftige komponenter. Selv om disse komponentene relativt raskt vil fordampe etter et uhellsutslipp, så vil de i en begrenset periode også kunne forårsake skade på organismer som lever pelagisk i vannsøylen.

På grunn av at petrogene blandinger som marin diesel, råolje og tungoljer er så utrolig komplekse i sin kjemiske sammensetning, at de ulike komponentene i disse blandingene i svært ulik grad påvirkes av

miljøparametere, og at de ulike komponentene har svært ulik evne til å forårsake skader på organismer, så er det ingen alternativer til bruk av numeriske modeller for å beregne skadeomfanget i marint miljø etter et uhellsutslipp. Skadeomfang og risikovurderinger etter uhellsutslipp av oljer til marint miljø gjennomføres ved bruk av numeriske modeller (f.eks. OSCAR og DREAM) som beregner oljens spredning og forvitring i tid og rom, samt biologiske effekter. I SINTEFs modell OSCAR (Oil Spill Contingency and Response) er det også mulig å evaluere kost/nytte for bruk av ulike oljevern-teknologi for å begrense skader forårsaket av utslippet. OSCAR-modellen ble nylig benyttet i utredningen for petroleumsvirksomhet i Lofoten og Barentshavet (ULB, 2010) for å simulere konsekvenser av uhellsutslipp i dette området, og den benyttes for forvaltningen ved alle uhellsutslipp langs Norskekysten for å estimere risiko for miljøkonsekvenser. Sentralt for å kunne beregne skadelige effekter på organismer med god presisjon er å ha et begrep om sensitiviteten til relevante organismer i de områdene man skal forvalte. I tillegg er kjennskap til organismenes størrelse, fettinnhold og levestett svært nyttig informasjon som kan benyttes direkte inn i modellen for å øke presisjonen og relevansen på et modellert utslippsscenario. Svært lite er kjent om hvordan arktiske organismer reagerer på eksponering for petrogene forbindelser som marin diesel. Man vet ikke hvilke effektgrenser marin diesel har, noe som er en nødvendig kunnskap for å kunne forutsi miljøkonsekvenser av et uhellsutslipp.

I de marine næringskjedene spiller dyreplankton, og hoppekreps av slekten *Calanus* spesielt, en svært sentral rolle. Raudåte (*Calanus finmarchicus*) og ishavsåte (*Calanus glacialis*) utgjør en helt essensiell del av den marine næringskjeden som bindeleddet mellom planteplankton og fisk. De er ekstremt fettrike (opptil 50 %), noe som gjør dem til et viktig tilskudd av lipider for fisk, men samtidig gjør dem svært utsatt for å ta opp fettløselige miljøgifter som bl.a. finnes i marin diesel og oljer (Hansen et al., 2009).

Dette studiet har som hovedmål å fremskaffe biologiske data og grenseverdier for effekter av marin diesel hos en arktisk hoppekreps (ishavsåte, *C. glacialis*, temperaturoptimum: 2 °C). Siden det eksisterer relativt mye økotoksikologiske data på raudåte (*C. finmarchicus*, temperaturoptimum: 10 °C), og disse er implementert i dagens modeller som benyttes til og predikere effekter av uhellsutslipp, ble det valgt å gjennomføre et identisk studium også på denne for å kunne sammenligne sensitivitet og grenseverdier de to artene imellom. I tillegg ble grenseverdiene (giftigheten) av marin diesel for disse to artene sammenlignet med den teoretisk beregnede giftigheten beregnet med bruk av den metoden som ligger til grunn for dagens modeller. Resultatene er av forvaltningsmessig relevans i forhold til å kunne predikere effekter (f.eks. dødelighet) av uhellsutslipp av marin diesel på en sentral art i Arktiske farvann. Her er av spesiell betydning forholdet mellom den teoretisk beregnede giftigheten til marin diesel i forhold til den observerte giftigheten på ishavsåte. Man antar generelt at det arktiske miljø er mer sårbart enn miljøer som ligger i varmere havområder. Prosjektet søker derfor også å finne ut om og i tilfelle hvorfor den arktiske arten er mer eller mindre sensitiv overfor marin diesel enn den atlantiske arten.

2 Materialer og metode

2.1 Forsøksdyr

Pelagiske planktonprøver ble innhentet ved planktontråling (WP3, 1000 µm) i Kongsfjorden ved bruk av Kings Bays arbeidsbåt Teisten. Planktonprøver ble samlet i hvite plaststamper (50 L) og fraktet til marinlaboratoriet i Kings Bay hvor plankton ble sortert. Alle dyr benyttet i forsøkene ble nøye inspisert og kvalitetssikret med hensyn på utseende, art og utviklingstrinn med stereoluper, fordi slike planktonprøver inneholder en rekke ulike arter og på ulike utviklingstrinn, samt at innsamlingsteknikken kan skade dyrene hvis det ikke gjennomføres forsiktig. I forsøkene ble det kun benyttet ishavsåte (*C. glacialis*) av kopepoditt-

stadium V. Forsøk med raudåte (*C. finmarchicus*) ble gjennomført ved bruk av dyr fra den kontinuerlige kulturen av arten ved SINTEF/NTNU Sealab i Trondheim. De to artene ble eksponert på relevant temperatur, henholdsvis 2 °C og 10 °C for ishavsåte og raudåte.

2.2 Tillaging av eksponeringsløsninger

Vannløselige fraksjoner (water accommodated fraction; WAF) av marin diesel ble lagd. Oppsettet er avbildet i figur 2. Metodikken for dette er standardisert og beskrevet i Chemical Response to Oil Spills – Ecological Effects Research Forum (CROSERF) og publisert av Aurland & Coelho (1996) og Singer et al. (2000). Sjøvann ble filtrert med Sterivex-filter (0,22 µm), og 9L ble overført til en 10L glassflaske. Marin diesel ble tilsatt på overflaten med bestemt forhold i forhold til vannmengden (diesel: vann, 1:40 og 1:10.000). Glassflasken ble så satt på forsiktig røring i 72 timer slik at det ikke ble dannet oljedråper i vannet, før vannet ble tappet av og brukt til eksperimenter. Tillaging av eksponeringsløsning ble gjennomført ved 13°C, og deretter kjølt ned til korrekt eksponeringstemperatur for artene. Alle eksponeringsløsninger ble analysert med gasskromatografiske metoder for beregning av total hydrocarbon content (THC) og individuelle oljekomponenter (beskrevet i Hansen et al., 2011).

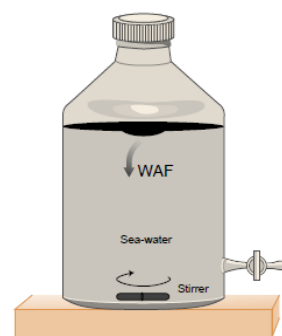


Fig 2: Oppsett for tillaging av WAF.

2.3 Akutt giftighetstesting

Akutt giftighet (eksperiment 1) måles etter en standard metodikk (ISO 14669:1999) modifisert for *C. finmarchicus*, og gir en verdi (lethal concentration₅₀, LC₅₀) som angir ved hvilken konsentrasjon av et stoff (i dette tilfellet WAF av marin diesel) halvparten av de eksponerte organismene er døde etter 96 timer. Forsøkene settes opp i 0.5 L Pyrex-flasker med 7 dyr i hver flaske. Det ble benyttet 6 konsentrasjoner av eksponeringsløsning hvor den opprinnelige ble sekvensielt fortynnet ned, og for hver konsentrasjon ble det benyttet 3 flasker (replikater). I tillegg ble det satt opp seks flasker med kun sjøvann som kontroller. Overlevelse og dødelighet ble overvåket hver 24. time inntil 96 (144) timer.

2.4 Subletale eksperimenter

Eksponering for vannløselige fraksjoner av marin diesel (forhold marin diesel: vann - 1:40) ble utført med tre konsentrasjoner tilsvarende 0.5, 5 og 50% av den beregnede LC₅₀-konsentrasjonen (eksperiment 2). 2L flasker ble benyttet med 75 dyr i hver flaske, og dyrene ble samlet etter 12, 24 og 48 timer. Disse prøvene ble tatt på konserveringsvæske (RNAlater, Ambion) og fraktet til laboratoriet på SINTEF Sealab for genekspressionsanalyser av detoksifiseringsenzymet glutathione S-transferase (GST). Metodikken for denne analysen er beskrevet i Hansen et al. (2008A).

Det siste eksperimentet (eksperiment 3) ble utført ved å tilsette 75 dyr i tre parallelle flasker med vannløselig fraksjon av marin diesel (forhold 1:40) med en konsentrasjon tilsvarende LC₂₀ (96 timer). Døde dyr ble tatt ut hver 24. time (inntil 144 timer) og fotografert for biometrisk måling av kroppsvolum og fettvolum (Miller et al., 1998).

2.5 Databearbeiding og statistiske analyser

Statistiske analyser og kurvetilpasninger ble utført med bruk av GraphPad Prism V4.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Sammenligning av genekspresjon av GST mellom kontrollgruppe og eksponerte grupper ble gjennomført ved bruk av ANOVA med Dunnett's post hoc test. For å bestemme signifikante forskjeller i fettinnhold mellom dyr eksponert for konsentrasjoner tilsvarende LC20 (Fig. 4) ble Kruskal-Wallis test benyttet med Dunn's post hoc test. Signifikansnivået var satt til $p < 0,05$.

3 Resultater og diskusjon

3.1 Kjemisk sammensetning av vannløselig fraksjon av marin diesel

Vannprøver fra samtlige WAFer ble analysert for kjemisk sammensetning. Totalt hydrokarbon innhold (total hydrocarbon content, THC) ble beregnet etter analyse med GC-FID, mens semi-flyktige komponenter (herav PAHer) og flyktige komponenter (herunder BTEXer) ble analysert med to ulike GC-MS-teknikker. Alle metodene er beskrevet av Hansen et al (2011). Til sammen ble 90 enkeltkomponenter analysert, og summerte komponentgrupper er presentert i Tabell 1. Det er alltid noen små variasjoner i komponentsammensetningen i en WAF selv om de er generert med nøyaktig samme prosedyre.

WAF generert med diesel:vann-forhold 1:40 har en noe annen sammensetning enn med 1:10.000-forhold. De ulike komponentene i marin diesel har forskjellig løselighet, og likevekten mellom diesel og vannet endres som funksjon av mengde-forholdet mellom dem.

Tabell 1: Kjemisk komponentsammensetning i WAF generert før akutt giftighetstest med raudåte og ishavsåte. Alle konsentrasjonene er oppgitt i $\mu\text{g/L}$.

Komponentgruppe	Raudåte 1:40	Ishavsåte 1:40	Raudåte 1:10.000	Ishavsåte 1:10.000
SUM VOC	1343,787	1823,443	554,228	377,692
SUM SVOC (excl phenols)	196,079	254,684	136,155	180,283
SUM Naphthalenes	153,808	203,895	110,772	146,890
SUM 2-3 ring PAH	40,942	47,708	24,450	31,414
SUM 4-6 ring PAH	0,486	1,123	0,206	0,184
SUM Phenols	171,120	165,020	0,758	2,883
SUM Decalins	0,718	1,958	0,606	1,570
THC (fra GC-FID)	5158,000	4517,000	909,000	1006,000
THC (for LC ₅₀)	6501,787	6340,443	1463,228	1383,692

Det er, ikke overraskende, relativt mye flyktige organiske forbindelser (volatile organic compounds, VOC) i WAFene. Analysene av VOC, som identifiserer og kvantifiserer 33 ulike komponenter, viste at det var mest cyclohexane, metylcyclopentane og n-nonane i eksponeringsløsningene. For de semi-flyktige forbindelsene (SVOC) var det naftalener og fenoler som dominerte, med noe innslag av 2-3-rings PAHer.

3.2 Teoretisk beregning av giftighet

Giftigheten til en blanding av komponenter kan beregnes teoretisk ved bruk av metoder beskrevet i Technical Guidance Document fra European Commission (TGD, 2003). Kort fortalt tar denne modellen utgangspunkt i LC_{50} for hver enkelt komponent og summerer det toksiske bidraget fra hver komponent basert på målte konsentrasjoner i en eksponeringsløsning. LC_{50} for hver enkelt komponent er basert på litteraturverdier, og for de komponentene man ikke kjenner LC_{50} for, beregnes en teoretisk LC_{50} basert på en korrelasjon mellom kjente komponenters fettløselighet (LogKow) og giftighet. Slik kan LC_{50} for krepsdyr beregnes teoretisk kun basert på målte konsentrasjoner i eksponeringsløsningen. Denne modellen ligger til grunn for risikovurdering i forbindelse med utslipp. Slike beregninger gir også informasjon om hvilke av de detekterte komponentene i løsningen som bidrar mest til giftigheten i løsningen.

Basert på konsentrasjonen av enkeltkomponenter i WAF generert med marin diesel:vann forhold 1:40 og 1:10.000, ble en teoretisk LC_{50} for krepsdyr beregnet. I og med at komponentsammensetningen og konsentrasjonen av de ulike komponentene er noe forskjellig i de to WAFene, og at de ulike komponentene har forskjellig LC_{50} , var det også til en viss grad ulike komponenter som bidro til giftigheten (Tabell 2).

Tabell 2: Teoretisk beregnet giftighet (LC_{50}) for WAF generert med to ulike diesel:vann-forhold, og hvilke forbindelser som bidrar mest til giftigheten. (Uten C4/5-benzenes)

Forhold diesel:vann	Dyr eksponert for WAF	Teoretisk LC_{50}	Størst bidrag til toksisitet
1:40	<i>C. finmarchicus</i>	2212 µg/L	xylenes (10,74%), n-pentylbenzene (7,19%), 1,2,4-trimethylbenzene (7,14%), C1-naphthalene (5,78%). C3-phenathrenes (5,69%)
1:40	<i>C. glacialis</i>	1533 µg/L	n-pentylbenzenes (18,02%), xylenes (7,64%), C4-phenathrenes (6,09%), C4-dibenzothiophenes (6,09%)
1:10.000	<i>C. finmarchicus</i>	1843 µg/L	1,2,4-trimethylbenzene (11,28%), C2-naphthalenes (10,30%), C1-naphthalenes (10,27%), xylenes (8,94%)
1:10.000	<i>C. glacialis</i>	1133 µg/L	n-pentylbenzene (20,39%), C1-naphthalenes (10,28%), C2-naphthalenes (9,59%), n-nonane (8,14%)

3.3 Akutt giftighet for WAF av marin diesel

Det er generelt antatt at det arktiske miljøet er veldig sensitivt for forurensning. Dette antagelig fordi det er et miljø som befinner seg langt unna forurensningskilder og dermed kan klassifiseres som urørt, og organismene der er ikke tilpasset eksponering for antropogene forurensninger. Det er dessuten et miljø som har store sesongavhengige variasjoner i en rekke abiotiske faktorer som lys, temperatur og værforhold. Den store variasjonen i lys og temperatur gjør at det kun i en begrenset periode av året foregår stor marin primærproduksjon. Å studere det arktiske miljøets sensitivitet bør gjennomføres med et representativt utvalg av de artene som befinner seg der. En arts sensitivitet overfor en type forurensning kan måles ved å studere en effekt av forurensningen på arten man studerer, og sammenligne den konsentrasjonsavhengige responsen med sammenlignbare data fra arter i områder med andre klima. Den enkleste effekten å måle er akutt giftighet hvor man benytter dødelighet som endepunkt. LC_{50} -verdiene fra Arktiske arter kan sammenlignes med LC_{50} -verdier for andre arter som er eksponert for den samme forurensningen. I dette prosjektet har vi valgt å fokusere på den Arktiske hoppekreps *C. glacialis* som er svært sentral i det marine næringsnett rundt Svalbard. Dessuten finnes det mye data fra giftighetstester av WAF fra ulike oljer på den noe mer sørlige søster-arten *C. finmarchicus*.

Akutt giftighet av marin diesel WAF ble testet på *C. finmarchicus* og *C. glacialis* med identisk eksperimentelt oppsett, og prosent overlevelse ble, etter standard metodikk, plottet mot eksponeringskonsentrasjon som var verifisert med kjemisk analyse (Fig. 3). Vi benyttet to ulike forhold mellom marin diesel og sjøvann for å generere WAF; 1:40 og 1:10.000, og det ble dermed gjennomført to slike tester for begge arter. Dødelighet ble observert hver 24. time opp til 96 timer, og % overlevelse for hver gruppe ble plottet som funksjon av eksponeringskonsentrasjon oppgitt som THC.

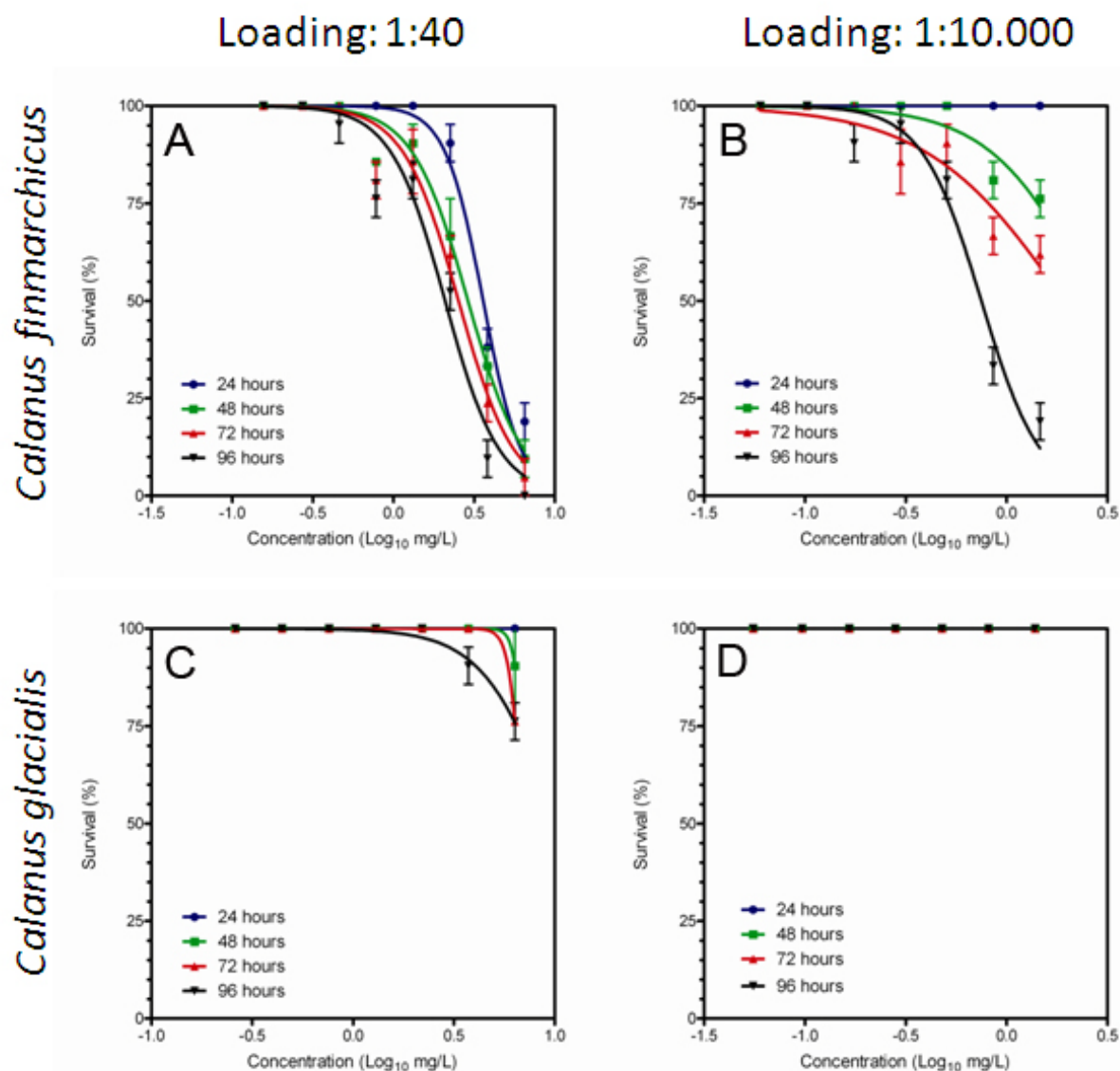


Fig. 3: Overlevelse (i %) hos raudåte (*C. finmarchicus*, øverst, A og B) og ishavsåte (*C. glacialis*, nederst, C og D) plottet som funksjon av eksponeringskonsentrasjon (total hydrokarboninnhold) for WAF tillaget med forhold marin diesel:vann 1:40 (venstre) og 1:10.000 (høyre). Hver kurve representerer for hvert enkelt tidspunkt overlevelse ble observert.

Det ble funnet klare forskjeller i effekter mellom de to artene, og beregnede LC₅₀-verdier er summert opp i Tabell 3. Ved eksponering for WAF lagd av marin diesel: vann-forhold på 1:40 ble det observert dødelighet for begge arter, men i løpet av de 96 timene eksponeringene varte, var det kun hos raudåte at konsentrasjonen av komponentene i vannet var av en høy nok til at det medførte over 50 % dødelighet, slik at man kan beregne en LC₅₀ med en tilstrekkelig grad av presisjon. Det ble ikke observert mer enn 25 %

dødelighet ved 100 % WAF-løsning for ishavsåte. For WAF tillaget med et forhold mellom marin diesel og sjøvann på 1:10.000 ble det observert dødelighet over 50 % kun etter 96 timer hos raudåte, mens det hos ishavsåte ikke var noe tegn til dødelighet ved noe tidspunkt. Eksperimentene med ishavsåte ble forlenget ut over 96 timer ettersom så lav dødelighet ble observert, men selv etter 144 timer ble ingen dødelighet observert for denne arten (WAF 1:10.000).

Tabell 3: Beregnet LC_{50} i akutt giftighetstesting av raudåte og ishavsåte basert på observerte data for alle tidspunkt, samt teoretisk beregnede effektgrenser (krepsdyr, LC_{50} – 96 timer) for WAF av marin diesel generelt er også teoretisk beregnet ut fra kjemisk sammensetning av WAF ut fra prosedyre i TGD (2003). NA= not analysed (ikke observert).

	Raudåte (<i>Calanus finmarchicus</i>)		Ishavsåte (<i>Calanus glacialis</i>)	
	1:40	1:10.000	1:40	1:10.000
LC_{50}– 24 timer	3599 µg/L	-	-	-
LC_{50}– 48 timer	2899 µg/L	2700 µg/L	-	-
LC_{50}– 72 timer	2531 µg/L	1935 µg/L	-	-
LC_{50}– 96 timer	2091 µg/L	749.5 µg/L	10100 µg/L	-
LC_{50}– 120 timer	NA	NA	7284 µg/L	-
LC_{50}– 144 timer	NA	NA	6928 µg/L	-
LC_{50}–teoretisk -96 timer	2212 µg/L	1843 µg/L	1533 µg/L	1133 µg/L

Tabell 3 viser hvilke konsentrasjoner (i THC) som påfører 50% dødelighet hos de to artene etter eksponering i ulike tidsperioder, samt teoretisk LC_{50} -verdier for krepsdyr eksponert for de komponentene som ble analysert for i løsningene. Jo lavere konsentrasjonene er, desto mer giftig er løsningen. For raudåte ser vi en økning i giftighet (senkning i LC_{50}) jo lengre de er blitt eksponert, og det samme ser vi for 1:40 WAF for ishavsåte.

Forvaltningsmessig er det viktig at man ikke underestimerer effekten av eksponeringen. Dette vil si at hvis den teoretiske LC_{50} -konsentrasjonen er høyere enn den observerte, vil man ende opp med å underestimere effekten (dødeligheten av hoppekreps) etter et utslipp. Hvis man sammenligner LC_{50} -96 timer for de observerte og de teoretiske dataene ser vi at for raudåte har en noe lavere observert LC_{50} enn teoretisk LC_{50} for både 1:40 og 1:10.000 WAF, og dette betyr at man underestimerer effekten av diesel. For ishavsåte derimot, er forholdet omvendt, og effekten blir overestimert. Dette er veldig tydelig for ishavsåte hvor den observerte LC_{50} var vesentlig høyere enn den teoretisk beregnede, og faktisk for 1:10.000 WAF var dødeligheten så lav at man ikke engang kunne beregne en LC_{50} ut fra observerte data. Som nevnt tidligere, så er det store forskjeller i LC_{50} mellom de to artene vi har studert, og ut fra disse dataene kan man konkludere med at ishavsåte er mer tolerant enn raudåte. Årsaken til dette kan ligge i at det tar lengre tid å ta opp de giftige forbindelser i løsningen slik at de kan forårsake skade, men det kan også bety at ishavsåte rett og slett tåler mer. Hvis årsaken er at den tar opp forbindelser saktere, som forøvrig er naturlig å anta ved lavere temperaturer, så betyr dette i praksis at man i forbindelse med et uhellsutslipp av marin diesel (og for så vidt andre typer petrogener forurensninger) vil ha et større tidsvindu i forhold til å få på plass oljevernberedskap for å samle opp utslippet. Samtidig er marin diesel, som nevnt over, i stor grad bestående av flyktige forbindelser som vil kunne fordampe relativt raskt sammenlignet med f.eks. tungoljer.

3.4 Forhold mellom akutt giftighet og dyrenes fettinnhold

Høyt fettinnhold er et kjent karaktertrekk hos Arktiske arter. Arter i *Calanus*-slekten har et stort fett-lager som den bygger opp, for så å forbrenne det i forbindelse med reproduksjon (produksjon av egg og

spermatoforer). Mange oljekomponenter har høy fettløselighet, og man kan dermed anta at disse forbindelsene vil akkumulere i fettrike vev når de tas opp av organismer. På en slik måte kan de giftige oljekomponentene bli liggende immobilt lagret inntil fett forbrennes og de frigis og dermed kan forårsake skade. Basert på disse antagelsene, kan man prediktere at hoppekreps som har lite fett vil være mer utsatt for den akutt giftige effekten av oljekomponenter. Vi gjennomførte et eksperiment hvor organismene eksponert for en marin diesel-løsning som var tilsvarende LC₂₀; altså en løsning som skulle medføre at 20% av testdyrene døde innen 96 timer. Døde dyr ble tatt ut hver 24. time og analysert for fettinnhold biometrisk. For *C. finmarchicus* benyttet vi voksne dyr, for disse varierer mye mer i fettinnhold enn kopepodittstadium V (CV). For *C. glacialis* benyttet vi CV, for det var stort sett bare CV vi fikk inn da vi trålte Kongsfjorden.

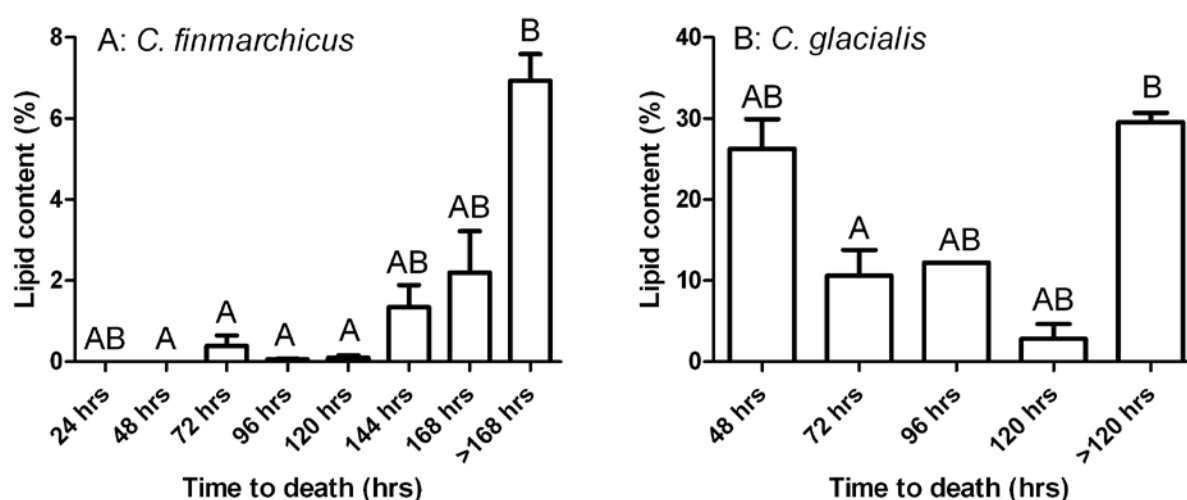


Fig. 4: Fettinnhold som en funksjon av dødstidspunkt for *C. finmarchicus* (A) og *C. glacialis* (B). >120 hrs og >168 hrs er de dyrene som var i live ved avslutning av testene. Signifikante forskjeller mellom gruppene er anvist med store bokstaver (A, B og AB) over søylene.

Resultatene fra eksperimentet med *C. finmarchicus* (Fig. 4A) viste tydelig at fettinnholdet var mye høyere i dyr som overlevde etter 168 timers eksponering enn i de dyra som døde inntil vi avsluttet forsøket (etter 168 timer). For *C. glacialis* ble forsøket kun kjørt over 120 timer, men et lignende forløp ble observert (Fig. 4B). Bortsett fra de dyrene som døde tidlig under eksponeringen (48 timer), så var fettinnholdet høyere i de dyrene som overlevde til slutten av forsøket enn i dyrene som døde før den tid. Resultatene viser at fettrike dyr overlever en akutt eksponering for marin diesel bedre enn fettfattige dyr. Dette ble vist for både *C. finmarchicus* og *C. glacialis*, og vi har også tidligere funnet og beskrevet det samme forholdet mellom akutt giftighet av forvitret råolje WAF og fettinnhold for hoppekreps (Hansen et al., 2011).

Disse resultatene er viktige bidragsyttere for å kunne presist forutsi eventuelle skadelige effekter av utslipp i arktisk marint miljø. I OSCAR-modellen beregnes opptak av oljekomponenter i organismer basert på tilstedeværelsen av oljekomponentene i vannfasen (modelleres i oljedriftsmodellen), opptak/utskillelseskinetikk og fettinnholdet i organismen som eksponeres. Data på fettinnholdet i ishavsåte, som er fremskaffet gjennom dette prosjektet, er derfor viktige for å kunne gjøre modellene enda mer presise i forhold til å beregne giftigheten av utslippet. Vi har også skaffet til veie datagrunnlag fra fettinnhold i CV av raudåte, som er sammenlignbare med de vi fant i ishavsåte; altså ingen signifikante forskjeller i fettinnhold de to artene imellom på dette stadiet. Det er viktig å ha et bevisst forhold til, og ha en oversikt over fettinnholdet i dyr man tester på når man gjennomfører slike akutte giftighetstester, fordi det er åpenbart at en LC₅₀ vil variere mellom dyr med forskjellig fettinnhold. Forvaltningsmessig er det med andre ord vesentlig også å ha en oversikt over fettinnholdet i de dyrene som befinner seg i det området et utslipp finner sted, og med de resultatene som nå foreligger er det mulig å implementere disse dataene når man gjennomfører modellsimuleringer av uhellsutslipp av marin diesel i Kongsfjorden og andre arktiske havområder. Samtidig er det viktig å være klar over at ulike utviklingstrinn hos *Calanus*-arter har ulikt

fettinnhold (Hansen et al., 2008B), noe som tilsier at det kan være variasjoner i LC_{50} også mellom dyr på ulikt stadium i utviklingen. Et annet aspekt er at i en eksponeringssituasjon vil de reproduserende dyrene, som har mindre fett enn CV, være mer utsatt og sensitiv for eksponering. Reproduserende hunner har vesentlig mindre fettinnhold enn CV. Økologisk sett vil et utslipp av marin diesel til marint miljø kunne ha større effekt hvis det skjedde på et sted og et tidspunkt hvor reproduksjon fant sted. På den annen side vil eventuelle langtidseffekter av lipid-akkumulerte komponenter finne sted først når de fettrike dyrene går over til å reproducere. Dette prosjektet kan ikke, på basis av et relativt begrenset antall eksperimentelle tester, fastslå i hvilken grad forskjellene i giftighet de ulike utviklingstrinn imellom er store, eller om eventuelle lipidakkumulerte oljeforbindelser faktisk vil påvirke dyrene ved et senere tidspunkt. Disse aspektene er likefullt viktige, og burde studeres videre.

3.5 Stressresponser i hoppekreps

Hos en rekke organismer finnes det såkalte avgiftningssystemer som bryter ned og metaboliserer giftige forbindelser som tas opp i organismer ved eksponering for olje og marin diesel. Vi har nylig beskrevet slike avgiftningssystemer i ishavsåte raudåte. Økt genuttrykk av avgiftningssyzymer som GST er tidligere vist etter eksponering for WAF av råolje (Hansen et al., 2011) og tungmetallet kvikksølv (Øverjordet et al., in prep). I dette forsøket gjennomførte vi to studier hvor vi skulle se på sammenhengen mellom GST uttrykk og eksponeringskonsentrasjon og sammenhengen mellom GST uttrykk og eksponeringstid. Begge eksponeringsforsøkene ble utført med WAF av marin diesel lagd med et forhold mellom diesel og vann på 1:40 (se pkt 2.2). Et økt uttrykk av GST gir et bilde på i hvor stor grad dyrene er blitt påvirket av eksponering for marin diesel, men også i hvor stor grad de er i stand til å håndtere stresset. Årsaken til å gjennomføre et slikt studium var å undersøke om responsen (avgiftningen) foregikk med ulik hastighet, og dermed kanskje kunne komme opp med en alternativ forklaring på hvorfor ishavsåte tilsynelatende var mindre sensitiv enn raudåte.

Økt GST genuttrykk ble observert for begge arter etter eksponering for WAF av marin diesel. Forholdet mellom uttrykk og eksponeringskonsentrasjoner er vist i Fig 5. For den høyeste konsentrasjonen, som tilsvarer 50% av LC_{50} -konsentrasjonen, ble det vist en signifikant økning i GST uttrykk for begge arter, men det ble vist klare trender for at man har en økt GST uttrykk også ved de lavere konsentrasjonene uten at disse var signifikant.

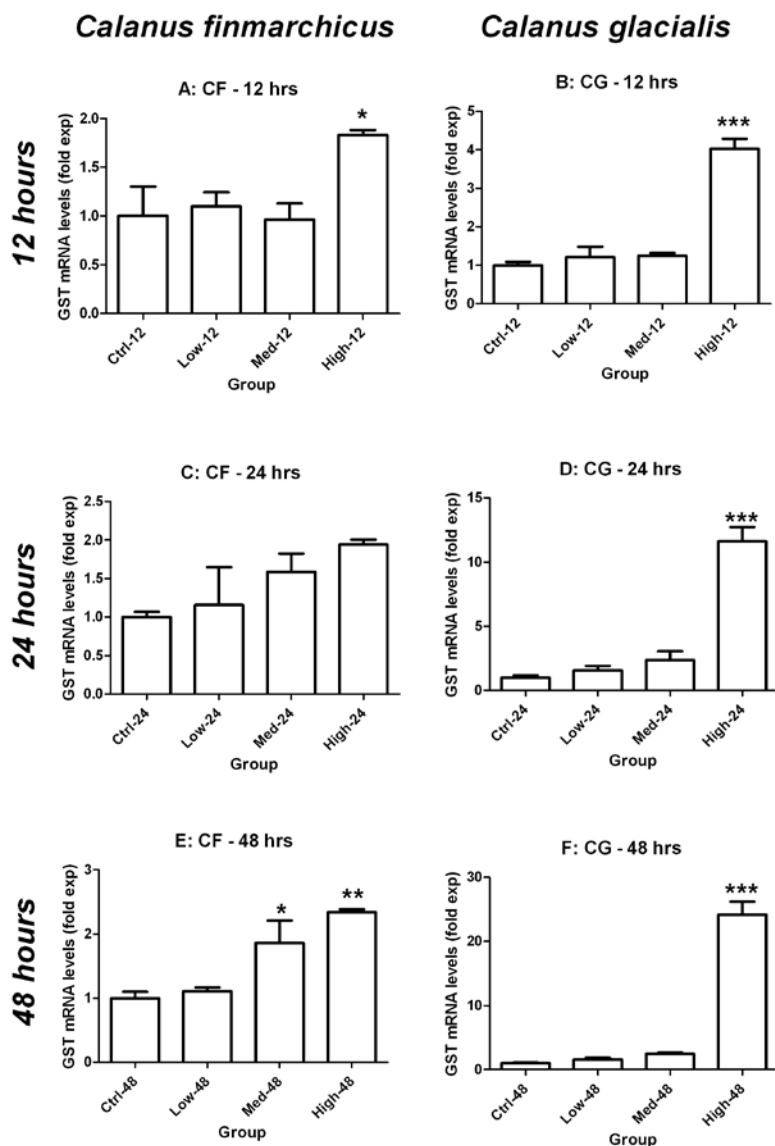


Fig 5: Uttrykk av GST som funksjon av eksponeringskonsentrasjon (Low=0.5% av LC_{50} , Med=5% av LC_{50} og High=50% av LC_{50}) for *C. finmarchicus* (til venstre) og *C. glacialis* (til høyre). Tre tidspunkt ble benyttet; 12, 24 og 48 timer. Søylene viser gjennomsnitt og standard feil (n=3). Signifikante forskjeller mellom kontroll (Ctrl) og eksponerte grupper er vist med * ($p<0.05$), ** ($p<0.01$) og *** ($p<0.001$). Vær oppmerksom på forskjellige intervall på y-aksene.

Også som funksjon av eksponeringstid ble det observert økende genuttrykk (Fig. 6) bortsett fra for den laveste konsentrasjonen som tilsvarer 0.5% av LC_{50} . Ved den høyeste konsentrasjonen ble det observert økt genuttrykk allerede etter 12 timers eksponering for begge artene (Fig 6E og F). Det er verdt å merke seg for begge disse studiene at responsen er mer intens i *C. glacialis* enn i *C. finmarchicus*.

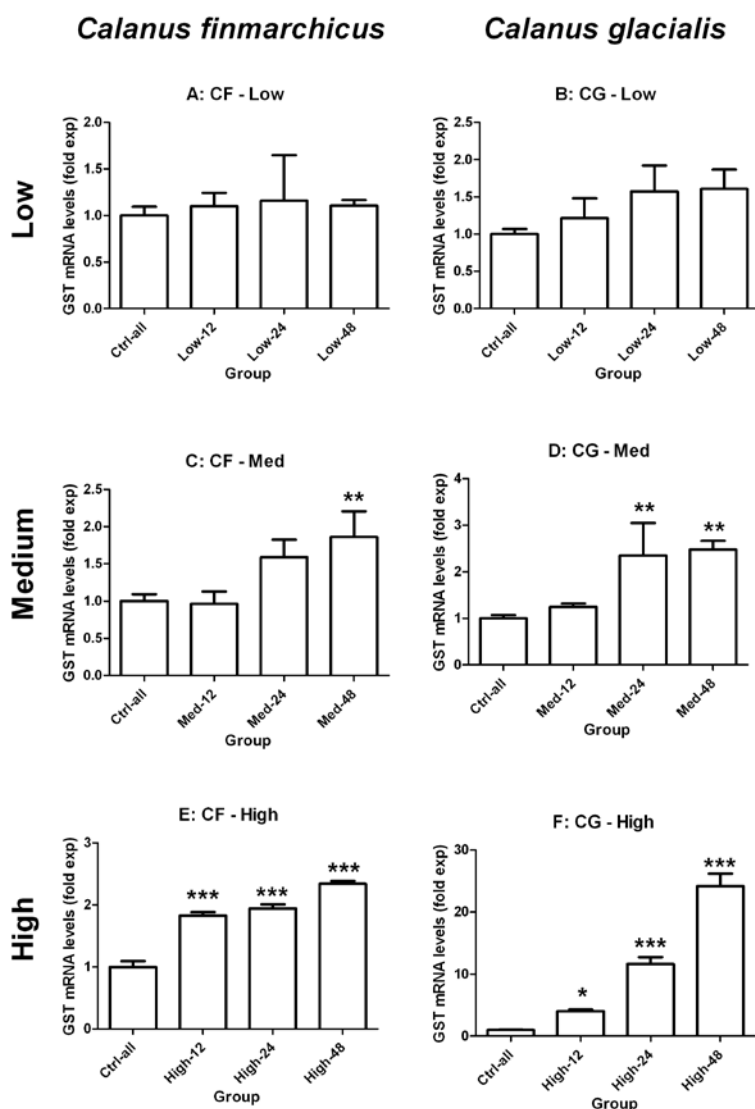


Fig. 6: Uttrykk av GST som funksjon av eksponeringstid for *C. finmarchicus* (til venstre) og *C. glacialis* (til høyre). Tre eksponeringskonsentrasjoner ble benyttet; low (0.5% av LC_{50}), med (5% av LC_{50}) og high (50% av LC_{50}). Søylen viser gjennomsnitt og standard feil (n=3). Signifikante forskjeller mellom kontroll (Ctrl) og eksponerte grupper er vist med * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) og *** ($p < 0.001$). Vær oppmerksom på forskjellige intervall på y-aksene.

Ettersom det ble observert store forskjeller i LC_{50} for de to artene er det trolig at forskjellene i responsintensitet artene mellom skyldes ulik evne til å takle stresset. Hvis man ser resultatene fra akutttestene (LC_{50}) og avgiftningssystemet i sammenheng, er det nærliggende å anta at årsaken til at ishavsåta er mer tolerant enn raudåta overfor eksponering for marin diesel er fordi førstnevnte er i bedre stand til å håndtere de giftige komponentene. Lignende resultater ble observert da de to artene ble eksponert for kvikksølv i et tidligere studium; altså at *C. glacialis* responderte med høyere intensitet, og tilsynelatende håndterte giftvirkningen bedre. For WAF lagd av forvitret råolje ble derimot det motsatte påvist; *C. finmarchicus* responderte med høyere intensitet enn *C. glacialis*. Dette kan forklares med et raskere opptak av forbindelser som finnes i råolje WAF (Hansen et al., 2011) enn i kvikksølv og marin diesel.

4 Oppsummerende konklusjon og forslag til oppfølging

Resultatene fra dette prosjektet er summert opp i Tabell 4, hvor også de vitenskapelige konklusjonene og den forvaltningsmessige relevansen er synliggjort.

Tabell 4: Prosjektets resultater satt i sammenheng med vitenskapelige konklusjoner og forvaltningsmessig relevans.

Funn og observasjoner	Vitenskapelig konklusjon	Forvaltningsmessig relevans
Den vannløselige fraksjonen (WAF) av marin diesel inneholdt en stor andel flyktige forbindelser, og svært lave mengder PAHer	Ved et utslipp av marin diesel på sjø vil en stor andel av dieselens fordampe	Innføring av pålegg om bruk av marin diesel i stedet for tung bunkersolje vil medføre stor nedgang i sannsynligheten for at drivstoff vil forårsake skader i strandsonen ved uhellsutslipp
Høyere LC ₅₀ for og lavere giftighet av marin diesel hos ishavsåte enn raudåte. Teoretisk beregnet LC50 lavere enn observert for ishavsåte.	Ishavsåte mer tolerant overfor eksponering for marin diesel enn raudåte og ”gjennomsnittelig krepsdyr”	Ved å benytte dagens modeller og data for å beregne skade etter et utslipp av marin diesel til marint miljø, så overestimeres effekten (tap av populasjon)
Hoppekreps med høyt fettinnhold overlever akutt eksponering for marin diesel lengre enn hoppekreps med lavt fettinnhold	Det er viktig å ha et forhold til fettinnholdet i testdyr når man skal vurdere effekter av marin diesel og andre typer oljesøl. Hvis man utfører giftighetstester på fettrike dyr, vil grenseverdien man kalkulerer være høyere enn at man tar høyde for effekter på fettfattige dyr	Nye biologiske data på fettinnhold av ishavsåte fra dette prosjektet kan benyttes i modeller for å gjøre modellene mer presise til å beregne effektene av et utslipp i arktiske havområder
Markant forskjell i genuttrykk av GST i de to artene: Ishavsåte responderte mye mer enn raudåte.	Ishavsåte er bedre rustet til å håndtere det stresset som innebærer i å bli eksponert for de vannløselige forbindelsene i en marin diesel	Ishavsåte, som er en svært sentral og tallrik art i arktiske farvann, er ikke spesielt sensitiv overfor eksponering for marin diesel

4.1 Forslag til oppfølgende studier

4.1.1 Simulering av utslipp

På basis av de resultatene som nå er på plass, kunne det vært av stor interesse å få gjennomført et simulert utslipp av marin diesel i Kongsfjorden ved bruk av OSCAR-modellen, både med gjeldende data som ligger i modellen og med justeringer for toleransegrensene for ishavsåte. Dette ville gitt direkte informasjon om hvor store utslag dette prosjektets datasett har tilført. I tillegg hadde det vært nyttig å simulere et scenario hvor

man slapp ut tilsvarende mengder tung bunkersolje for å se på hvilken forskjell i effekt det ville hatt, og samtidig få visualisert hvilke fordeler forbudet mot bruken av tung bunkersolje rundt Svalbard har medført i forhold til skjebnen og effekten av oljen. Man kunne kanskje også sett for seg å simulere utslipp av andre typer drivstoff, som f.eks. "wide range gas oil" (WRG) som også er forbudt i Arktis, men som International Maritime Organization (IMO) har tillatt bruk av i Antarktis.

4.1.2 Arktiske arters sensitivitet

Det kan generelt sett være av stor interesse å undersøke videre sensitiviteten til arktiske organismer overfor olje-relaterte utslipp. Resultatene fra dette studiet tilsier at ishavsåte er mindre sensitiv enn raudåte overfor eksponering for marin diesel, men det er et for tynt grunnlag til å generalisere. For slike sammenlignende studier er raudåte og ishavsåte fine å bruke siden de er tilpasset de miljøene man gjerne vil sammenligne, og artene er ellers relativt like både rent fysisk og i levesett. Videre studier anbefales for å få en enda bedre oversikt. Det er svært viktig at man tar alle forbehold før man åpner for oljeindustri-relatert virksomhet i Arktis, og ikke minst hvis det med tiden også blir økt skipstransport i området.

5 Referanser

Aurand, D.; Cuelho, G., 1996. Proceedings of the 4th meeting of the chemical response to oil spills: Ecological Effect Research Forum (CROSERF) Report 96-01 Ecosystem Management & Associates, Purcellville, VA; 50 pp.

European Commission, 2003. Technical Guidance Document on Risk Assessment. European Chemicals Bureau.

Hansen, Bjørn Henrik; Altin, Dag.; Rørvik, Siv Fiske; Øverjordet, Ida Beathe; Olsen, Anders J.; Nordtug, Trond. 2011. Comparative study on acute effects of water accommodated fractions of an artificially weathered crude oil on *Calanus finmarchicus* and *Calanus glacialis* (Crustacea: Copepoda). Science of the Total Environment, 409, 704-709.

Hansen, Bjørn Henrik; Nordtug, Trond; Altin, Dag; Booth, Andy; Hessen, Kristine Mordal; Olsen, Anders J. 2009. Gene expression of GST and CYP330A1 in lipid-rich and lipid poor female *Calanus finmarchicus* (Copepoda: Crustacea) exposed to dispersed oil. Journal of Toxicology and Environmental Health, 72, 131-139.

Hansen, Bjørn Henrik; Altin, Dag; Vang, Siv-Hege; Nordtug, Trond; Olsen, Anders J., 2008A. Effects of naphthalene on stress gene transcription in *Calanus finmarchicus* (Crustacea, Copepoda). Aquatic Toxicology, 86, 157-165.

Hansen, Bjørn Henrik; Altin, Dag; Hessen, K.M.; Dahl, Ulrika; Breitholtz, Magnus; Nordtug, Trond; Olsen, Anders J., 2008B. Expression of ecdysteroids and cytochrome P450 enzymes involved in lipid turnover and reproduction in *Calanus finmarchicus* (Crustacea: Copepoda). General and Comparative Endocrinology, 158, 115-121.

ISO. Water quality – Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda: Crustacea). ISO 14669: 1999. 16 pp.

ISO 8217 Fuel Standard Fourth Edition: website:

<http://www.dnv.com/industry/maritime/servicessolutions/fueltesting/fuelqualitytesting/iso8217fuelstandard.asp>

Miljøverndepartementet, 2009. Forskrift om endringer i forskrift om opprettelse av fuglereservater og større naturvernområder på Svalbard. Fastsatt ved Kongelig resolusjon 4. september 2009 med hjemmel i lov av 15. juni 2001 nr. 79 om miljøvern på Svalbard (svalbardmiljøloven) § 12, § 16, § 17, § 21, § 22, § 39, § 42, § og §99, jf § 102. Fremmet av Miljøverndepartementet.

Miller, C.B., Morgan, C.A., Prah, F.G., Sparrow, M.A., 1998. Storage lipids of the copepod *Calanus finmarchicus* from Georges Bank and the Gulf of Maine. Limnol. Oceanogr. 43, 488–497.

Øverjordet, I.; Altin, D.; Gabrielsen, G.W.; Berg, T.; Jenssen, B.M.; Hansen, B.H. Uptake and acute effects of mercury on *Calanus glacialis* and *Calanus finmarchicus*. Manuscript prepared for Aquatic Toxicology.



Teknologi for et bedre samfunn
www.sintef.no