



Avdeling for anvendt økologi og landbruksfag Institutt for skog- og utmarksfag  
Campus Evenstad

Ivar Optun Andersen & Else-Mari Slåttelid

# Effekten av aluminium på marflo (*Gammarus lacustris*)

The effect of aqueous aluminium on the  
amphipod *Gammarus lacustris*

«Verre tider, verre syner gjennom fremtidsnatten lyner!

*Brittens kvalme stenkullsky senker sort seg over landet, smusser alt det friske grønne, kveler alle spirer skjønne, stryker lavt, med giftstoff blandet, stjeler sol og dag fra egnen, drysset ned som askeregnet over oldtids dømte by (Ibsen, 1866)»*

6EV299 Bacheloroppgave i utmarksforvaltning

2020

Samtykker til tilgjengeliggjøring i digitalt arkiv Brage    JA  NEI

## Sammendrag

Helt siden starten av 1900-tallet har man forsket på sur nedbør og hvilke effekter det har for naturen. Det har vært mange teorier om årsaken til at vann og vassdrag blir giftige etter å ha vært utsatt for sur nedbør. Tidligere forskning kom til slutt frem til at økte konsentrasjoner av aluminium i avrenningen til vann og vassdrag regnes som den mest alvorlige konsekvensen av sur nedbør. Det er også godt dokumentert at det er en sammenheng mellom aluminium i vannet og fiskedød.

En grundig gjennomgang av litteraturen viser at det er gjort lite forskning på evertebrater og aluminium. Den begrensede forskningen som er gjort har ikke klargjort betydningen av aluminium for de enkelte artene, eller hvilke mekanismer som ligger bak giftvirkningen. Vi har i denne oppgaven tatt for oss arten marflo (*Gammarus lacustris*). Marflo er en tangloppe (*Amphipoda*) som regnes for å være svært følsom for lav pH, og det er tidligere registrert nedgang i antall bestander av marflo som følge av sur nedbør. I våre eksperimenter har vi brukt marflo for å finne svaret på om aluminium er like giftig for evertebrater som for fisk.

Det ble utført tre forsøk hvor dyrene ble eksponert for fire forskjellige vanntyper, inkludert ubehandlet driftsvann (kontroll, pH 7,3); Surt Al-rikt vann med pH 5,8 (ustabil) ved å tilsette aluminiumnitrat ( $\text{Al}_3\text{NO}_3$ ) og salpetersyre ( $\text{HNO}_3$ ), surt Al-rikt vann med pH 4,8 (stabil) ved å tilsette aluminiumnitrat og dobbelt så mye salpetersyre, og surt Al-fattig vann med pH 4,8 ved å tilsette bare salpetersyre. Hvert forsøk varte i 18 dager.

Resultatene våre viser at det var en statistisk signifikant forskjell i dødelighet mellom de ulike vanntypene ( $p < 0,001$  (log-rank)) i alle tre forsøkene. Dyrene eksponert for surt Al-rikt vann (stabil) og Surt Al-fattig vann hadde 100% dødelighet i alle forsøkene. I eksponeringene med surt Al-rikt vann (ustabil) var dødeligheten 8% i forsøk 1, 67% i forsøk 2 og 63% i forsøk 3. Dødeligheten i ubehandlet driftsvann var 8% i forsøk 1, 0% i forsøk 2 og 8% i forsøk 3.

Våre resultater viser at ved pH 4,8 er det  $\text{H}^+$ -konsentrasjonen i vannet som først og fremst har effekt på marflo. Vi finner ingen holdepunkter for at aluminium er mer giftig for marflo ved pH rundt 5,8 enn ved pH rundt 4,8, slik det er vist å være for fisk. Resultatene viser også at Al-polymersiering har stor betydning for effekten av surt Al-rikt vann på marflo ved pH 5,8, og at effekten er sammenlignbar med det som tidligere er vist for fisk. Aluminium synes å ha en viktig rolle når det gjelder effekten av sur nedbør på evertebrater generelt, og marflo spesielt. Aluminium kan se ut til å ha noe mindre betydning for effekten av sur nedbør for evertebrater sammenlignet med fisk

## Abstract

Since the beginning of the 20<sup>th</sup> century research has been conducted on acid precipitation and its effects on nature. Many theories have emerged as to why lakes and streams become toxic to aquatic animals after being exposed to acid precipitation. Previous research eventually concluded that the increase in concentration of aluminum in the water is considered the most serious consequence of acid precipitation. The correlation between aqueous aluminum and fish toxicity is well documented.

A thorough review of the literature shows that little research has been conducted on invertebrates and aluminum. The research that has been conducted has not clarified the importance of aluminum or the mechanism behind the toxic effect on each of the species studied. In this study we have used the amphipod *Gammarus lacustris* in our experiments. *G. lacustris* is considered to be sensitive to low pH, previously there have been registrations of a decrease in the number of populations as a result of acid precipitation.

We have performed three consecutive experiments where the animals were exposed to four different treatments, including untreated water (control, pH 7,3), acidic Al-rich water with pH 5,8 (unstable) by adding aluminum nitrate ( $\text{Al}_3\text{NO}_3$ ) and nitric acid ( $\text{HNO}_3$ ) to the water, acidic Al-rich water with pH 4,8 (stable) by adding aluminum nitrate and twice as much nitric acid, and acidic Al-poor water with pH 4,8 by adding only nitric acid. The experiments lasted for 18 days.

Our results show that there was a statistically significant difference in mortality between the waters tested ( $p < 0,001$  (log-rank)). Animals exposed to acidic Al-rich water (stable) and acidic Al-poor water had a mortality of 100% in all three experiments. The mortality in the exposure to acidic Al-rich water (unstable) was 8% in experiment 1, 67% in experiment 2 and 63% in experiment 3. The mortality in the untreated water varied between 0 and 8%.

At pH 4,8 the concentration of  $\text{H}^+$ -ions is the primary reason to the effect on *G. lacustris*. We could not prove aluminum to be more toxic to *G. lacustris* at pH 5,8 than at pH 4,8, as it is for fish. Al-polymerization is of great importance for the effect of acidic Al-rich water on *G. lacustris* at pH 5,8, and the effect is comparable to that previously shown for fish. Aluminum appears to be of great importance to the effect of acidic precipitation on invertebrates in general, and *G. lacustris* in particular. Aluminum seems to have a little less significance for the effect of acidic precipitation on invertebrates compared to fish

## Forord

Med denne oppgaven avslutter vi våre 3år som bachelorstudenter på Evenstad. Denne tiden har vært lærerik og spennende. Vi har begge en stor interesse for fiske og med den interessen kommer nysgjerrigheten om ferskvannøkologien og hvordan den påvirkes av naturlige og unaturlige årsaker. Gjennom de tre årene vi har hatt på Evenstad har vi lært mye om dette temaet og da Antonio B. S. Poléo presenterte prosjektet om aluminium og sur nedbør var vi begge sikre på at dette var noe vi ville være med å forske videre på.

Etter flere timer med kjemiundervisning med veileder, prøving og feiling under innhenting av dyr, lange dager og netter på laboratoriet kan vi trygt si at denne oppgaven har gitt oss mye erfaring både i feltarbeid og på labben.

Vi vil takke Erik Haftor Gill for samarbeidet under hele prosjektet. Takk til Emilie Bouckenooghe for hjelp til feltarbeid, og Olivier Devineau for hjelp med statistikk. Videre vil vi takke Kåre Sandklev og Olav Berge på settefiskanlegget, Svein Birger Wærvågen, Arne Linløkken og Ruben A. Pettersen. Vi vil også takke Kjartan Østby og resten av forskningsgruppen vår for gode innspill underveis. Til slutt vil vi rette en stor takk til vår veileder Antonio B. S. Poléo for god veiledning og stort engasjement for oppgaven.

Sitatet på forsiden er hentet fra Henrik Ibsens «Brand» fra 1866.

Evenstad, 28. mai 2020

Ivar Optun Andersen & Else-Mari Slåttelid

# Innholdsfortegnelse

Innledning.....	7
Aluminium .....	8
Evertebrater og marflo.....	10
Problemstilling .....	11
Materiale og metode.....	12
Forsøksdyr.....	12
Forsøksoppsett.....	13
Forsøksprotokoll og gjennomføring.....	17
Prøvetaking og analyser .....	18
Statistiske analyser .....	21
Resultater.....	22
Vannkjemi .....	22
Al-kjemi .....	25
Dødelighet hos marflo.....	31
Forsøk 1.....	31
Forsøk 2.....	32
Forsøk 3.....	34
Diskusjon.....	37
Al-kjemi .....	37
Er aluminium giftig for marflo eksponert for surt aluminiumrikt vann? .....	38
Er en eventuell giftighet av aluminium knyttet til graden av Al-polymerisering, likt det vi finner hos fisk?.....	41
Er aluminium hovedårsaken til at sur nedbør har negativ effekt på marflo? .....	43
Konklusjon .....	44
Referanser.....	45
Vedlegg .....	49
Oppskrifter .....	49

## Innledning

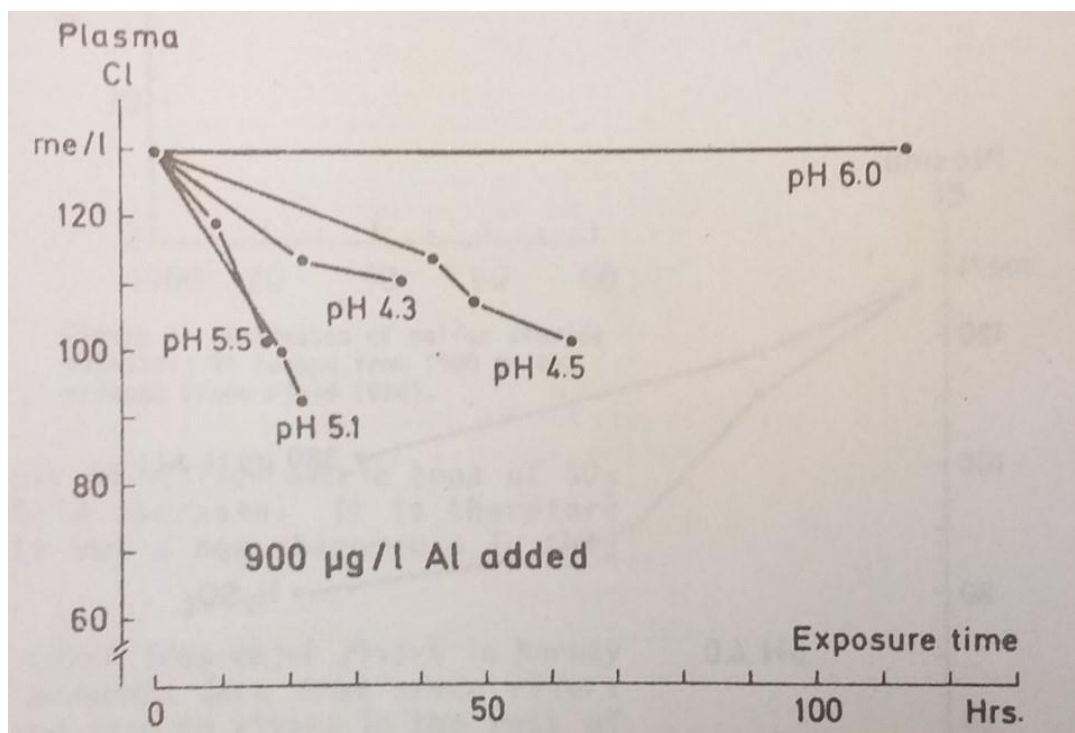
Frem til godt ut på 1990-tallet fikk sur nedbør mye oppmerksomhet, og ble regnet for kanskje det største miljøproblemet for norske vann og vassdrag. Forurenset luft som inneholdt svovel- og nitrogen-oksider ble fraktet over lange avstander, og hadde forurensende effekt også langt unna der svovel- og nitrogenutslippene fant sted (Likens et al., 1979). Områdene i Sør-Norge var spesielt utsatt for forsuring på grunn av den relativt ionefattige berggrunnen og nærheten til de store utslippskildene på kontinentet. Spesielt påvirket var Aust-Agder, Vest-Agder, Telemark, Rogaland og sørlige deler av Hordaland (Muniz & Leivestad, 1980; Muniz, 1984). En av de første gangene sur nedbør synes å være omtalt er i boken «*Air and Rain, The Beginnings of a Chemical Climatology*» skrevet av Robert Angus Smith (Smith, 1872). På begynnelsen av 1900-tallet begynte man å legge merke til at det skjedde ting i vassdragene på Sørlandet (Huitfeldt-Kaas, 1922). Fra 1920 og utover registrerte man nedganger i fangstene av laks (*Salmo salar*) og ørret (*Salmo trutta*) i lakseførende vassdrag på Sørlandet. Enkelte perioder kunne det også oppstå massiv fiskedød av laks og ørret i elvene i forbindelse med vårflommer og høststormer hvor det regnet mye (Dahl, 1921; Schofield, 1976). Huitfeldt-Kaas (1922) forklarte den plutselige fiskedøden med at det omfattende regnet dro med seg giftig vann fra inntørkede myrer. Høsten 1926 oppsto det en plutselig fiskedød i et klekkeri i Kristiansand, og det ble foreslått at det var vannets surhetsgrad som var årsaken (Dahl, 1926). På den tiden kjente man enda ikke til fenomenet «sur nedbør», vertfall ikke naturvitenskapelig sett, og i enda mindre grad til problemer med luftforurensning. Det var først da Alf Dannevig skrev om sur nedbør man ble gjort klar over problematikken her til lands (Dannevig, 1959). Kanskje hadde han lest artiklene til Mackereth (1957) og Gorham (1958) som hadde kommet frem til samme konklusjon fra studier av engelske vann og vassdrag. Videre forskning i årene etter dette endte opp med at man mot slutten av 1970-tallet forsto at det ikke var konsentrasjonen av  $H^+$ -ioner som var giftig for fisken, men at det heller var økte konsentrasjoner av aluminium i vannet som resulterte i fiskedød (Dickinson, 1977, 1978).

Når svoveldioksid ( $SO_2$ ) og nitrogendioksid ( $NO_2$ ) reagerer med vannmolekyler i atmosfæren dannes det svovelsyre ( $H_2SO_4$ ) og salpetersyre ( $HNO_3$ ). Disse syrene løser seg i fuktigheten i atmosfæren, og faller i sin tur ned mot bakken sammen med regnet i form av  $H^+$ -ioner, og sulfat- ( $SO_4^{2-}$ ) og nitrater ( $NO_3^-$ ). Når denne sure nedbøren (på grunn av det forhøyede  $H^+$ -innholdet) blander seg med jordvannet fører det til en gradvis utvasking av basekationer ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$  og  $Ca^{2+}$ ) fra jordsmonnet. Det skjer en ionebytting hvor  $H^+$ -ionene tar plassen til

basekationene som er løst bundet til jord- og leirpartikler i jorda. Basekationene følger med jordvannet ut i vann og vassdrag. Innholdet av basekationer kan betraktes som jordsmonnets bufferkapasitet mot sur nedbør. Etter mange års forsurening vil imidlertid basekationene i stor grad være vasket ut fra jordsmonnet. Da vil  $H^+$ -ionene selv begynne å lekke ut sammen med jordvannet, og etter hvert også andre ioner, spesielt aluminium ( $Al^{3+}$ ), som sitter sterkere bundet til jord- og leirpartiklene enn basekationene. Aluminium er det vanligste metallet på jorda, så det vil aldri bli vasket helt ut slik som basekationene. Resultatet blir en økt tilførsel av  $H^+$  og  $Al^{3+}$  til økosystemene i ferskvann (Cronan & Schofield, 1979; Seip et al., 1989; Lawrence et al., 1999; Stoddard et al., 1999).

### Aluminium

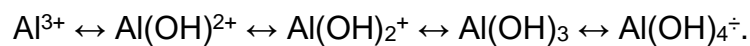
Økte konsentrasjoner av aluminium i avrenningen til vann og vassdrag regnes som den mest alvorlige konsekvensen av sur nedbør, og det er godt dokumentert at det er en klar sammenheng mellom aluminium i vannet og fiskedød (Driscoll et al., 1980; Howells et al., 1994; Sparling & Lowe, 1996; Gensemer & Playle, 1999). Aluminium påvirker fiskens gjeller og fører til kvelning og hemmet ioneregulering (Neville, 1985; Howells et al., 1990).



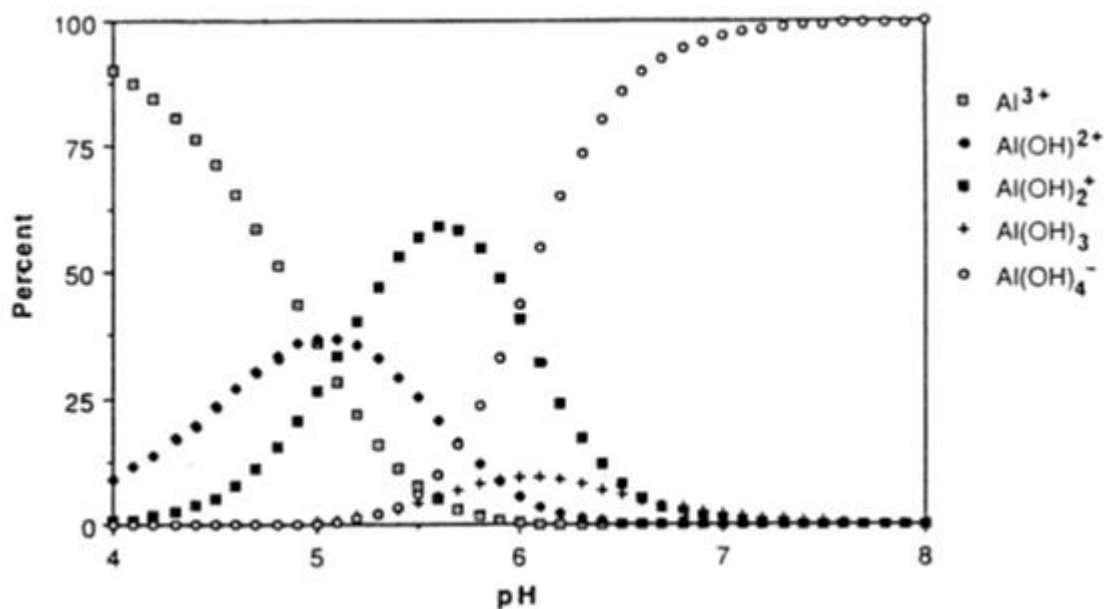
**Figur 1.** Tap av klorid (Cl) fra blodplasma hos brunørret (*Salmo trutta*) eksponert for vann tilsatt 900 µg Al/l ved forskjellige pH-verdier (fra Muniz & Leivestad (1980)).



I 1992 presenterte vår veileder en forklaring på hvordan aluminium virker når vannet synes å være mest giftig for fisken (Poléo, 1992, 1995). Det er nemlig slik at vann med en gitt konsentrasjon av aluminium er mest giftig for fisk når pH er om lag 5,8 sammenlignet med når pH for eksempel er 4,5 (Figur 1). Dette virker ikke logisk fordi vann uten aluminium er giftig for fisk og mange andre ferskvannsorganismer ved pH 4,5, men ikke ved 5,8. For å forstå dette må vi se litt nærmere på hvordan aluminium oppfører seg når det er løst i vann. Når aluminium løses i vann, vil det fordele seg etter hydrolyselikevekten:



Denne likevekten er forskjøvet helt mot venstre når pH er under 4,0, og vil forskyve seg fra venstre mot høyre med økende pH (Lydersen, 1990). Likevekten er også temperaturavhengig, og går raskere mot høyre ved høye enn ved lave temperaturer (Lydersen, 1990). I vann med pH 4,0 eller lavere foreligger altså alt aluminium på formen  $\text{Al}^{3+}$ . Ved høyere pH enn 4,0 vil andelen Al-hydroksider i vannet øke, og fordele seg slik som vist i Figur 2.



**Figur 2.** Fordelingen av monomere hydrolyseprodukter av aluminium i pH-intervallet 4-8, når vanntemperaturen er 2,0°C (fra Lydersen (1990)).

Legg også merke til at når vi beveger oss fra venstre mot høyre i hydrolyselikevekten går den positive ladningen til Al-formene fra +3 til  $\div 1$ . Det spesielle med aluminium er at de positivt ladde Al-hydroksidene har evnen til å binde seg til hverandre og danne store molekyler

(polymerer), i en reaksjon som kalles polymerisering. Denne prosessen er forklart i detalj i Lydersen (1990) og Poléo (1995). Etter hvert som polymerene vokser går deres netto ladning mot null (Hem & Roberson, 1967). Dette er viktig å merke seg fordi giftigheten til aluminium hos fisk synes å være høyest når aluminium foreligger som en blanding av hydroksidene  $\text{Al(OH)}^{2+}$  og  $\text{Al(OH)}_2^+$ , og små positivt ladde Al-polymerer (Poléo, 1995). Giftigheten henger etter alt å dømme sammen med at gjelleoverfalten til fisk har rikelig med negative bindingssteder for positive ioner, og at det er de nevnte Al-ionene som lettest vil binde seg til gjelleoverflaten og forstyrre fiskens respirasjon og ioneregulering (Poléo, 1995; Poléo & Bjerkely, 2000). Dersom forholdene ligger til rette for det, for eksempel at pH i vannet forblir rundt 5,8, vil aluminium fortsette å polymerisere med hydroksidene og polymerene som allerede er bundet til gjelleoverflaten, og føre til omfattende akkumulering av aluminium på gjellene, slik at fisken til slutt kveles og dør (Poléo, 1995; Poléo & Bjerkely, 2000; Poléo et al., 2017).

### Evertebrater og marflo

Som tidligere nevnt er fisk følsom for lav pH dersom nivåene er lave nok, for eksempel 4,5 eller lavere. Dette gjelder også for andre ferskvannsorganismer, hvor også mange arter tåler betydelig mindre nedgang i pH enn fisk (Fjellheim & Raddum, 1990). Registreringer gjort i Härjedalen i Sverige på 90-tallet viste en nedgang på 90 % av den samlede bunndyrfaunaen siden 70-tallet (Degerman et al., 1992). En rekke studier viser at det er en økning i dødelighet og nedgang i biomasse i takt med økende innhold av  $\text{H}^+$ -ioner i vannet (Sutcliff & Carrick, 1973; Friberg et al., 1980; Brehm & Meijering, 1982; Otto & Svensson, 1983; Økland & Økland, 1986). Det har derfor lenge vært enighet om at lav pH har en negativ effekt på evertebratfaunaen i ferskvann (Herrmann, 1993; Havas & Rosseland, 1995). Dette har blant annet blitt underbygget av at det i områder hvor det er blitt kalket har tidligere forsvunne arter kommet tilbake til vassdragene. Et eksempel er fra Store og Lille Hovvatn i Aust-Agder, hvor kalking og etterfølgende pH-økning førte til at mange arter rekoloniserte vassdraget (Halvorsen, 2004).

Krepsdyr som marflo (*Gammarus lacustris*) regnes blant de mest følsomme ferskvannsorganismene for lav pH (Herrmann, 1993). For Skandinavia og deler av Europa er det registrert en nedgang i antall bestander av marflo som en direkte effekt av sur nedbør (Økland, 1969; Meijering, 1984; Økland & Økland, 1986; Herrmann, 1993). Det er imidlertid uklart om følsomheten hos ulike evertebrater generelt, eller marflo spesielt, er direkte knyttet til synkende pH-verdier eller indirekte knyttet til økte Al-verdier, slik tilfelle er for fisk. Dette

spørsmålet ble reist allerede på 1990-tallet (Howells et al., 1990; Rosseland, 1990), og er fortsatt uklart. Både om aluminium er den viktigste årsaken til giftigheten av forsuret vann eller ikke, og hvordan eventuelt aluminium virker på de ulike artene, herunder marflo. En grundig gjennomgang av litteraturen viser at det er gjort lite forskning på evertebrater og aluminium, og den begrensede forskningen som er gjort har ikke klargjort betydningen av aluminium for de enkelte artene, eller hvilke mekanismer som ligger bak giftvirkningen.

I dette studie har vi derfor valgt oss ut marflo som en modellorganisme for å finne ut om aluminium kan være hovedårsaken til effektene av sur nedbør på bunndyrfaunaen i norske vann og vassdrag. Hos fisk er det de fysiologiske prosessene som er knyttet til gjellene som påvirkes av lav pH og aluminium (Poléo, 1992). Krepsdyr som marflo har i likhet med fisk gjeller, selv om disse strukturelt sett ikke er like. Krepsdyr (*Crustacea*) er leddyr (*Arthropoda*) som har et sett kroppsvedheng (for det meste i form av bein) knyttet til hvert kroppsledd. Disse beina er birame. Det vil si at de har todelte bein, såkalte spalteføtter, som består av en indre grein (endopoditt) og en ytre grein (eksopoditt). Langs brystet sitter eksopoditten øverst på spaltefoten, og kalles en epipoditt. Det er disse epipodittene som er omdannet til gjeller hos krepsdyr slik som marflo, og ligger gjemt under skallet (Hågvar, 2014). Den strukturelle forskjellen mellom krepsdyrgjeller og fiskegjeller bidrar til spørsmålet om aluminium virker på marflo på samme måte som på fisk.

## Problemstilling

Målet med denne oppgaven har derfor vært å frembringe resultater som kan bidra til å finne svaret på om aluminium er like giftig for evertebrater som for fisk, og om det er samme mekanisme for en slik giftighet hos evertebrater og fisk. For å bidra til denne kunnskapen har vi stilt følgende spørsmål:

- 1) Er aluminium giftig for marflo eksponert for surt aluminiumrikt vann?
- 2) Er en eventuell giftighet av aluminium knyttet til graden av Al-polymerisering, likt det vi finner hos fisk?
- 3) Er aluminium hovedårsaken til at sur nedbør har negativ effekt på marflo?

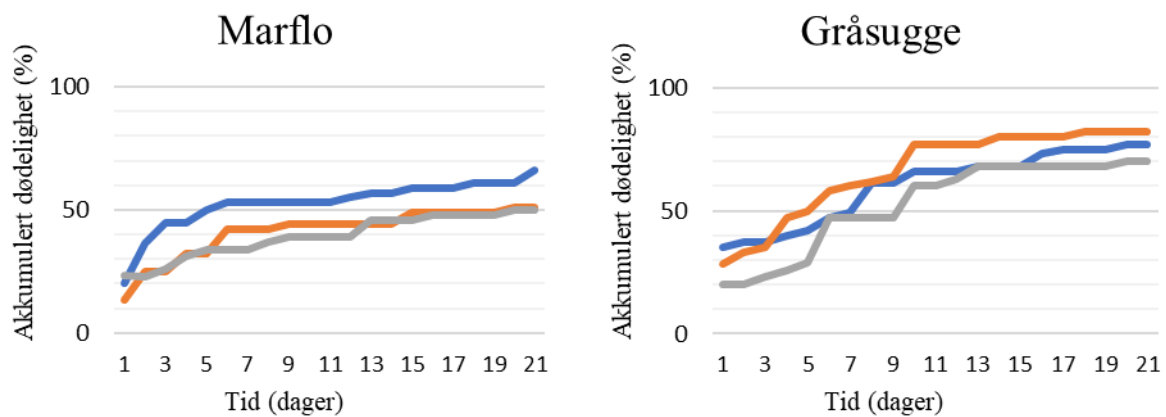
## Materiale og metode

Studiet i denne oppgaven har blitt gjennomført som en serie av tre separate eksperimenter i laboratoriet ved fiskeanlegget på Evenstad, i Stor-Elvdal kommune. Driftsvannet i anlegget er overflatevann fra en nærliggende bekk. Vannet holder en pH på rundt 7,0 og har en ledningsevne på 26  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Vanntemperaturen varierte mellom 0,5 og 3,0°C under forsøksperioden.

### Forsøksdyr

I forsøkene har vi benyttet marflo (*Gammarus lacustris*), som vi fanget med stangsil i Negardssjøen (GPS-koordinater: 61.5235826,10.8807032) i Stor-Elvdal kommune. Det var imidlertid også meningen å benytte gråsugge (*Asellus aquaticus*) i forsøkene. Vi fanget marflo ved tre anledninger. Etter fangst ble dyrene fraktet til fiskeanlegget, hvor de ble aklimert i driftsvannet frem til de skulle brukes i forsøk. pH i Negardssjøen ble målt til 7,6. I anlegget ble dyrene oppbevart i små tanker med om lag 20 individer i hver tank. Tankene inneholdt vegetasjon og litt av bunnssubstratet fra Negardssjøen, for å øke trivselen til dyrene.

Gråsugge ble fanget med stangsil i Skollsjøen (GPS-koordinater: 61.341675,10.8525293) i Stor-Elvdal kommune. Vi foretok fangst av gråsugge ved hele åtte anledninger. pH i Skollsjøen ble målt til 6,7. Etter fangst ble dyrene fraktet til fiskeanlegget, hvor de ble aklimert og oppbevart på samme måte som marflo. Vi hadde imidlertid så store problemer med overlevelsen til gråsugge at vi omsider ga opp å bruke disse til forsøk frem til vi har funnet årsaken til den høye dødeligheten. Vi gjennomførte flere separate tester for å finne ut hvordan gråsugge og marflo best trives i fangenskap. Begge artene viste dødelighet den første tiden etter at de var tatt inn i anlegget på Evenstad. For gråsugge var denne dødeligheten på mellom 68-80 % i løpet av de to første ukene, mens den for marflo lå på mellom 46-57 % (Figur 3). Etter to uker i driftsvannet til fiskeanlegget flatet dødelighetskurvene for begge arter ut, og overlevelsen på de resterende dyrene var på 98%.

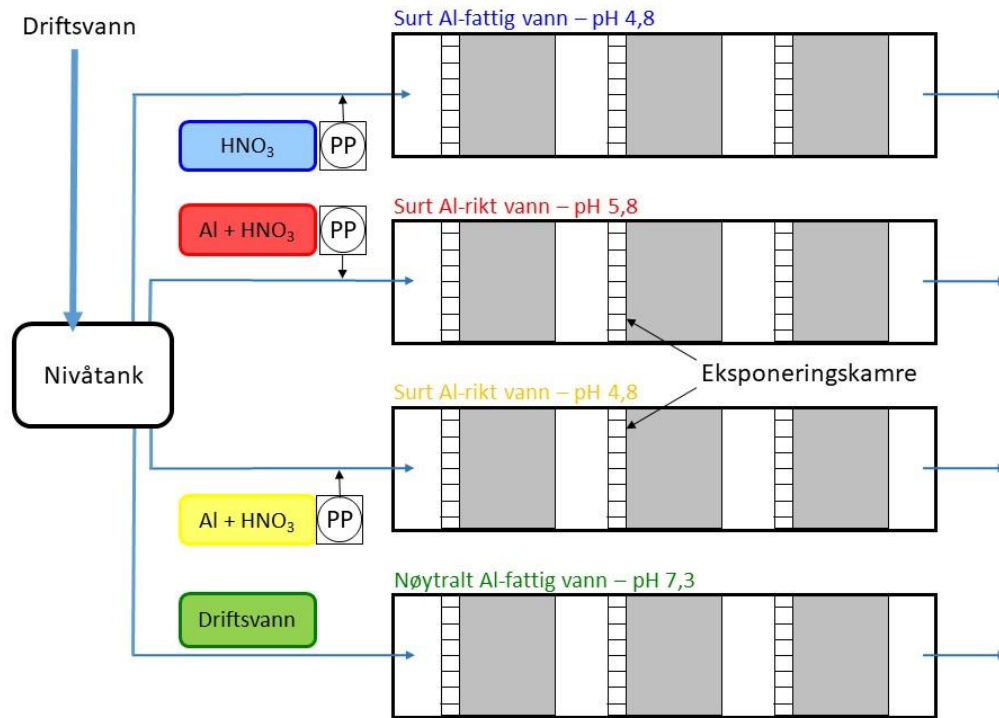


**Figur 3.** Akkumulert dødelighet av marflo (*Gammarus lacustris*) og gråsugge (*Asellus aquaticus*) under aklimeringsperioden før vi gjennomførte forsøkene våre. Dyrene ble aklimert under tre ulike forhold: Fôret med krepsfôret JBL Novo Prawn (rød kurve), rikelig med naturlig substrat fra vannet dyrene ble hentet fra (grå kurve), og ingen fôring og minimalt med substrat (blå kurve).

### Forsøksoppsett

Forsøksoppsettet bestod av én nivåtank på 122 liter (bredde x dybde x lengde = 52 x 30 x 78 cm), fire klekkerenner (47 x 17 x 220 cm), 12 modifiserte klekkebakker (47 x 15 x 46 cm), rør og tre Watson Marlow 205S peristaltiske pumper (Figur 4). Under forsøk 2 og 3 ble det benyttet en pH-logger WTW Multi 3420 med termometer. Elektroden var plassert i nivåtanken. Alle rennene og bakkene i oppsettet var laget av glassfiber, rør av PVC, tankene av plast og slangene fra pumpene av silikon. Rørene som ledet vann ut av nivåtanken ned til rennene hadde påmontert finmasket netting for å filtrere bort store partikler fra inntaksvannet. Nivåtankens funksjon var å sikre en så jevn som mulig vanngjennomstrømning i systemet. Dette ble gjort ved å la overskudd av driftsvannet gå i overløp (Figur 5).

Vanntilførselen fra nivåtanken til rennene ble kontrollert ved hjelp av kraner. Vanntilførselen til hver av rennene var på ca. 2 l/min. Der tilførselsrøret gikk ned i hver klekkerenne konstruerte vi en enkel blandemekanisme som sikret god innblanding av doseringsløsningen i driftsvannet (Figur 6). Midt på tilførselsrøret var det montert et stigerør, hvor tilsettingen av doseringsløsningen ble gjort (Figur 7).



**Figur 4.** Skjematisk fremstilling av forsøksoppsettet. Driftsvannet (pH 7,3) pumpes inn i nivåtanken, før det fordeles til de fire kleskerennene. Doseringsløsningene ble tilsatt driftsvannet ved hjelp av peristaltiske pumper (PP). Det manipulerede vannet nådde eksponeringskamrene i første kleskebakk ca. 15 sekunder etter innblanding.



**Figur 5.** Bildet viser nivåtanken og de fire rørene som fordeler vannet til de fire rennene. Overskuddsvannet inn i nivåtanken går i overløp for å skape en jevn vannføring gjennom rennene.



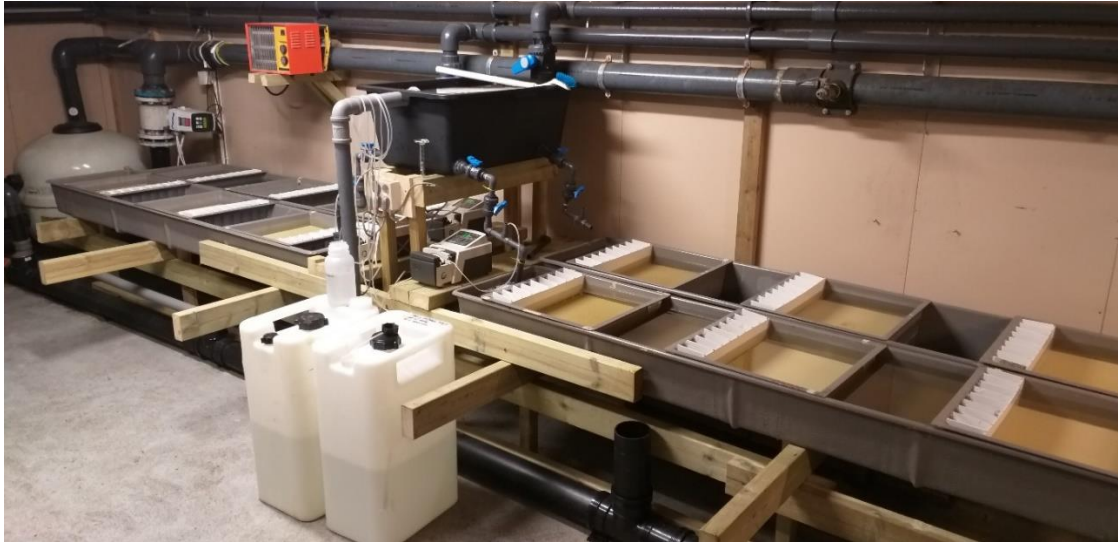
**Figur 6.** Blandemekanismen for innblanding av doseringsløsning vises i bunnen av klekkerennen, foran klekkebakken. Klekkebakkene ble modifisert ved at bunnen ble skåret ut og erstattet med en PVC-plate og en perforert plate i fremre del (1 x 1 mm perforering). Fremre del var seksjonert med PVC-plater i 8 like store eksponeringkamre (6 x 10 x 14 cm) hvor dyrene, ett i hvert kammer, ble eksponert under forsøkene.



**Figur 7.** Silikonslangen plassert i stigerøret for å tilsette doseringsløsningen, på bildet kan man også se en av de peristaltiske pumpene som ble benyttet til å tilsette doseringsløsningen i riktig mengde.



I hver klekkerennene ble det plassert tre modifiserte klekkebakker, med åtte eksponeringskamre for dyr (Figur 6 og 8). Klekkebakkene var konstruert, og plassert i rennene, slik at vannet måtte passere gjennom dem på vei gjennom rennene. Vannets oppholdstid gjennom klekkerennene var på om lag 45 min.



**Figur 8.** *Oversikt over eksperimentoppsettet med tre klekkebakker plassert i hver av fire klekkerenner. De hvite dunkene inneholdt doseringsløsning. Vi benyttet tre slike dunker, men en av dem var ikke til stede da bildet ble tatt.*

I tillegg til driftsvannet som skulle fungere som kontroll, laget vi tre ulike vanntyper for å få svar på hvordan aluminium i surt vann virker på marflo (Tabell 1). Vi lagde to sure Al-rike vanntyper ved å sette salpetersyre ( $\text{HNO}_3$ ) og aluminiumnitrat ( $\text{Al}_3\text{NO}_3$ ) til driftsvannet, slik at den totale Al-konsentrasjonen (nominell Al-konsentrasjon) ble beregnet til å ligge rundt  $1000 \mu\text{g/l}$ . Mengden salpetersyre var dobbelt så høy i den ene tilsetningen som i den andre, slik at vi endte opp med en sur Al-rik vanntype med pH 4,8 (stabil) og en med pH 5,8 (ustabil). Ut fra fordelingen av hydrolyseproduktene av aluminium forventet vi at Al-kjemien var mer stabil ved pH 4,8 sammenlignet med ved pH 5,8 (Figur 2). Ved pH 4,8 vil mesteparten av aluminiumet i vannet foreligge som  $\text{Al}^{3+}$ , og dermed i liten grad polymerisere. Ved pH 5,8 derimot, vil det meste av aluminiumet foreligge som Al-hydroksider som hyppig polymeriserer (Lydersen, 1990; Poléo, 1995). Den tredje vanntypen vi lagde var surt Al-fattig vann, med pH 4,8, ved å sette kun salpetersyre til driftsvannet (Tabell 1), med tanke på å teste hvor viktig henholdsvis pH og aluminium er for giftigheten av surt Al-holdig vann for marflo. De fire ulike vanntypene ble ledet gjennom hver sin renne, og i hvert forsøk ble marflo eksponert for alle fire.



**Tabell 1.** Vanntypene som ble brukt i forsøkene, med mengden kjemikalier som ble tilsatt 25 l destillert vann for å lage de ulike doseringsløsningene som ble satt til driftsvannet.

	Vanntype	pH	Nominell Al-konsentrasjon	Doseringsløsning
<b>Renne 2 (rød)</b>	Sur Al-rik ustabil	5,8	1000 µg/l	280g Al(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> og 190 ml HNO <sub>3</sub>
<b>Renne 3 (gul)</b>	Sur Al-rik stabil	4,8	1000 µg/l	280g Al(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> og 380 ml HNO <sub>3</sub>
<b>Renne 1 (blå)</b>	Sur Al-fattig	4,8	0 µg/l	380 ml HNO <sub>3</sub>
<b>Renne 4 (grønn)</b>	Ubehandlet driftsvann	7,3	0 µg/l	Ingen

### Forsøksprotokoll og gjennomføring

Hvert av de tre påfølgende forsøkene hadde en varighet på 18 dager. Minst en time før hvert forsøk ble startet ble doseringen i rennene satt i gang. Denne tiden ble brukt til å justere doseringspumpene slik at ønsket pH-verdi i hver av rennene ble oppnådd (Tabell 1). Når ønsket pH-verdi i alle rennene var oppnådd startet selve forsøket ved at vi plasserte ett individ i hvert eksponeringskammer, 24 i hver renne (totalt 96 individer). Dette ble gjort på kveldstid. Deretter lot vi dyrene være over natten frem til neste morgen hvor første prøvetaking ble gjort. I forsøk 1 ble prøvetaking utført tre ganger daglig; morgen, ettermiddag og kveld. I forsøk 2 og 3 ble prøvetaking utført morgen og kveld. Først sjekket vi dødelighet i eksponeringskamrene, deretter ble det tatt ut en vannprøve til måling av pH og ledningsevne, før vi sjekket vannføringen, doseringsmengden og vanntemperaturen i hver renne.

Vannprøver til Al-analyser ble tatt tre ganger i løpet av forsøk 1 – rett før forsøket startet, på dag 5, og siste dag. I forsøk 2 ble det tatt vannprøver til Al-analyser to ganger – på dag 5 fra alle rennene, deretter fra rennen med surt Al-rikt vann (pH 4,8, gul) på dag 11, og fra rennene med surt Al-rikt vann (pH 5,8, rød) og rent driftsvann (pH 7,3, grønn) på dag 18. I forsøk 3 ble det tatt vannprøve til Al-analyser en gang; på dag 6 fra rennene med surt Al-fattig vann (pH 4,8, blå) og surt Al-rikt vann (gul), og på dag 20 (dagen etter at forsøket var avsluttet) fra rennene med surt Al-rikt vann (rød) og ubehandlet driftsvann (grønn). Alle tre forsøkene ble avsluttet ved at doseringen ble slått av og de gjenlevende dyrene fjernet fra eksponeringskamrene.

## Prøvetaking og analyser

Vi sjekket dødelighet ved å pumpe vann mot dyret nede i eksponeringskammeret ved hjelp av en pipette. Dersom dyret ikke reagerte ble det klassifisert som dødt. Da ble dyret tatt ut av kammeret, og vi målte lengden på det før det ble lagt på etanol og oppbevart for eventuelt senere undersøkelser.

Vannføringen inn i hver renne sjekket vi ved å feste en slange på inntaksrøret til rennen, slik at vi kunne samle opp alt vannet i løpet av 1 minutt i en målesylinder, og lese av vannmengden (l/min). Doseringen inn i rennene sjekket vi ved å ta doseringsslengen ut av stigerøret og over i en liten målesylinder, hvor vi samlet opp doseringsløsningen i 1 minutt, før vi leste av mengden (ml/min). Vanntemperaturen ble målt med et Testo 830-T4 termometer i alle fire klekkerennene i forsøk 1. Siden temperaturen ikke varierte mellom rennene, ble vanntemperaturen logget ved hjelp av termometeret tilknyttet pH-loggeren som var plassert i nivåtanken i forsøk 2 og 3.

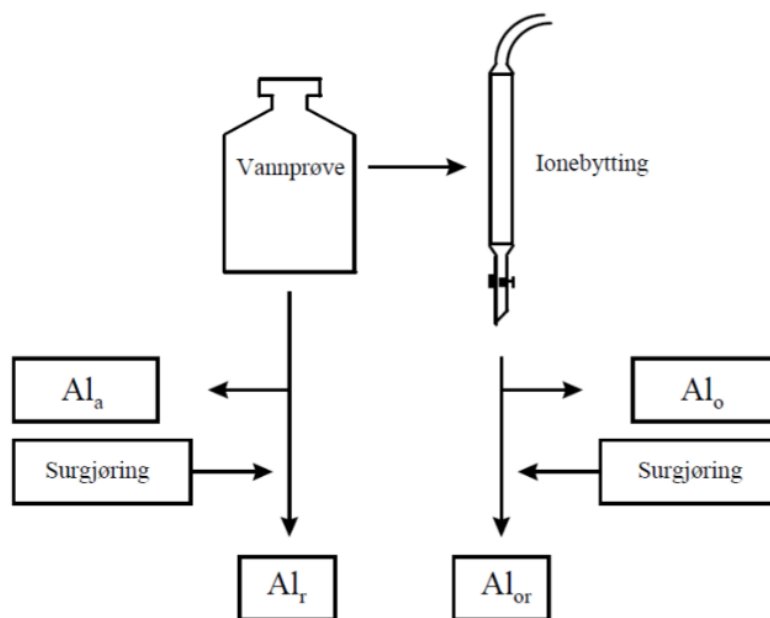
Plastflaskene som ble benyttet til vannprøvetaking ble på forhånd skylt to ganger i samme vann som det skulle tas prøver fra. Vannprøvene til måling av pH og ledningsevne ble tatt rett fra hver renne, mellom klekkebakk 1 og 2. Vannprøver til Al-analyser ble tatt ved hjelp av en hevert i det midterste eksponeringskammeret i hver klekkebakk – tre prøver fra hver renne.

Vannets elektrolytiske ledningsevne ble målt med et Radiometer Copenhagen CDM 80 Conductivity meter. Verdiene ble avlest til nærmeste tiendedel og temperaturkorrigert til 25 °C. Ledningsevnen ble målt gjentatte ganger inntil tre målinger på rad viste samme verdi, som så ble avlest. pH ble målt ved hjelp av et WTW 3110 pH-meter med en Hamilton Polilyte Plus H S8 120-glasselektrode. pH-buffere på 4,01 og 7,00 ble benyttet til å kalibrere elektroden daglig før måling. pH-meteret har en indikator som blinker under målingen. Når indikatoren sluttet å blinke ble pH-verdien avlest.

Vi har benyttet den såkalte Barnes/Driscoll-metoden til å fraksjonere aluminium i de ulike vanntypene brukt i forsøket, etter en protokoll utarbeidet av Poléo et al. (1997). Dette er en velegnet fraksjoneringsmetode for aluminium i vann, spesielt under feltforhold (Barnes, 1975; Driscoll, 1984; Sullivan et al., 1986; Lydersen et al., 1994). Metoden kombinerer kationebytting med keton-ekstraksjon. Ved ekstraksjon av en vannprøve kompleksbindes aluminium med 8-hydrokxyquinolin (HQ) (C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>NO), og Al-HQ-komplekset ekstraheres over i en organisk fase av metylisobutylketon (MIBK). Ekstraksjonstiden vi har benyttet er 20 sek, slik Barnes (1975) anbefaler. Det er viktig at fraksjoneringen gjøres umiddelbart etter at vannprøven er tatt for å

forhindre at fordelingen av ulike Al-former endrer seg mens prøven lagres (Lydersen et al., 1990; 1994). Hver gang vi ekstraherte aluminium laget vi også en standardrekke (0, 40, 100, 200, 400 og 600 µg Al/l) som ble brukt til å fremstille en standardkurve for beregning av Al-konsentrasjonen i prøvene. Standardene ble ekstrahert på samme måte som prøvene. Tabell 2 gir en oversikt over de fraksjonene som ble analysert eller beregnet, mens Figur 11 gir en skjematisk oversikt over hvordan fraksjoneringen foregår. Mengden monomere Al-forbindelser (Ala) ble bestemt ved direkte ekstraksjon av en ubehandlet vannprøve umiddelbart etter prøvetaking (Driscoll, 1984). Deretter ble vann fra vannprøven ionebyttet. Ved kationebytting holdes positivt ladete forbindelser tilbake i ionebytterkolonnen, mens negative og uladete forbindelser slipper gjennom. Vi benyttet en kationebytter på Na<sup>+</sup>-form (Amberlite IR-120, 10 ml ionebyttermasse i kolonnen). For å unngå forandringer i Al-fraksjonene som følge av endring i pH under ionebytting, ble pH i ionebytteren justert slik at pH ikke avvek mer enn 0,5 pH-enheter fra pH i vannprøven. Væskehastigheten gjennom kolonnen var 3,8 ml/min pr. ml ionebyttermasse. Ionebyttermassen ble preparert med 60 ml 10<sup>-4</sup> M NaCl-løsning mellom hver vannprøve, og 60 ml vannprøve ble alltid kjørt gjennom ionebytteren før 60 ml ble samlet for analyse (ekstraksjon). På bakgrunn av ekstraksjonstiden (20 sek) er det aluminiumet som ekstraheres fra en kationebytter vannprøve definert som ikke-labil aluminium. I naturlig vann defineres ofte denne fraksjonen som monomert organisk aluminium (Alo) (Driscoll, 1984). Monomert uorganisk aluminium (Ali) sitter da igjen i ionebytteren. Konsentrasjonen av Ali ble derfor beregnet som differansen mellom Ala og Alo.

<b>Tabell 2.</b> <i>Beskrivelse av de ulike Al-fraksjonene som ble analysert eller beregnet i henhold til Barnes/Driscoll-metoden.</i>	
<b>Alr</b>	Totalt aluminium, bestemmes ved ekstraksjon av vannprøve surgjort til pH 1 med HNO <sub>3</sub> , etter minst 24 timer lagring.
<b>Ala</b>	Totalt monomert aluminium, bestemmes ved ekstraksjon av ubehandlet vannprøve.
<b>Alo</b>	Organisk monomert aluminium, bestemmes ved ekstraksjon av eluatet fra kationebyttet prøve.
<b>Ali</b>	Uorganisk monomert aluminium, definert som differansen Ala - Alo.



**Figur 9.** Skjematisk oversikt over hvordan fraksjoneringen ved ionebyttning og ekstraksjon foregår etter Barnes/Driscoll-metoden. Legg merke til at Al<sub>i</sub>-fraksjonen mangler. Det skyldes at den beregnes som differansen mellom Al<sub>a</sub> og Al<sub>o</sub>. Al<sub>or</sub>-fraksjonen ble ikke gjennomført i dette studiet.

Kolloidale, polymere, stabile organiske og hydroksiorganiske Al-forbindelser er ikke ekstraherbare i løpet av 20 sek. Den totale konsentrasjonen av aluminium (Al<sub>r</sub>) i prøvene ble derfor bestemt ved ekstraksjon etter at vannprøvene var surgjort med HNO<sub>3</sub> til pH 1,0, og lagret i minst 24 timer.

Ekstraktene ble lagret ved 4°C i minst 24 timer før mengden aluminium ble analysert spektrofotometrisk ved 395 nm (Tikhonov, 1973; Bloom et al., 1979) på et Shimadzu UV 1201 spektrofotometer. Absorbansen ble også målt ved 600 nm for å korrigere for interferens med jern (Sullivan et al., 1986). Standardavviket for metoden er beregnet til omtrent 1% av gjennomsnittet (Sullivan et al., 1986), og deteksjonsgrensen er ifølge Vogt et al. (1994) 13 µg Al/l.

Konsentrasjonen av aluminium i ekstraktene ble til slutt beregnet ved hjelp av Excel. Først beregnet vi den kvadrerte r-verdien (rkvadrat), stigningstallet og skjæringspunktet på y-aksen for standardkurven. Stigningstallet og skjæringspunktet satte vi så inn i følgende formel for å regne ut konsentrasjonen av aluminium i hver prøve:

$$[Al] = ((\text{abs. } 395 \text{ nm} - (\text{abs. } 600 \text{ nm} \times 1,12)) / \text{stigningstall}) \pm \text{skjæringspunkt}$$

Til slutt ble mengden uorganisk monomert aluminium (Ali) beregnet som differansen:  $Al_a \div Al_o = Ali$ .

## Statistiske analyser

Til de statistiske analysene hvor vi har sammenlignet dødeligheten i de ulike vanntypene og i bakkene i hver enkelt renne, har vi benyttet Kaplan-Meiers overlevelsesanalyse (Kaplan & Meier, 1958). Analysene er gjennomført ved hjelp av programmeringsspråket R, versjon 3.6.2 (RCore-Team, 2019) i programmet R-Studio, versjon 1.2.5033 (RStudio-Team, 2019). Tilleggpakkene readXL, Survminer, versjon 0.4.6 (Kassambara et al., 2019) og Survival, versjon 3.1.12 (Therneau et al., 2020) ble også benyttet.

Det er tiden det tar for en hendelse å skje som er den interessante variabelen i en overlevelsesanalyse, og den som benyttes for utregningene i Kaplan-Meiers overlevelsesanalyse (Kleinbaum & Klein, 2012). Kaplan-Meier estimatoren beregner overlevelsesfunksjonen  $S(t)$ , og er gitt ved funksjonen:

$$\hat{S}_t = \prod_{t_i \leq t} \left[ 1 - \frac{d_i}{n_i} \right]$$

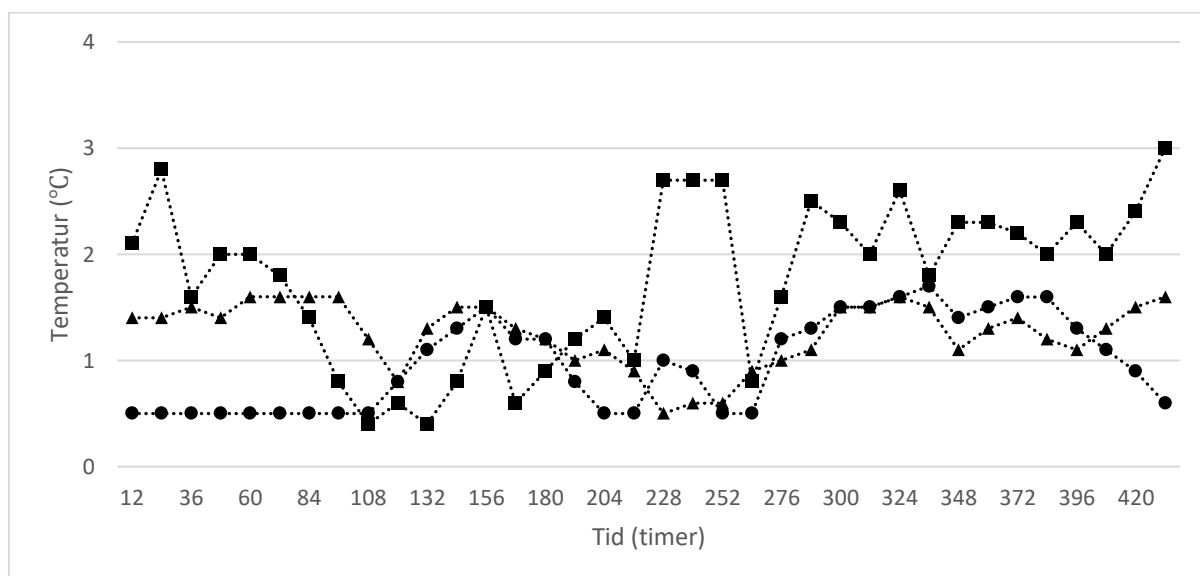
Hvor  $S_t$  = antall individer som overlever lenger enn  $t$  dividert på det totale antall individer i forsøket. Og  $t$  er tidsperioden for overlevelse eller tiden det tok før dyret døde. Videre  $t_i$  er forsøkets varighet ved  $i$  og  $d_i$  er antallet døde individer ved  $i$ , og  $n_i$  er antall individer i fare før  $t_i$ .  $S$  baserer seg på sannsynligheten for at et individ overlever til slutten av forsøket (Kleinbaum & Klein, 2012)

Median overlevelse blir også beregnet i Kaplan-Meiers overlevelsesanalyse, og vi har valgt å uttrykke dette som  $LT_{50}$ . Den tiden det tar inntil 50% av individene i en gruppe er døde uttrykkes ofte i toksikologien som  $LT_{50}$ , som betyr «Lethal Time», og hvor 50 står for prosentandelen. For å kunne si noe om forskjellen mellom de forskjellige dødelighetskurvene har vi benyttet en log-rank test. Testen sier oss om det er en statistisk signifikant forskjell mellom kurvene, og gir oss en  $p$ -verdi. Testen er nærmere forklart i Kleinbaum og Klein (2012).

# Resultater

## Vannkjemi

Temperaturen i vannet var lav under hele forsøksperioden, og varierte mellom 0,4 og 3,0 °C (Figur 11). De høyeste temperaturene og den største variasjonen målte vi i det første forsøket (forsøk 1). I dette forsøket ble temperaturen målt i hver enkelt renne med et manuelt termometer, mens vi i de to siste forsøkene målte temperaturen ved hjelp av en pH-logger, som også logget vanntemperaturen, i nivåkaret. Dette kan være årsaken til at vanntemperaturen varierte noe mer i det første forsøket sammenlignet med de to andre. Den lave vanntemperaturen skyldes at forsøkene ble gjort i perioden oktober - februar.



**Figur 11.** Vanntemperaturen gjennom de tre forsøkene. (■) forsøk 1, (●) forsøk 2 og (▲) forsøk 3.

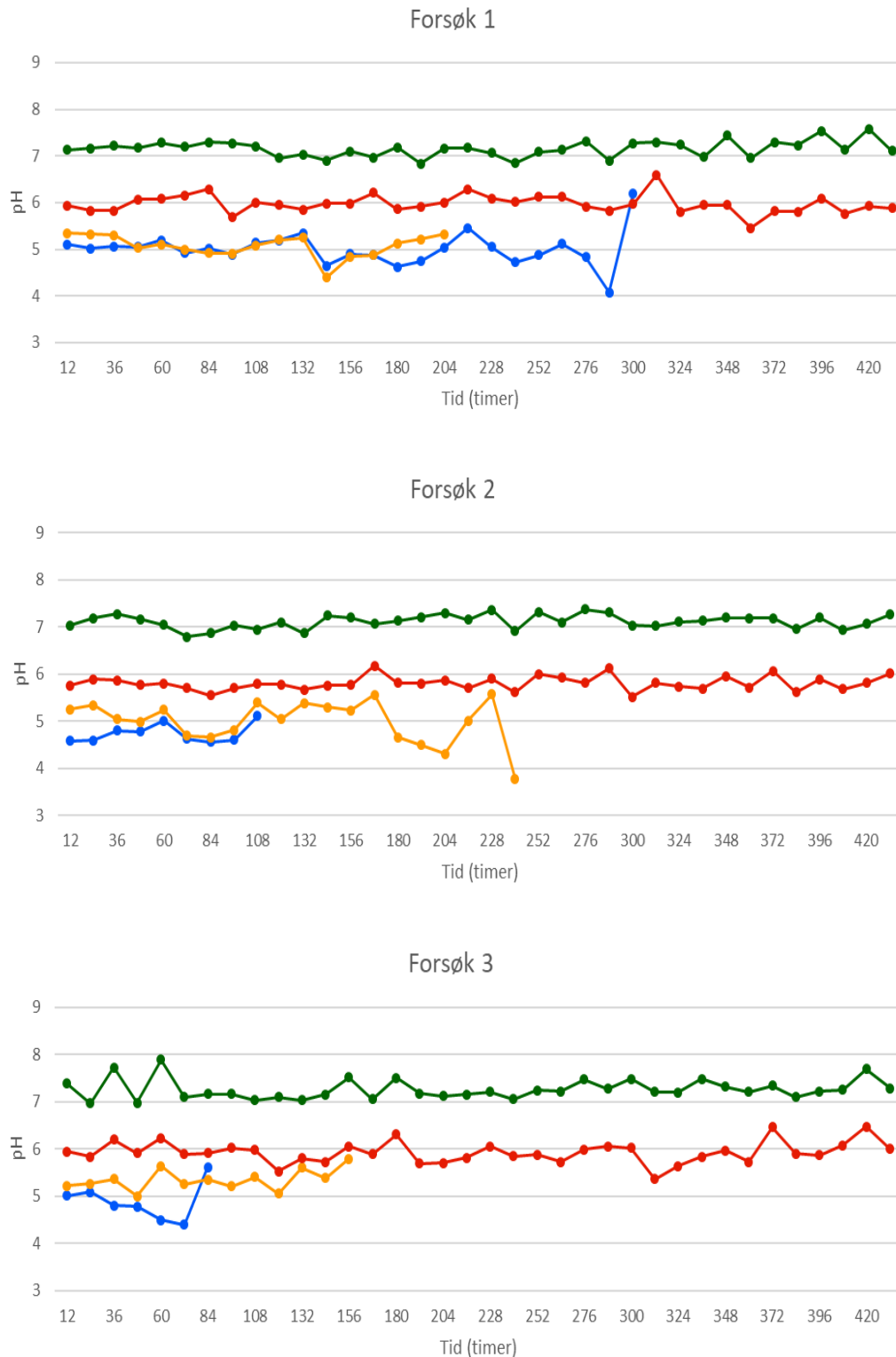
Vannets ledningsevne var relativt stabil gjennom hele forsøksperioden, og varierte mellom rennene på grunn av den kjemiske tilsetningen for å lage de ulike vanntypene (Tabell 3). I det ubehandlede driftsvannet (grønn) lå ledningsevnen mellom 22,7 og 24,4  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (min/maks: 19,4 og 28,1  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ). I renna med surt Al-rikt vann under ustabile forhold (rød) lå gjennomsnittet mellom 28,9 og 30,6  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (min/maks: 23,8 og 38,1  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), men det i renna med surt Al-rikt vann under stabile forhold (gul) var noe høyere, mellom 34,5 og 37,6  $\mu\text{S}/\text{cm}$

(min/maks: 27,4 og 71,9  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ). I renna med surt Al-fattig vann (blå) lå ledningsevnen mellom 32,2 og 35,2  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (min/maks: 27,1 og 59,5  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ).

**Tabell 3.** Vannets ledningsevne ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) i de fire rennene under hvert enkelt forsøk. Verdiene som er oppgitt er gjennomsnitt ( $n = 36$ ) med minimums- og maksimumsverdi i parentes.

	Sur Al-rik ustabil	Sur Al-rik stabil	Sur Al-fattig	Driftsvann
<b>Forsøk 1</b>	28,9 (24,3 - 31,7)	34,5 (27,4 - 47,2)	32,2 (27,1 - 59,5)	23,6 (19,4 - 26,1)
<b>Forsøk 2</b>	29,0 (23,8 - 38,1)	37,6 (30,0 - 71,9)	32,4 (29,1 - 36,6)	22,7 (21,4 - 28,1)
<b>Forsøk 3</b>	30,6 (29,6 - 36,0)	34,5 (31,7 - 39,9)	35,2 (30,2 - 46,3)	24,4 (22,4 - 25,3)

pH i driftsvannet var stabil gjennom hele forsøksperioden, og varierte mellom 6,8 og 7,9 (Figur 12). Det var imidlertid relativt store variasjoner i pH fra dag til dag, noe som ga utslag i noe større variasjon i pH i de vanntypene vi lagde ved å sette til kjemikalier. I renna med Al-rikt vann (ustabil, rød), varierte pH mellom 5,4 og 6,6 gjennom forsøksperioden (Figur 12). I renna med Al-rikt vann (stabil, gul), varierte pH mellom 4,3 og 5,8, bortsett ved siste måling i forsøk 2 hvor pH var så lav som 3,8 (Figur 12). I renna med surt Al-fattig vann (blå) varierte pH for det meste mellom 4,4 og 5,6 gjennom forsøksperioden. Ved nest siste dag av eksponeringen i forsøk 2 var imidlertid pH så lav som 4,1, mens målingen siste dag viste en pH på 6,2 (Figur 12).



**Figur 12.** pH i hver av rennene gjennom de tre forsøkene. Sur Al-rik ustabil (rød), sur Al-rik stabil (gul), sur Al-fattig (blå) og ubehandlet driftsvann (grønn). Når alle dyrene var døde i en av rennene ble det ikke målt pH lenger i renna.



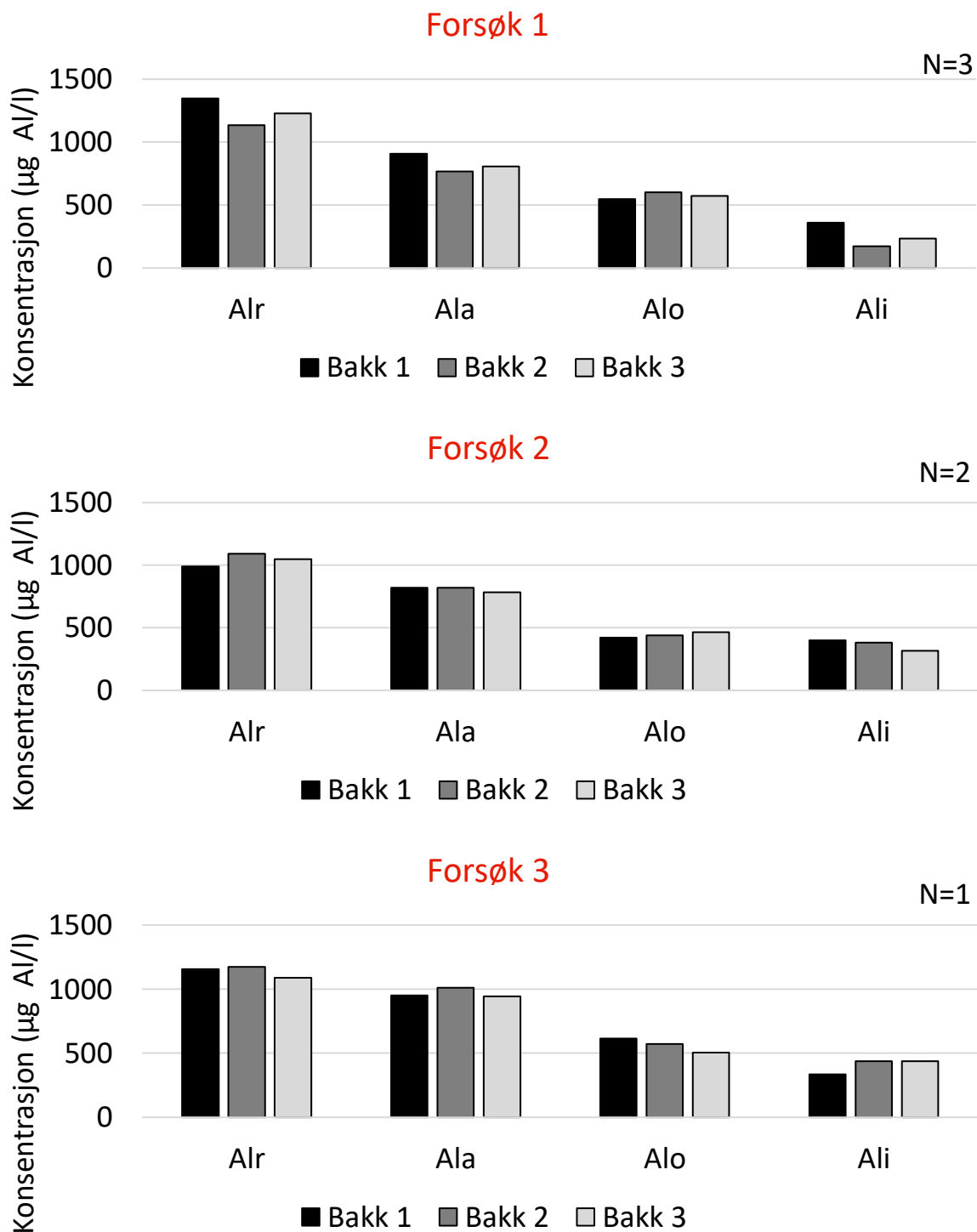
## Al-kjemi

Konsentrasjonen av aluminium, og de ulike fraksjonene av aluminium, var som forventet mye høyere i de to vanntypene tilsatt aluminium sammenlignet med de to uten tilsetning. I renna med surt Al-rikt vann (ustabil, rød) varierte den totale konsentrasjonen av aluminium (Alr) mellom 990 og 1346  $\mu\text{g/l}$  gjennom forsøksperioden (Figur 13). I den andre renna med surt Al-rikt vann (stabil, gul) varierte konsentrasjonen av Alr mellom 914 og 1098  $\mu\text{g/l}$  gjennom forsøksperioden (Figur 14). I de to rennene hvor det ikke ble tilsatt aluminium (sur Al-fattig, blå og ubehandlet driftsvann, grønn), lå Alr-konsentrasjonen mellom 35 og 106  $\mu\text{g/l}$  gjennom forsøksperioden (Figur 15 og 16). Disse verdiene representerer bakgrunnsverdiene, eller den naturlige mengden aluminium i driftsvannet

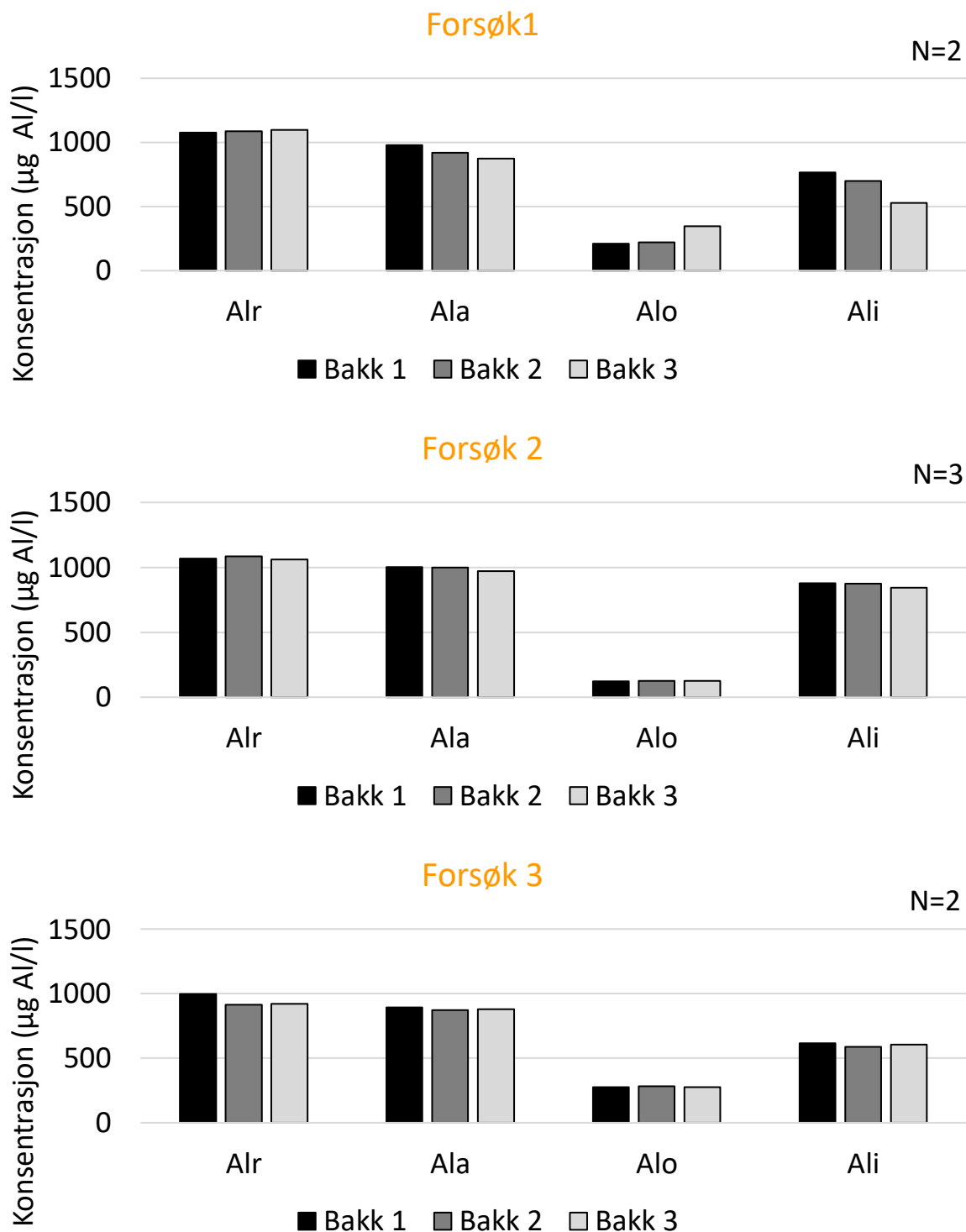
Ala-konsentrasjonen i rød renne (ustabil) med surt Al-rikt vann var noe lavere enn Alr-konsentrasjonen, og varierte mellom 767 og 1009  $\mu\text{g/l}$  (Figur 13), mens den i gul renne (stabil) med Al-rikt vann var nesten like høye som Alr-konsentrasjonen, mellom 872 og 1000  $\mu\text{g/l}$  (Figur 14). I de to rennene uten Al-tilsetning var også Ala-konsentrasjonen lavere, og til dels betydelig lavere, enn Alr-konsentrasjonen, og lå mellom 2 og 40  $\mu\text{g/l}$  (Figur 15 og 16). Det betyr at aluminium som er til stede i driftsvannet hovedsakelig foreligger som store polymere former, og derfor ikke er ekstraherbare i løpet av 20 sekunder. Alo-konsentrasjonen i rød renne lå mellom 420 og 614  $\mu\text{g/l}$  gjennom forsøksperioden (Figur 13), og var betydelig høyere enn i gul renne hvor den lå mellom 123 og 347  $\mu\text{g/l}$  (Figur 14). Følgelig var Ali-konsentrasjonen betydelig lavere i rød renne sammenlignet med gul renne, henholdsvis mellom 173 og 439  $\mu\text{g/l}$  og 528 og 877  $\mu\text{g/l}$  (Figur 15 og 16). I samsvar med at Ala-konsentrasjonen var lav i blå og grønn renne, var konsentrasjonene av både Alo og Ali i disse rennene også relativt lave (Figur 15 og 16).

Det var en viss variasjon i konsentrasjonen av de ulike Al-fraksjonene gjennom renna (mellom bakkene). Vi tror dette først og fremst skyldes at vi ikke har så mye erfaring med Al-fraksjonering, og at antallet Al-analyser som ble gjort var få. Det var ingen gradvis nedgang i Ala-fraksjonen, eller økning i Alo-fraksjonen, gjennom den røde renna som kunne forventes siden Al-kjemien var ustabil og favoriserer polymerisering som vil pågå mens vannet renner gjennom renna. Dette kan dels skyldes at den relativt store variasjonen som skyldes vår uerfarenhet maskerer en slik gradvis endring, og dels det lave antallet fraksjoneringer og analyser som ble gjort. To av prøvene vi fraksjonerte og analyserte fra rød renne ga skyhøye Al-verdier, opptil fire ganger høyere enn øvrige verdier. Disse prøvene ble utelukket fra

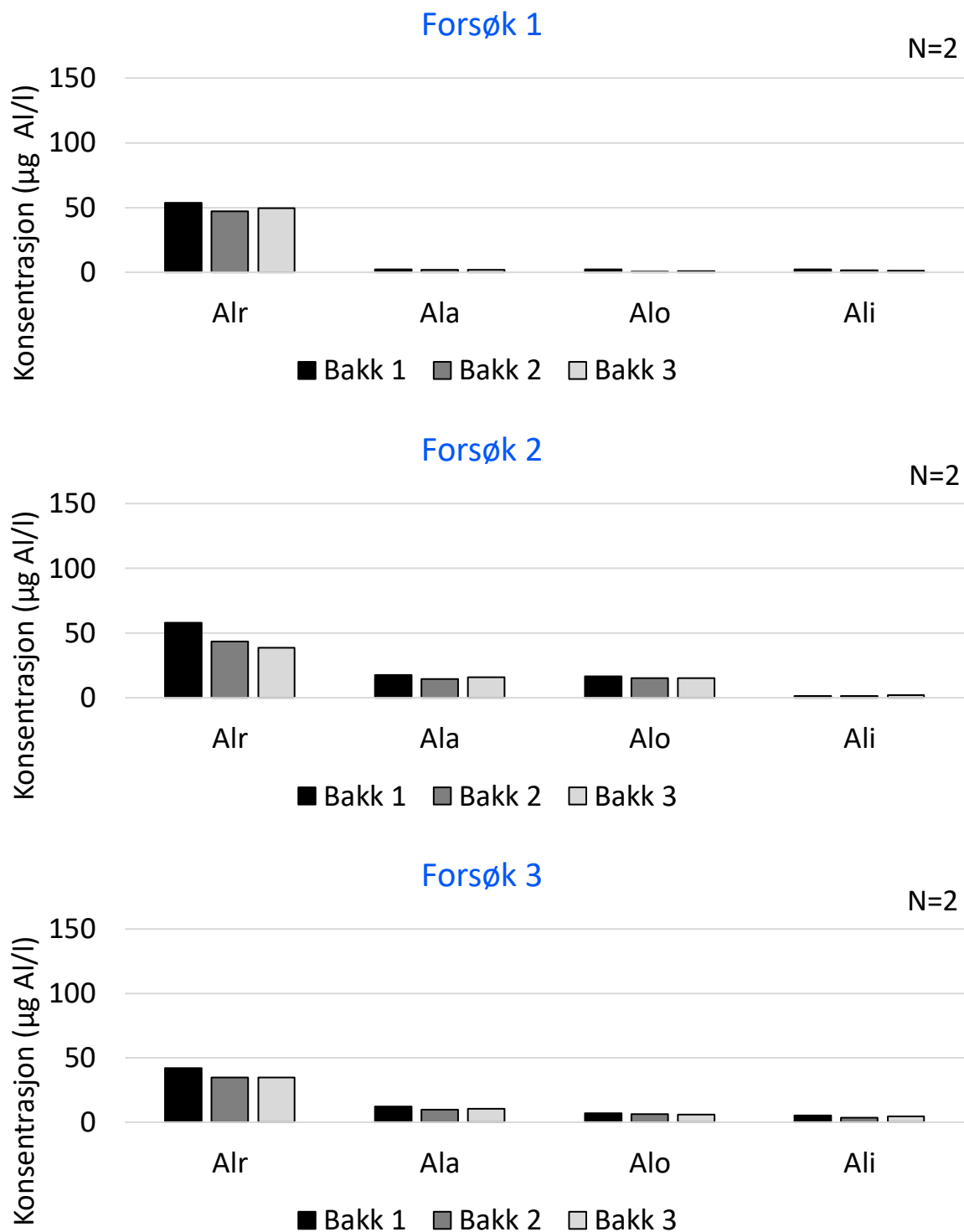
materialet fordi både Al-doseringen og vanngjennomstrømningen i renna ikke avvek fra det normale når prøven ble tatt. I grønn renne i forsøk 3 var Alr-konsentrasjonen merkelig høy i bakk 2 (106 µg/l) sammenlignet med bakk 1 og 3 (58 og 72 µg/l). Vi har ingen forklaring på hvorfor vi fikk denne høye verdien. I grønn renne i forsøk 1 var Alo-konsentrasjonen i bakk 1 (42 µg/l) mer enn seks ganger så høy som i bakk 2 og 3 (7 µg/l i begge). Vi har heller ingen forklaring på dette, men tror det må være gjort en feil i selve analysen fordi Ala-konsentrasjonen i samme bakk (28 µg/l) var lavere enn Alo-konsentrasjonen, noe som er teoretisk umulig.



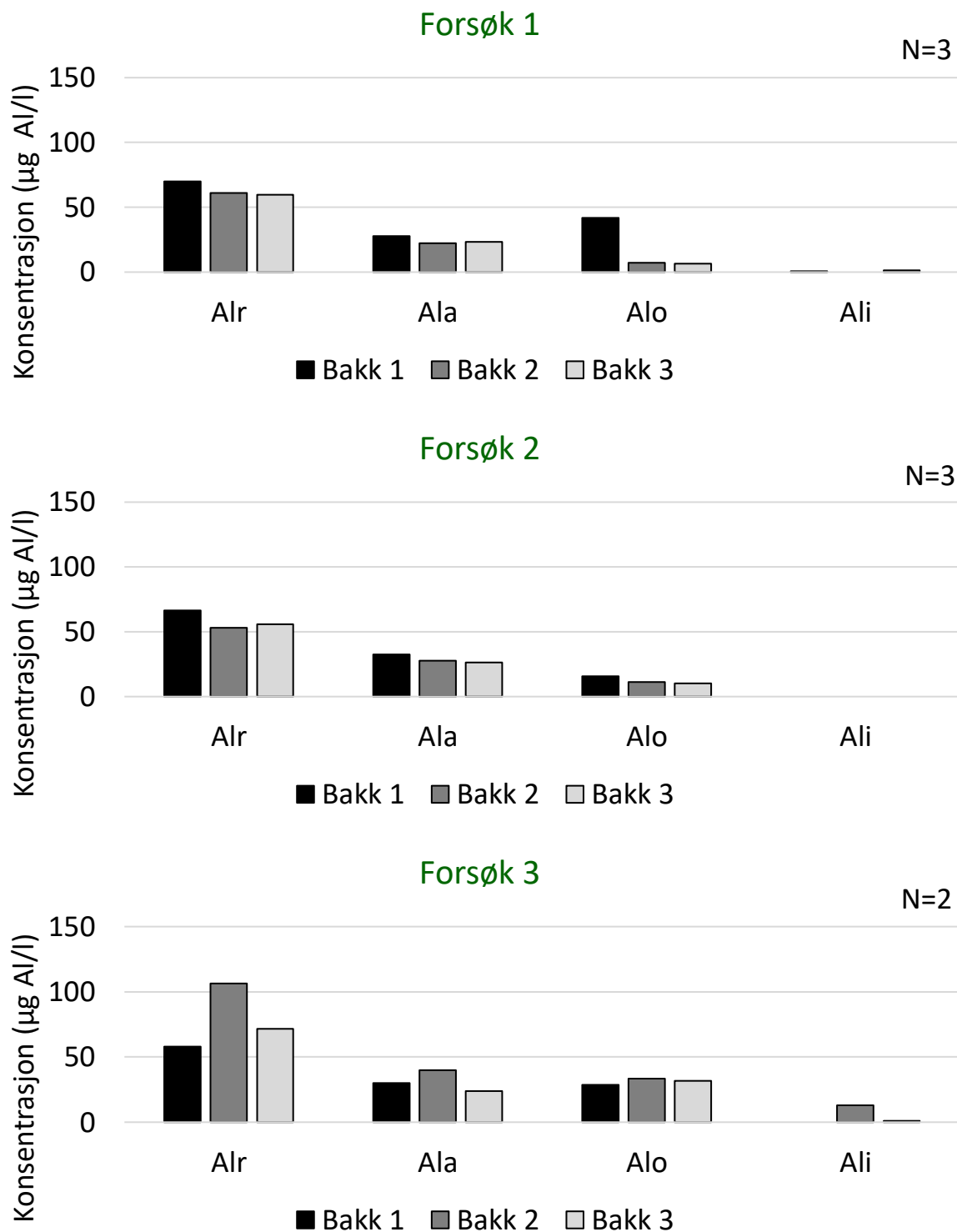
**Figur 13.** Den gjennomsnittlige konsentrasjonen av de ulike Al-fraksjonene i hver bakk i rennen Sur Al-rik ustabil gjennom alle forsøkene. Total aluminium (Alr), totalt monomert aluminium (Ala), organisk monomert aluminium (Alo) og uorganisk monomert aluminium (Ali).



**Figur 14.** Den gjennomsnittlige konsentrasjonen av de ulike Al-fraksjonene i hver bakk i rennen Sur Al-rik stabil gjennom alle forsøkene. Total aluminium (Alr), totalt monomert aluminium (Ala), organisk monomert aluminium (Alo) og uorganisk monomert aluminium (Ali).



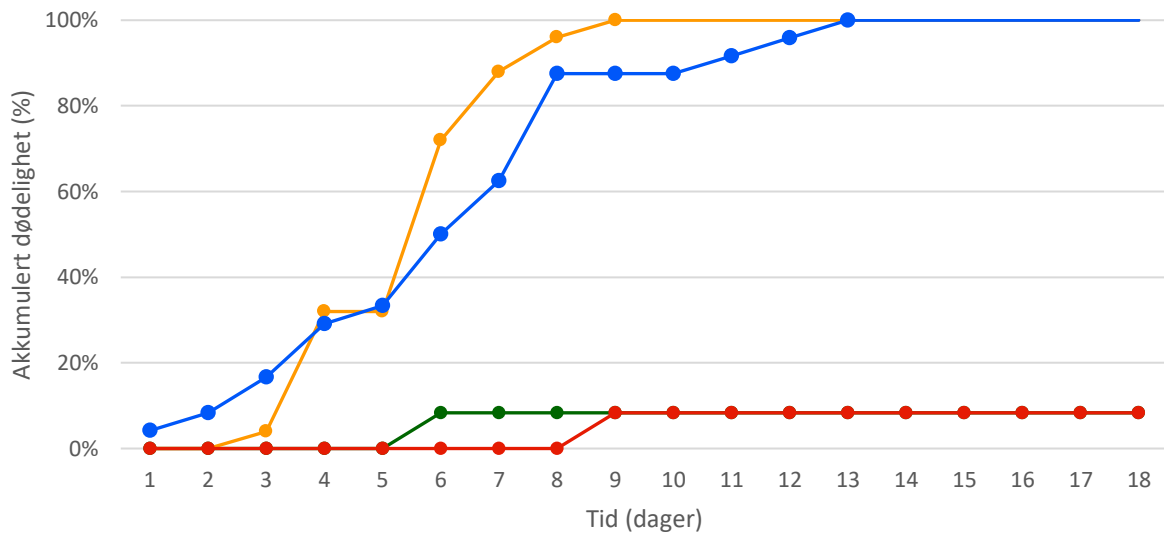
**Figur 15.** Den gjennomsnittlige konsentrasjonen av de ulike Al-fraksjonene i hver bakk i rennen Sur Al-fattig gjennom alle forsøkene. Total aluminium (Alr), totalt monomert aluminium (Ala), organisk monomert aluminium (Alo) og uorganisk monomert aluminium (Ali).



**Figur 16.** Den gjennomsnittlige konsentrasjonen av de ulike Al-fraksjonene i hver bakk i rennen med driftsvann gjennom alle forsøkene. Total aluminium (Alr), totalt monomert aluminium (Ala), organisk monomert aluminium (Alo) og uorganisk monomert aluminium (Ali).

## Dødelighet hos marflo

### Forsøk 1



**Figur 17.** Akkumulert dødelighet i forsøk 1. Sur Al-rik ustabil (rød,  $n = 24$ ), sur Al-rik stabil (gul,  $n = 25$ ), sur Al-fattig (blå,  $n = 24$ ) og ubehandlet driftsvann (grønn,  $n = 24$ ).

I forsøk 1 observerte vi dødelighet av marflo i alle rennene, og det var en statistisk signifikant forskjell i dødelighet mellom de ulike vanntypene ( $p < 0,001$  (log-rank)). Det var imidlertid bare i surt Al-rikt vann (stabil, gul) og i surt Al-fattig vann (blå) at alle dyrene døde (100 % dødelighet) i løpet av eksponeringen (Figur 17). I surt Al-rikt vann (ustabil, rød) og i ubehandlet driftsvann (grønn) var det bare to dyr som døde (8 % dødelighet).

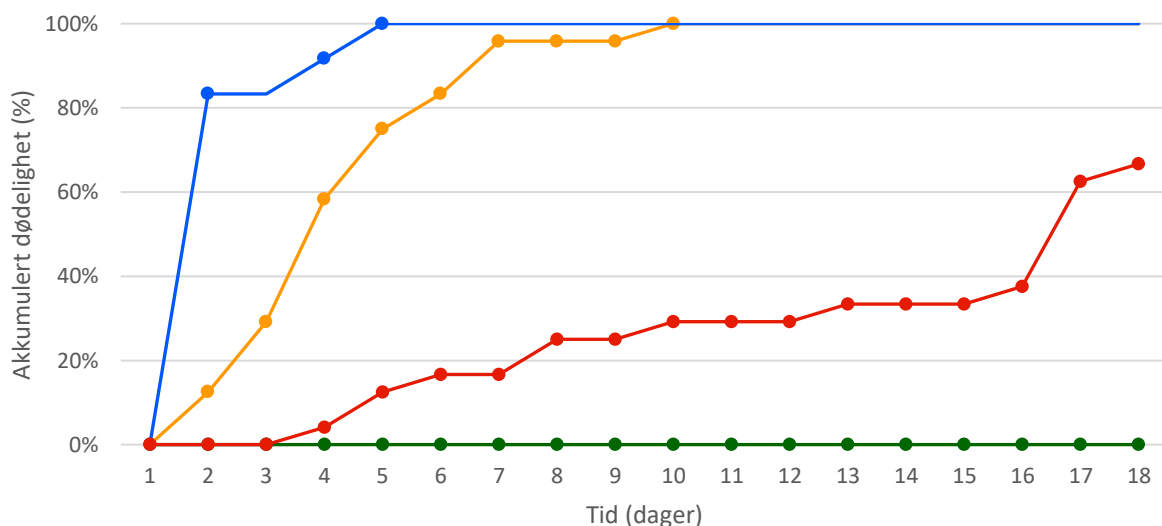
Marflo døde tilsynelatende litt raskere i surt Al-rikt vann (gul), 100 % dødelighet etter 9 dagers eksponering ( $LT_{50} = 6$  dager), sammenlignet med i surt Al-fattig vann (blå), 100 % etter 12 dager ( $LT_{50} = 6,5$  dager). Denne forskjellen var imidlertid ikke statistisk signifikant ( $p = 0,083$ , Tabell 4). Vi fant ingen statistisk signifikant forskjell i dødelighet av marflo mellom bakkene i hver enkelt av rennene i forsøk 1 (Tabell 5).

<b>Tabell 4.</b> Resultater fra parvis sammenligning av dødeligheten av marflo mellom de ulike vanntypene i forsøk 1, ved hjelp av en log-rank test.			
Behandling	Sur Al-rik ustabil	Sur Al-rik stabil	Sur Al-fattig
Sur Al-rik ustabil			
Sur Al-rik stabil	0,0001		
Sur Al-fattig	0,0001	0,083	
Driftsvann	0,96	0,0001	0,0001

**Tabell 5.** Resultater fra sammenligning av dødeligheten av marflo mellom bakkene i hver renne i forsøk 1, ved hjelp av en log-rank test.

Vanntype	p-verdi (log-rank)
Sur Al-rik ustabil	0,59
Sur Al-rik stabil	0,66
Sur Al-fattig	0,078
Driftsvann	0,12

## Forsøk 2



**Figur 18.** Akkumulert dødelighet i forsøk 2. Sur Al-rik ustabil (rød,  $n = 24$ ), sur Al-rik stabil (gul,  $n = 24$ ), sur Al-fattig (blå,  $n = 24$ ) og ubehandlet driftsvann (grønn,  $n = 24$ ).

I forsøk 2 observerte vi dødelighet av marflo i rennene med surt Al-rikt vann (rød og gul) og i renna med surt Al-fattig vann (blå), men ikke i renna med ubehandlet driftsvann (grønn). Det var en statistisk signifikant forskjell i dødelighet mellom de ulike vanntypene ( $p < 0,001$  (log-rank)). Også i dette forsøket var det bare i surt Al-rikt vann (stabil, gul) og i surt Al-fattig vann (blå) at alle dyrene døde (100 % dødelighet) i løpet av eksponeringen (Figur 18). I surt Al-rikt vann (ustabil, rød) var det 67 % dødelighet av marflo ved forsøkets slutt etter 18 dager.



**Tabell 6.** Resultater fra parvis sammenligning av dødeligheten av marflo mellom de ulike vanntypene i forsøk 2, ved hjelp av en log-rank test.

Behandling	Sur Al-rik ustabil	Sur Al-rik stabil	Sur Al-fattig
Sur Al-rik ustabil			
Sur Al-rik stabil	0,0001		
Sur Al-fattig	0,0001	0,0001	
Driftsvann	0,0001	0,0001	0,0001

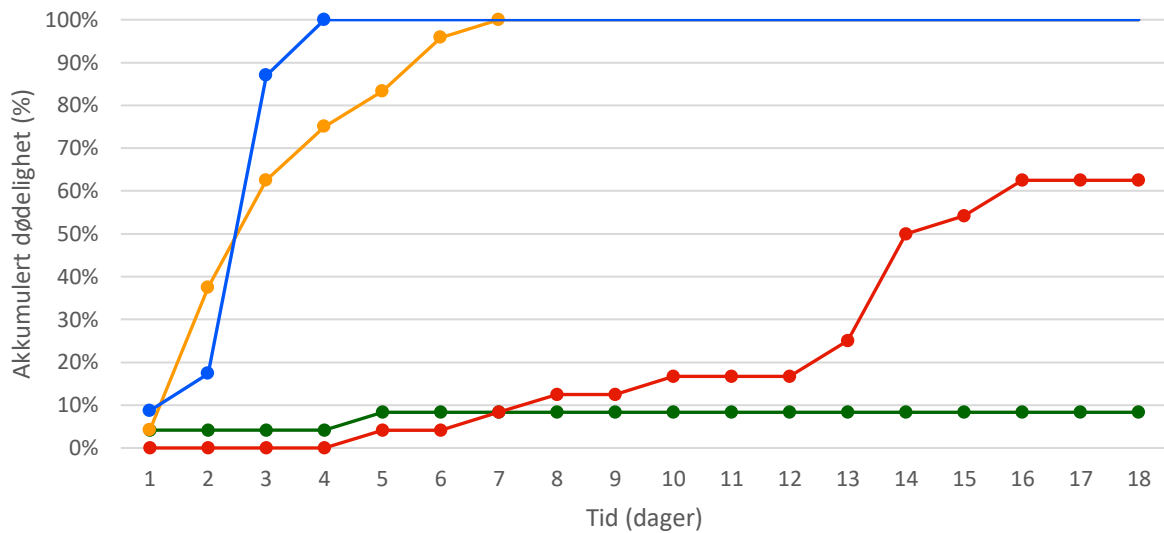
Marflo døde raskere i surt Al-fattig vann (blå), 100 % dødelighet etter 5 dagers eksponering ( $LT_{50} = 2$  dager), sammenlignet med i surt Al-rikt vann (gul), 100 % etter 10 dager ( $LT_{50} = 4$  dager), og denne forskjellen var statistisk signifikant ( $p < 0,0001$ , Tabell 6).  $LT_{50}$  i surt Al-rikt vann (rød) var 17 dager, og dødeligheten i denne vanntypen var statistisk signifikant forskjellig fra både surt Al-rikt vann (stabil, gul) og surt Al-fattig vann (blå) ( $p < 0,0001$ ), men ikke sammenlignet med ubehandlet driftsvann (grønn) ( $p = 0,15$ ).

Vi fant ingen statistisk signifikant forskjell i dødelighet av marflo mellom bakkene i hver enkelt av rennene i forsøk 2 (Tabell 7).

**Tabell 7.** Resultater fra sammenligning av dødeligheten av marflo mellom bakkene i hver renne i forsøk 2, ved hjelp av en log-rank test.

Behandling	p-verdi (log-rank)
Sur Al-rik ustabil	0,069
Sur Al-rik stabil	0,24
Sur Al-fattig	0,18
Driftsvann	1

### Forsøk 3



**Figur 19.** Akkumulert dødelighet i forsøk 3. Sur Al-rik ustabil (rød,  $n = 24$ ), sur Al-rik stabil (gul,  $n = 24$ ), sur Al-fattig (blå,  $n = 23$ ) og ubehandlet driftsvann (grønn,  $n = 24$ ).

I forsøk 3 observerte vi dødelighet av marflo i alle rennene, og det var en statistisk signifikant forskjell i dødelighet mellom de ulike vanntypene ( $p < 0,001$  (log-rank)). Det var imidlertid bare i surt Al-rikt vann (stabil, gul) og i surt Al-fattig vann (blå) at alle dyrene døde (100 % dødelighet) i løpet av eksponeringen (Figur 19). I surt Al-rikt vann (ustabil, rød) var det 63 % dødelighet av marflo ved forsøkets slutt etter 18 dager, mens det i ubehandlet driftsvann (grønn) bare var to dyr som døde (8 % dødelighet).

**Tabell 8.** Resultater fra parvis sammenligning av dødeligheten av marflo mellom de ulike vanntypene i forsøk 3, ved hjelp av en log-rank test.

Behandling	Sur Al-rik ustabil	Sur Al-rik stabil	Sur Al-fattig
Sur Al-rik ustabil			
Sur Al-rik stabil	0,0001		
Sur Al-fattig	0,0001	0,18	
Driftsvann	0,00023	0,0001	0,0001

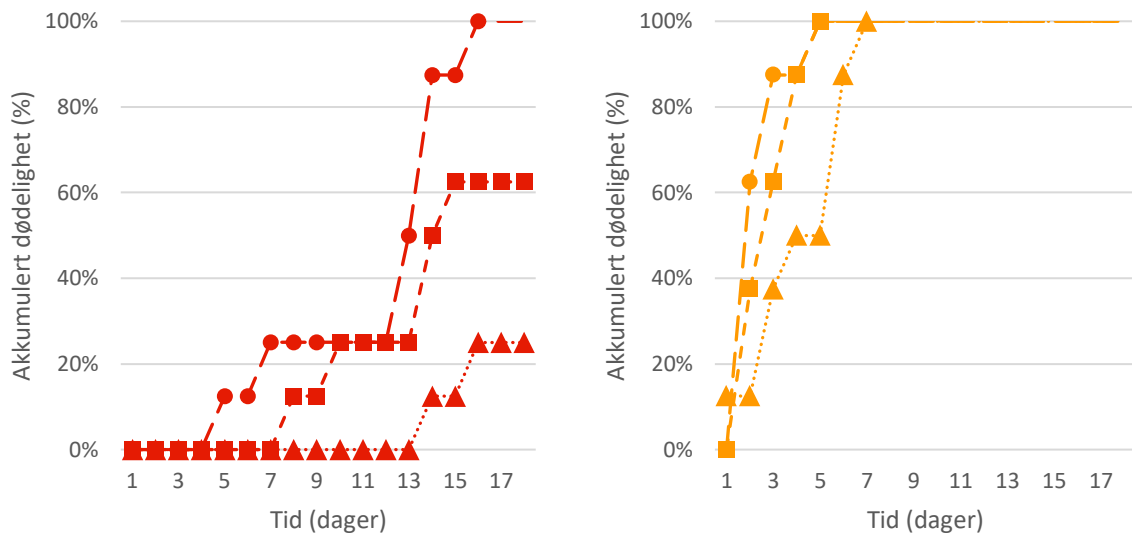
Marflo døde tilsynelatende litt raskere i surt Al-fattig vann (blå), 100 % dødelighet etter 4 dagers eksponering ( $LT_{50} = 3$  dager), sammenlignet med i surt Al-rikt vann (gul), 100 % etter 7 dager ( $LT_{50} = 3$  dager). Denne forskjellen var imidlertid ikke statistisk signifikant ( $p = 0,18$ ,

Tabell 8).  $LT_{50}$  i surt Al-rikt vann (rød) var 14 dager. Dødeligheten i denne vanntypen var statistisk signifikant forskjellig fra både surt Al-rikt vann (stabil, gul) og surt Al-fattig vann (blå) ( $p < 0,0001$ ), og sammenlignet med ubehandlet driftsvann (grønn) ( $p = 0,00023$ ).

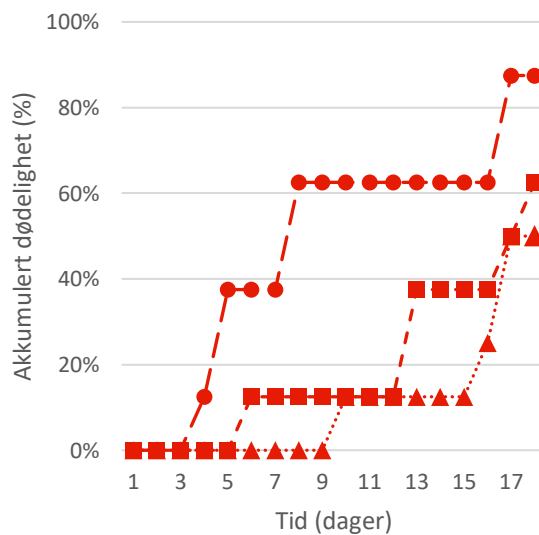
<b>Tabell 9. Resultater fra sammenligning av dødeligheten av marflo mellom bakkene i hver renne i forsøk 3, ved hjelp av en log-rank test. Signifikante verdier er uthevet.</b>	
<b>Behandling</b>	<b>p-verdi (log-rank)</b>
<b>Sur Al-rik ustabil</b>	<b>0,002</b>
<b>Sur Al-rik stabil</b>	<b>0,03</b>
<b>Sur Al-fattig</b>	0,34
<b>Driftsvann</b>	0,12

Vi fant en statistisk signifikant forskjell i dødelighet av marflo mellom bakkene i de to rennene (rød og gul) med surt Al-rikt vann (Tabell 9). I surt Al-rikt vann (ustabil, rød) var det høyest dødelighet i bakk 1 (100 %,  $LT_{50} = 13$  dager), og dødeligheten avtok gradvis gjennom renna (Figur 20). I bakk 2 var det 63 % dødelighet, og  $LT_{50}$  var 14 dager, mens det i bakk 3 var 25 % dødelighet ved forsøkets slutt etter 18 dager. I surt Al-rikt vann (stabil, gul) var det 100 % dødelighet i alle tre bakkene, men  $LT_{50}$  økte gradvis gjennom renna; 2 dager i bakk 1, 3 dager i bakk 2 og 5 i bakk 3 (Figur 20).

I forsøk 2 fant vi samme gradvise forløp i dødeligheten av marflo gjennom renna med surt Al-rikt vann (ustabil, rød) som i forsøk 3, men det var ikke statistisk signifikant forskjell mellom bakkene ( $p = 0,069$ , Tabell 7). Dødeligheten i bakk 1 var 88 % og  $LT_{50} = 7,5$ , i bakk 2 var dødeligheten 63 % og  $LT_{50} = 17$ , og i bakk 3 var dødeligheten 50 % og  $LT_{50} = 17$  (Figur 20).



**Figur 20.** Akkumulert dødelighet av marflo ( $n = 8$ ) i hver av bakkene i surt Al-rikt vann (ustabil, rød) og surt Al-rikt vann (stabil, gul) i forsøk 3. Bakk 1 (●), bakk 2 (■) og bakk 3 (▲).



**Figur 21.** Akkumulert dødelighet av marflo ( $n = 8$ ) i hver av bakkene i surt Al-rikt vann (ustabil) i forsøk 2. Bakk 1 (●), bakk 2 (■) og bakk 3 (▲).

## Diskusjon

Resultatene fra våre forsøk viser klart at marflo som eksponeres for surt vann dør av behandlingen. Videre tyder resultatene våre på at høye konsentrasjoner av aluminium i vannet i mindre grad påvirker dødeligheten. Når vi sammenligner effekten av aluminium under stabile og ustabile forhold finner vi klare forskjeller i hvordan aluminium virker på marflo, og resultatene våre tyder på at graden av Al-polymerisering har betydning for dødeligheten hos marflo i surt Al-rikt vann. Aluminium ser imidlertid ikke ut til å være hovedårsaken til at sur nedbør har en negativ effekt på marflo, men kan ha avgjørende betydning når vannet er moderat forsuret.

### Al-kjemi

Ala-konsentrasjonen i rød renne (ustabil) med surt Al-rikt vann utgjorde en mindre andel av den totale mengden aluminium i vannet (Alr-konsentrasjonen) sammenlignet med i gul renne (stabil). Dette tyder på at en større andel av aluminium i den røde renna forelå som store polymere former sammenlignet med i den gule renna, og kan forklares med at de ustabile kjemiske forholdene for aluminium ved pH 5,8 har ført til at enkle monomere Al-former løst i vannet har polymerisert i større grad enn ved pH 4,8. Videre var Alo-konsentrasjonen i rød renne (ustabil) betydelig høyere enn i gul renne (stabil), og følgelig var Ali-konsentrasjonen betydelig lavere i rød renne sammenlignet med gul renne. Dette underbygger at det foregikk mer polymerisering av aluminium i rød renne ved pH 5,8 enn i gul renne ved pH 4,8. Denne tolkningen støttes av flere tidligere forsøk hvor man har laget Al-rikt vann med ustabile forhold for Al-hydrolysen på tilsvarende måte som oss (Poléo et al., 1994; Poléo & Bjerkely, 2000; Poléo & Hytterød, 2003). Når de enkle monomere Al-formene ved pH 5,8 begynner å polymerisere vil det først dannes små polymere Al-former (dimerer, trimerer osv), som senere vokser og blir til store Al-polymerer (Lydersen et al., 1991). De små Al-polymerene er ekstraherbare i løpet av 20 sekunder, men passerer gjennom kationebytteren fordi deres netto ladning har begynt å nærme seg null. Disse vil da bli analysert som Alo, selv om de er uorganiske (Hem & Roberson, 1967; Lydersen et al., 1994).

Våre resultater tyder altså på at marflo ble eksponert for pågående Al-polymerisering i den røde renna med ustabil Al-kjemi. Vi kan ikke utelukke at det også foregikk noe polymerisering av aluminium i den gule renna med stabil Al-kjemi. Alo-konsentrasjonen i gul renne var om lag fire ganger høyere enn totalkonsentrasjonen av aluminium (Alr) i den sure kontrollen (blå

renne). Aluminium som settes til driftsvannet foreligger utelukkende som  $\text{Al}^{3+}$  før det settes til, fordi doseringsløsningen er sterkt sur ( $\text{pH} < 2,0$ ).  $\text{Al}_0$ -fraksjonen i gul renne må derfor stamme fra doseringsløsningen siden bakgrunnsverdiene, altså  $\text{Al}_r$  i blå og grønn renne, er mye lavere. På samme måte som i vannet fra rød renne vil de små  $\text{Al}$ -polymerene i vannet fra gul renne passere ionebytteren og bli analysert som  $\text{Al}_0$ . Likevel, og fordi  $\text{Al}_i$ -fraksjonen i den gule renna med stabil  $\text{Al}$ -kjemi var svært høy (mellom 528 og 877  $\mu\text{g/l}$ ), kan vi konkludere med at marflo i den gule renna har blitt eksponert for høye konsentrasjoner av monomert uorganisk aluminium, primært  $\text{Al}^{3+}$  i våre forsøk. Videre at marflo i den blå og den grønne renna ble eksponert for relativt lave konsentrasjoner av aluminium. Til dette kommer det faktum at  $\text{Al}_i$ -konsentrasjonen, som ofte regnes for den mest giftige fraksjonen, var under deteksjonsgrensen ( $< 13 \mu\text{g/l}$ ) (Vogt et al., 1994).

### Er aluminium giftig for marflo eksponert for surt aluminiumrikt vann?

Vi har ikke klart å finne noen andre studier som har undersøkt om surt  $\text{Al}$ -rikt vann har effekt på marflo. Våre resultater synes derfor å være den første dokumentasjonen på at aluminium har liten eller ingen betydning for giftigheten av surt vann på marflo ved  $\text{pH} 4,8$ . I to av forsøkene (2 og 3) døde marflo raskere i det sure  $\text{Al}$ -fattige vannet (blå renne) enn i det sure  $\text{Al}$ -rike vannet (gul renne). I forsøk 1 var det omvendt. Forskjellene var imidlertid svært små, og bare i forsøk 2 var det signifikant raskere dødelighet i den blå renna sammenlignet med den gule. Vi har derfor ingen holdepunkter for at høye konsentrasjoner av aluminium bidrar til økt giftighet av vannet ved  $\text{pH} 4,8$ . Derimot kan vi ikke utelukke at aluminium hadde en svak dempende effekt på dødeligheten, men den er så liten at vi velger å ikke legge vekt på det.

Tidligere studier med fisk har vist at aluminium er mer giftig ved  $\text{pH}$  rundt 5,8 enn ved rundt  $\text{pH} 4,8$  (Muniz & Leivestad, 1980; Poléo et al., 1994). Vi fant ingen holdepunkter for at det er slik hos marflo. Tvert imot, i våre forsøk var som nevnt vannet med  $\text{pH} 4,8$ , uavhengig av om det inneholdt aluminium eller ikke, mer giftig for marflo enn det  $\text{Al}$ -rike vannet ved  $\text{pH} 5,8$ . Vi har imidlertid ikke eksponert marflo for  $\text{Al}$ -fattig vann ved  $\text{pH} 5,8$  i våre forsøk, og kan derfor ikke avgjøre i hvilken grad giftigheten av det sure  $\text{Al}$ -rike vannet ved  $\text{pH} 5,8$  skyldtes den høye  $\text{Al}$ -konsentrasjonen eller redusert  $\text{pH}$ . Poléo et al. (1997) viste at surt  $\text{Al}$ -rikt vann ved  $\text{pH}$  mellom 5,0 og 5,3 var svært giftig for sju ulike arter ferskvannsfisk, mens  $\text{Al}$ -fattig vann ved samme  $\text{pH}$  var betydelig mindre giftig for mort (*Rutilus rutilus*) og ørekyte (*Phoxinus phoxinus*) og hadde ingen effekt på de øvrige fem artene. Som vi har vært inne på allerede, er det imidlertid

mye som tyder på at den kunnskapen vi har om effekten av surt Al-rikt vann på fisk ikke kan overføres til marflo.

Selv om vi ikke har funnet studier i litteraturen som omhandler effekten av surt Al-rikt vann på marflo, så finnes det mange studier som omhandler effekter av surt Al-rikt vann på en rekke andre evertebrater (for eksempel: Berrill et al., 1985, Havas & Likens, 1985, Burton & Allan, 1986, Herrmann & Andersson, 1986, Ormerod et al., 1987, Mackie, 1989, McCahon & Poulton, 1991, Storey et al., 1992, Havas & Rosseland, 1995, Gensemer & Playle, 1999). Problemet med flere av disse er at de omhandler feltundersøkelser, og derfor i liten grad kan svare på om det er aluminium eller lav pH som er årsaken til de effektene som rapporteres. Burton & Allan (1986) viste imidlertid ved hjelp av eksperimenter at en reduksjon i pH fra mellom 6,8 og 7,2 til 4,0 førte til om lag 50 % dødelighet hos fire ulike arter evertebrater i løpet av 28 dagers eksponering. I likhet med våre resultater førte altså lav pH til dødelighet, men dødeligheten var betydelig lavere hos de fire artene som ble testet enn hos marflo i våre forsøk (100 %), til tross for at pH var enda lavere og eksponeringstiden 10 dager lenger. Videre fant de at dødeligheten økte til rundt 80 % for tre av artene når vannet i tillegg ble tilsatt 500 µg Al/l. En av disse artene var isopoden *Asellus intermedius*. Dette samsvarer ikke med våre resultater, hvor dødeligheten var lik ved pH 4,8 enten aluminium ble tilsatt eller ikke. Dette til tross for at vi satte til dobbelt så mye aluminium (1000 µg/l) som i eksperimentet til Burton & Allan (1986). Dette gir oss gode holdepunkter for å hevde at marflo er svært sensitiv for lav pH sammenlignet med andre evertebrater, og at aluminium i vannet har liten betydning for giftigheten ved pH 4,8. Denne høye sensitiviteten understøttes ytterligere av et annet eksperiment Burton & Allan (1986) gjorde, hvor de reduserte pH til 5,0 og satte til 250 µg Al/l. Denne eksponeringen hadde ingen effekt på de fire artene som ble testet. I vårt studium var pH bare litt lavere (4,8), men førte til 100% dødelighet i alle forsøkene.

Vi har holdepunkter for at marflo ikke bare er svært sensitiv for surt vann sammenlignet med andre evertebrater generelt, men også sammenlignet med andre krepsdyr spesielt. Burton og Allan (1986) har, som allerede nevnt, vist at isopoden *Asellus intermedius* er betydelig mer tolerant for lav pH i sine forsøk enn marflo i våre forsøk. Storey et al. (1992) studerte marflo sin nære slektning, amfipoden *Gammarus pulex*, og fant at den også er betydelig mer tolerant for surt vann enn marflo. De fant ingen dødelighet av *G. pulex* i løpet av 7 dagers eksponering til ulike kombinasjoner av pH (4,5 – 6,9) og aluminium (0 – 1000 µg/l). Våre forsøk varte i 18 dager, men i de to vanntypene med pH 4,8 (gul og blå renne) lå dødeligheten til marflo mellom 63 og 100 % etter 7 dagers eksponering. Dessuten observerte vi begynnende dødelighet av

marflo etter 7 dager ved pH 5,8 i våre forsøk. Som nevnt kan vi ikke si noe om i hvilken grad dødeligheten til marflo i det sure Al-rike vannet ved pH 5,8 (rød renne) skyldes pH eller 1000 µg Al/l. Til sammenligning var det ingen dødelighet i eksponeringene til Storey et al. (1992) når de eksponerte *G. pulex* til 1000 µg Al/l ved henholdsvis pH 4,5, pH 5,0 og pH 5,5.

I forsøkene til Storey et al. (1992) observerte de omsider dødelighet av *G. pulex* når pH ble senket til 4,0; mellom 70 og 100 % i løpet av 7 dager. De fant også at aluminium i det sure vannet økte dødeligheten noe. Uten Al-tilsetning ga 70 % dødelighet ved pH 4,0, mens henholdsvis 10, 100 og 1000 µg Al/l ga mellom 90 og 100 % dødelighet (Storey et al., 1992). Det er viktig å huske at pH er en logaritmisk skala, og at pH 4,0 derfor er nesten 10 ganger surere enn pH 4,8. Dette indikerer at marflo er betydelig mer sensitiv for surt vann enn andre krepsdyr, inkludert amfipoder. Det faktum at aluminium i det sure vannet førte til økt dødelighet av *G. pulex* ved pH 4,0, er ikke helt i overensstemmelse med våre resultater som ikke ga noen forskjell i dødelighet ved pH 4,8 mellom surt Al-rikt vann (gul) og surt Al-fattig vann (blå).

Resultatene fra litteraturen spriker imidlertid en del. Mens Storey et al. (1992) ikke fant noen effekt i løpet av 7 dager hos *G. pulex* eksponert for surt Al-rikt vann før pH var så lav som 4,0, fant McCahon & Poulton (1991) mellom 70 og 90 % dødelighet etter 6 dager hos arten når den ble eksponert for surt Al-rikt vann hvor pH var senket fra 7,2 til om lag 5,0, og tilsatt mellom 570 og 940 µg Al/l. Dette samsvarer ganske godt med hva vi har funnet for marflo i de to sureste vanntypene i våre forsøk. Videre fant Ormerod et al. (1987) at *G. pulex* eksponert for surt Al-rikt vann ved pH 5,0 og 400 µg Al/l, viste 20% dødelighet etter de 3 dagene eksponeringen foregikk. De observerte også at Al-fattig vann ved pH 4,5 hadde nøyaktig samme effekt. Dette er omtrent samme dødelighet vi observerte hos marflo i surt Al-fattig vann i forsøk 1, men betydelig lavere enn i forsk 2 og 3, hvor dødeligheten av marflo etter 3 dager var henholdsvis 83 og 87 %.

Det har blitt foreslått at aluminium kan ha en bedrende effekt på skader hos evertebrater som eksponeres for surt vann, ved at levetiden øker hos dyr eksponert for vann med lav pH og aluminium, sammenlignet med dyr eksponert for vann med kun lav pH (Havas & Likens, 1985; Havens, 1993). Våre resultater gir rom for å spekulere på om det kan være slik for marflo også. I forsøk 1 var det en ikke-signifikant raskere dødelighet i surt Al-rikt vann ved pH 4,8 (gul renne) enn i surt Al-fattig vann pH 4,8 (blå renne). I forsøk 2 var det imidlertid en signifikant raskere dødelighet i det sure Al-fattige vannet (blå) enn i det sure Al-rike vannet (gul). I forsøk 3 var det også raskere dødelighet i blå renne enn i gul renne, men denne gangen var forskjellen



ikke signifikant. Siden disse forskjellene i to av tre tilfeller ikke var statistisk signifikant, har vi for lite data til å konkludere med at aluminium har en beskyttende effekt på marflo ved pH 4,8.

Samlet sett tyder våre og andres resultater på at marflo er mer sensitiv for surt vann enn andre evertebrater, inkludert andre ferskvanns-krepsdyr. Ifølge Økland & Økland (1985) er ikke marflo å finne i innsjøer med pH lavere enn 6,0. I enkelte studier viser evertebrater en økt dødelighet dersom det er forhøyede konsentrasjoner av aluminium i det sure vannet, mens det i andre studier, inkludert vårt, ikke er noen entydig forskjell i dødelighet mellom surt Al-rikt vann og surt Al-fattig vann ved samme pH. Dette gjelder først og fremst når pH er under 5,0.

Er en eventuell giftighet av aluminium knyttet til graden av Al-polymerisering, likt det vi finner hos fisk?

Så langt har vi konkludert med at aluminium i liten eller ingen grad har noen betydning for dødeligheten hos marflo i surt Al-rikt vann. Dette er basert på resultatene våre som viser at det å sette til 1000 µg Al/l til vannet ikke har noen signifikant påvirkning av dødeligheten til marflo i surt vann ved pH 4,8. Siden vi ikke eksponerte marflo for surt Al-fattig vann ved pH 5,8, kan vi heller ikke si noe om en eventuell giftighet av aluminium i det sure Al-rike vannet ved pH 5,8 (rød renne), og langt mindre svare på om denne giftigheten er knyttet til graden av Al-polymerisering. Men dersom vi snur litt på spørsmålet, og spør om graden av Al-polymerisering kan knyttes til en eventuell giftighet av aluminium, blir det mulig å gi noen svar.

Al-analysene våre viser, som allerede nevnt, at marflo i det sure Al-rike vannet ved pH 5,8 (rød renne) ble eksponert for pågående Al-polymerisering. De viser også at det i begrenset omfang kan foregå noe Al-polymerisering også i det sure Al-rike vannet ved pH 4,8 (gul renne). I forsøk 1 observerte vi ingen dødelighet av marflo i den røde renna, men i både forsøk 2 og 3 viste våre resultater at dødeligheten var høyest i bakk 1, og avtok gradvis gjennom den røde renna. Disse resultatene samsvarer godt med tidligere studier hvor fisk har blitt eksponert for pågående Al-polymerisering (Poléo et al., 1994; Poléo & Bjerkely, 2000; Poléo & Hytterød, 2003). I alle disse studiene avtok dødeligheten, så vel som anatomiske og fysiologiske skader hos overlevende fisk, med vannets oppholdstid gjennom rennene. Dette forklares med at Al-polymerene vokser etter hvert som vannet renner gjennom rennene. Når Al-polymerene vokser går deres netto ladning mot null (Hem & Roberson, 1967), og deres evne til å binde seg til biologiske overflater avtar (Poléo, 1995). I forsøk 3 fant vi avtagende dødelighetsrate hos marflo gjennom den gule renna, og dette kan skyldes at noe aluminium polymeriserer også

under mer stabile kjemiske forhold, slik den økte Al<sub>0</sub>-fraksjonen i det sure Al-rike vannet ved pH 4,8 indikerer. Denne observasjonen kan bety at aluminium kan ha en effekt på dødeligheten også ved pH 4,8, men at denne maskeres av effekten av det sure vannet i seg selv, og derfor ikke blir mer synlig i våre resultater.

Det faktum at dødeligheten av marflo kan knyttes til graden av pågående Al-polymerisering, bekrefter at aluminium likevel har betydning for giftigheten av surt Al-rikt vann, selv om det ikke, eller i liten grad, har det når pH er så lav som 4,8. På bakgrunn av våre resultater er det rimelig å foreslå at Al<sup>3+</sup>-ioner, som er den dominerende Al-formen ved pH 4,8 (Lydersen, 1990), i liten grad klarer å konkurrere med H<sup>+</sup>-ionene om negative bindingssteder på for eksempel gjellene til marflo. Dermed fører ikke 1000 µg Al/l i vannet til opptak av aluminium, eller til binding og akkumulering på dyrets gjelleoverflate, og heller ingen endret effekt enn det lav pH i seg selv har. Videre foreslår vi at ved pH 5,8, hvor Al-kjemien er betydelig mer ustabil og det er gode forhold for Al-polymerisering (Lydersen, 1990), vil aluminium bindes og akkumuleres på gjelleoverflaten til marflo. Vi tror dette kan skje fordi de ulike positivt ladde (kationiske) monomere Al-ionene (hovedsakelig Al-hydroksider) lettere konkurrerer om bindingssetene når H<sup>+</sup>-konsentrasjonen ved pH 5,8 bare er 10% av det den er ved pH 4,8. Lavere dødelighet i surt Al-rikt vann ved pH 5,8 (rød) enn ved pH 4,8 (gul) kan simpelt hen skyldes det samme – at H<sup>+</sup>-konsentrasjonen er betydelig lavere.

Fjeld et al. (1988) observerte omfattende akkumulering av aluminium og skader på gjellene til edelkreps (*Astacus astacus*) når surt Al-rikt vann ble nøytralisert ved tilsetning av kalk-slurry. De hadde imidlertid ingen god forklaring på hvorfor giftigheten økte når pH økte – stikk i strid med konseptet sur nedbør! Vannet holdt opprinnelig pH 5,2 og 280 µg Al/l (Al<sub>r</sub>), hvorav 130 µg/l var labilt aluminium (tilsvarende Al<sub>i</sub>) og 150 µg/l var ikke-labilt aluminium (tilsvarende Al<sub>r</sub> ÷ Al<sub>i</sub>, altså Al<sub>0</sub> + polymerer). Etter kalktilsetning hadde pH økt til 6,6, og Al<sub>r</sub>-konsentrasjonen sunket til 250 µg/l. Den største forandringen var imidlertid i mengden labilt aluminium som hadde sunket til 20 µg/l og ikke-labilt aluminium som hadde steget til 230 µg/l. Dette stemmer godt med våre resultater som viser at det samme skjer i det sure Al-rike vannet ved pH 5,8 (rød), sammenlignet med det sure Al-rike vannet ved pH 4,8 (gul). Vi tror at monomert aluminium, hovedsakelig Al<sup>3+</sup>, begynte å polymerisere når pH økte ved tilsetning av kalk, og dermed forskjøv Al-hydrolysen mot høyre (se Figur 2). Når Al-hydroksider dominerer i løsningen vil, som vi har vært inne på flere ganger, aluminium begynne å polymerisere – og dermed akkumulere på krepsens gjeller nettopp slik Fjeld et al. (1988) observerte. Våre resultater er derfor den første dokumentasjonen etter Fjeld et al. (1988) på at graden av Al-

polymerisering har betydning for giftigheten av surt Al-rikt vann på andre organismer enn fisk, vertfall ved pH 5,8.

Er aluminium hovedårsaken til at sur nedbør har negativ effekt på marflo?

En gjennomgang av litteraturen viser at det finnes mange studier som omhandler effekter av sur nedbør på ulike arter evertebrater (Økland, 1969; Borgstrøm & Hendrey, 1976; Burton & Allan, 1986; Herrmann & Andersson, 1986; Økland & Økland, 1986; Hall et al., 1987; Ormerod et al., 1987; Mackie, 1989; Mc Cahon & Pascoe, 1989; Havens, 1993). Som vi har sett er det stor variasjon i hvilken effekt aluminium har når vi sammenligner disse studiene, og mange av dem skiller ikke mellom effekten av aluminium og av pH.

Våre resultater tyder på at aluminium har en viktig rolle når det gjelder effekten av sur nedbør på evertebrater generelt, og marflo spesielt. Videre tyder våre resultater på at aluminium er noe mindre avgjørende for giftigheten av forsurede vann og vassdrag for evertebrater sammenlignet med fisk. Det er imidlertid sjelden at forsurede vann og vassdrag i Norge blir så sure som pH 4,8. Det normale er at pH synker til mellom 5,6 og 5,8, men at konsentrasjonen av aluminium øker betydelig, ofte til mellom 200 og 400 µg/l. Vi tror derfor det fortsatt kan være slik at aluminium kan være hovedårsaken til at enkelte arter evertebrater forsvinner fra forsurede lokaliteter, spesielt i den innledende fasen av forsuringen og i lokaliteter hvor det blir moderat surt.

Siden 1980-tallet har den sure nedbøren over landet vårt blitt redusert betydelig, takket være internasjonale avtaler om utslippsreduksjoner av svovel- og nitrogenforbindelser til atmosfæren. Restitueringen av vannkvaliteten i tidligere forsurede vann og vassdrag har allerede kommet langt (Skjelkvåle et al., 1998; 2007; Wright, 2008; Garmo et al., 2014). Det viser seg imidlertid at den biologiske restitueringen av økosystemene i disse lokalitetene går langsommere enn restitueringen av vannkvaliteten (Hesthagen et al., 2011; Enge et al., 2016; 2016). Årsaken til denne «mismatchen» mellom kjemisk og biologisk restituering synes å være at bufferevnen til nedbørfeltene fortsatt er lav, og at det har skjedd et skifte mellom kronisk forsuring til episodisk forsuring (Wright, 2008). Nedbørfeltet lekker altså ikke konstant aluminium slik som før, men økte Al-konsentrasjoner opptrer sporadisk i forbindelse med kraftig regn og storm (Laudon & Bishop, 1999; Serrano et al., 2008; Enge et al., 2016). Fordi pH i vannene øker, vil surheten få gradvis mindre betydning for evertebrater generelt og marflo spesielt. Økningen i vannets pH kan også bety at svært surt Al-holdig jordvann som lekker ut i

vann og vassdrag under sure episoder, i større grad enn tidligere kan begynne å polymerisere. Dermed kan aluminium få større betydning for effekten av sur nedbør ettersom restitueringen fortsetter. I et klimaperspektiv, med økende hyppighet av stormer og ekstremvær på grunn av global oppvarming, kan vi også se for oss at betydningen av aluminium kan øke når det gjelder effekter på marflo.

## Konklusjon

Våre eksperimenter med Al-eksponering av marflo, bidrar til å avklare om det er aluminium generelt, og graden av Al-polymerisering spesielt, eller effekten av  $H^+$ -ioner som har størst betydning for den negative effekten av sur nedbør på marflo. Våre resultater viser at ved pH 4,8 er det  $H^+$ -konsentrasjonen i vannet som først og fremst har effekt på marflo. Vi finner ingen holdepunkter for at aluminium er mer giftig for marflo ved pH rundt 5,8 enn ved pH rundt 4,8, slik det er vist å være for fisk. Våre resultater viser at Al-polymerisering har stor betydning for effekten av surt Al-rikt vann på marflo ved pH 5,8, og at effekten er sammenlignbar med det som tidligere er vist for fisk. Det gjenstår å svare på om surt Al-fattig vann ved pH 5,8 er giftig for marflo.

Aluminium synes å ha en viktig rolle når det gjelder effekten av sur nedbør på evertebrater generelt, og marflo spesielt. Våre resultater foreslår at aluminium har noe mindre betydning for effekten av sur nedbør for evertebrater sammenlignet med fisk, men at dette kan endre seg med varmere klima og hyppigere forekomst av ekstremvær.

## Referanser

- Barnes, R. B. (1975). The determination of specific forms of aluminum in natural water. *Chemical Geology*, 15, 177-191.
- Berrill, M., Hollett, L., Margosian, A., & Hudson, J. (1985). Variation in tolerance to low environmental pH by the crayfish *Orconectes rusticus*, *O. propinquus*, and *Cambarus robustus*. *Can. J. Zool*, 63, 2586-2589.
- Bloom, P. R., McBride, M. B., & Weaver, R. M. (1979). Aluminium organic matter in acid soils: Buffering and solution aluminium activity. *Soil Science Society of America Journal*, 43, 488-493.
- Borgstrøm, R., & Hendrey, G. R. (1976). *pH Tolerance of the first Larval Stages of Lepidurus Arcticus (Pallas) and Adult Gammarus Lacustris G. O. Sars*. Retrieved from Reidar Borgstrøm
- Brehm, J., & Meijering, M. P. D. (1982). Zur Säureempfindlichkeit ausgewählter, Süßwasserkrebse (*Daphnia* und *Gammarus lacustris*). 17-27.
- Burton, T. M., & Allan, J. W. (1986). Influence of pH, aluminum, and organic matter on stream invertebrates. *Can. J. Fish. Aquat. Sci*, 43, 1285-1289.
- Cronan, C. S., & Schofield, C. L. (1979). Aluminium leaching response to acid precipitation: Effects on high-elevation watersheds in the Northeast. *Science*, 204, 304-306.
- Dahl, K. (1921). Undersøkelser av ørretens utdøen i det sydvestlige Norges fjeldvand. *Norsk Jeger- og Fiskeforenings Tidsskrift*, 49, 249-267.
- Dahl, K. (1926). Vandets surhetsgrad og dens virkninger paa ørretynge. *Tidsskrift for Det Norske Landbruk*, 7, 232-242.
- Dannevig, A. (1959). Nedbørens innflytelse på vassdragenes surhet, og på fiskebestanden. *Jeger og Fisker*, 88(3), 116-118.
- Degerman, E., Engblom, E., Lingdell, P.-E., Melin, E., & Olofsson, E. (1992). *Försuring i fjällen* (Vol. 1). Drottningholm: Fiskeriverket
- Dickinson, W. (1977). Aquatic Aluminium: Chemistry, Toxicology, and Environmental Prevalence. *CRC Critical Reviews in Environmental Control*, 167-216.
- Dickinson, W. (1978). Some effects of the acidification of Swedish Lakes. *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen*, 20(2), 851-856.  
doi:10.1080/03680770.1977.11896609
- Driscoll, C. T. (1984). A procedure for the fractionation of aqueous aluminum in dilute acidic waters. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 16, 267-283.
- Driscoll, C. T., Baker, J. P., Bisogni, J. J., & Schofield, C. L. (1980). Effect of aluminum speciation on fish in dilute acidified waters. *Nature*, 284, 161-164.
- Enge, E., Auestad, B. H., & Hesthagen, T. (2016). Temporary increase in sea salt deposition accelerates recovery of brown trout (*Salmo trutta*) populations in very dilute and acidified mountain lakes. *Water Air and Soil Pollution*, 227. doi:10.1007/s11270-016-2889-9
- Fjeld, E., Hessen, D. O., Roos, N., & Taugbøl, T. (1988). Changes in gill ultrastructure and haemolymph chloride concentrations in the crayfish, *Astacus astacus*, exposed to de-acidified aluminium-rich water. *Aquaculture*, 72, 139-150.
- Fjellheim, A., & Raddum, G. (1990). Acid precipitation: Biological monitoring of streams and lakes. *The Science of the Total Environment*, 96, 57-66.
- Friberg, F., Otto, C., & Svensson, B. S. (1980). Effects of acidification on the dynamics of allochthonous leaf material and benthic invertebrate communities in running waters. *Ecological Impact of Acid Precipitation*, 304-305.
- Garmo, O. A., Skjelkvale, B. L., de Wit, H. A., Colombo, L., Curtis, C., Folster, J., . . . Worsztynowicz, A. (2014). Trends in Surface Water Chemistry in Acidified Areas in Europe and North America from 1990 to 2008. *Water Air and Soil Pollution*, 225(3), 14. doi:10.1007/s11270-014-1880-6
- Gensemer, R. W., & Playle, R. C. (1999). The bioavailability and toxicity of aluminum in aquatic environments. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 29(4), 315-450.  
doi:10.1080/10643389991259245

- Gorham, E. (1958). The influence and importance of daily weather conditions in the supply of chloride, sulphate and other ions to fresh waters from atmospheric precipitation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 241(679), 147-178.
- Hall, R. J., Driscoll, C. T., & Likens, G. E. (1987). Importance of hydrogen ions and aluminium in regulating the structure and function of stream ecosystems: an experimental test. *Freshwater Biology*, 18, 17-43.
- Halvorsen, G. (2004). *Planktoniske og litorale krepsdyr i Store og Lille Hovvatn* (Vol. 1). Trondheim: Direktoratet for naturforvaltning.
- Havas, M., & Likens, G. E. (1985). Toxicity of aluminum and hydrogen ions to *Daphnia catawba*, *Holopedium gibberum*, *Chaoborus punctipennis*, and *Chironomus anthrocinus* from Mirror Lake. *Can. J. Zool*, 63, 1114-1119.
- Havas, M., & Rosseland, B. O. (1995). Response of zooplankton, benthos, and fish to acidification: An overview. *Water Air and Soil Pollution*, 85, 51-62.
- Havens, K. E. (1993). Acid aluminium effects on osmoregulation and survival of the freshwater copepod *Skistodiaptomus oregonensis*. *Journal of Plankton Research*, 15(6), 683-691.
- Hem, J. D., & Roberson, C. E. (1967). *Form and stability of aluminium hydroxide complexes in dilute solution*. Retrieved from <https://pubs.usgs.gov/wsp/1827a/report.pdf>
- Herrmann, J. (1993). Acid-stress Effects on Stream Biology. *AMBIO*, 22, 298-307.
- Herrmann, J., & Andersson, K. G. (1986). Aluminium impact on respiration of lotic mayflies at low pH. *Water Air and Soil Pollution*, 30, 703-709.
- Hesthagen, T., Fiske, P., & Saksgård, R. (2016). Recovery of young brown trout (*Salmo trutta*) in acidified streams: what are the critical values for acid-neutralizing capacity? *Atmospheric Environment*, 146, 226-244. doi:10.1016/j.atmosenv.2016.07.010
- Hesthagen, T., Fjellheim, A., Schartau, A. K., Wright, R. F., Saksgård, R., & Rosseland, B. O. (2011). Chemical and Biological Recovery of Lake Saudlandsvatn, a Formerly Highly Acidified Lake in Southernmost Norway, in Response to Decreased Acid Deposition *Sci. Total Environ*, 409(15), 2908-2916. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.04.026
- Howells, G., Dalziel, T. R. K., Reader, J. P., & Solbe, J. F. (1990). Eifac Water Quality Criteria for European Freshwater Fish: Report On Aluminium. *Chemistry and Ecology*, 4, 117-173.
- Howells, G., Dalziel, T. R. K., Reader, J. P., & Solbe, J. F. (1994). Aluminium and freshwater fish water and quality criteria. *Water Quality for Fresh Water Fish. Gordon and Breach, Amsterdam*, 55-115.
- Huitfeldt-Kaas, H. (1922). Om aarsaken til massedød av laks og ørret i Frafjordelven, Helleelven og Dirdalselven i Ryfylke høsten 1920. *Norges Jeger- og Fiskeforening*(51), 37-44.
- Hågvar, E. B. (2014). *Det zoologiske mangfoldet* (Vol. 3). Oslo: Universitetsforlaget.
- Kaplan, E. L., & Meier, P. (1958). Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American Statistical Association*, 53(282), 457-481.
- Kassambara, A., Kosinski, M., Biecek, P., & Scheipl, F. (2019). Drawing Survival Curves using 'ggplot2' (Version 0.4.6). Retrieved from <http://www.sthda.com/english/rpkgs/survminer/>
- Kleinbaum, D. G., & Klein, M. (2012). *Survival Analysis: A Self-Learning Text* (3 ed.). New York: Springer-Verlag.
- Laudon, H., & Bishop, K. H. (1999). Quantifying sources of ANC depression during spring flood episodes in Northern Sweden. *Environmental Pollution*, 105, 427-455.
- Lawrence, G. B., David, M. B., Lovett, G. M., Murdoch, P. S., Burns, D. A., Baldigo, B. P., . . . Stoddard, J. L. (1999). Soil calcium status and the response of stream chemistry to changing acidic deposition rates in the Catskill Mountains of New York. *Ecological Applications*, 9, 1059-1072.
- Likens, G., Wright, R., Galloway, J., & Butler, T. (1979). Acid Rain. *Scientific American*, 241(4), 43-51.
- Lydersen, E. (1990). The solubility and hydrolysis of aqueous aluminium hydroxides in dilute fresh waters at different temperatures. *Nordic Hydrology* 21, 195-204.
- Lydersen, E., Poléo, A. B. S., & Muniz, I. P. (1991). Formation and dissolution kinetics of Al(OH)<sub>3</sub>(s) in synthetic freshwater solutions. *Water Resour. Res*, 27, 351-357.

- Lydersen, E., Poléo, A. B. S., Nandrup Pettersen, M., Riise, G., Salbu, B., Kroglund, F., & Rosseland, B. O. (1994). The importance of "in situ" measurements to relate toxicity and chemistry in dynamic aluminium freshwater systems. *Journal of Ecological Chemistry* 3, 357-365.
- Lydersen, E., Salbu, B., Poléo, A. B. S., & Muniz, I. P. (1990). The influences of temperature on aqueous aluminium chemistry. *Water Air and Soil Pollution* 51, 203-215.
- Mackereth, J. (1957). Chemical Analysis in Ecology Illustrated from Lake District Tarns and Lakes.
- Mackie, G. L. (1989). Tolerances of five benthic invertebrates to hydrogen ions and metals (Cd, Pb, Al). *Arch Environ Contam Toxicol*, 18, 215-223.
- McCahon, C. P., & Pascoe, D. (1989). Short-term experimental acidification of a Welsh stream: Toxicity of different forms of aluminium at low pH to fish and invertebrates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 18, 233-242.
- McCahon, C. P., & Poulton, M. J. (1991). Lethal and sub-lethal effects of acid, aluminium and lime on *Gammarus pulex* during repeated simulated episodes in a Welsh stream. *Freshwater Biology*, 25, 169-178.
- Meijering, M. P. D. (1984). Die verbreitung von indikatorarten der Gattung *Gammarus* im Schlitzlerland (Osthessen) in 1968 und 1982. 96-105.
- Muniz, I. P. (1984). The effects of acidification on Scandinavian freshwater fish fauna. *Phil Trans Royal Soc London*, 305, 517-528.
- Muniz, I. P., & Leivestad, H. (1980). Acidification effects on freshwater fish. In Drabløs D, Tollan A, eds, Ecological impact of acid precipitation. *SNSF project*, 84-92.
- Neville, C. M. (1985). Physiological Response of Juvenile Rainbow Trout, (*Salmo gairdneri*), to Acid and Aluminum - Prediction of Field Responses from Laboratory Data. *Can. J. Fish. Aquat. Sci*, 42, 2004-2019.
- Ormerod, S. J., Boole, P., McCahon, C. P., Weatherley, N. S., Pascoe, D., & Edwards, R. W. (1987). Short-term experimental acidification of a Welsh stream: comparing the biological effects of hydrogen ions and aluminium. *Freshwater Biology*, 17, 341-356.
- Otto, C., & Svensson, B. S. (1983). Properties of acid brown water streams in South Sweden. *Arch. Hydrobiol*, 99, 15-36.
- Poléo, A. B. S. (1992). Fisk i surt vann. In (pp. 391-400).
- Poléo, A. B. S. (1995). Aluminium Polymerization - A Mechanism of Acute Toxicity of Aqueous Aluminium To Fish. *Aquatic Toxicology*, 31(4), 347-356. doi:10.1016/0166-445x(94)00083-3
- Poléo, A. B. S., & Bjerkely, F. (2000). Effect of unstable aluminium chemistry on Arctic char (*Salvelinus alpinus*). 57, 1423-1433. doi:10.1139/cjfas-57-7-1423
- Poléo, A. B. S., & Hytterød, S. (2003). The effect of aluminium in Atlantic salmon (*Salmo salar*) with special emphasis on alkaline water. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 97(1), 89-96. doi:10.1016/s0162-0134(03)00261-7
- Poléo, A. B. S., Lydersen, E., Rosseland, B. O., Kroglund, F., Salbu, B., Vogt, R. D., & Kvellestad, A. (1994). Increased mortality of fish due to changing Al-chemistry of mixing zones between limed streams and acid tributaries. *Water Air and Soil Pollution*, 74, 339 - 351.
- Poléo, A. B. S., Ostbye, K., Oxnevad, S. A., Andersen, R. A., Heibo, E., & Vollestad, L. A. (1997). Toxicity of acid aluminium-rich water to seven freshwater fish species: A comparative laboratory study. *Environmental Pollution*, 96(2), 129-139. doi:10.1016/s0269-7491(97)00033-x
- Poléo, A. B. S., Schjolden, J., Sørensen, J., & Nilsson, G. (2017). The high tolerance to aluminium in crucian carp (*Carassius carassius*) is associated with its ability to avoid hypoxia. *PLoS ONE*, 12(6). doi:10.1371/journal.pone.0179519
- RCore-Team. (2019). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria. Retrieved from <https://www.R-project.org>
- Rosseland, B. O. (1990). Environmental effects of aluminium. *Environmental Geochemistry and Health*, 12(1-2), 17-27.
- RStudio-Team. (2019). RStudio: Integrated Development Environment for R. Boston, MA, USA. Retrieved from <http://www.rstudio.com>
- Schofield, C. (1976). Acid Precipitation: Effects on Fish. *AMBIO*, 5(5), 228-230.

- Seip, H. M., Andersen, D. O., Christophersen, N., Sullivan, T. J., & Vogt, R. D. (1989). Variations in concentrations of aqueous aluminium and other chemical species during hydrological episodes at Birkenes, southernmost Norway. *Journal of Hydrology*, *108*, 387-405. doi:10.1016/0022-1694(89)90295-3
- Serrano, I., Buffam, I., Palm, D., Brännäs, E., & Laudon, H. (2008). Thresholds for survival of brown trout during the spring flood acid pulse in streams high in dissolved organic carbon. *Transactions of the American Fisheries Society*, *137*, 1363-1377.
- Skjelkvåle, B. L., Wilander, A., Hindar, A., & Borg, H. (2007). Large scale patterns of chemical recovery in lakes in Norway and Sweden; importance of seasalt episodes and changes in dissolved organic carbon. *Applied Geochemistry*, *22*(6), 1174-1180. doi:10.1016/j.apgeochem.2007.03.040
- Skjelkvåle, B. L., Wright, R., & Henriksen, A. (1998). Norwegian lakes show widespread recovery from acidification; results from national surveys of lakewater chemistry 1986-1997. *Hydrol. Earth System*, *2*, 555-562.
- Smith, R. A. (1872). *Air and Rain, the Beginnings of a Chemical Climatology*. London.
- Sparling, D. W., & Lowe, T. P. (1996). Environmental hazards of aluminium to plants, invertebrates, fish and wildlife. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, *145*, 1-127.
- Stoddard, J., Jeffries, D., Luekewille, A., Clair, T., Dillon, P., Driscoll, C., . . . Wilander, A. (1999). Regional trends in aquatic recovery from acidification in North America and Europe. *Nature*, *401*. doi:10.1038/44114
- Storey, D. M., Pyatt, F. B., & Broadley, L. E. (1992). An appraisal of some effects of simulated acid rain and aluminium ions on *Cyclops viridis* (crustacea, copepoda) and *Gammarus pulex* (crustacea, amphipoda). *International Journal of Environmental Studies*, *42*, 169-176.
- Sullivan, T. J., Seip, H. M., & Muniz, I. P. (1986). A comparison of frequently used methods for the determination of aqueous aluminum. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, *26*, 61-75.
- Sutcliffe, D. W., & Carrick, T. R. (1973). Studies on mountain streams in the English Lake District. I, pH, calcium and the distribution of invertebrates in the River Duddon. *Freshwater Biology* *3*, 437-462.
- Therneau, T., Lumley, T., Atkinson, E., & Crowson, C. (2020). A Package for Survival Analysis in R (Version 3.1.12). Retrieved from <https://cran.r-project.org/web/packages/survival/index.html>
- Tikhonov, V. N. (1973). *Analytical chemistry of aluminium*. New York: John Wiley and Sons, Inc.
- Vogt, R. D., Ranneklev, S. B., & Mykkelbost, T. C. (1994). The impact of acid treatment on soilwater chemistry at the humex site. *Environment International* *20*, 277-286.
- Wright, R. F. (2008). The decreasing importance of acidification episodes with recovery from acidification: an analysis of the 30-year record from Birkenes. *Hydrol. Earth Syst. Sci*, *12*, 353-362.
- Økland, J. (1969). Om forsuring av vassdrag og betydningen av surhetsgraden (pH) for fiskens næringsdyr i ferskvann. *Fauna*, *22*(2), 140-147.
- Økland, J., & Økland, K. A. (1986). The effects of acid deposition on benthic animals in lakes and streams. *Experientia* *42*, 471-486.
- Økland, K. A., & Økland, J. (1985). Factor Interaction Influencing the Distribution of the Freshwater "Shrimp" *Gammarus*. *Oecologia*, *66*(3), 364-367. doi:10.2307/4217637



## Vedlegg

### Oppskrifter

Barnes/Driscoll:

#### **Phenolrødt**

Løs 0,100g phenolsulfonphthalein (P.A., Merck 1.07233.0025) i 28ml 0,01 M NaOH (Merck 1.06469.0250, og fortynn til 250ml med MilliQ-vann. Det brukes 0,5ml av løsningen pr prøve.

#### **5 % 8-hydroxyquinoline**

Løs 25g 8-hydroxyquinoline (P.A., Merck 1.07098.0250) i 50ml eddiksyre (CH<sub>3</sub>COOH, P.A., Merck 1.00063.2500) og fortynn til 500ml med MilliQ-vann. Det brukes 2ml av løsningen pr prøve.

#### **25% NH<sub>3</sub>-Løsning (P.A.)**

Kjøpes. (Merck 1.05432.2500). Det brukes 0,5ml av løsningen pr prøve.

#### **Ekstraksjonsbuffer**

Bland 233ml NH<sub>3</sub> (P.A.) og 170ml eddiksyre (P.A.) og fortynn til 1000ml med MilliQ-vann. Juster pH til 8,3 med NH<sub>3</sub> eller eddiksyre. Behovet for justering kan variere svært mye. Siden du blander syre og base vil dette produsere varme og damp. Det er derfor en fordel om ammoniakken er nedkjølt på forhånd. Eddiksyren må være i romtemperatur for å unngå frysing (iseddik). Sørg for god ventilasjon, og bland sakte. Bruk eventuelt saktegående pumpe for å blande. Det brukes 5ml av løsningen pr prøve.

#### **Metylisobutylketon (MIBK)**

Kjøpes (VWR Prolabo BDH 25655.364). Det brukes 15ml keton pr prøve.

#### **Aluminium-stamløsning, 100mg Al/l**

Vei inn 1,7582g KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> \* 12H<sub>2</sub>O (P.A., Merck 1.01047.1000) og løs det i 50ml MilliQ-vann i en 1000ml målekolbe. Tilsett deretter 10ml 4 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> og fortynn til merket med MilliQ-vann. Løsningen kan oppbevares over lang tid, men må beskyttes mot fordampning (og dermed oppkonsentrering).

### **Tillaging av ionebyttermasse**

For 10ml ionebyttermasse veier du ut 10g av Amberlite IR 120 (Merck 1.15966.0500) i en 250ml plastflaske. Tilsett dobbelt så mye ddH<sub>2</sub>O som det er ionebyttermasse. Rist flasken godt, dekantér av vannet og gjenta én gang. Gjenta samme prosedyre to ganger med 10<sup>-4</sup>-løsningen. Skyll ionebytterkolonnen med ddH<sub>2</sub>O og fyll opp med ionebyttermasse til 10ml-merket. Ionebyttermassen må byttes etter 50-100 prøver.

Løsninger for ionebytting:

#### **2 M NaCl**

58,44g NaCl (VWR Prolabo BDH 27810.262) løses i ddH<sub>2</sub>O vann og fortynnes til 500ml.

#### **10<sup>-4</sup> M NaCl**

Bruk en liten plastsprøyte og tilsett 0,5ml 2 M NaCl-løsning til 10L ddH<sub>2</sub>O.

#### **0,1 M HCl**

8,34ml konsentrert (37%) HCl (Merck 1.00317.1000) tilsettes 1L ddH<sub>2</sub>O.

#### **HNO<sub>3</sub>-løsning for surgjøring av prøver (Alr)**

6,57ml konsentrert (65%) HNO<sub>3</sub> (Merck 1.00456.1000) i 100ml ddH<sub>2</sub>O. Bruk 0,5ml av dette pr prøve. (Vi har ofte bruk for 0,5ml konsentrert HNO<sub>3</sub> direkte i prøven)