



Statlig program for forurensningsovervåking

Oppdragsgiver

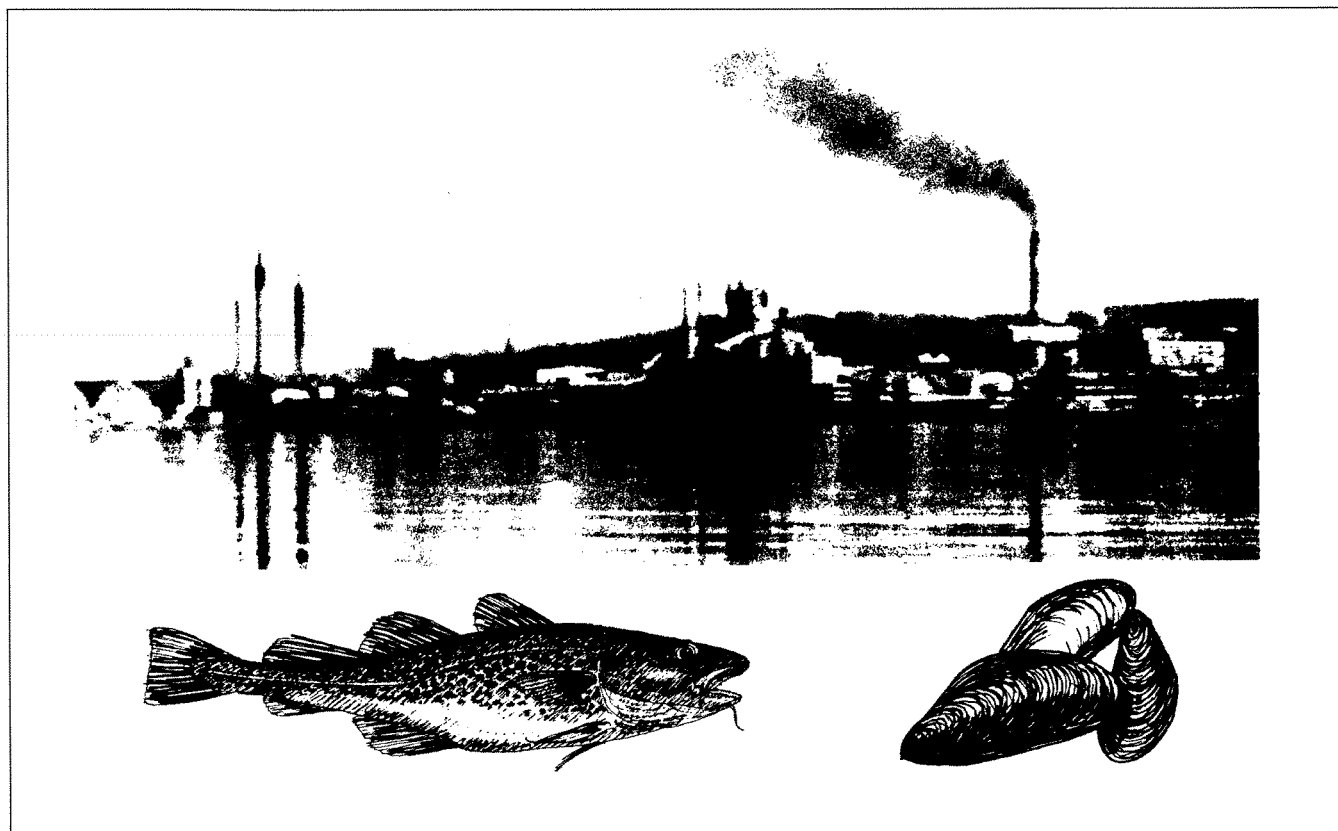
Statens forurensningstilsyn

Rapport 714/97

Utførende institusjoner NIVA

Overvåking av effekter av miljø- gifter på blåskjell og torsk fra **Grenlandsfjordene**

1996



Hovedkontor

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

Sørlandsavdelingen

Televeien 1
4890 Grimstad
Telefon (47) 37 29 50 55
Telefax (47) 37 04 45 13

Østlandsavdelingen

Sandvikaveien 41
2312 Ottestad
Telefon (47) 62 57 64 00
Telefax (47) 62 57 66 53

Vestlandsavdelingen

Nordnesboder 5
5005 Bergen
Telefon (47) 55 30 22 50
Telefax (47) 55 30 22 51

Akvaplan-NIVA A/S

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

Tittel Overvåking av effekter av miljøgifter på blåskjell og torsk fra Grenlandsfjordene 1996 Overvåkingsrapport 714/97 TA-nr. 1486/97	Løpenr. (for bestilling)	Dato	
	3763-97	20. januar 1998	
	Prosjektnr.	Udennr.	Sider
	80312	2	28
Forfatter(e) Ketil Hylland Torgeir Bakke Lars Förlin	Fagområde	Distribusjon	
	Marin økologi		
	Geografisk område	Trykket	
	Telemark	NIVA	

Oppdragsgiver(e) SFT (Statlig program for forurensningsovervåking)	Oppdragsreferanse Per Erik Iversen
---	---------------------------------------

Sammendrag


Denne undersøkelsen ble utført for å klarlegge om forhøyde konsentrasjoner av organiske miljøgifter i Grenlandsfjordene gir effekter på blåskjell og torsk. Effekter på blåskjell og torsk ble vurdert ved analyser av vekstpotensiale (blåskjell) og påvirkning på avgiftningenszymer (fase-1 og fase-2). Det var redusert vekstpotensiale for blåskjell fra alle tre stasjonene i Langesundsfjorden sammenlignet med blåskjell fra ytre Oslofjord (Solbergstrand). Tilsvarende ble de høyeste aktivitetene av fase-1 enzymer (benzo[a]pyren hydroksylase, BPH) funnet i blåskjell innsamlet nær Brevik, mens de laveste nivåene ble funnet i blåskjell fra Solbergstrand. Det var klare responser i begge biomarkørene hos torsk innsamlet i Frierfjorden sammenlignet med torsk innsamlet ved Brevik eller Såstein. Både fase-1 (EROD) og fase-2 (glutathion S-transferase, GST) var signifikant forhøyd i torsk fra Frierfjorden sammenlignet med torsk fra Breviksfjorden eller Såstein. Det var noe forhøyde nivåer av PAH-metabolitter i galle til torsk fra Frierfjorden, men det er sannsynlig at det største bidraget til forhøyde EROD og GST aktiviteter kommer fra klorerte organiske miljøgifter.

Fire norske emneord 1. biomarkør 2. torsk 3. blåskjell 4. vekstpotensiale	Fire engelske emneord 1. biomarker 2. Atlantic cod 3. blue mussel 4. scope for growth
---	---



Ketil Hylland
Prosjektleder

ISBN 82-577-3335-0



Bjørn Braaten
Forskningssjef

O-803122

**Overvåking av effekter av miljøgifter på blåskjell og
torsk fra Grenlandsfjordene 1996**

Forord

Dette prosjektet er en del av overvåking av Grenlandsfjordene under Statlig program for forurensningsovervåking. Kontakt hos SFT har vært Per Erik Iversen. Bjørnar Kvalheim takkes for innsamling av torsk og blåskjell, Åse Kristine Rogne for analyse av PAH-metabolitter, Randi Romstad og Harry Efraimsen for biokjemisk analysearbeid og Aina Stenborg, Gøteborgs Universitet, for analyse av glutathion *S*-transferase og EROD i torskelever. Ketil Hylland har koordinert felt-innsamling, prøvetaking for biokjemiske analyser og opparbeiding av alt vev, samt utført analyser for glutathion *S*-transferase og benzo[*a*]pyren hydroksylase i fordøyelseskjertel fra blåskjell, Torgeir Bakke har hatt ansvar for fysiologiske undersøkelser av blåskjell (scope for growth), Lars Förlin for biokjemiske analyser i torsk.

Oslo, 20.januar 1997

Ketil Hylland

Innhold

SAMMENDRAG	5
SUMMARY	6
1. INNLEDNING.....	7
1.1 FORMÅL.....	7
1.2 VALG AV EFFEKT-PARAMETRE OG ORGANISMER.....	7
2. MATERIALE OG METODER	9
2.1 INNSAMLING OG PRØVETAKING AV ORGANISMER	9
2.2 ANALYSER - BLÅSKJELL	9
2.2.1 <i>Energibudsjett</i>	9
2.2.2 <i>Opparbeiding til biokjemiske analyser</i>	12
2.2.3 <i>Benzo[a]pyren hydroksylase (BPH)</i>	13
2.2.4 <i>Glutation S-transferase (GST)</i>	13
2.2.5 <i>Protein</i>	13
2.3 ANALYSER - FISK	13
2.3.1 <i>Opparbeiding til biokjemiske analyser</i>	13
2.3.2 <i>Cytokrom P4501A aktivitet (EROD)</i>	13
2.3.3 <i>Glutation S-transferase (GST)</i>	13
2.3.4 <i>Protein</i>	13
2.3.5 <i>PAH-metabolitter og biliverdin i galle</i>	14
2.4 STATISTISKE ANALYSER	14
3. RESULTATER OG DISKUSJON.....	15
3.1 EFFEKTER PÅ BLÅSKJELL	15
3.1.1 <i>Energibudsjett</i>	15
3.1.2 <i>Benzo[a]pyren hydroksylase (BPH) aktivitet</i>	19
3.1.3 <i>Glutation S-transferase aktivitet</i>	19
3.1.4 <i>Syntese av resultater for blåskjell</i>	20
3.2 EFFEKTER PÅ FISK.....	21
3.2.1 <i>Pyren- og benzo[a]pyren-metabolitter i galle</i>	21
3.2.2 <i>Cytokrom P4501A aktivitet</i>	22
3.2.3 <i>Glutation S-transferase aktivitet</i>	23
3.2.4 <i>Syntese av resultater for torsk</i>	24
4. KONKLUSJONER	25
5. REFERANSER.....	26

Sammen drag

1. Miljøgift-tilførsler har i flere tiår påvirket Grenlandsfjordene og har ført til kostholdsråd og omsetningsrestriksjoner for marine organismer innsamlet i området. Til tross for at tilførslene fra industrien er kraftig redusert er det fremdeles forhøyde konsentrasjoner av miljøgifter i både evertebrater og fisk i området. Denne undersøkelsen ble utført for å klarlegge om de forhøyde konsentrasjonene gir effekter på blåskjell og torsk.
2. For blåskjell ble vekstpotensialet (scope for growth), samt biomarkører for organiske miljøgifter kvantifisert på tre stasjoner i Langesundsfjorden og en referansestasjon (marin forskningsstasjon, Solbergstrand). Det ble innsamlet torsk i tre områder: Frierfjorden, Breviksfjorden og ved Såstein (utenfor Langesundsfjorden). Torskelever ble analysert for biomarkører for organiske miljøgifter i lever og for metabolitter av utvalgte PAH-forbindelser i galle.
3. Det var redusert vekstpotensiale for blåskjell fra alle tre stasjonene i Langesundsfjorden sammenlignet med blåskjell fra ytre Oslofjord (Solbergstrand). Tilsvarende ble de høyeste aktivitetene av fase-1 enzymer (benzo[a]pyren hydroksylase) funnet i blåskjell innsamlet nær Brevik, mens de laveste nivåene ble funnet i blåskjell fra Solbergstrand.
4. Det var klare responser i begge biomarkørene hos torsk innsamlet i Frierfjorden sammenlignet med torsk innsamlet ved Brevik eller Såstein. Både fase-1 (cytokrom P4501A-aktivitet målt som EROD) og fase-2 (glutathion *S*-transferase, GST, aktivitet) var signifikant forhøyd i torsk fra Frierfjorden sammenlignet med torsk fra de to andre områdene.
5. Det var høyere konsentrasjoner av PAH-metabolitter i galle til torsk fra Frierfjorden enn fra de to andre stasjonene, og den relative andelen av de to målte metabolittene var ulik for torsk innsamlet i Frierfjorden sammenlignet med torsk innsamlet i Breviksfjorden eller ved Såstein.
6. Det er sannsynlig at det største bidraget til forhøyde EROD- og GST-aktiviteter kommer fra klorerte organiske miljøgifter, men med et mulig bidrag fra PAH.
7. Forurensningsbelastningen i området påvirker både blåskjell og fisk. Påvirkningen på blåskjell omfatter kystområder ut til Skagerrak-kysten (også Helgeroa). Torsk innsamlet i Frierfjorden var klart påvirket i forhold til fisk innsamlet i Breviksfjorden (og ved Såstein).
8. Det var ingen forskjeller i påvirkning mellom torsk innsamlet i Breviksfjorden og torsk innsamlet ved Såstein. Det er sannsynlig at torsk fra begge områdene har noe forhøyde aktiviteter av EROD (sammenlignet med torsk fra referanseområder). I leveren til torsk fra Breviksfjorden var det 1.4 ganger større mengder toksisitetsekvivalenter enn i torsk fra Såstein. Denne økningen var sannsynligvis ikke tilstrekkelig til å føre til økning i aktiviteten av avgiftningenszymer når denne trolig allerede var noe forhøyd.

Summary

Title: Monitoring effects of contaminants on blue mussel og Atlantic cod in Grenland 1996

Year: 1997

Authors: Ketil Hylland, Torgeir Bakke, Lars Förlin

Source: Norwegian Institute for Water Research, ISBN No.: ISBN 82-577-3335-0

1. Innledning

Miljøgift-tilførsler, særlig av klororganiske forbindelser, har i flere tiår påvirket Grenlandsfjordene og har ført til kostholdsråd og omsetningsrestriksjoner for marine organismer innsamlet i området (Knutzen et al. 1995). Til tross for at tilførslene fra industrien er kraftig redusert er det fremdeles forhøyde konsentrasjoner av miljøgifter i både evertebrater og fisk (Knutzen 1997). De største overkonsentrasjoner av miljøgifter i organismer gjelder klorerte organiske miljøgifter som dioksiner, dibenzofuraner, oktaklorstyren, enkelte polyklorerte bifenyler (PCB) og heksaklorbensen (HCB), mens det tidligere også har vært store tilførsler av polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH) og kvikksølv (Hg). Det er etterhvert betydelig kunnskap om konsentrasjoner av miljøgifter i organismer, men eventuelle effekter har ikke vært like grundig undersøkt. Det har vært gjort flere undersøkelser av bunndyrsamfunn (Rygg 1989, 1995, 1996) og det ble i 1986 holdt en internasjonal workshop der ulike metoder ble benyttet til å kvantifisere effekter på marine organismer, særlig blåskjell og skrubbe (Bayne et al., 1988, Addison, 1988). I tillegg har det vært gjort noen begrensede undersøkelser i nyere tid (Winther-Larsen, 1990, Olsen, 1997).

1.1 Formål

Målet med undersøkelsen var å klarlegge om de nåværende miljøgift-forholdene i Grenlandsfjordene har effekter på bunndyr og/eller fisk i området.

1.2 Valg av effekt-parametre og organismer

Som nevnt ovenfor er miljøproblemene i Grenlandsfjordene hovedsakelig knyttet til forhøyde konsentrasjoner av organiske miljøgifter i sediment og organismer. Klorerte organiske miljøgifter kan gi en rekke ulike skader på marine organismer. Slike skader kan være knyttet til redusert reproduksjon (Cross og Hose, 1988; von Westernhagen et al. 1989), effekter på immunforsvaret (Voccia et al. 1994), redusert larveoverlevelse (Waring et al. 1996; Shenker og Cherr, 1990) eller økt sykdomsfrekvens (Vethaak og ap Rheinallt, 1992). Overkonsentrasjoner av polysykliske aromatiske hydrokarboner har særlig vært knyttet mot økt dannelse av kreftsvulster (Stein et al. 1993) og redusert reproduksjon (Johnson et al. 1993; Casillas et al. 1991).

Fysiologiske effekt-parametre

Vekst er et integrert resultat av flere viktige fysiologiske prosesser i en organisme, og redusert vekst er derfor et sentralt mål for stress. Spesielt indikerer vekst balansen mellom prosesser for energiopptak (fødeopptak og assimilasjon) og energibruk (forbrenning og ekskresjon). Hver av disse funksjonene kan med rimelig letthet måles i muslinger under tilnærmet naturlige betingelser, og siden alle funksjonene kan uttrykkes i form av energiflukt pr tidsenhet (f.eks. $J h^{-1}$), kan man på basis av målingene kalkulere den energiflukt skjellene i samme tidsrom har tilgjengelig for vekst og reproduksjon. Denne energiflukt eller mål for energistatus er betegnet scope-for-growth, SFG, som forenklet kan oversettes til vekstpotensiale. SFG kan uttrykkes ved formelen:

$$SFG = I * A - (R+E)$$

der I = næringsopptak
 A = % av næringen som blir assimilert (assimilasjonseffektivitet)
 R = energitap gjennom forbrenning (respirasjon)
 E = energitap gjennom (nitrogen-)ekskresjon

SFG kan variere fra klart positiv under optimale livsbetingelser til klart negativ når dyret lever under stressforhold der kroppsreservene forbrukes.

SFG-målinger i blåskjell har blitt brukt med hell til å påvise og kvantifisere forurensningsbelastninger i estuarier og kystområder i en rekke områder (Widdows og Donkin 1992, Widdows et al 1995). Erfaring har vist at ved riktig behandling av skjellene vil en etablert tilstand av SFG (i skjellene) beholdes i minst 3-4 døgn etter at skjellene er samlet. Dette betyr at man kan frakte skjell fra et undersøkelsesområde til laboratoriet og utføre målingene der. Metodens følsomhet og sammenheng med grad av belastning ble også demonstrert under en internasjonal sammenlikning av teknikker for biologisk overvåking i 1986, der skjell fra omtrent de samme lokaliteter i Grenlandfjordene og fra eksperimentelle bassenger ved NIVAs forskningsstasjon Solbergstrand ble undersøkt (Widdows og Johnson 1988).

I tilknytning til miljøgiftovervåkingen i Grenlandfjordene 1996 ble det besluttet å måle SFG i de samme blåskjellbestandene som ble undersøkt for organiske miljøgifter. Fra de samme individene ble det også tatt prøver for måling av biomarkører (se nedenfor).

Biokjemiske effekt-parametre

Det ble valgt å fokusere på cellulære mekanismer knyttet til metabolisme og utskillelse av organiske miljøgifter. Dette er responser som vil være markører for mer alvorlige skader i økosystemet (som nevnt ovenfor). I tillegg til å være direkte knyttet til metabolismen av fremmedstoffer vil de aktuelle enzymene bli induert ved belastning med organiske miljøgifter. Enzymet cytokrom P4501A hos fisk er det første trinnet i en omdanning av plane organiske miljøgifter som PAHer, klorerte dibenzo-p-dioksiner, dibenzofuraner og plane PCBer. Denne biomarkøren har også vært benyttet i stor grad innen overvåking. Etter en innledende omdanning via cytokrom P4501A (fase-1) vil fremmedstoffer kunne konjugeres med vannløselige stoffer og derved kunne skilles ut via galle eller urin. Det kvantitativt viktigste konjugerende (fase-2) enzymet hos fisk er glutation S-transferase (GST). Det er imidlertid flere ulike isoenzymer av GST hos fisk. Regulering og substrat-spesifisitet er foreløpig ikke godt undersøkt for noen fiskearter. Noen GST isoenzymer er trolig delvis regulert av cellulære nivåer av antioksidanten glutation og responsen vil derfor også kunne påvirkes av oksidativ stress i tillegg til belastning med plane organiske miljøgifter. Biokjemiske mekanismer er dårligere karakterisert hos evertebrater enn hos fisk, men blåskjell er trolig den best undersøkte art i så måte. Evertebrater har både fase-1 og fase-2 enzymaktiviteter, men disse har ikke de samme egenskapene og katalyseres ikke av helt de samme enzymene som hos fisk og andre vertebrater. Den beste markøren for fase-1 aktivitet hos blåskjell og andre evertebrater synes å være en enzymaktivitet som måler nedbrytningen av benzo[a]pyren, såkalt benzo[a]pyren hydroksylase (BPH, (Michel et al. 1994)). For fase-2 synes imidlertid GST å være kvantitativt viktig også for evertebrater.

I denne undersøkelsen ble det derfor valgt ut to markører hos torsk og blåskjell som er direkte knyttet til metabolismen av organiske miljøgifter.

Valg av arter

Valg av arter ble i noen grad styrt av analyseprogrammet for kjemiske nivåer i organismer. I tillegg var det ønskelig å kunne gjenta noen av de undersøkelsene som ble gjort i 1986, da forurensningsnivået var langt høyere enn i dag. Blåskjell ble valgt som bunnlevende evertebrat siden den inngår i den igangværende overvåking og ble benyttet i 1986. Torsk ble valgt som fiskeart, hovedsakelig på grunn av den viktige rollen denne arten har innen miljøgift-overvåking i Norge og grunnlaget fra undersøkelsene i Grenlandfjordene. Torsk ble ikke undersøkt under workshop'en i 1986.

2. Materiale og metoder

2.1 Innsamling og prøvetaking av organismer

Torsk (*Gadus morhua*) ble innsamlet i månedsskiftet mai-juni 1996 i tre områder: Frierfjorden, Brevik og Såstein (se **Figur 1**). Torsken ble transportert til innerst i Eidangerfjorden og holdt i ruser i inntil tre dager før prøvetaking. Det er usannsynlig at et opphold på tre dager vil ha vesentlig effekt på konsentrasjoner av miljøgifter i lever. Det er ingen punktkilder for miljøgifter i området der fisken ble holdt. Ved prøvetaking ble hver torsk gitt et slag til hodet, lengdemålt og veid. Bukhulen ble åpnet og prøver tatt av galle og lever. Galleprøven ble holdt på is til nedfrysning og transport ved -20°C, mens omtrent 1 g av leverprøven ble frosset i flytende nitrogen. Denne ble senere lagret ved -80°C og transportert på tørris. Resten av leveren ble overført til et glødet glass for kjemiske analyser og holdt nedfrost til analyse. Det ble tatt prøver av 20 torsk fra hver av de tre områdene.

Blåskjell (*Mytilus edulis*) ble innsamlet 8. september 1996. Testbestander på ca 30 skjell ble samlet inn fra samme lokaliteter som for miljøgiftanalyser: To lokaliteter i Breviksfjorden: Croftholmen og Risøyholmen, og fra Helgeroa (**Figur 1**). I tillegg ble en bestand fra Drøbaksundet inkludert som kontroll. Skjell fra dette området har i tidligere undersøkelser vist seg å ha normalt bakgrunnsnivå av miljøgifter (Næs et al., 1995) og normale SFG-verdier (Widdows og Johnson 1988). Etter analyser for SFG (energibudsjett, se seksjon 2.2.1) ble innmaten veid, fordøyelseskjertelen dissekert ut og frosset på flytende nitrogen. Prøven ble senere lagret ved -80°C.

2.2 Analyser - blåskjell

2.2.1 Energibudsjett

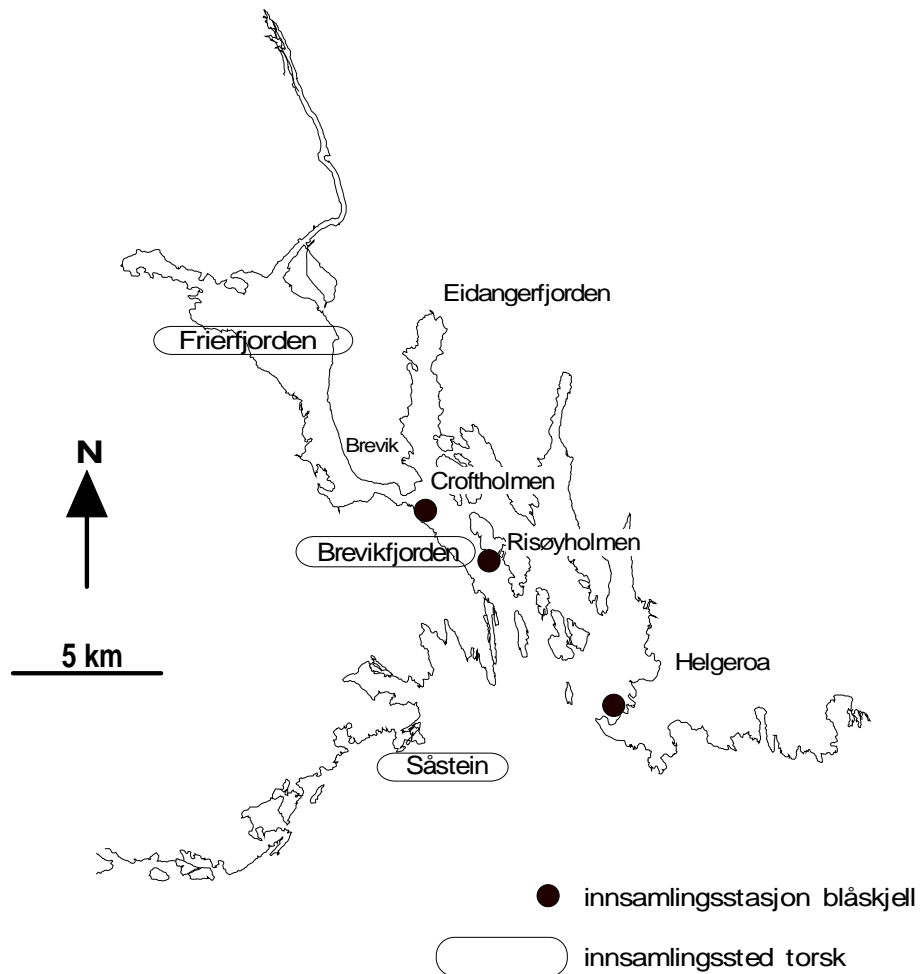
SFG-målingene ble utført ved Marin Forskningsstasjon Solbergstrand (MFS) i perioden 9-13 september 1996. MFS ligger ved Oslofjorden rett sør for Drøbak, Testskjellene ble fraktet nedkjølt til stasjonen, hvor de ble rensset på utsiden og deretter oppbevart i strømmende vann fra ca 1 m dyp til målingene ble utført. Målingene ble utført på det samme tilfeldige utvalg på 15 skjell fra hver bestand. Skallengden på de utvalgte skjellene varierte innen området 50 til 65 mm.

Alle forsøk ble gjennomført i sjøvann fra stasjonens ordinære inntak på 1 m dyp. Vann-temperaturen sank gradvis fra ca 14 til ca 10°C under forsøkene, og saltholdigheten varierte mellom 22.6 og 22.9.

Måling av næringsopptak

Blåskjell tar opp næring ved å pumpe vann over gjellene som fungerer som et filter. Partikler som fanges opp her (normalt i størrelse 2 - 20 µm), fraktes videre langs gjellene til munnen. Næringsopptak ble beregnet ut fra måling av hvor mye vann hvert skjell filtrerte pr tidsenhet multiplisert med mengde partikulært materiale i det innstrømmende vann, og omregnet til energifluks.

Måling av filtreringshastighet ble gjort ved å plassere skjellene individuelt i kammer med 380 ml vannvolum. Ubehandlet sjøvann pumpet fra 1 m dyp og med naturlig innhold av næringspartikler ble under hele forsøket ledet gjennom hvert kammer i en rate av ca 100-150 ml/min (forhindret partikkelsedimentering).



Figur 1. Kart som viser innsamlingsområder for torsk og stasjoner for blåskjell i Grenlandsfjordene. I tillegg ble blåskjell innsamlet ved marin forskningsstasjon, Solbergstrand. Kartdata fra Statens Kartverk.

Skjellene ble gitt ca 1 time tilpasningstid i kammeret før første måling og for hvert individ ble det gjort 2 målinger. I hver måling ble utstrømmende vann fra kammeret samlet over en nøyaktig målt tidsperiode (rundt 30 sekunder), og partikkelkonsentrasjonen analysert ved bruk av partikkelteller (Coulter Counter mod. ZB.). Prøve av innstrømmende vann ble tatt samtidig. Filtreringshastighet ble beregnet på basis av målt forskjell i konsentrasjon av partikler ($> 4.5 \mu\text{m}$ diameter) i innstrømmende og utstrømmende vann i hvert kammer og nøyaktig målt strømningshastighet av vannet gjennom kammeret ved bruk av formelen:

$$\text{Filtreringshastighet (l h}^{-1}\text{)} = v \cdot (C_i - C_u) / C_i$$

der v = strømningshastighet gjennom kammeret (l h^{-1})
 C_i = konsentrasjon av partikler i innstrømmende vann (antall ml^{-1})
 C_u = konsentrasjon av partikler i utstrømmende vann (antall ml^{-1})

Måling av assimilasjonseffektivitet

Assimilasjonseffektiviteten, ble målt etter metoden beskrevet av Conover (1966). Den viser hvor stor

andel av det organiske materialet i næringen som virkelig taes opp i kroppen. Dette beregnes ut fra måling av forholdet 'askefri tørrvekt : tørrvekt' (ATV/TV) i næringspartiklene som taes inn og i avføring (feces).

Prøver for analyse av næringspartikler ble tatt ved 3 tidspunkt i løpet av forsøket. Hver gang ble en bestemt vannmengde, 3-4 l, filtrert på et brent, tarert GF/C-filtrer. Tilsvarende ble avføringsmateriale fra hver skjellbestand samlet fra bunnen av kammerne etter måling av filtreringshastighet. Dette materialet ble også filtrert på brente og tarerte GF/C-filtre. Etter kort forsiktig vasking med destillert vann for å fjerne salt ble filtrerne tørket 24 timer ved 100°C, veiet, deretter brent 2 timer ved 470°C, og veiet igjen.

I tillegg til ATV/TV forhold for næringspartikler og feces, ga disse målingene tall for normalkonsentrasjonen av partikulært materiale i sjøvannet på 1 m dyp utenfor MFS (Solbergstrand). Disse verdiene ble benyttet i utregningen av næringsopptak ut fra filtreringshastighetene.

Assimilasjonseffektiviteten ble beregnet ut fra formelen (Conover 1966):

$$\text{Assimilasjonseffektivitet (\%)} = 100 \times (F-E) / [(1-E)/F]$$

der $F = \text{ATV/TV}$ for næringspartikler
 $E = \text{ATV/TV}$ for feces.

Det ble beregnet en gjennomsnittlig assimilasjonseffektivitet for hver bestand.

Måling av oksygenforbruk (respirasjon)

Respirasjon ble målt som reduksjon i oksygeninnholdet i vannet i lukket kammer med individuelle skjell. Hvert skjell ble plassert i et temperaturkontrollert kammer utstyrt med magnetrører. Vannet i kammeret var prefiltrert (GF/C) vann fra 1 m inntaket, og gjennomboblet med luft til 100 % metning. Stikkprøver for måling av oksygenkonsentrasjon i det mettede vannet ble ved flere anledninger tatt etter standard prosedyre for titrimetrisk analyse (Winkler, NIVA prosedyre F 1). I kammerlokket var montert en WTW Trioxmat 201 oksygenelektrode koblet til et WTW Interlog OK1 flerkanals oksymeter. Etter ca 30 min akklimatisering ble kammeret fylt med mettet sjøvann, lokket påsatt og oksygeninnhold og temperatur i kammeret logget hvert minutt i 1 time. Skjellenes oksygenforbruk (respirasjon) ble regnet ut etter formelen:

$$\text{Respirasjon } (\mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1}) = [C(t_0) - C(t_1)] \times (V_r) \times 60/(t_1 - t_0)$$

der $t_0, t_1 =$ start og sluttid (min) for måleperioden
 $C(t) =$ konsentrasjon av oksygen i kammervannet ($\mu\text{mol O}_2 \text{ l}^{-1}$) ved tid t
 $V_r =$ volum av kammer minus volum av skjell (l).

Måling av nitrogeneskresjon

Energitap i form av utskillelse av oppløst nitrogen (som ammonium NH_4^+) ble målt ved å inkubere skjellene enkeltvis i 200 ml prefiltrert (GF/C) sjøvann i 2 timer ved konstant temperatur. Et kontrollglass uten skjell ble inkludert. Etter inkubering ble skjellene tatt ut og en prøve av vannet overført til 20 ml scintillasjonsglass og preservert med 0.2 ml 4 M svovelsyre for analyse av NH_4^+ innhold. Analysene ble gjort på NIVAs laboratorium etter standard fotometrisk metode (NIVA prosedyre D 5-1). Utskillelsen av nitrogen ble beregnet etter formelen:

$$\text{Nitrogenutskillelse } (\mu\text{mol NH}_4\text{-N h}^{-1}) = [N_c - N_i] \times 60/t$$

der $t =$ inkuberingstid (min)

N_c = konsentrasjon av $\text{NH}_4\text{-N}$ ($\mu\text{mol h}^{-1}$) i testvannet ved slutten av inkuberingen.
 N_t = konsentrasjon av $\text{NH}_4\text{-N}$ ($\mu\text{mol h}^{-1}$) i kontrollglasset slutten av inkuberingen.

Størrelsesmålinger

I tillegg til de fysiologiske målingene ovenfor ble følgende målt for hvert skjell:

- Skallengde (L)
- Totalt volum (V_r)
- Volum av skallmaterialet (V_s)
- Våtvekt skallinnmat (VV)
- tørrvekt skallinnmat (TV)

Scope for growth

De enkelte ledd i SFG ble beregnet for hvert individ som energiflukt pr tidsenhet og pr gram tørrvekt skjellmat ($\text{J h}^{-1} \text{g}^{-1}$) etter følgende formler:

Konsumert energi:

$I = \text{gjennomsnittlig filtreringsrate (l h}^{-1} \text{g}^{-1}) \times (\text{mg POM l}^{-1}) \times (23 \text{ J mg}^{-1} \text{ POM})$
 ut fra et tilnærmet energiinnhold i tørt algemateriale på 23 J mg^{-1}

Absorbert energi:

$A = I \times \text{Ass. eff. (\%)}$

Respirert energi:

$R = \text{oksygenforbruk (}\mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{g}^{-1}) \times 0.456$

der omregning fra oksygenopptak til energiforbruk er gjort etter en varmeequivalent på $0.456 \text{ J } \mu\text{mol}^{-1} \text{ O}_2$.

Ekskret energi:

$E = (\mu\text{mol NH}_4\text{-N h}^{-1}) \times 0.349$

der ekskresjonen av $1 \mu\text{mol NH}_4\text{-N}$ tilsvarer et energitap på 0.349 J .

Scope for growth:

$\text{SFG} = A - (R + E)$

I tillegg er følgende indekser regnet ut for hver skjell:

- Veksteffektivitet angitt som SFG per enhet absorbert energi: $\text{GE} = \text{SFG} \times A^{-1}$
- Kondisjonsindeks angitt som tørrvekt skjellmat pr volumenhet skjellhulrom: $\text{BCI} = \text{TV}/(V_r - V_s)$.
 Dette er en indeks tradisjonelt brukt i skjellnæringen for å beskrive tilstand.

2.2.2 Opparbeiding til biokjemiske analyser

Prøver ble tint så mye at de kunne tas ut av kryorørene. Deretter ble de homogenisert i iskald homogeniseringsbuffer (0.1 M K-fosfat, pH 7.5 med 1 mM dithiothreitol, Complete protease-inhibitor og 0.15 M KCl) med en motorisert Potter-Elvehjem teflon-glass homogenisator. Homogenatet ble sentrifugert ved $10\,000 \text{ g}$ i 30 min og supernatanten deretter ved $48\,000 \text{ g}$ i 2 timer. Begge sentrifugeringer ble foretatt ved 4°C . Supernatanten fra den andre sentrifugeringen, cytosol-fraksjonen, ble fordelt i rør og frosset ved -80°C . Pelleten fra denne sentrifugeringen, mikrosom-fraksjonen, ble resuspendert i homogeniseringsbuffer med 20% glycerol, fordelt på rør og frosset ved -80°C .

2.2.3 Benzo[a]pyren hydroksylase (BPH)

Benzo[a]pyren hydroksylase aktiviteten i mikrosom-fraksjonen ble målt ved inkubering av mikrosomer med ^{14}C -merket benzo[a]pyren og etterfølgende kvantifisering av vann-løselige metabolitter. Mikrosomene ble tilsatt en reaksjonsblanding som inneholdt 0.05 M Na-fosfat buffer, pH 7.3, med 12.5 μg benzo[a]pyren (4.125 kBq), 0.6 mg NADPH og 1 mg bovint serum albumin i et totalvolum på 500 μL . Det ble benyttet en referanse for hver prøve som inneholdt det samme, men uten NADPH. Begge prøvene ble inkubert ved romtemperatur i 20 min før reaksjonen ble stoppet ved tilsetning av 1 mL stoppløsning (25% 1 M KOH, 75% DMSO). Ikke-metabolisert benzo[a]pyren ble fjernet ved to ekstraksjoner med 5 mL sykloheksan (på ristebord). Etter ekstraksjonen ble mengde vannløselige metabolitter kvantifisert ved scintillasjonstelling. Prøve (0.7 mL) ble blandet med 0.8 mL 1 M HCl og 5 mL tellervæske. Prøvene ble talt i 10 min og aktivitet beregnet.

2.2.4 Glutation S-transferase (GST)

Glutation S-transferase aktiviteten i cytosol ble bestemt ved bruk av substratet 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), i hovedsak som beskrevet av Habig et al. (1974). Femti μL blank (bare buffer), referanse eller fortynnede prøver ble pipettert ut i fire replikater i en 96-brønns mikrotiterplate. To hundre μL av reaksjonsblandingen, som inneholdt 1 mM redusert glutation og 20 mM CDNB, ble pipettert ut i alle brønnene og platene ristet. Dannelsen av reaksjonsprodukt ble målt ved 340 nm i 2 min etter 30 sekunder innledende reaksjon.

2.2.5 Protein

Totalkonsentrasjonen av protein ble bestemt ved bruk av Lowry's metode (Lowry et al. 1951) tilpasset måling med mikrotiterplate og plateleser. Cytosol-prøver ble fortennet 30 ganger og mikrosom-prøver fortennet 10 ganger før analyse. Det ble benyttet reagenser fra Bio-Rad. Standardprotein var bovint gamma globulin og standardkurven gikk fra 0.2 til 1.1 mg/mL.

2.3 Analyser - fisk

2.3.1 Opparbeiding til biokjemiske analyser

Leverprøvene ble tint så mye at de kunne tas ut av rørene og homogenisert i iskald homogeniseringsbuffer (0.1 M K-fosfat buffer med 1 mM EDTA, 1 mM DTT og 0.15 M KCl) med en motorisert Potter-Elvehjem teflon-glass homogenisator. Homogenatet ble deretter sentriugert ved 10 000 g i 30 min og supernatanten ved 100 000 g i 1 time. Supernatanten, cytosol, ble benyttet til bestemmelse av glutation S-transferase og mikrosom-fraksjonen til bestemmelse av CYP1A aktivitet (EROD).

2.3.2 Cytokrom P4501A aktivitet (EROD)

Cytokrom P4501A aktivitet ble kvantifisert som EROD (etoksyresorufin *O*-deetylase) som beskrevet i Förlin et al. (1986). Rodamin ble benyttet som intern standard.

2.3.3 Glutation S-transferase (GST)

Glutation S-transferase aktivitet ble kvantifisert med CDNB som substrat, som beskrevet av Habig et al. (1974).

2.3.4 Protein

Protein i cytosol- og mikrosom-fraksjonene ble kvantifisert etter metoden beskrevet av Lowry et al. (1951).

2.3.5 PAH-metabolitter og biliverdin i galle

Metabolitter av pyren og benzo[a]pyren i galle ble bestemt ifølge Ariese et al. (1993) med modifikasjonene som beskrevet i Beyer et al. (1997). Galle ble fortynnet i 1:1 etanol:vann og fluorescens målt ved bølgelengdeparene 341/383 (pyren) og 379/425 (benzo[a]pyren). Fluorescens ble standardisert i forhold til biliverdin-konsentrasjonen i galle, målt ved 650 nm i 96-brønns mikrotiterplater og kvantifisert i forhold til en standardkurve av innveid biliverdin.

2.4 Statistiske analyser

Eventuelle ulikheter mellom stasjoner ble identifisert ved enveis ANOVA (variensanalyse) med effekt-parameter som avhengig variabel under H_0 : Ingen forskjell mellom stasjonene (Underwood, 1981; Sokal og Rohlf, 1981). Homogenitet i variansene ble sjekket med metoden beskrevet av (Levene, 1960) og variablene log-transformert hvis nødvendig. Ved eventuelle forskjeller ble stasjonene sammenlignet innbyrdes med metoden beskrevet av Tukey (se Day og Quinn, 1989). Multippel regresjon ble utført med effekt-parametre som avhengige variable og andre faktorer (størrelse, kondisjon, kjønn, PAH-metabolitter) som faktorer (Draper og Smith, 1981). Multippel regresjonsmodeller ble tilpasset manuelt ved å inkludere og ekskludere faktorer til den høyest oppnåelige forklaringsprosent ble oppnådd. Signifikansnivå for forkastelse av H_0 ble satt til 0.05 for alle analyser.

3. Resultater og diskusjon

3.1 Effekter på blåskjell

3.1.1 Energibudsjett

Næringsopptak og assimilasjon

Gjennomsnittlig filtreringshastighet varierte fra 2.1 til 3.2 l h⁻¹ g⁻¹ for de ulike bestandene. Skjell fra Risøyholmen hadde lavest filtrering. Gjennomsnittlig konsumert energi varierte tilsvarende fra 30.0 til 44.4 J h⁻¹ g⁻¹. Kontrollbestanden hadde høyest energikonsumering, signifikant høyere enn skjellene fra Risøyholmen og Helgeroa (p < 0.05), men ikke signifikant forskjellig fra Croftholmen-bestanden (Tabell 1).

Assimilasjons-effektiviteten varierte fra 50 % for Croftholm- og Risøyholm-bestandene til 64 % for kontrollbestanden. Gjennomsnittlig absorbert energi varierte etter dette fra 14.9 til 28.5 J h⁻¹ g⁻¹, dvs dobbelt så høyt energiopptak i kontrollskjellene som i skjellene fra Risøyholmen. Alle de tre testpopulasjonene fra Grenland hadde signifikant lavere energiabsorpsjon (p < 0.01; Tabell 1), enn kontrollpopulasjonen. Videre hadde Helgeroa-bestanden høyere energiabsorpsjon enn Risøyholmen-bestanden (p < 0.05).

Respirasjon

Energiforbruket i respirasjon varierte relativt lite mellom bestandene, fra 5.33 J h⁻¹ g⁻¹ i kontrollbestanden til 6.31 J h⁻¹ g⁻¹ i bestanden fra Croftholmen. Forskjellen mellom bestandene var ikke signifikant.

Nitrogenekskresjon

Energitapet i form av nitrogenekskresjon var som ventet lavt i forhold til respirasjonstapet og varierte fra 0.04 J h⁻¹ g⁻¹ hos Helgeroa-bestanden til 0.20 J h⁻¹ g⁻¹ i kontrollbestanden. Førstnevnte var signifikant lavere enn de øvrige (p < 0.01; Tabell 1).

Kondisjonsindeks

Kondisjonsindeksen varierte fra 109.6 i Helgeroa-bestanden til 95.2 i Risøyholmen-bestanden (**Figur 2A**). Forskjellene var ikke signifikante, og det var ingen tendenser som reflekterte SFG-resultatene (se nedenfor).

Veksteffektivitet

Veksteffektiviteten (hvor stor % av absorbert energi som er tilgjengelig for vekst) varierte fra 15 % i Risøyholm-bestanden til 51 % i kontroll-bestanden (**Figur 2B**). Bestandene fra Croftholmen og Risøyholmen hadde signifikant lavere veksteffektivitet enn kontrollen (henholdsvis p < 0.05 og < 0.01). Helgeroa-bestanden skilte seg ikke fra kontrollen, men hadde høyere veksteffektivitet enn skjellene fra Risøyholmen.

Vekstpotensiale - scope for growth

SFG-verdiene var klart positive for alle bestandene. Dette indikerer at ingen bestand var utpreget stresset energimessig i denne perioden. Lavest SFG ble funnet i Risøyholm-bestanden med 8.5 J h⁻¹ g⁻¹ tilgjengelig for vekst (**Figur 2C**). Kontrollpopulasjonen hadde høyest SFG med 22.9 J h⁻¹ g⁻¹ tilgjengelig for vekst. Dette var signifikant høyere enn i noen av Grenlands-bestandene (p < 0.01), og over dobbelt så høyt som i bestanden fra Risøyholmen. I tillegg var gjennomsnittlig SFG i Helgeroa-bestanden signifikant høyere enn i Risøyholm-bestanden (p < 0.05).

Summert viste fysiologimålingene klare forskjeller mellom skjell-bestandene. De tre bestandene fra Grenland hadde signifikant dårligere energistatus enn kontrollskjellene fra Drøbaksundet. Innbyrdes

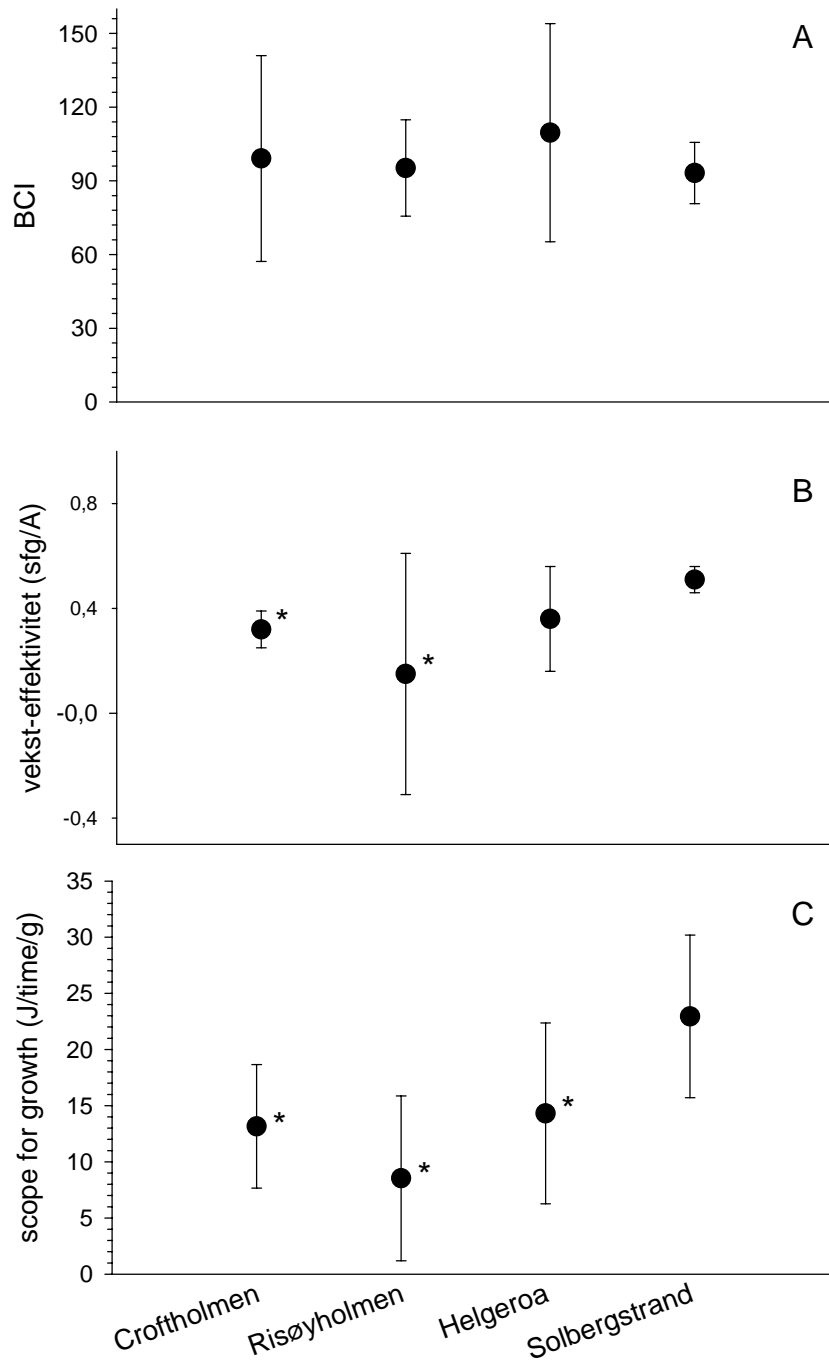
bestandene fra Grenland var forskjellene mindre, men det var flere tegn på at Helgeroa-bestanden hadde en bedre energistatus enn de to fra Brevikfjorden og at skjellene fra Risøyholmen hadde den dårligste tilstanden. Ingen av bestandene hadde imidlertid negativt energibudsjett (SFG) på denne tiden av året.

Tabell 1. Gjennomsnittlig energifluks pr time og gram tørrvekt ($J h^{-1} g^{-1} \pm SD$) for elementene i Scope for Growth (vekstpotensiale) i de 4 testpopulasjonene av blåskjell. Hver populasjon besto av 15 individer målt hver for seg. Signifikant forskjell fra kontrollbestanden (Solbergstrand) er angitt: *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$.

Bestand	Konsumert	Absorbert	Respirert	Ekskreert
Croftholmen	39.26±12.05	19.60±6.01 **	6.31±1.05	0.14±0.15
Risøyholmen	29.96±12.77 *	14.91±6.36 **	6.29±1.98	0.09±0.06
Helgeroa	34.39±12.54 *	20.25±7.38 **	5.89±1.30	0.04±0.05 **
Solbergstrand	44.40±11.78	28.48±7.56	5.33±1.58	0.20±0.16

Widdows og Johnson (1988) målte i august 1986 SFG i blåskjell fra 4 stasjoner i Brevik - Langesundsområdet. Innsamlingen ble ikke foretatt på de samme stasjonene som i 1996, men omtrent den samme geografiske gradient ble dekket: fra Helgeroa til Brevik. Videre ble innsamlingen gjort ca 1 mnd tidligere i 1986 enn i 1996, men begge innsamlingene ble gjort i det som normalt betraktes som en periode med aktivt næringsopptak og vekst hos blåskjell. Det foreligger ikke spesifikke hydrografiske målinger fra disse stasjonene i forkant av innsamlingene verken i 1986 eller 1996, men siden blåskjell har evnen til å regulere de næringsfysiologiske funksjonene innen et bredt spekter av salinitets- og temperaturvariasjoner, er det liten grunn til å forvente at forskjellene over tid som er beskrevet nedenfor skyldes eventuelle hydrografiske forskjeller mellom 1986 og 1996.

Tabell 2 sammenlikner SFG- og GE-verdiene funnet nå med de fra 1986. SFG-verdiene var klart høyest i 1996, og gradienten mellom stasjonene var mindre. I området utenfor Brevik (1986 Postberget, 1996 Croftholmen) var forskjellen betydelig med negativ SFG i 1986 mot 13.2 i 1996. I skjell fra Helgeroa og Risøyområdet var SFG-verdiene nesten dobbelt så høye i 1996 som i 1986. En analyse av elementene som inngår i SFG viser at forskjellen skyldes både lavere energiabsorpsjon (unntatt Helgeroa) og større energiforbruk i 1986 enn i 1996. Respirasjon varierte fra 11.3 til 12.5 $J h^{-1} g^{-1}$ i 1986 mot 5.9 - 6.3 $J h^{-1} g^{-1}$ i 1996. Veksteffektivitet (GE) var i praksis den samme i de to undersøkelsene i skjell fra Helgeroa, dårligere i 1996 i forhold til 1986 i Risøyområdet, mens en betydelig bedring kunne spores i området rett utenfor Brevik. Lav energiabsorpsjon dvs lav evne til å ta opp den næringen som finnes i vannet, og høyt energiforbruk i respirasjon er typisk for skjell under forurensningsstress. Resultatene tyder derfor på en bedring i miljøtilstanden i hele det undersøkte fjordområdet i løpet av 10-års perioden, og i særlig grad i området utenfor Brevik. Fallet i veksteffektivitet i Risøy-området kan vanskelig forklares, men målingene viser at skjellene herfra hadde det klart dårligste energibudsjettet av de undersøkte bestandene i 1996. Det kan nevnes at dioksininnholdet (som toksisitetsekvivalenter) var 50% høyere i skjell fra Risøyholmen enn fra Croftholmen (Knutzen et al. 1998). I september samme år ble det registrert et uventet høyt dioksininnhold i skjell fra begge disse stasjonene.



Figur 2. Parametre for vekst og kondisjon i blåskjell innsamlet på tre stasjoner i Grenland og ved marin forskningsstasjon Solbergstrand. **A.** kondisjonsindeks (BCI), **B.** veksteffektivitet, **C.** scope for growth (vekstpotensiale). Gjennomsnitt \pm standard avvik, $n=15$. Grupper merket * er signifikant forskjellige fra gruppen fra Solbergstrand ($p < 0.05$).

Tabell 2. SFG (scope for growth, vekstpotensiale) og GE (veksteffektivitet) - verdier i blåskjell på strekningen Brevik - Helgeroa 1986 (Widdows og Johnson 1988) og 1996 (denne undersøkelsen). Geografisk sammenfallende eller nærliggende stasjoner i samme kolonne.

1986	Stasjon	1 (Helgeroa)	2 (Sivertstrand, Siktesøy)	3 (Bjørkøyholm)	4 (Postberget, Sandøy)
	SFG	7.99	5.49	- 1.10	- 0.90
	GE	0.39	0.30	- 0.1	- 0.07
1996	Stasjon	Helgeroa	Risøy	Croftholmen	
	SFG	14.31	8.53	13.15	
	GE	0.36	0.15	0.32	

I **Tabell 3** er belastningen av PCB og PAH i skjell i 1986 (Klungesøyr et al. 1988) og i 1996 (Knutzen 1998) sammenliknet. Selv om ikke analysene er entydig sammenliknbare fordi de divergerer noe mht komponenter som er analysert, indikerer tallene at belastningen har gått merkbart ned (i samsvar med overvåkingsresultater), og at den geografiske gradienten i belastningen er betydelig mindre i 1996 enn den var i 1986 både for PAH og PCB. Begge deler samsvarer bra med endringene over tid i fysiologisk tilstand. Total PCB steg fra 12.6 til 45 µg/kg våtvekt (vv) dvs med en faktor på ca 3.6 fra Helgeroa til Brevik i 1986. Tilsvarende for 1996 var fra 3.12 til 5.02 µg/kg vv, dvs en faktor på 1.6. Disse tallene kan imidlertid ikke sammenlignes direkte siden dekalorbifenyl (PCB 209) trolig ble inkludert i 1986-tallet for total PCB, men er ikke med i ΣPCB i 1996. Det er sannsynlig at gradienten var mer påtagelig i 1986 siden belastningen med klorerte dioksiner var 100 ganger høyere da enn den er nå (Knutzen et al., 1995). Klorerte dioksiner (og dekalorbifenyl) har lavere vannløselighet enn de fleste PCBer, vil transporteres kortere og derved gi klarere gradienter enn ΣPCB.

Tabell 3. Vevsnivå i blåskjell av total PCB og total PAH (µg/kg våtvekt) på strekningen Brevik - Helgeroa 1986 (Klungesøyr et al. 1988) og 1996 (Knutzen 1998). Geografisk sammenfallende eller nærliggende stasjoner i samme kolonne (cf. **Tabell 2**). Verdiene fra 1986 er konvertert fra tørrvekt til våtvekt ved multiplikasjon med faktor 0.16. Tall i parentes angir overkonsentrasjon, dvs i forhold til konsentrasjon på ytre, sammenfallende stasjon (Helgeroa).

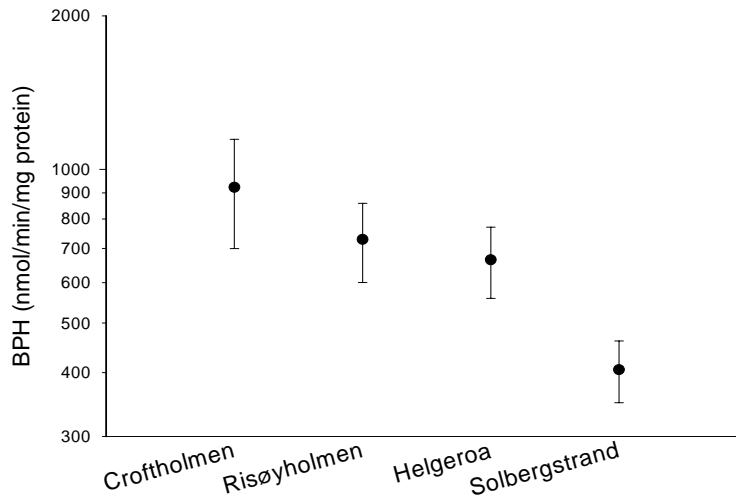
1986	Stasjon	1 (Helgeroa)	2	3	4
	tot-PCB*	12.6 (1)	29.5 (2.3)	36.9 (2.9)	45.0 (3.6)
	tot-PAH**	370 (1)	960 (2.6)	1870 (5.1)	2530 (6.8)
1996	Stasjon	Helgeroa	Risøy	Croftholmen	
	tot-PCB*	3.12 (1)	4.32 (1.4)	5.02 (1.6)	
	tot-PAH**	77.5 (1)	76.8 (1)	119.2 (1.5)	

*Kongenere i **1986**: 52, 44, 95, 101, 110, 118, 153, 138, 128, 180, 170, 194; Kongenere i **1996**: 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180, 105, 156.

Enkeltforbindelser i **1986: naph. metnaph, phen, metphen, antrac, dibenz, metdibenz, fluoran, pyr, b(a)a, chrys, b(b,k)fl, b(e)p, b(a)p, peryl; Enkeltforbindelser i **1996**: naph. metnaph, bif, acenafty, acenafty, fluoren, phen, metphen, antrac, dibenz, metdibenz, fluoran, pyr, b(a)a, chrys/trif, b(b)fl, b(j,k)fl, b(e)py, b(a)py, peryl, i(123cd)a, b(ghi)pe.

3.1.2 Benzo[a]pyren hydroksylase (BPH) aktivitet

Aktiviteten av BPH var noe forhøyd i blåskjell fra alle stasjonene i Grenland sammenlignet med blåskjell fra MFS, men forskjellene var ikke statistisk signifikante (**Figur 3**).



Figur 3. Aktivitet av benzo[a]pyren hydroksylase (BPH) i fordøyelseskjertel hos blåskjell innsamlet på tre stasjoner i Grenland og ved marin forskningsstasjon Solbergstrand. Gjennomsnitt \pm standardfeil, $n=12-14$. Merk log-akse.

I en multippel regresjon kunne det synes som om BPH i noen grad var avhengig av kondisjonen til blåskjellene (**Tabell 4**). I andre undersøkelser har en funnet effekter av miljøgifter på denne enzymaktiviteten hos blåskjell, både ved belastning med PAH og med klorerte forbindelser (Livingstone et al. 1995; Michel et al. 1994). Til tross for at forskjellene ikke var signifikante er det en klar gradient. Under GEEP-workshop'en i 1986 ble det funnet en lignende gradient, men det ble der målt aktivitet i hele muslinger (Suteau et al. 1988). Som nevnt ovenfor var forurensningsbelastningen større i 1986 enn i 1996.

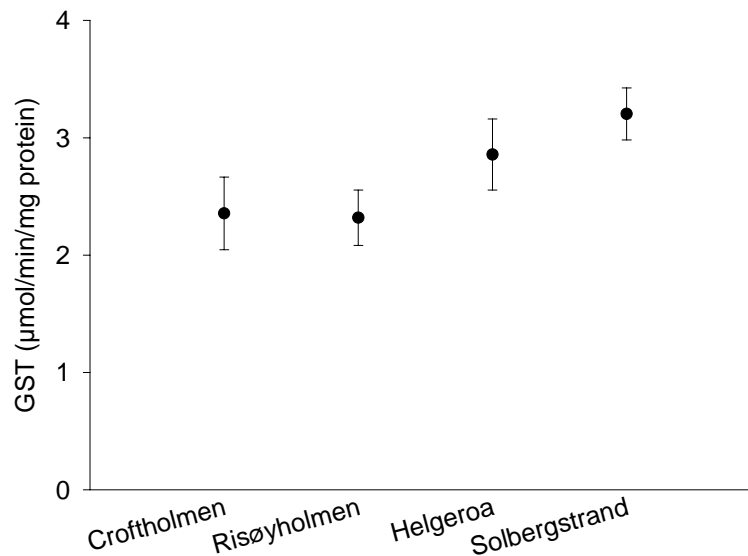
Tabell 4. Faktorer som bidro til å forklare variabilitet i BPH aktivitet i blåskjell. Modellen er signifikant ($p = 0.001$) og forklarer 29% av variabiliteten i BPH (justert $R^2 = 0.29$).

faktor	frihetsgrader	F-ratio	p-verdi
stasjon	3	1.75	0.17
våtvekt (størrelse)	1	3.75	0.06
BCI (kondisjon)	1	3.11	0.03

3.1.3 Glutation S-transferase aktivitet

Aktiviteten av GST var noe høyere i blåskjell fra MFS sammenlignet med blåskjell innsamlet i Grenlandsfjordene, men forskjellene var ikke signifikante (**Figur 4**). Den "forventede" respons ved økt miljøgift-belastning vil være økt enzym-aktivitet. En slik reduksjon i GST-aktivitet nær kilden har imidlertid vært funnet tidligere for kamskjell i en PAH-belastet fjord, Sunndalsfjorden (Næs, Hylland, Oug, in prep). Disse resultatene kan tyde på at GST spiller en annen rolle hos muslinger enn hos andre evertebrater og fisk. Den mest sannsynlige forklaringen er at enzymet i noen grad reguleres av

oksidativ stress i tillegg til via direkte belastning med miljøgifter. Slik oksidativ stress kan forårsakes indirekte gjennom fase-1 metabolisme av organiske miljøgifter (Livingstone et al. 1995). Resultatene som ble funnet her er også i samsvar med resultatet fra GEEP-workshopen, der GST-aktiviteten sank på de to innerste stasjonene i forhold til stasjonen ved Risøya, men var lavere igjen ved Helgeroa (Suteau et al., 1988).



Figur 4. Aktivitet av glutation *S*-transferase (GST) i fordøyelseskjertel hos blåskjell innsamlet på tre stasjoner i Grenland og ved marin forskningsstasjon Solbergstrand. Gjennomsnitt ± standardfeil, n=12-14.

Stasjon syntes å være den viktigste forklarende faktor i en multippel regresjons-analyse som også hadde med størrelsen (som våtvekt) som faktor (**Tabell 5**).

Tabell 5. Faktorer som bidrar til å forklare variabilitet i GST aktivitet i blåskjell. Modellen er signifikant ($p = 0.01$) og forklarer 17% av variabiliteten i GST (justert $R^2 = 0.17$).

faktor	frihetsgrader	F-ratio	p-verdi
stasjon	3	4.37	<0.01
våtvekt (størrelse)	1	5.12	0.03

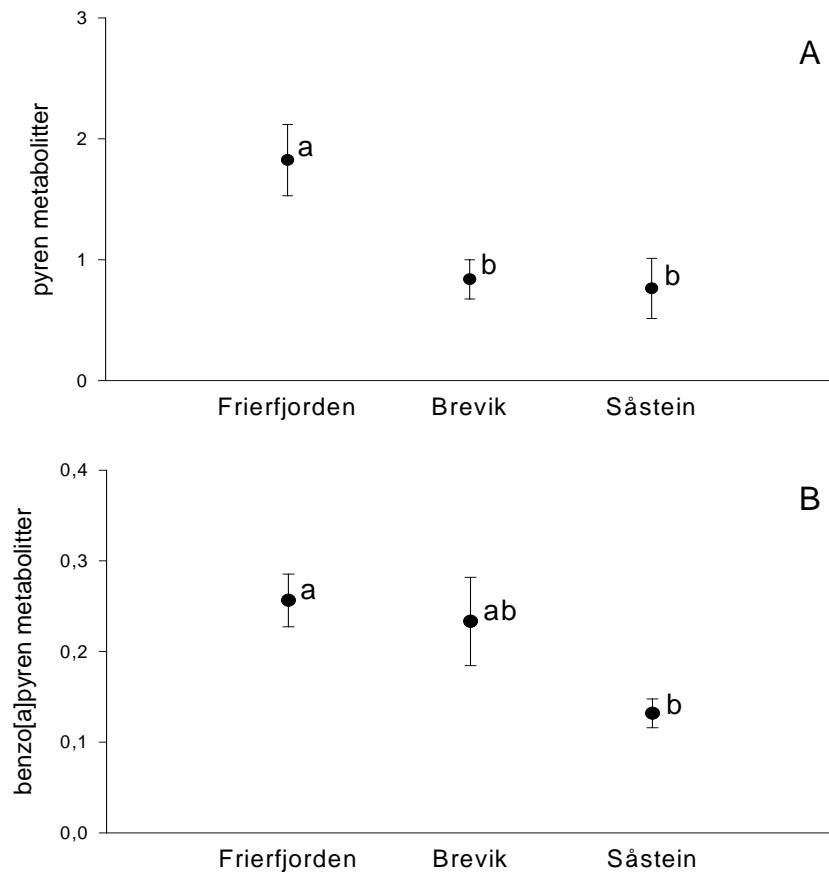
3.1.4 Syntese av resultater for blåskjell

Resultatene tyder på at blåskjell i Langesundsfjorden er negativt påvirket av forurensningsbelastningen og at belastningen i hovedsak skyldes klorerte forbindelser. Det også var noe forhøyde konsentrasjoner av PAH i blåskjell innsamlet ved Croftholmen sammenlignet med Risøyholmen og Helgeroa, men alle verdiene lå bare moderat over antatt høyt bakgrunnsnivå (1.5-2.5 ganger). Levebetingelsene for blåskjell er imidlertid sterkt forbedret nå i forhold til i 1986 da det var negativt vekstpotensiale for flere populasjoner i området.

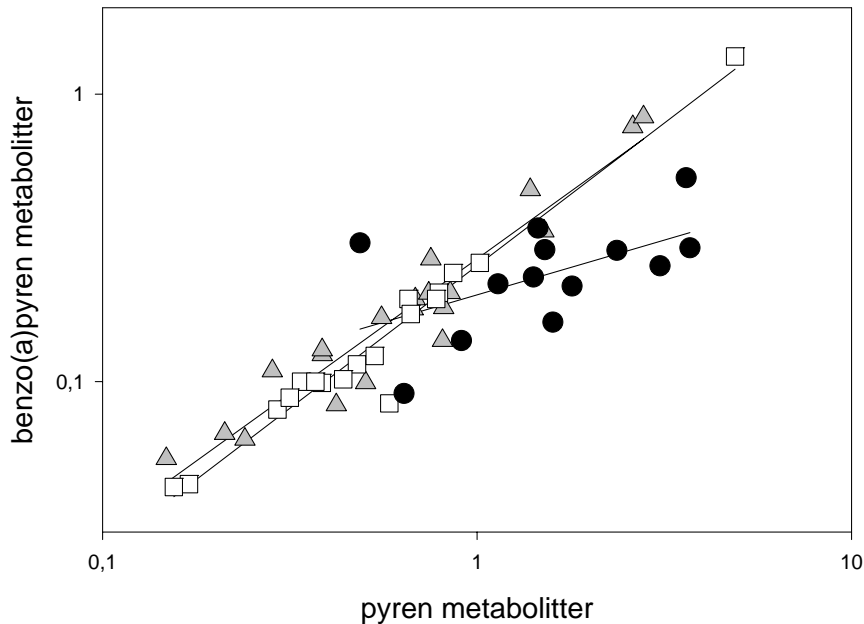
3.2 Effekter på fisk

3.2.1 Pyren- og benzo[a]pyren-metabolitter i galle

Det var høyere konsentrasjoner av både pyren- og benzo[a]pyren-metabolitter i galle hos torsk innsamlet i Frierfjorden enn i Langesundsfjorden (**Figur 5**). Forholdet mellom metabolittene peker i retning av at det er en annen kilde-sammensetning for PAH-belastningen i Frierfjorden enn i Langesundsfjorden (**Figur 6**). Nivåene av metabolitter er imidlertid ikke spesielt høye i noen av områdene og de observerte forskjellene vil ikke forventes å gi store utslag i biokjemiske eller fysiologiske responser.



Figur 5. Konsentrasjoner av metabolitter av **A.** pyren og **B.** benzo[a]pyren i galle fra torsk innsamlet i Frierfjorden, ved Brevik og ved Såstein. Gjennomsnitt \pm standardfeil, $n=18-20$. Grupper med ulik bokstav er signifikant forskjellige. Det er altså signifikant høyere nivåer av pyren-metabolitter i torsk fra Frierfjorden i forhold til torsk fra de to andre stasjonene, mens det ikke var signifikant forskjell i benzo(a)pyren metabolitter mellom Frierfjorden og Brevik.



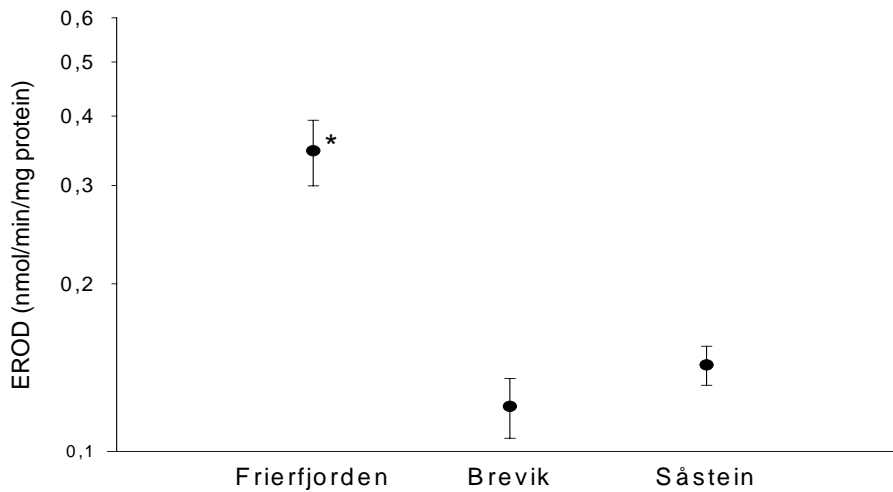
Figur 6. Forhold mellom metabolitter av pyren og benzo[a]pyren i galle fra torsk innsamlet i Frierfjorden (sirkler), ved Brevik (triangler) og ved Såstein (firkanter).

3.2.2 Cytokrom P4501A aktivitet

Torsk fra Frierfjorden hadde langt høyere EROD aktivitet enn fisk innsamlet ved Brevik eller Såstein (**Figur 7**). Resultatene viser at det er en sterk belastning med plane organiske miljøgifter i fjordområdet og overensstemmer godt med de observerte konsentrasjonene av organiske miljøgifter i fisk fra området (Knutzen 1998). Ingen andre faktorer enn stasjon bidro i multipel regresjonsmodeller (resultat ikke vist), så responsen var tilsynelatende ikke påvirket av størrelse, kjønn eller kondisjon hos den innsamlede torsken. EROD-responsen stemmer bra overens med overkonsentrasjoner av toksisitetsekvivalenter fra dioksiner og dibenzofuraner i torskelever (hhv 60, 11 og 7 for Frierfjorden, Brevik og Såstein; Knutzen 1998). Det er derfor overveiende sannsynlig at de observerte forskjellene hovedsakelig skyldes overkonsentrasjoner av plane klorerte miljøgifter i fisken. De mest sannsynlige årsakene kan trolig finnes i kombinasjoner av de følgende faktorene:

- Gruppene fra de tre områdene inkluderte fisk som var nylig innvandret fra andre områder,
- Miljøgift-konsentrasjonene i torsk er langt fra normalfordelt (noen få fisk med svært høye konsentrasjoner vil få stor betydning i en blandprøve)
- EROD-aktiviteten vil kunne inhiberes av andre miljøgifter som forekommer sammen med de som induserer aktiviteten (f.eks. organiske tinnforbindelser og noen PCBer).

EROD-aktiviteten i torsk fra Brevik og Såstein er noe høyere enn forventede bakgrunnsaktiviteter, noe som tyder på at også torsk fra disse områdene er påvirket av de forhøyde nivåene av organiske miljøgifter. En tilsvarende gradient som denne ble funnet i 1986, men da med skrubbe som test-organisme (Stegeman et al. 1988). I 1986 samlet en imidlertid ikke inn fisk fra innenfor Brevik.



Figur 7. CYP1A aktivitet (EROD) i lever hos torsk innsamlet i Frierfjorden, ved Brevik eller Såstein. Gjennomsnitt \pm standardfeil, $n=18-20$. * grupper som er signifikant forskjellig fra grupper uten ($p < 0.05$). Merk log-skala.

3.2.3 Glutathion S-transferase aktivitet

Torsk fra Frierfjorden hadde høyere GST aktivitet enn torsk innsamlet ved Brevik eller Såstein (**Figur 8**). Det er normalt høy aktivitet av GST i leverceller og det måles derfor ofte ingen respons i denne parameteren (Hylland et al. 1996). Den inkluderes imidlertid ofte allikevel på grunn av den cellulære betydningen av fase-2 konjugeringsreaksjoner. Det har derfor vært foreslått at det bør utvikles metoder til å måle spesifikt på de ulike isoenzymene. I denne undersøkelsen var det en klar økning i GST i lever til torsk innsamlet i Frierfjorden sammenlignet med torsk innsamlet ved Brevik og Såstein. Dette gjenspeiler at det fremdeles er en sterk miljøgiftbelastning i Frierfjorden, noe som også støttes av resultatene for EROD-aktivitet (se ovenfor). Det er ikke sannsynlig at denne økningen skyldes PAHer selv om det tilsynelatende er et svakt bidrag fra pyren i en multippel regresjon (Tabell 6). Som nevnt ovenfor skyldes trolig bidraget fra stasjon i denne modellen den ulike belastningen med organiske miljøgifter på de tre stasjonene.

Tabell 6. Faktorer som bidrar til å forklare variabilitet i GST aktivitet i torskelever. Modellen er signifikant ($p < 0.0001$) og forklarer 49% av variabiliteten (justert $R^2 = 0.49$).

faktor	frihetsgrader	F-ratio	p-verdi
stasjon	3	12.97	<0.0001
log pyren-metabolitter	1	3.45	0.07



Figur 8. GST aktivitet i lever hos torsk innsamlet i Frierfjorden, ved Brevik eller Såstein. Gjennomsnitt \pm standardfeil, $n=18-20$. * grupper som er signifikant forskjellig fra grupper uten ($p < 0.05$).

3.2.4 Syntese av resultater for torsk

Det var en klar sammenheng mellom forhøyd aktivitet av CYP1A og GST i torskelever. Mens torsk innsamlet i Frierfjorden hadde høyere nivåer enn begge de andre stasjonene, var det små forskjeller mellom torsk innsamlet ved Brevik og torsk innsamlet ved Såstein. Til tross for at det er mer enn 10 km mellom de to stasjonene og Såstein-stasjonen ligger på Skagerrak-kysten, var det ikke mer enn 1.3 ganger større mengde sum toksisitetsekvivalenter (1.7 for toksisitetsekvivalenter fra dioksiner) i torskelever fra Brevik i forhold til Såstein (Knutzen et al. 1998). Denne forskjellen er trolig for liten til at den gir signifikante utslag på EROD eller GST som i utgangspunktet er noe forhøyd (se nedenfor). En 4-5 gangers økning i toksisitetsekvivalenter fra Breviksfjorden til Frierfjorden er imidlertid nok til å få en klar respons i begge parametrene. Som nevnt ovenfor er EROD-aktiviteten i lever fra torsk innsamlet ved Brevik og Såstein noe høyere enn forventet bakgrunn og det er da også forhøyde konsentrasjoner av organiske miljøgifter i dette vevet.

4. Konklusjoner

Det var redusert vekstpotensiale for blåskjell fra alle tre stasjonene i Langesundsfjorden sammenlignet med blåskjell fra ytre Oslofjord (Solbergstrand). Tilsvarende ble de høyeste aktivitetene av fase-1 enzymer (benzo[a]pyren hydroksylase) funnet i blåskjell innsamlet nær Brevik, mens de laveste nivåene ble funnet i blåskjell fra Solbergstrand.

Det var klare responser i begge biomarkørene hos torsk innsamlet i Frierfjorden sammenlignet med torsk innsamlet ved Brevik eller Såstein. Aktivitetene av både fase-1 (cytokrom P4501A-aktivitet målt som EROD) og fase-2 (glutathion *S*-transferase, GST, aktivitet) enzymer var signifikant forhøyd i lever til torsk fra Frierfjorden sammenlignet med torsk fra de to andre områdene.

Det var høyere konsentrasjoner av PAH-metabolitter i galle til torsk fra Frierfjorden enn fra de to andre stasjonene, og den relative andelen av de to målte metabolittene var ulik for torsk innsamlet i Frierfjorden sammenlignet med torsk innsamlet i Breviksfjorden eller ved Såstein.

Det er sannsynlig at det største bidraget til forhøyde EROD- og GST-aktiviteter i torskelever kommer fra klorerte organiske miljøgifter, men med et mulig bidrag fra PAH.

Forurensningsbelastningen i området påvirker både blåskjell og fisk. Påvirkningen på blåskjell omfatter kystområder ut til Skagerrak-kysten (dvs ved Helgeroa). Torsk innsamlet i Frierfjorden var klart påvirket i forhold til fisk innsamlet i Breviksfjorden (og ved Såstein).

Det var ingen forskjeller i påvirkning mellom torsk innsamlet i Breviksfjorden og torsk innsamlet ved Såstein. Det er sannsynlig at torsk fra begge områdene har noe forhøyde aktiviteter av EROD (sammenlignet med torsk fra referanseområder). I leveren til torsk fra Breviksfjorden var det 1.3 ganger større sum toksisitetsekvivalenter enn i torsk fra Såstein. Denne økningen var sannsynligvis ikke tilstrekkelig til å føre til økning i aktiviteten av avgiftningsevenzymer når denne trolig allerede var noe forhøyd.

5. Referanser

- Addison, R.F. Biochemical effects in a pollution gradient - summary. *Mar.Ecol.Prog.Ser.* 46:75-77, 1988.
- Ariese, F., Kok, S.J., Verkaik, M., Gooijer, C., Velthorst, N.H. and Hofstraat, J.W. (1993) Synchronous fluorescence spectrometry of fish bile: a rapid screening method for the biomonitoring of PAH exposure. *Aquat.Toxicol.* **26**, 273-286.
- Bayne, B.L., Addison, R.F., Capuzzo, J.M., Clarke, K.R., Gray, J.S., Moore, M.N., and Warwick, R.M.. An overview of the GEEP workshop. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 46, 235-243, 1988.
- Beyer, J., Sandvik, M., Skåre, J.U., Egaas, E., Hylland, K., Waagbø, R., Goksøy, A. Time- og dose-dependent biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) exposed to benzo[a]pyrene, 2,3,3',4,4',5-hexachlorobiphenyl (PCB-156) og cadmium. *Biomarkers* 2: 335-44, 1997.
- Casillas, E., Misitano, D., Johnson, L.L., et al. Inducibility of spawning og reproductive success of female English sole (*Parophrys vetulus*) from urban og nonurban areas of Puget Sound, Washington. *Mar.environ.Res.* 31:99-122, 1991.
- Conover, R.J. Assimilation of organic matter by zooplankton. *Limnol. Oceanogr.* 11: 338-354, 1966.
- Cross, J.N. og Hose, J.E. Evidence for impaired reproduction in white croaker (*Genyonemus lineatus*) from contaminated waters off southern California. *Mar.environ.Res.* 24:185-188, 1988.
- Day, R.W. og Quinn, G.P. Comparisons of treatments after an analysis of variance in ecology. *Ecol.Monographs* 59:433-463, 1989.
- Draper, N.R. og Smith, H. *Applied regression analysis*, New York:John Wiley & Sons, 1981. Ed.2nd - 709.
- Förlin, L., Haux, C., Karlsson-Norrgren, L., Runn, P. og Larsson, Å. Biotransformation enzyme activities og histopathology in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, treated with cadmium. *Aquat.Toxicol.* 8:51-64, 1986.
- Habig, W.H., Pabst, M.J. og Jakoby, W.B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J.biol.Chem.* 249:7130-7139, 1974.
- Hylland, K., Sandvik, M., Skåre, J.U., Beyer, J., Egaas, E. og Goksøy, A. Biomarkers in flounder (*Platichthys flesus*): an evaluation of their use in pollution monitoring. *Mar.environ.Res.* 42:223-227, 1996.
- Johnson, L., Casillas, E., Sol, S., Collier, T.K., Stein, J.E. og Varanasi, U. Contaminant effects on reproductive success in selected benthic fish. *Mar.environ.Res.* 35:165-170, 1993.
- Klungsøy, J., Wilhelmsen, S., Westrheim, K., Saetvedt, E., Palmork, K.H. The GEEP Workshop: Organic chemical analyses. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 46: 19-26, 1988.
- Knutzen, J., Biseth, A., Brevik, E., Green, N., Schlabach, M., Skåre, J.U. Overvåking av miljøgifter i fisk og skalldyr fra Grenlandsfjordene 1994. Statlig program for forurensningsovervåking – Rapport 630/95, NIVA-rapport 3363, 165 s, 1995.

- Knutzen, J. Overvåking av miljøgifter i fisk og skaldyr fra Grenlandsfjordene 1996. NIVA-rapport, 1998 (in prep.)
- Levene, H. Robust tests for the equality of variances. In: *Contributions to probability og statistics*, edited by Olkin, I. Stanford University Press, 1960.
- Livingstone, D.R., Lemaire, P., Matthews, A., et al. Assessment of the impact of organic pollutants on goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) og mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice Lagoon, Italy: biochemical studies. *Mar. environ. Res.* 39:235-240, 1995.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. og Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* 193:265-275, 1951.
- Michel, X., Salaün, J.-P., Galgani, F. og Narbonne, J.F. Benzo(a)pyrene hydroxylase activity in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*: a potential marker of contamination by polycyclic aromatic hydrocarbon-type compounds. *Mar. environ. Res.* 38:257-273, 1994.
- Næs, K., Bakke, T., and Konieczny, R. Mobilization of PAH from polluted seabed and uptake in the blue mussel (*Mytilus edulis* L.). *Mar. Freshwater Res.*, 46, 275-285, 1995.
- Olsen, J.S. Burforsøk med skrubbe (*Platichthys flesus* L.) på kontaminert sediment: Akkumulering og effekter. Cand.Scient. oppgave, Univ. Oslo, 71 s, 1997.
- Rygg, B. Bløtbunnsfaunaundersøkelser i Grenlandsfjordene 1987. Statlig program for forurensningsovervåking – Rapport 361/89. NIVA-rapport 2271, 23 s, 1989.
- Rygg, B. Undersøkelser av bløtbunnsfauna i Grenlandsfjordene 1994. Statlig program for forurensningsovervåking – Rapport 619/95. NIVA-rapport 3320, 50 s, 1995.
- Rygg, B. Overvåking av Grenlandsfjordene. Bløtbunnsfaunaundersøkelser 1996. Statlig program for forurensningsovervåking – Rapport 682/96. NIVA-rapport 3602, 27 s, 1996.
- Shenker, J.M. og Cherr, G.N. Toxicity of zinc og bleached kraft mill effluent to larval English sole (*Parophrys vetulus*) og Topsmelt (*Atherinops affinis*). *Arch. environ. Contam. Toxicol.* 19:680-685, 1990.
- Sokal, R.R. og Rohlf, F.J. *Biometry*, New York:W.H. Freeman & Co, 1981. Ed.2nd pp. 1-859.
- Stegeman, J.J., Woodin, B.R. og Goksøy, A. Apparent cytochrome P-450 induction as an indication of exposure to environmental chemicals in the flounder *Platichthys flesus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 46:55-60, 1988.
- Stein, J.E., Collier, T.K., Reichert, W.L., Casillas, E., Hom, T. og Varanasi, U. Bioindicators of contaminant exposure og sublethal effects in benthic fish from Puget Sound, WA, USA. *Mar. environ. Res.* 35:95-100, 1993.
- Suteau, P., Daubeze, M., Migaud, M.L. og Narbonne, J.F. PAH-metabolizing enzymes in whole mussels as biochemical tests for chemical pollution monitoring. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 46:45-49, 1988.
- Underwood, A.J. Techniques of analysis of variance in experimental marine biology and ecology. *Oceanogr. mar. Biol. Ann. Rev.* 19:513-605, 1981.
-

Vethaak, A.D. og ap Rheinallt, T. Fish disease as a monitor for marine pollution: the case of the North Sea. *Rev.Fish Biol.Fish.* 2:1-32, 1992.

Voccia, I., Krzystyniak, K., Dunier, M., Flipo, D. og Fournier, M. In vitro mercury-related cytotoxicity og functional impairment of the immune cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat.Toxicol.* 29:37-48, 1994.

Waring, C.P., Stagg, R.M., Fretwell, K., McLay, H.A. og Costello, M.J. The impact of sewage sludge exposure on the reproduction of the sand goby, *Pomatoschistus minutus*. *Environ.Pollut.* 1:17-25, 1996.

von Westernhagen, H., Cameron, P., Dethlefsen, V. og Janssen, D. Chlorinated hydrocarbons in North Sea whiting (*Merlangius merlangus* L.), and effects on reproduction. I. Tissue burden and hatching success. *Helgoländer Meeresunters.* 43:45-60, 1989.

Widdows, J., Donkin, P. Mussels and environmental contaminants: bioaccumulation and physiological aspects. I: Gosling, E. (red) *The Mussel Mytilus*; kapittel 8, Elsevier Press, Amsterdam, s. 384-424, 1992.

Widdows, J., Donkin, P., Brinsley, M.d., Evans, S.V., Salkeld, P.N., Franklin, A., Law, R.J., Waldock, M.J. Scope for growth and contaminant levels in North Sea mussels *Mytilus edulis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 127: 131-148, 1995.

Widdows, J., Johnson, D. Physiological energetics of *Mytilus edulis*: scope for growth. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 46, 113-121, 1988.

Winther-Larsen, T. Cytokrom P-450-systemet i skrubbe-lever sett i forhold til fiskens fysiologi. Effekter av kjemiske forbindelser. Etoksiresorufin-deetylase - kan dette enzymet brukes som biologisk forurensningsindikator? Cand. Scient. oppgave, Universitetet i Oslo, 1990.