



Danmarks Miljøundersøgelser
Miljøministeriet

Biologisk effektmonitoring i havsnegle og fisk

Marine workshoper 2004

Arbejdsrapport fra DMU, nr. 210



[Tom side]



Danmarks Miljøundersøgelser
Miljøministeriet

Biologisk effektmonitoring i havsnegle og fisk

Marine workshoper 2004

Arbejdsrapport fra DMU, nr. 210
2005

Jakob Strand

Datablad

Titel:	Biologisk effektmonitoring i havsnegle og fisk
Undertitel:	Marine workshopper 2004
Forfatter:	Jakob Strand
Afdelinger:	Afdeling for Marin Økologi
Serietitel og nummer:	Arbejdsrapport fra DMU nr. 210
Udgiver:	Danmarks Miljøundersøgelser© Miljøministeriet
URL:	http://www.dmu.dk
Udgivelsestidspunkt:	Juni 2005
Redaktionen afsluttet:	Juni 2005
Faglig kommentering:	Peter Henriksen, DMU
Finansiell støtte:	Ingen ekstern finansiering.
Bedes citeret:	Strand, J. 2005: Biologisk effektmonitoring i havsnegle og fisk. Marine workshopper 2004. Danmarks Miljøundersøgelser. 34 s. – Arbejdsrapport fra DMU, nr. 210. http://arbejdsrapporter.dmu.dk
	Gengivelse tilladt med tydelig kildeangivelse.
Sammenfatning:	To workshopper omkring biologisk effektmonitoring i hhv. havsnegle og ålekvabbe blev afholdt i 2004 i forbindelse med opstarten af den nye programperiode for den marine overvågning under NOVANA. Rapporten indeholder bl.a. resultater fra interkalibreringsøvelser for deltagernes bestemmelser af imposex og intersex i havsnegle. Derudover omfatter rapporten detaljerede illustrationer af hhv. imposex i forskellige arter af konksnegle, intersex i almindelig strandsnegl og fejludviklet fiskeyngel hos ålekvabbe.
Emneord:	Imposex, intersex, reproduktiv succes, ålekvabbe, overvågning, NOVANA
Layout:	Anne van Acker
Forsidefotos:	Jakob Strand. 1) Almindelig konk med imposex. 2) Ålekvabbe:Yngel med spiralformet ryg.
ISSN (elektronisk):	1399-9346
Sideantal:	34
Internet-version:	Rapporten findes kun som PDF-fil på DMU's hjemmeside http://www2.dmu.dk/1_viden/2_Publikationer/3_arbrapporter/rapporter/AR210.pdf
Kan købes hos	Miljøministeriet Frontlinien Rentemestervej 8 2400 København NV Tel. 70 12 02 11 frontlinien@frontlinien.dk www.frontlinien.dk

Indhold

Sammenfatning 5

1 Workshop om imposex og intersex i havsnegle 6

- 1.1 Introduktion 6
- 1.2 Praktiske forhold 7
 - 1.2.1 Workshoppens indhold 7
 - 1.2.2 Deltagere 7
 - 1.2.3 Prøvemateriale til brug ved workshop 8
 - 1.2.4 Metodebeskrivelse for interkalibreringsøvelser 8
- 1.3 Resultater og diskussion af interkalibrering 9
 - 1.3.1 Interkalibrering for dværgkonk 9
 - 1.3.2 Interkalibrering for alm. strandsnegl 10
- 1.4 Evaluering af workshopen 12
- 1.5 Konklusion 12
- 1.6 Referencer 13
- 1.7 Deltagerliste 14

2 Workshop om ålekvabbens reproduktion som forureningsmarkør 15

- 2.1 Introduktion 15
- 2.2 Indhold 15
- 2.3 Referencer 16
- 2.4 Deltagerliste 16

Bilag 1 - Illustrationer af intersexstadier i almindelig strandsnegl 17

Bilag 2 - Illustrationer af imposexstadier i konk-snegl 23

Bilag 3 - Illustrationer af forskellige typer af fejludviklet fiskeyngel i ålekvabbens kuld 29

Danmarks Miljøundersøgelser

[Tom side]

Sammenfatning

Denne rapport omfatter en opsamling af to marine workshopper, som blev afholdt i 2004 som led i kvalitetskontrollen af den landsdækkende overvågning af biologisk effektmonitoring i hhv. havsnegle og fisk inden for overvågningsprogrammet NOVANA.

Den første workshop om havsnegle omfattede undersøgelser af udvikling af både imposex og intersex som biomarkører for forurening med antibegroingsmidlet tributyltin (TBT). Interkalibreringsøvelser viste, at overordnet set var der en relativ lille variation mellem de enkelte deltageres resultater af undersøgelser af hhv. imposex i dværgkonk og intersex i alm. strandsnegl. Dette viser, at imposex og intersex i havsnegle er relativt robuste biologiske markører. Sammenlignelige resultater kan opnås, selvom de personer, der oparbejder prøverne, kun har et mindre erfaringsgrundlag med denne type af undersøgelser.

Den anden workshop omhandlede ålekvabbens reproduktion som forureningsmarkør, der er en ny parameter i den marine del af overvågningsprogrammet. Denne workshop omfattede gennemgang af den tekniske anvisning samt praktiske øvelser.

Afsluttende er der udarbejdet tre bilag med detaljerede illustrationer af forskellige stadier af intersex og imposex i havsnegle (Bilag 1 og 2) samt af forskellige varianter af fejludviklet fiskeyngel, der kan forekomme i ålekvabbens kuld (Bilag 3).

1 Workshop om imposex og intersex i havsnegle

Workshoppen blev afholdt på Søminestationen ved Isefjord 18. og 19. maj 2004.

1.1 Introduktion

I den marine overvågning indgår undersøgelser af udbredelsen af imposex og intersex i fire arter af havsnegle som biologiske markører for forurening med miljøgiften tributyltin (TBT), der anvendes i skibsmalinger på mange større skibe. Overvågningen omfatter en række områder i kystvande og åbne farvande i Danmark og er fortrinsvis foretaget i regi af det tidligere overvågningsprogram NOVA-2003 og i det nye NOVANA-program, på regionalt såvel som på nationalt niveau (DMU 2004).

Denne workshop havde til formål at træne/interkalibrere personer, der forstår undersøgelser af imposex og intersex i havsnegle i forbindelse med marin overvågning, for at kvalitetssikre/harmonisere resultaterne af denne type af undersøgelser.

Imposex og intersex er to forskellige måder, hvorved TBT-inducerede hormonforstyrrelser kommer synligt til udtryk i ellers særkønnede havsnegle. Hunnerne begynder at udvikle irreversible hanlige køns karakterer, der i værste fald kan medføre sterilitet. Graden af imposex, der er udviklet i snegle fra et område, beskrives med indeks-værdien VDSI (Vas Deferens Sekvens Index), der er en midlet værdi af alle observerede imposexstadier fra 0 til 4. Tilsvarende beskrives graden af intersex med et indekset ISI, der er en midlet værdi af alle observerede intersexstadier fra 0 til 4. Yderligere anvendes antallet af peniskirtler, givet ved et middelkirtelantal (mPK), hos hanner af alm. strandsnegl som indikator, da lave værdier af mPK tilsvarende kan findes i TBT-belastede områder.

Workshoppen fokuserede primært på undersøgelser af imposex i dværgkonk (*Hinia* (= *Nassarius*) *reticulata*) og intersex i almindelig strandsnegl (*Littorina littorea*). Udgangspunktet for disse undersøgelser var instrukserne beskrevet i den tekniske anvisning for biologisk effektmonitoring i havsnegle, der er elektronisk tilgængelig på Det Marine Fagdatacenters hjemmeside (<http://m-fdc.dmu.dk>).

Workshoppen blev afholdt af Jakob Strand fra Danmarks Miljøundersøgelser, Afdeling for Marin Økologi i regi af Det Marine Fagdatacenter. Sidste tilsvarende workshop om imposex og intersex i havsnegle blev afholdt af DMU/ Det Marine Fagdatacenter i 1999 (Strand & Dahl 2001), og en ny fælles workshop var nu vurderet som relevant i forbindelse med en den nye programperiode for marin overvågning under NOVANA.



Dværgkonk



Almindelig strandsnegl



Jette,
Ringkjøbing
Amt

1.2 Praktiske forhold

1.2.1 Workshoppens indhold

Workshoppen blev afholdt over to dage. Den første dag var forbeholdt undersøgelser af imposex i dværgkonk og den anden dag intersex i alm. strand-snegl. Begge dage startede med en præsentation af de tekniske anvisninger og hvilke kendetegn, man skulle kigge efter, mht. kønsbestemmelse og de forskellige stadier af imposex eller intersex. Den fremtidige programbeskrivelse og enkelte resultater fra den hidtidige marine overvågning under NOVA-2003/NOVANA blev også præsenteret, se bl.a. *Strand (2003)*.

De næste timer blev brugt på praktiske undersøgelser af havsnegle i laboratoriet, hvor hver enkelt deltager havde adgang til stereolup. Hermed var der mulighed for instruktion og diskussion af bestemmelse af køn og forskellige stadier af imposex eller intersex.

De praktiske undersøgelser blev begge dage afsluttet med en interkalibreringsøvelse, hvor alle deltagere hver især gennemgik de samme 10 individer. Denne øvelse gav et grundlag for at vurdere sammenlignelighed/variation i resultater af disse typer af undersøgelser.

Derudover blev der på workshoppen præsenteret et indlæg om forslag til, hvordan imposex og intersex i havsnegle kan indgå i vurderinger af miljøtilstanden i det marine miljø, og hvordan det kan integreres med overvågning af miljøgifte. Dette er primært set med henblik på EU's kommende vandramme- og habitatdirektiv.

Yderligere gav Marina Magnusson fra Gøteborg Universitet en god præsentation af undersøgelser af imposex i dværgkonk ved den svenske vestkyst i Skagerrak.

1.2.2 Deltagere

Workshoppen havde i alt 11 deltagere, hvoraf de ni deltog med henblik på NOVANA-programmet. De to andre deltagere var udenlandske gæster fra hhv. Sverige og Holland.

Ikke alle deltagere havde det samme erfaringsgrundlag med denne type undersøgelser. Fire deltagere havde god erfaring med undersøgelser af dværg-

Tabel 1 Oversigt over deltagernes erfaring med undersøgelser af hhv. imposex i dværgkonk og intersex i alm. strandsnegl opgjort ved hvor mange individer, deltagerne havde undersøgt før workshoppen.

	< 10 individer	> 10 - < 50 individer	> 50 individer
Imposex i dværgkonk	6 deltagere	1 deltager	4 deltagere
Intersex i alm. strandsnegl	3 deltagere	2 deltagere	6 deltagere

konk og seks havde god erfaring med undersøgelser af alm. strandsnegl. Fire deltagere havde ingen eller kun lille erfaring med de pågældende to arter (*tabel 1*).

Kun tre af deltagerne havde også deltaget i den tidligere workshop afholdt af DMU i 1999.

1.2.3 Prøvemateriale til brug ved workshop

Deltagere fra Ringkjøbing Amt havde op til workshoppen indsamlet levende dværgkonker fra den vestlige Limfjord ved Lemvig og Thyborøn fra både mere og mindre TBT-belastede områder. Yderligere havde en deltager fra Fyns Amt medtaget alm. strandsnegle fra Odense Fjord. Det var dermed muligt at studere både upåvirkede og alvorligt påvirkede snegle.

Disse snegle blev 1-2 timer før de praktiske øvelser bedøvet i 7% MgCl₂-opløsning.

Derudover blev der studeret enkelte frosne eksemplarer af rødskonk og almindelig konk, som var blevet indsamlet i Skagerrak.

1.2.4 Metodebeskrivelse for interkalibreringsøvelser

Både for dværgkonk og almindelig strandsnegl blev der afholdt interkalibreringsøvelser. Øvelserne foregik ved, at 10 individer blev taget ud af deres skaller og lagt på 10 nummererede petriskåle, hvori der var hældt en 7% MgCl₂-opløsning som bedøvelsesmiddel.

I første omgang skulle deltagerne kun bestemme, om sneglene var hunner eller hanner ud fra de ydre køns karakterer, dvs. fortrinsvis på om der var en ret ovidukt eller en krøllet seminal visikel til stede. For alm. strandsnegle skulle det – i tilfælde af at det var en hun – også vurderes, om den havde udviklet en prostatakirtel, som udvikles i intersex stadium 3.

I anden omgang skulle deltagerne fokusere på bestemmelsen af imposex i henhold til VDSI-klassifikationen og intersexstadier i henhold til ISI-klassifikationen. For dværgkonk blev alle hannerne udskiftet med nye individer af hunner. For alm. strandsnegl blev kappehulen klippet op på de hunner, som ikke var bestemt til at være udviklet til stadie 3, så den vaginale åbning blev blottet og udviklingen af intersex i stadie 0, 1 eller 2 derpå kunne vurderes. For hannerne af alm. strandsnegl skulle antallet af penialkirtler på penis tælles i anden omgang.

1.3 Resultater og diskussion af interkalibrering

Sammenligningen af resultaterne af de enkelte deltageres undersøgelser af 10 individer af hhv. dværgkonk og alm. strandsnegle er angivet i *tabel 2-6*.

Oversigten i *tabel 2-6* giver mulighed for at vurdere variationen mellem forskellige personers bestemmelse af imposex og intersex. Det skal i denne sammenhæng igen nævnes at ikke alle deltagere havde det samme erfaringsgrundlag med disse typer af undersøgelser, jvf. *tabel 1*. Derudover vil prøvestørrelsen også have indflydelse på den numeriske variation i bestemmelsen af indeks-værdier mellem forskellige personer. Af den tekniske anvisning fremgår det at der optimalt set bør undersøges 40 snegle per station og ikke 10 som i disse øvelser.

Deltager A's resultater kan i disse interkalibreringsøvelser betragtes som en mulig referenceværdi, da deltager A (Jakob Strand, DMU) har en stor erfaring med undersøgelser af både imposex og intersex i havsnegle. Jakob Strand har bl.a. igennem en årrække deltaget i internationale ringtests og to workshopper igennem organisationen Quasimeme (se fx *Quasimeme 2002*). Muligheden for, at også andre deltagere fremover kan tilmelde sig sådanne øvelser indenfor Quasimeme som en yderligere kvalitetssikring, bør nævnes.

1.3.1 Interkalibrering for dværgkonk

Alle deltagere foretog en korrekt kønsbestemmelse af de 10 individer af dværgkonk, der fordelte sig på 5 hunner og 5 hanner (*tabel 2*). Samtlige hunner af dværgkonk, der blev undersøgt i anden omgang, havde udviklet imposex, hvilket også blev fundet af alle deltagere med undtagelse af deltager E, som havde bestemt individ nr. 2 og 9 til stadie 0 (*tabel 3*). Deltager E havde i øvrigt haft vanskeligheder med at finde brudstykke af sædleder i en række af de andre hunner, hvorfor vedkommende så havde bestemt disse stadier til 1A eller 2A, hvorimod resten af deltagere havde bestemt dem til stadium 3A.

Kun for tre af individerne (nr. 2, 9 og 10) var der ellers en vis variation mellem deltagere i bestemmelsen af imposexstadier (*tabel 3*). I individ nr. 2 fandt hovedparten af deltagere kun en begyndende udvikling af en penis uden et brudstykke af sædleder (stadium 1A), hvorimod to deltagere fandt tegn på brudstykke af sædleder, men ingen penis (stadium 1B), og en enkelt deltager fandt både penis og brudstykke af sædleder (stadium 3A). I individ nr. 9 fandt

Tabel 2 Deltagernes kønsbestemmelser af 10 individer af dværgkonk (1: hun, 0: han).

Deltager	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	
Individ nr.												
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	RSD (%)
Kønsratio	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,0%

Tabel 3 Deltagernes bestemmelser af imposex i 10 individuelle hunner af dværgkonk.

Deltager	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	
Individ nr.												
1	3A	3A	3A	3A	3A	3A	3A	3A	3A	-	3A	
2	1A	1A	3A	1B	0	1A	1A	1A	1B	-	1A	
3	3A	3A	3A	3A	3A	3A	3A	3A	3A	-	3A	
4	3A	3A	3A	3A	3A	3A	3A	3A	3A	-	3A	
5	3A	3A	3A	3A	2A	3A	3A	3A	3A	-	3A	
6	3A	3A	3A	3A	1A	3A	3A	3A	3A	-	3A	
7	3A	3A	3A	3A	1A	3A	3A	3A	3A	-	3A	
8	3A	3A	3A	3A	3A	3A	3A	3A	3A	-	3A	
9	1B	3A	1B	1B	0	1B	1B	1A	1A	-	1A	
10	3A	3A	2A	1A	1A	2A	2A	2A	3A	-	3A	RSD (%)
VDSI	2,6	2,8	2,7	2,4	(1,7) ¹	2,5	2,5	2,5	2,6	-	2,6	4,7%

¹ Deltager E indgår ikke i beregningen af RSD.

fem deltagere kun tegn på brudstykke af sædleder, men ingen penis (stadium 1B), tre deltagere fandt en penis, men ingen sædleder (stadium 1A), og en enkelt deltager fandt både penis og sædleder (stadium 3A). I individ nr. 10 fandt fire deltagere både en penis og et brudstykke af sædleder, fire deltagere fandt en penis med penisdukt, men ingen sædleder (stadium 2A) og to deltagere fandt kun en penis uden penisdukt og sædleder (stadium 1A). Ved reeksamination af de pågældende individer fremstod et brudstykke af sædleder i individ 9 og 10, når der blev arbejdet med skyggeeffekter af mikroskoplys.

Overordnet var der en god sammenlignelighed mellem deltagernes bestemmelser af imposexstadier i dværgkonk, hvilket også afspejler sig i variationen i den beregnede VDSI-værdi, hvor den relative standardafvigelse (RSD) var på 4,7%, når der ses bort fra deltager E (tabel 3).

1.3.2 Interkalibrering for alm. strandsnegl

Alle deltagere foretog en korrekt kønsbestemmelse af de 10 individer af alm. strandsnegl, der fordelte sig på 6 hunner og 4 hanner (tabel 4). Selv i de to mere vanskelige tilfælde, hvor hannens seminale vesikel, der er hannens primære kendetegn, ikke fremstod videre tydeligt.

Samtlige deltagere var også enige om, at 3 af hunnerne havde udviklet en prostatakirtel identisk med hannens, så de kun kunne kønsbestemmes vha. den rette ovidukt, dvs. intersex i stadium 3 (tabel 5). Derved var der ingen tvivl om, at de pågældende hunner kunne betragtes som sterile.

Derimod var der en vis variation i bestemmelsen af, om de 3 andre hunner havde udviklet intersex i stadium 0 eller 1, dvs. om der i den ventrale side af den vaginale åbning var en mindre, men unaturlig, split eller ej. Individ nr. 1 blev af 6 deltagere bestemt til stadium 0, hvorimod 5 deltagere bestemte den til stadium 1. Individ nr. 4 og 8 blev af 9 deltagere bestemt til stadium 1, hvorimod 2 deltagere bestemte dem til stadium 0 (tabel 5).

Overordnet var der en god sammenlignelighed mellem deltagernes bestemmelser af intersexstadier i alm. strandsnegl, hvilket også afspejler sig i variationen i den beregnede ISI-værdi, hvor RSD var på 7,5% (tabel 5).

Tabel 4 Deltagernes kønsbestemmelser af 10 individer af alm. strandsnegl (1: hun, 0: han).

Deltager	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	
Individ nr.												
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	RSD (%)
Kønsratio	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,0%

Tabel 5 Deltagernes bestemmelser af intersex i 6 individuelle hunner af alm. strandsnegl (jf. tabel 4).

Deltager	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	
Individ nr.												
1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	
3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
4	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	
6	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
8	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	
10	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	RSD (%)
ISI	1,8	2,0	2,0	1,8	1,8	1,8	1,8	2,0	1,8	1,5	1,8	7,5%

Tilsvarende var der også en relativ god sammenlignelighed mellem deltagerens bestemmelser af antallet af penialkirtler på de fire hanners penis, hvor RSD var 4,1% for mPK (tabel 6). Alle deltagere var enige om, at to af hannerne helt manglede penialkirtler, at den ene han havde tre penialkirtler (to deltagere talte dog seks kirtler), og den sidste han havde efter de fleste deltageres bestemmelser 32 kirtler, men seks deltagere talte mellem 26 og 31 kirtler. På penis af den sidste han var mange af kirtlerne særligt tætsiddende, hvilket vanskeliggjorde tællingen af dem.

Tabel 6 Deltagernes bestemmelser af antallet af penialkirtler på penis hos 4 individuelle hanner af alm. strandsnegl (jf. tabel 4).

Deltager	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	
Individ nr.												
2	3	3	3	3	6	3	3	3	3	3	6	
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
7	32	32	31	32	26	32	31	32	28	30	28	
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	RSD (%)
mPK	8,8	8,8	8,5	8,8	8,0	8,8	8,5	8,8	7,8	8,3	8,5	4,1%

1.4 Evaluering af workshoppen

Afsluttende blev der omdelt et spørgeskema for at få deltagernes vurdering af workshoppen. Tilbage meldingen var, at workshoppen overordnet var vellykket, både mht. de faglige indlæg og øvelser samt med de rammer, som Søminestationen frembød (tabel 7).

Tabel 7 Deltagernes evaluering af workshoppens delelementer opgjort med en middelværdi af en karaktergivning fra 1 til 5, hvor 1 er bedst og 5 er værst.

Delelementer	Middel-score
Vægtning mellem indlæg og øvelser	1,4
Kvalitet af indlæg	1,9
Hvordan var de praktiske øvelser	1,1
Kvalitet af den tekniske anvisning	1,7
Var workshoppens længde tilpas	1,2
Antal deltagere i forhold til instruktion	1,6
Indkvartering	1,9
Forplejning	2,8

Den væsentligste svaghed, som blev fremhævet i flere af evalueringerne, var, at der under de praktiske øvelser burde have været en monitor/skærm samt et kamera, der var koblet til en af stereolupperne, så man kunne have foretaget fælles fremvisninger og evt. taget fotos af illustrative samt specielle individer af snegle.

Deltagerne blev også spurgt om, hvorvidt de syntes, der var behov for yderligere workshopper om imposex og intersex i havsnegle. Her lå svarene noget spredt, fra ønsker om årligt opfølgende workshopper til først behov for en gentagelse efter en årrække, fx når NOVANA skal revideres igen med henblik på en ny programperiode. Variationen i dette behov afspejler nok i høj grad, hvilken erfaring de enkelte deltagere havde på forhånd.

1.5 Konklusion

Overordnet set var der en god sammenlignelighed mellem de enkelte deltageres undersøgelser af hhv. dværgkonk og alm. strandsnegl.

Interkalibreringen viste, at alle deltagere havde fuldstændigt ensartede kønsbestemmelser af både dværgkonks og alm. strandsnegls køn, dvs. af hhv. hanner og hunner. Mht. bestemmelse af imposex i dværgkonk og intersex i alm. strandsnegl var der kun mindre variationer med relative standardafvigelse på de midlede indekxværdier mellem 4,1% og 7,5%. Denne variation kunne tilskrives bestemmelser af hhv. imposex- og intersexstadier i få individuelle hunner, hvor det for dværgkonk især var vanskeligt at vurdere, om der var mindre brudstykker af sædleder til stede eller ej, og for alm. strandsnegl om der var en mindre, men unaturlig split i den vaginale åbning eller ej. En mindre variation var også til stede i resultaterne for antallet af penialkirtler på hannens penis hos alm. strandsnegl, især ved forekomst af mange tætsidende kirtler.

Den forholdsvis lille variation mellem deltagerne viser, at indekxværdierne for imposex og intersex i havsnegle er relativt robuste biologiske markører. Sammenlignelige resultater kan opnås, når de personer, der oparbejder prøverne, har et vist erfaringsgrundlag med denne type af undersøgelser.

1.6 Referencer

DMU 2004: Programbeskrivelse for NOVA-2003 og NOVANA. Elektroniske versioner tilgængelige via <http://www.dmu.dk/Overvågning/NOVANA/>

Strand, J. & Dahl, K. 2001: Interkalibrering omkring bestemmelse af imposex- og intersexstadier i marine snegle. Resultat af workshop afholdt den 30.-31. marts 1999 af Det Marine Fagdatacenter. Danmarks Miljøundersøgelser. - Faglig rapport fra DMU 305: 18 s. (elektronisk). Findes på: http://www2.dmu.dk/1_viden/2_Publikationer/3_fagrappporter/rappporter/FR305.pdf

Strand, J. 2003: Biologisk effektmonitoring af TBT. – I: Rasmussen, M.B. (red.): Marine områder 2002 - Miljøtilstand og udvikling. NOVA 2003. Danmarks Miljøundersøgelser. - Faglig rapport fra DMU 467. s. 54 (elektronisk). Findes på: http://www2.dmu.dk/1_viden/2_Publikationer/3_fagrappporter/rappporter/FR467.PDF

Strand, J. 2004: Teknisk anvisning for marin overvågning. 4.6 Biologisk effektmonitoring - imposex og intersex i havsnegle. NOVANA. ver. 20-10-04. Danmarks Miljøundersøgelser. - Teknisk anvisning fra DMU's Marine Fagdatacenter : 29 s. (elektronisk).
http://www2.dmu.dk/1_Om_DMU/2_tvaer-funk/3_fdc_mar/programgrundlag/TekAnv2004_2009/Del4/TA04_4_6_Imposex.pdf

Quasimeme 2002. Quasimeme laboratory performance studies, Round 29: BE-1 Imposex and intersex in marine snails, exercise 519. Elektronisk version tilgængelig fra www.quasimeme.marlab.ac.uk

Internationale guidelines

Oehlmann, J. 2004: Biological effects of contaminants: Use of intersex in the periwinkle (*Littorina littorea*) as a biomarker of tributyltin pollution. 22pp. ICES Techniques in Marine Environmental Sciences No. 37. <http://www.ices.dk/products/techniques.asp>

OSPAR 2003: Proposed amendments to the current OSPAR Guidelines on TBT-specific effect monitoring. ASMO meeting 28 April – 2 May 2003 in Svolvær, Norway, document 03/4/2E.

1.7 Deltagerliste

Følgende deltog i workshoppen om imposex og intersex i havsnegle, som blev afholdt på Søminestationen ved Isefjord 18. og 19. maj 2004.

Navn	Institution	e-mail
Jakob Strand	DMU, Afdeling for Marin Økologi	jak@dmu.dk
Marina Magnusson	Kristinebergs Marina Forskningsstation	marina.magnusson@kmf.gu.se
Erik Skindhøj Petersen	Hedeselskabet	esp@hedeselskabet.dk
Jette P. Nielsen	Ringkjøbing Amt	vamjpn@ringamt.dk
Jørgen Theibel	Ringkjøbing Amt	vamjt@ringamt.dk
Lene Nielsen	Fyns Amt	ln.anv@fyns-amt.dk
Rikke W. Becker	Vejle Amt	rwa@vejleamt.dk
Bettina Lerche	Vejle Amt	bettina.lerche@biology.au.dk
Mona Nielsen	Vejle Amt	mn@vejleamt.dk
Johan Jol	Netherlands Institute of Fisheries Research	j.g.jol@rikz-zws-minvenw.nl
Peter Kofoed	DMU, Afdeling for Marin Økologi	pk@dmu.dk



FOTO: PETER KOFOED

Deltagere: Jørgen, Johan, Marina, Erik, Rikke, Bettina, Lene, Jette, Mona, Jakob.

2 Workshop om ålekvabbens reproduktion som forureningsmarkør

Workshoppen blev afholdt hos DMU i Roskilde den 20. oktober 2004.

2.1 Introduktion

Undersøgelser af ålekvabbens reproduktion indgår i den marine del af overvågningsprogrammet NOVANA. Disse undersøgelser vil bidrage til vurderinger af forekomsten af biologiske effekter af miljøfarlige stoffer i havmiljøet. De foretages i fire regionale kystvande med to stationer i hver. Derudover indgår også to DMU-stationer.



Ålekvabbe (*Zoarces viviparus*)

Denne workshop havde til formål at træne personer, der undersøger ålekvabbens reproduktion inden for marin overvågning i regi af overvågningsprogrammet NOVANA. Dette skal ses som en del af kvalitetssikringen/harmoniseringen af resultaterne af denne type undersøgelser. Derudover skabte workshoppen en ramme for at udveksle erfaringer, blive inspireret af og diskutere med kolleger.

Workshoppen fokuserede primært på makroskopiske undersøgelser af ålekvabben og dens yngel, herunder hvordan forskellige typer af fejludviklet fiskeyngel karakteriseres. Udgangspunktet for disse undersøgelser var instrukserne beskrevet i den tekniske anvisning for biologisk effektmonitoring i fisk, der er elektronisk tilgængelig på Det Marine Fagdatacenters hjemmeside (<http://m-fdc.dmu.dk>).

Workshoppen havde 12 deltagere, hhv. to fra DMU, ni repræsentanter fra fire amter og en person tilknyttet et universitet. Seks personer havde tidligere foretaget undersøgelser ifølge den tekniske anvisning, bl.a. tre af amterne, som allerede det foregående år havde foretaget indledende pilotundersøgelser.

Workshoppen blev afholdt af Jakob Strand fra Danmarks Miljøundersøgelser, Afdeling for Marin Økologi i regi af Det Marine Fagdatacenter.

2.2 Indhold

Workshoppen indeholdt en gennemgang og diskussion af den tekniske anvisning, præsentation af resultater fra feltundersøgelser og praktiske øvelser.

Under gennemgangen af den tekniske anvisning blev også procedure for indsamling og håndtering af prøver diskuteret. Det blev bl.a. foreslået, at DMU fremover burde indsende en ansøgning til Fiskeridirektoratet for at få en samlet dispensation til indsamling af ålekvabben i dens fredningsperiode for hele

programperioden i NOVANA. Dispensationen skal dække både de regionale og DMU-stationer. Yderligere blev udtagning og transport af leverprøver til målinger af afgiftningsenzymmer, dvs. EROD aktivitet, diskuteret. Det blev påpeget, at leverprøver skal tages fra friske fisk hurtigst muligt efter indsamlingen fra ruser, hvorpå prøverne skal fryses ned i flydende nitrogen eller tøris for at bevare enzymaktiviteten.

Jakob Strand og Beth Søeborg præsenterede data fra tidligere undersøgelser udført af hhv. DMU og Storstrøms Amt.

De praktiske øvelser indeholdt bl.a. håndtering og dissektion af dagfriske gravide ålekvabber og yngel. Desuden var det muligt at studere præparater af forskellige typer af deformiteter, der kan forekomme hos ålekvabbers yngel.

I den afsluttende opsamling blev den tekniske anvisning kommenteret endnu engang. Status for rapportering af data til MADS blev også diskuteret. En revideret teknisk anvisning vil blive tilgængelig snarest muligt sammen med de opdaterede STANDAT-kodelister.

Det blev også foreslået, at fotografier af forskellige typer af fiskeyngel burde gøres tilgængelig via M-FDC's hjemmeside. Disse er nu vedlagt i bilag 3.

2.3 Referencer

Strand, J. & Dahllöf, I. 2004: Teknisk anvisning for marin overvågning. 6.3 Biologisk effektmonitoring - fisk. ver. 05-11-04. Danmarks Miljøundersøgelser. - Teknisk anvisning fra DMU's Marine Fagdatacenter : 19 s. (elektronisk). http://www2.dmu.dk/1_Om_DMU/2_tvaer-funk/3_fdc_mar/programgrundlag/TekAnv2004_2009/Del6/TA04_6_3_BEM_fisk.pdf

2.4 Deltagerliste

Følgende deltog i workshoppen om ålekvabbers reproduktion, som blev afholdt hos DMU i Roskilde den 20. oktober 2004.

Navn	Institution	e-mail
Jakob Strand	DMU/MAR	jak@dmu.dk
Birgit Søborg	DMU/MAR	bis@dmu.dk
Birgit Jacobsen	Fyns Amt	bgj@anv.fyns-amt.dk
Rikke K. Rudolf	Fyns Amt	
Thomas Flarup Sørensen	RUC	flarup@virgil.ruc.dk
Beth Søeborg Lundholm	Storstrøms Amt	bes@vm.stam.dk
Nina Lave Nielsen	Storstrøms Amt	nll@vm.stam.dk
Mona Nielsen	Vejle Amt	mn@vejleamt.dk
Rikke Warberg Becker	Vejle Amt	rwa@vejleamt.dk
Bettina Lerche	Vejle Amt	bettina.lerche@biology.au.dk
Dorthea Harlev Jensen	Vejle Amt	dortheaharlev@jubiiipost.dk
Christian A. Jensen	Århus Amt	caj@ag.aaa.dk

Bilag 1 - Illustrationer af intersexstadier i almindelig strandsnegl

Forekomsten af intersex i almindelig strandsnegl undersøges i den marine del af det danske overvågningsprogram NOVANA som en biomarkør for forureningen med antibegroningsmidlet tributyltin (TBT), der er blevet anvendt i skibsmalinger.

En mere detaljeret teknisk anvisning kan ses på Det Marine Fagdatacenters hjemmeside <http://m-fdc.dmu.dk>.

Kønskarakterer i alm. strandsnegl

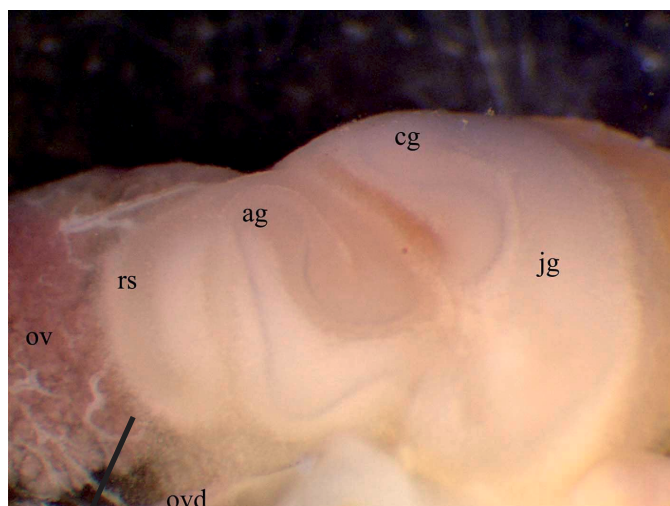
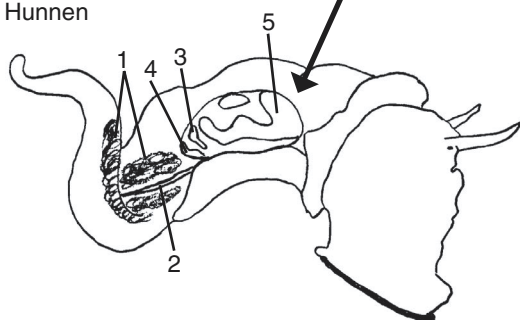


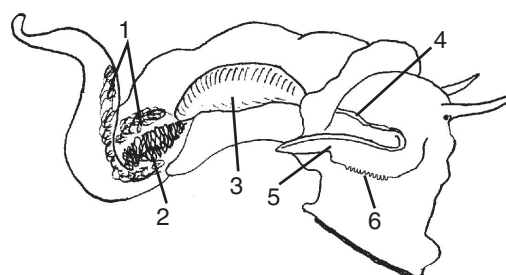
Foto: ÅRHUS AMT

Hunnen



- 1) ovarie
- 2) ovidukt
- 3) æggehvidekirtel
- 4) sædgemme
- 5) ægkapselkirtel

Hannen

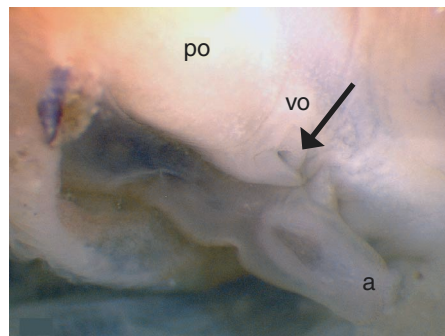
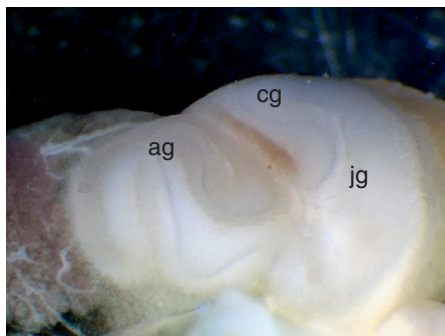


- 1) testis
- 2) seminal vesikel
- 3) prostata kirtel
- 4) sædrende
- 5) penis
- 6) penialkirtel på penis

Intersex stadium 0:

Normal hun med fuldt udviklet ovidukt og en ikke opsplittet kønsåbning.

a: anus
ag: albumin gland
cg: capsule gland
jg: jelly gland
po: pallial ovidukt
vo: vaginal opening



FOTOS: ÅRHUS AMT

Intersex stadium 1:

Opsplitningen af kønsåbning har en længde på $< 1/3$ af den samlede længde af den palliale ovidukt.

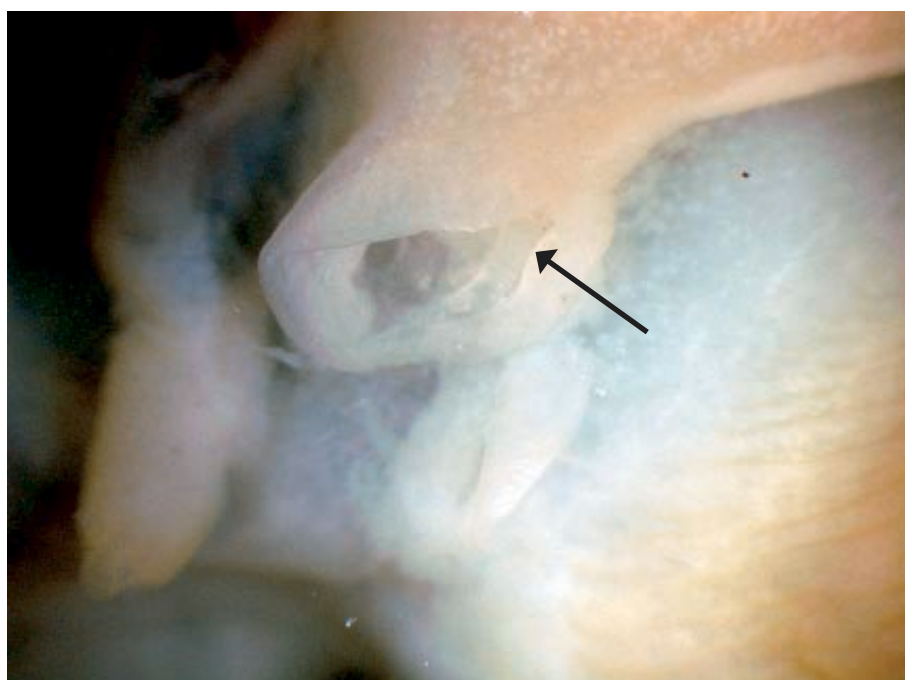


FOTO: RINGKØBING AMT

Intersex stadium 2:

Opsplitningen af kønsåbning har en længde på $>1/3$ af den samlede længde af den palliale ovidukt men med ingen synlig udvikling af prostatakirtel på ydersiden af kappen.

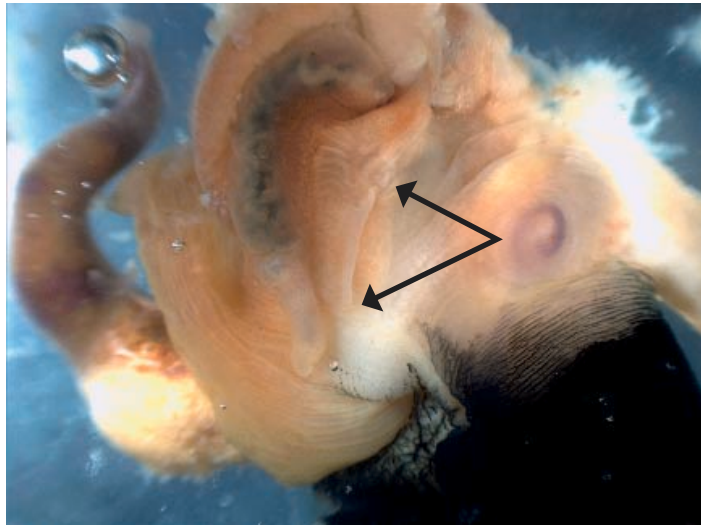


FOTO: RINGKJØBING AMITT

Intersex stadium 3:

Helt eller delvis dannet prostatakirtel i hunner. Længden af prostata er angivet.

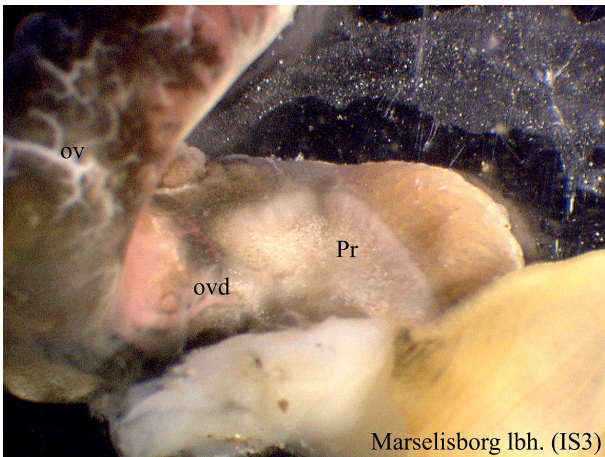


FOTO: ÅRHUS AMT

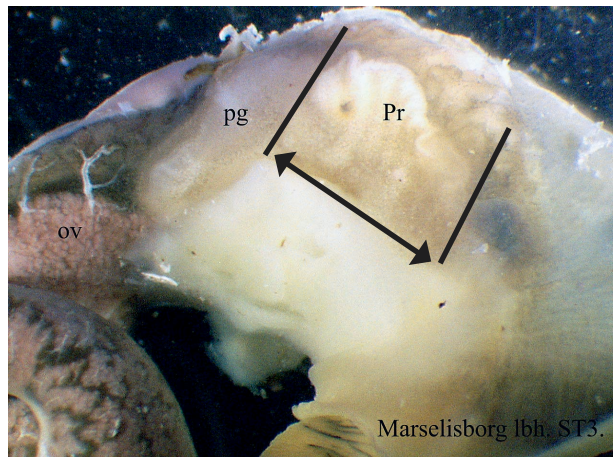


FOTO: ÅRHUS AMT

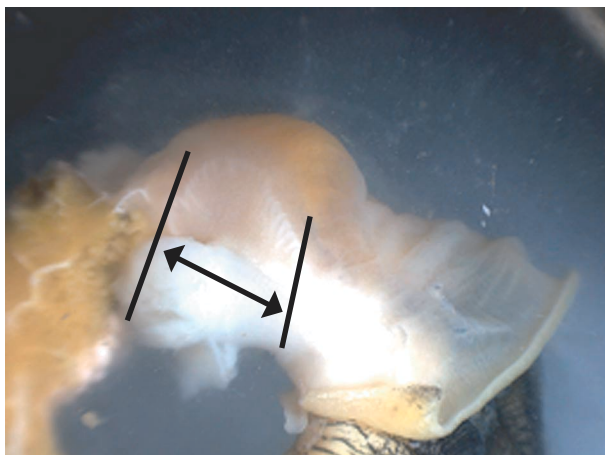


FOTO: RINGKJØBING AMT

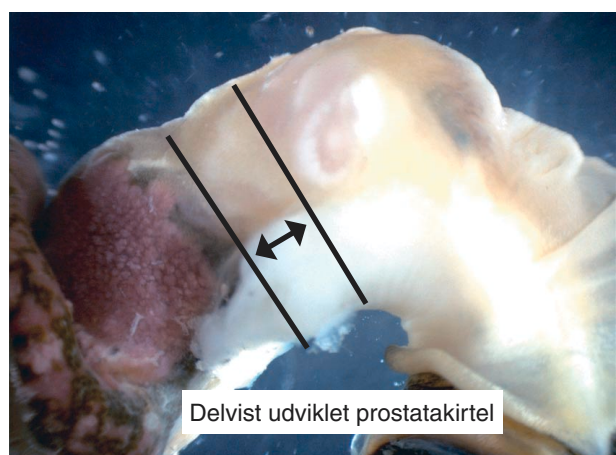


FOTO: RINGKJØBING AMT

Intersex stadium 4:

Hunnen har i tillæg til prostatakirtlen også udviklet en pseudopenis.

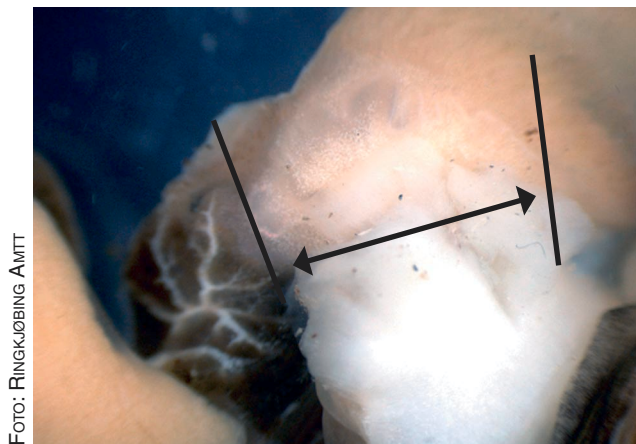


Foto: RINGKJØBING AMTT

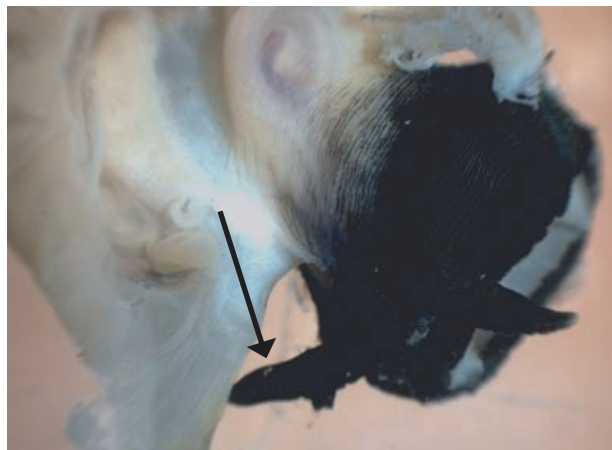


Foto: RINGKJØBING AMTT

Antallet af penialkirtler på hannens penis er også afhængig af forureningsniveauet.



Foto: ÅRHUS AMT

2 stk. penialkirtler på hannens penis.

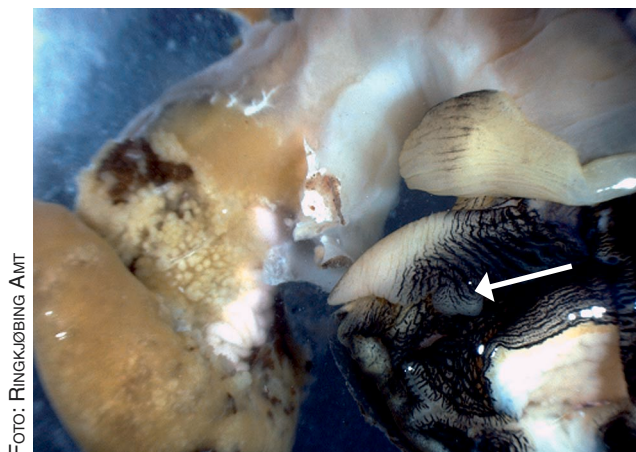


Foto: RINGKJØBING AMT

0 stk. penialkirtler på hannens penis.



Foto: RINGKJØBING AMT

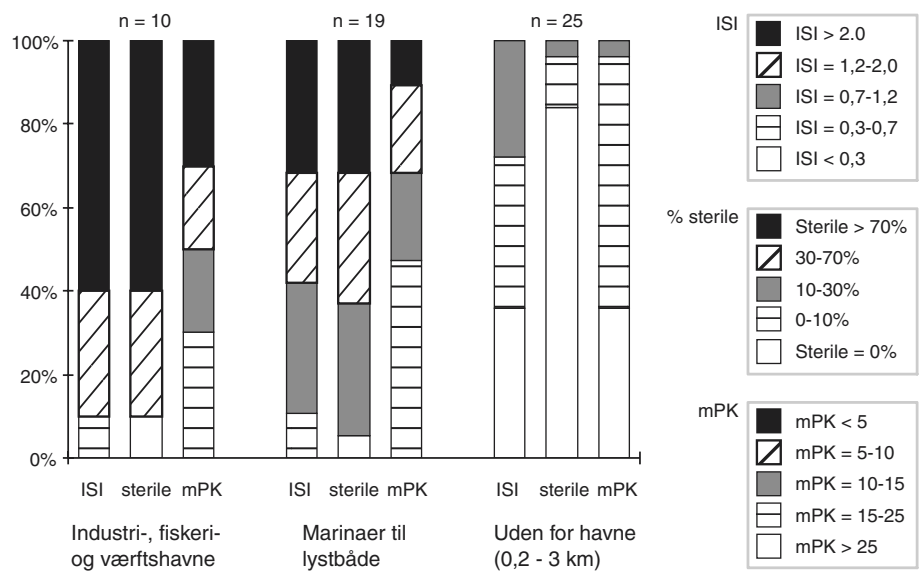
Mål for intersex

Minimum 40 snegle, hvor ca. halvdelen er hunner bør undersøges pr. station.

- Frekvens (%) af hunner der har udviklet intersex
- Intersex Index: $ISI = \sum ISI/n♀$
- % sterile: Andel af hunner med ISI/stadier 2 - 4
- Middellængde af prostata i hunner: $mFPL = \sum fpl/n♀$
- Middeltantal af penialkirtler: $mPK = \sum pk/n♂$

Forekomst af intersex i alm. strandsnegl i Danmark

Data fra 1998-2002.



Data er rapporteret hhv. i regionale overvågningsrapporter for kystvande samt i de nationale rapporter for marine områder som fx:

Marine områder 2002 - Miljøtilstand og udvikling. NOVA 2003. Faglig rapport fra DMU nr. 467 - http://www.dmu.dk/Udgivelser/Faglige_rapporter/Nr.+500-549/

[tom side]

Bilag 2 - Illustrationer af imposexstadier i konksnegl

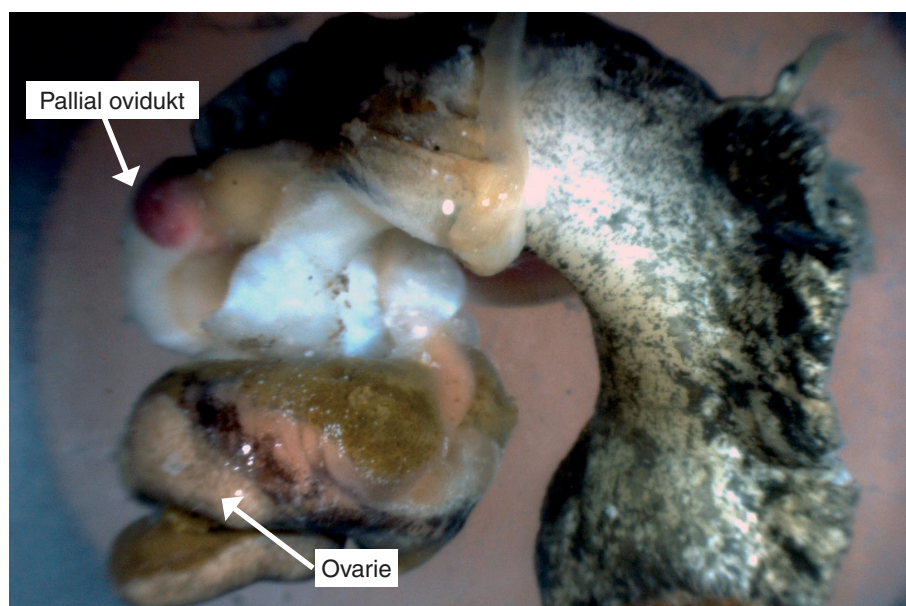
Forekomsten af imposex i konksnegle undersøges i den marine del af det danske overvågningsprogram NOVANA som en biomarkør for forureningen med antibegroningsmidlet tributyltin (TBT), der er blevet anvendt i skibsmalinger til skibe.

Følgende arter af havsnegle undersøges: dværgkonk (*Hinia reticulata*), almindelig konk (*Buccinum undatum*), rødkonk (*Neptunea antiqua*) og purpursnegl (*Nucella lapillus*). I alt er imposex hidtil observeret i ni forskellige arter af danske havsnegle.

En mere detaljeret teknisk anvisning kan ses på Det Marine Fagdatacenters hjemmeside: <http://m-fdc.dmu.dk>

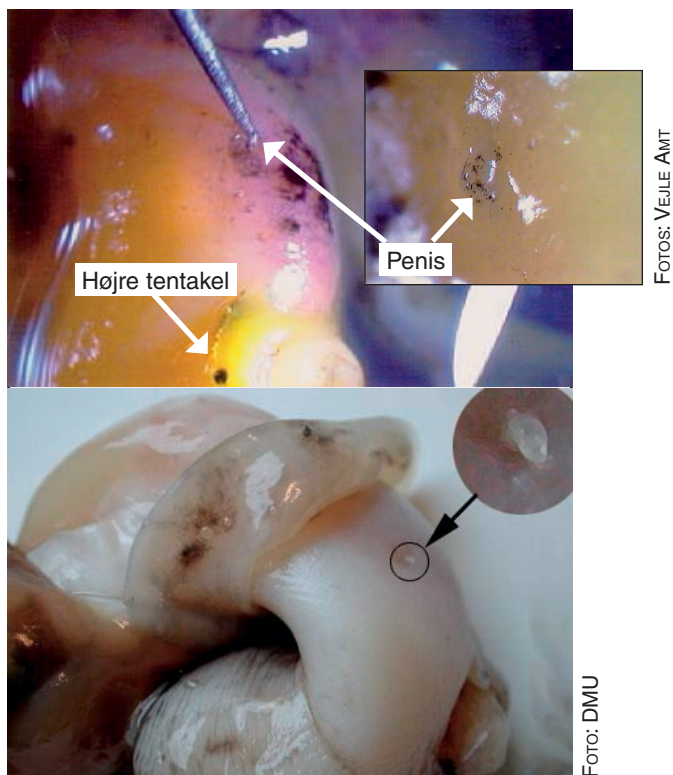
Imposex stadium 0:

Normal hun af dværgkonk med ingen udvikling af penis eller sædleder.



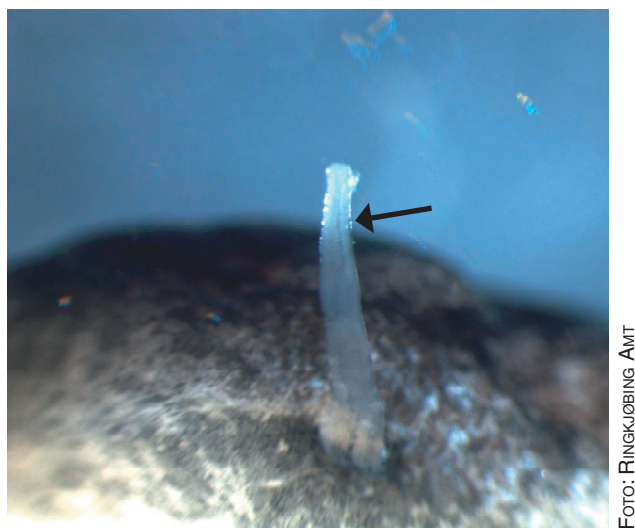
VDS stadium 1(A):

En (pseudo)penis er udviklet men uden penisdukt og uden brudstykke af vas deferens (sædleder).



VDS stadium 2(A):

Penisdukt fremstår som en tynd streg inde i penis, men der er ikke udviklet brudstykke af vas deferens.



VDS stadium 3(A):

Delvis dannet vas deferens (sædleder) i tillæg til penis i hun.

Dværgkonk

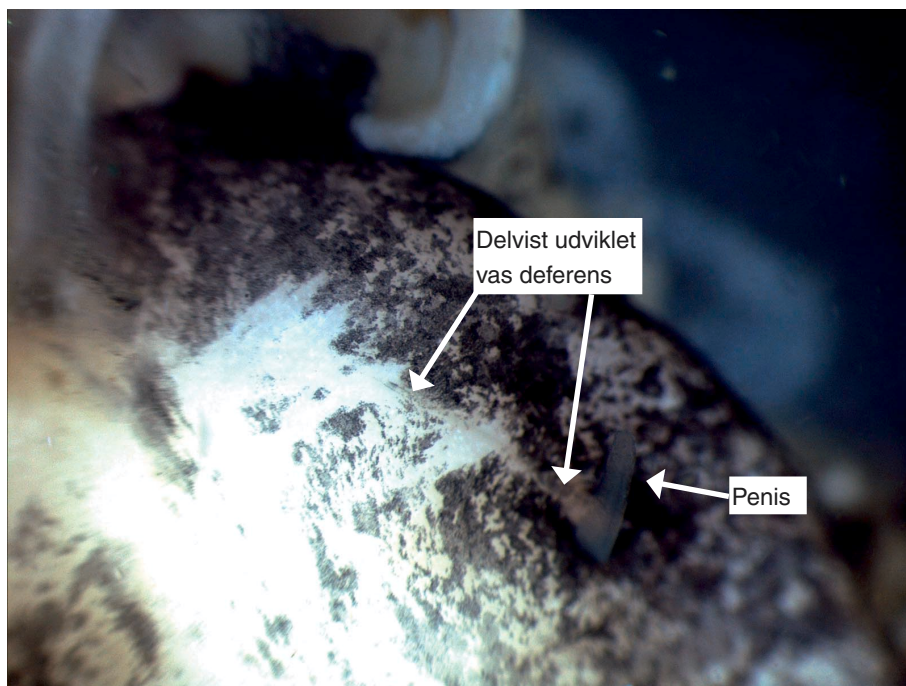


Foto: RINGKØBING AMT

Almindelig konk

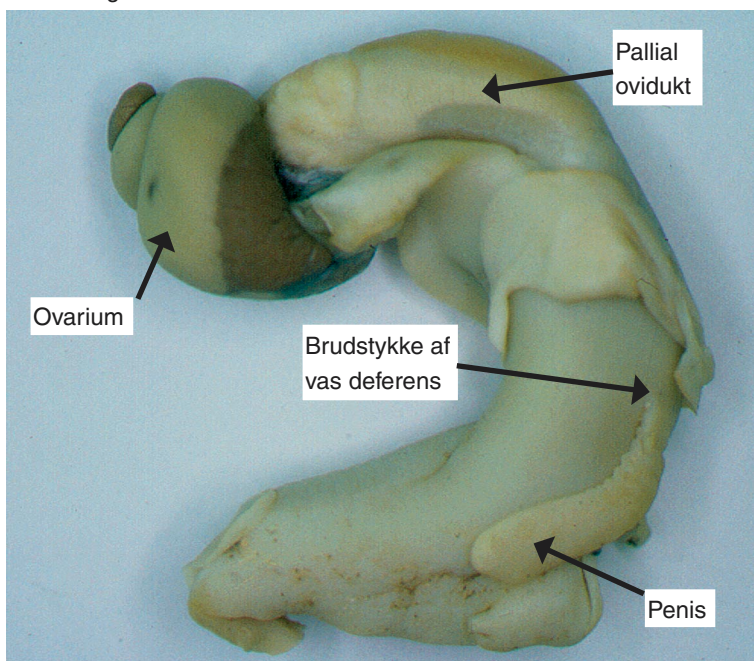


Foto: DMU

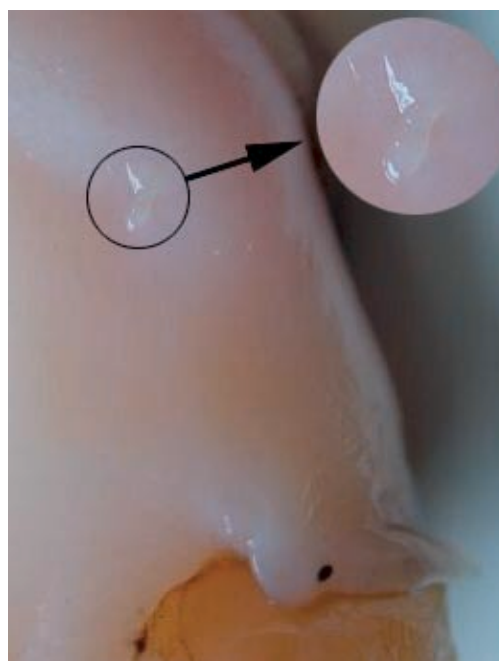


Foto: DMU

VDS stadium 4:

I tillæg til penis har hunnen udviklet en sædleder, der ubrudt løber mellem basis af penis og kønsåbningen.

Dværgkonk

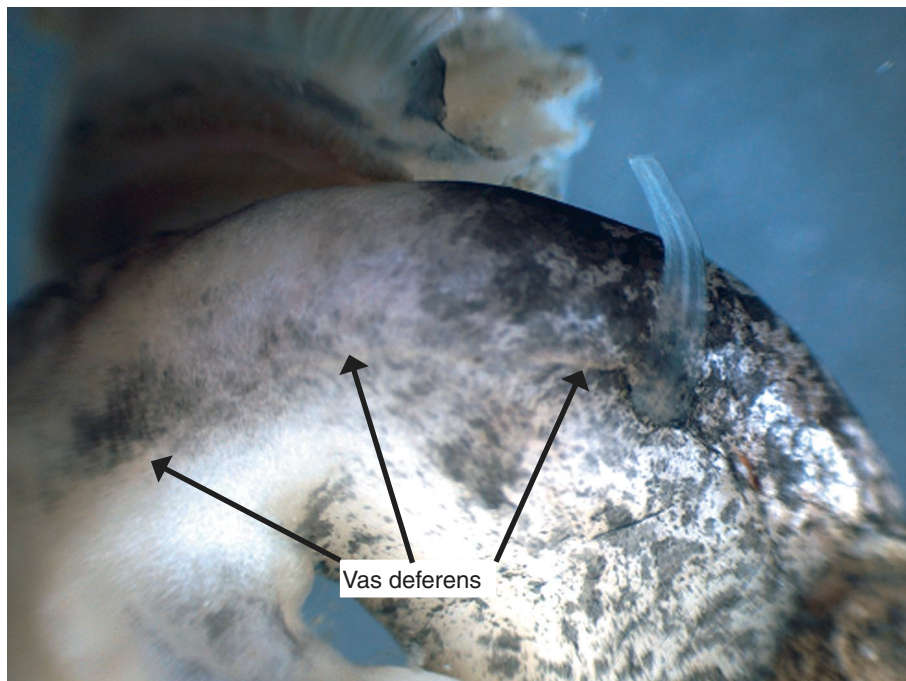


FOTO: RINGKJØBING AMT

Rødkonk

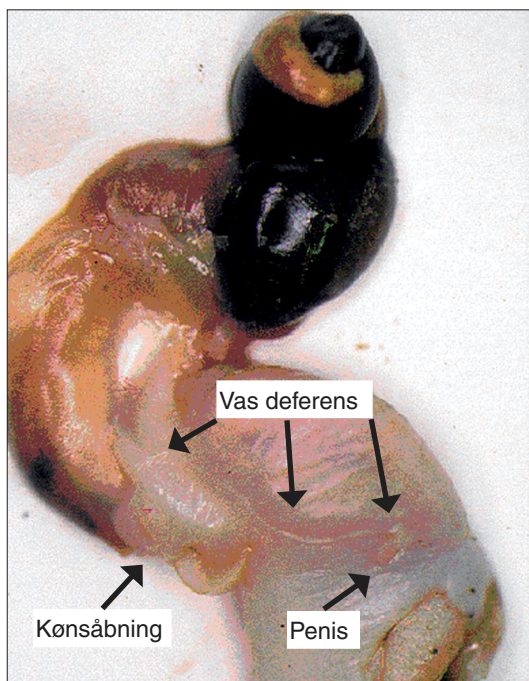


Foto: DMU

Yderligere fremskredne imposexstadier i hunner

Imposexstadier, der er mere fremskredne end VDSI = 4, betragtes som værende sterile, fx i stadium 5 og 6 i purpursnegl, hvor sædlederen vokser henover kønsåbningen og derved blokerer, så hunnen ikke kan lægge sine æg. Andre fremskredne kønsændringer er bl.a. udvikling af en krøllet ovidukt, der til forveksling kan ligne hannens seminal vesikel.

Rødkonk

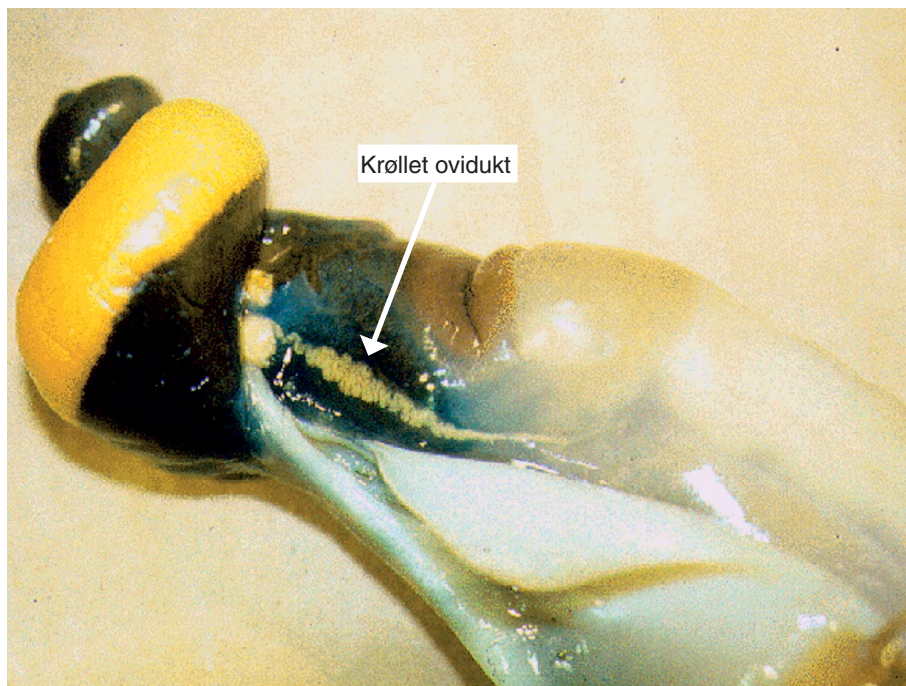


Foto: DMU

Hanner

Det primære kendetegn hos hanner er udviklingen af en seminal vesikel.

Dværgkonk

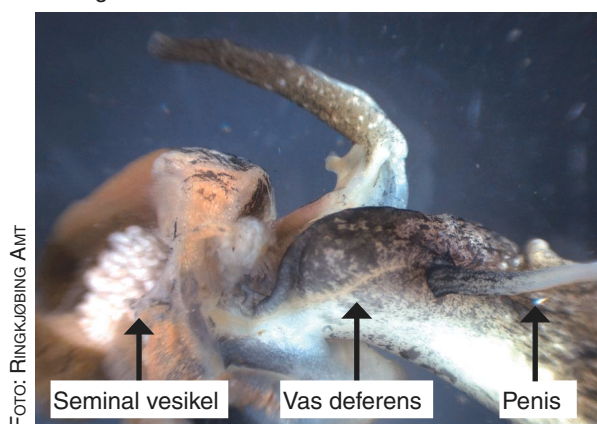


FOTO: RINGKJØBING AMT

Rødkonk

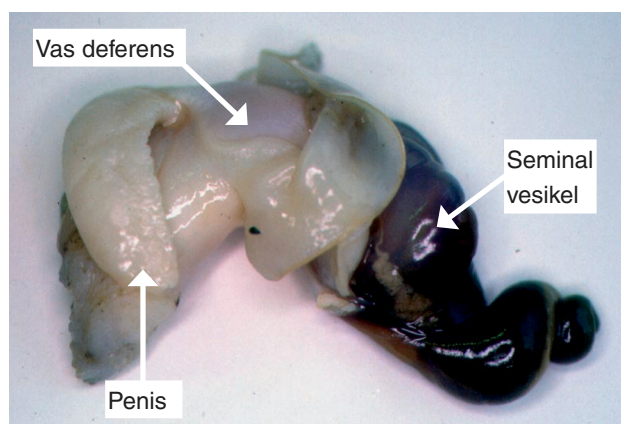


Foto: DMU

Mål for imposex

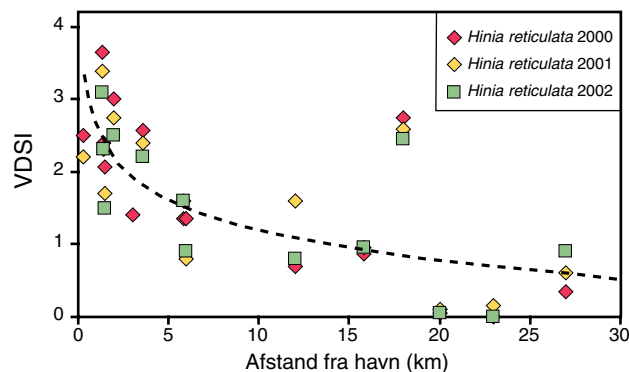
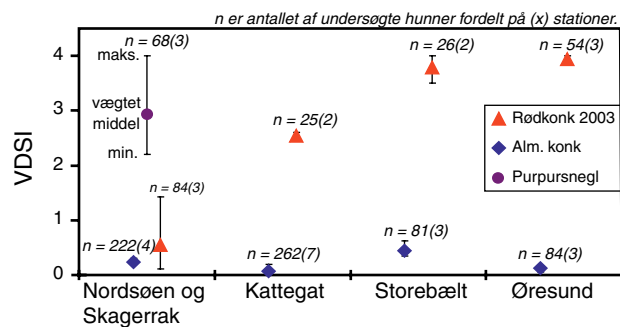
Minimum 40 snegle, hvor ca. halvdelen er hunner, bør undersøges pr. station.

- Frekvens af hunner med imposex.
- % sterile: Andel af hunner med isi-stadier 2 - 4.
- Vas deferens Sekvens Index: $VDSI = \sum vdsi/n^{\text{♀}}$
- Penis Classification Index: $PCI = \sum pci/n^{\text{♀}}$
Tidligere kaldet Mensink Sekvens Index (MSI)
- Relativ Penis Længde Index: $RPLI = 100\% * FPL/MPL = 100\% * (\sum pl^{\text{♀}}/n^{\text{♀}})/(\sum pl^{\text{♂}}/n^{\text{♂}})$
- Relativ Penis Størrelse Index: $RPSI = 100\% * (FPL/MPL)^3$

Længden af penis måles



Nogle resultater fra det danske overvågningsprogram NOVA-2003



Data er rapporteret hhv. i regionale overvågningsrapporter for kystvande samt i de nationale rapporter for marine områder som fx:

- Marine områder 2002 - Miljøtilstand og udvikling. NOVA 2003. Faglig rapport fra DMU Nr. 467; <http://faglige-rapporter.dmu.dk>

Bilag 3 - Illustrationer af forskellige typer af fejludviklet fiskeyngel i ålekvabbens kuld

FOTOS: JAKOB STRAND, DMU OG CHRISTIAN A. JENSEN, ÅRHUS AMT.

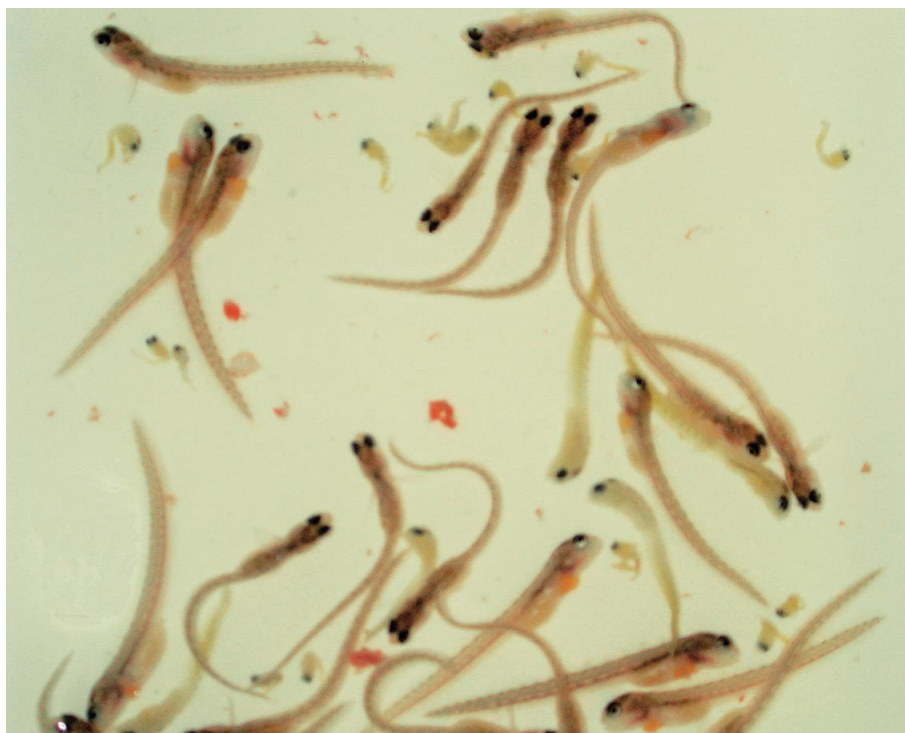
Forekomsten af fejludviklet fiskeyngel i kuld fra ålekvabbe (*Zoarces viviparus*) undersøges i den marine del af det danske overvågningsprogram NOVANA som en generel biomarkør for forurening med forskellige typer af miljøgifte.

En mere detaljeret teknisk anvisning kan ses på Det Marine Fagdatacenters hjemmeside: <http://m-fdc.dmu.dk>

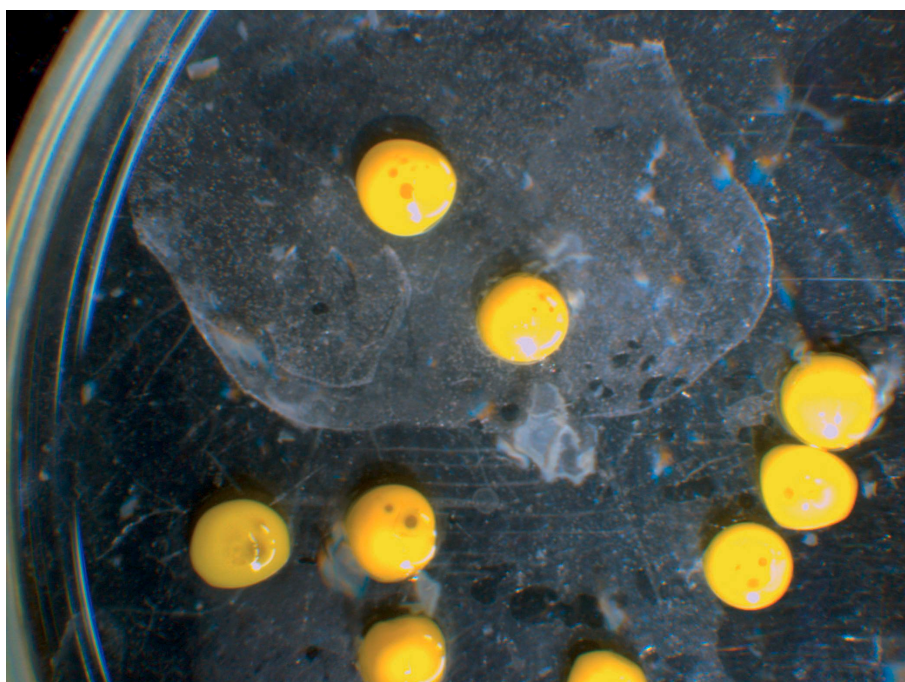
Karakterisering af forskellige typer af fejludviklet yngel

- O Befrugtede æg eller embryo, der lige er klækket (< 10mm)
 - A Død yngel uden misdannelser, > 10 mm
 - B Yngel med misdannelser i blommesæk eller indvolde
 - C Yngel med 'vinkelknæk' på rygrad eller hale
 - D Yngel med spiralformet rygrad
 - E Yngel med defekt på øjne eller helt manglende øjne
 - F Yngel med misdannelser i hovedet
 - G To sammenvoksede yngel, evt. som siamesisk tvilling
 - H Andre abnormiteter evt. som kalcificeret yngel
 - I Signifikant mindre yngel, "dværgvækst"
-

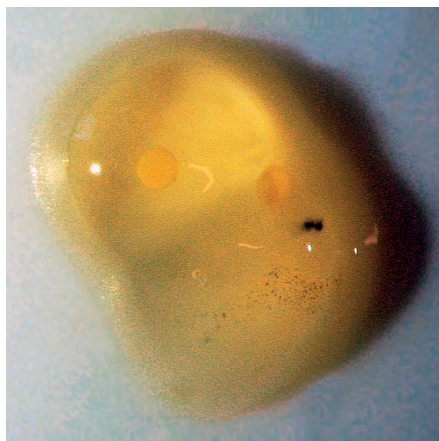
I visse kuld kan der forekomme op til flere fejludviklede unger.



Ubefrugtede æg.



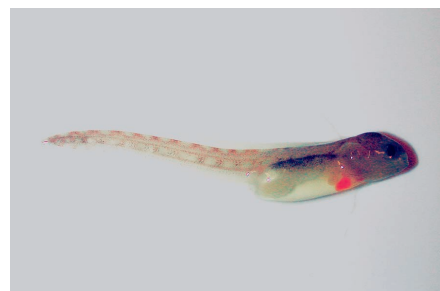
Type 0: Tidligt døde embryoer (< 10 mm).



Type A: Sent døde unger (> 10 mm).



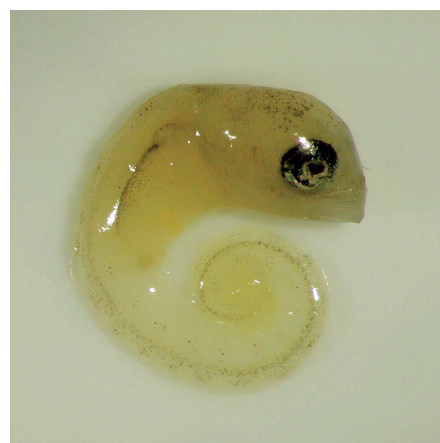
Type B: Yngel med misdannelser i blommeseæk eller indvolde.



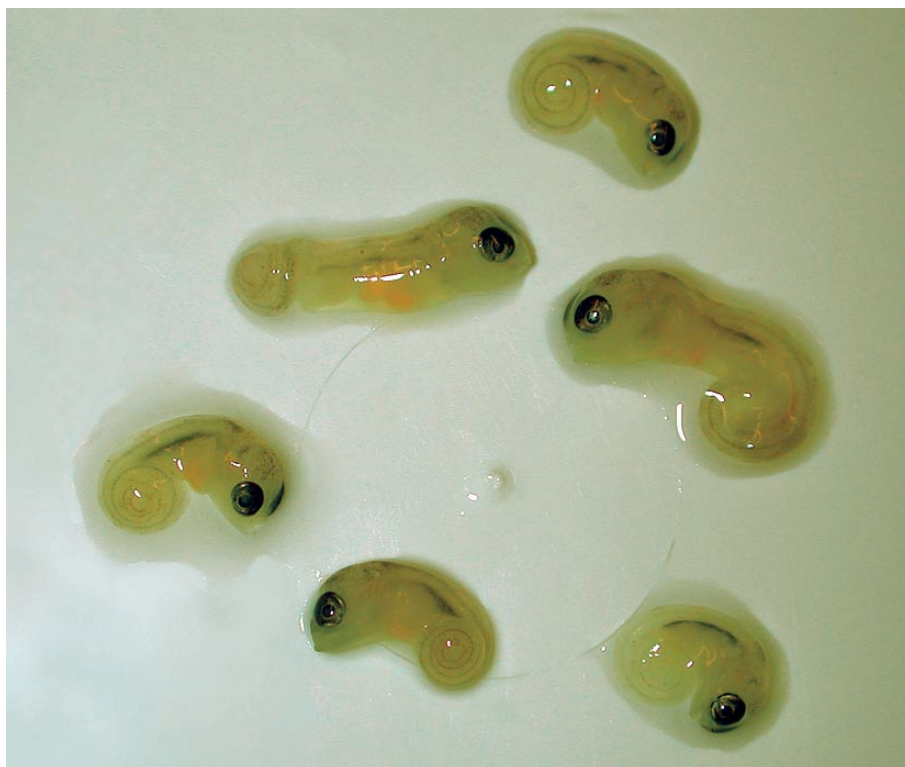
Type C: Yngel med 'vinkelknæk' på ryggrad eller hale.



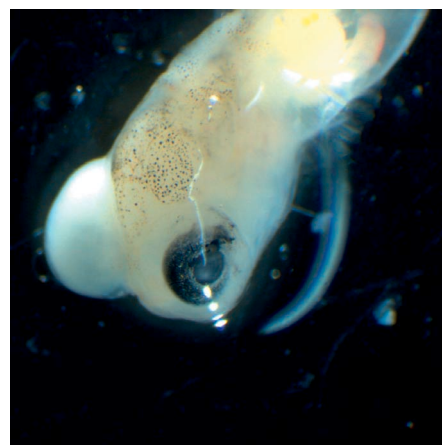
Type D: Yngel med spiralformet ryggrad.



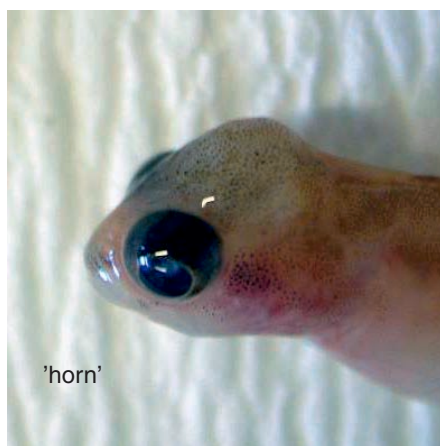
Type D: Yngel med spiralformet rygrad.



Type E: Yngel med defekt på øjne eller helt manglende øjne.



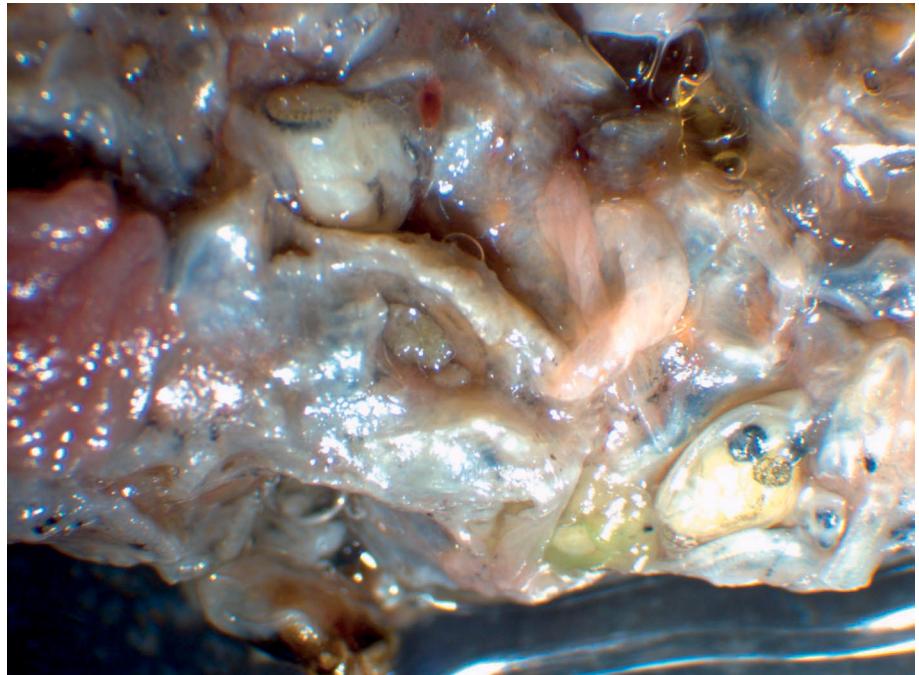
Type F: Yngel med misdannelser i hovedet.



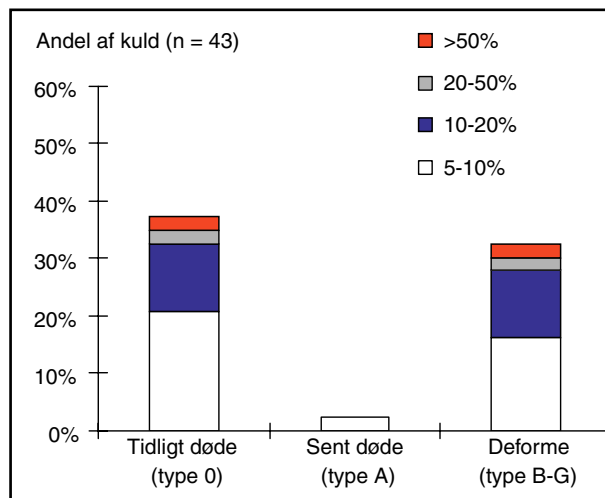
Type G: To sammenvoksede unger, evt. som siamesisk tvilling.



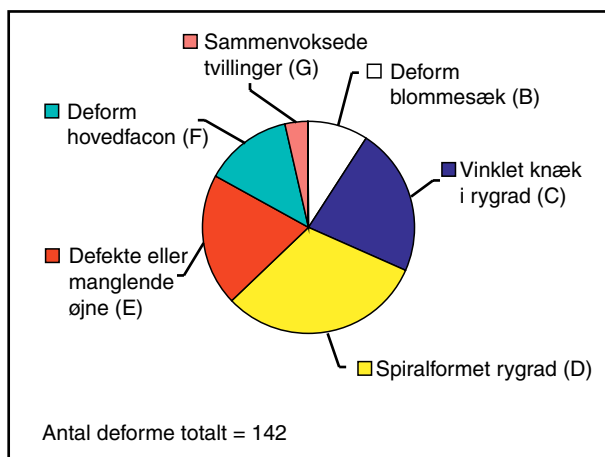
Type H: Andre abnormiteter, evt. som kalkificeret yngel i en sammenvokset masse.



Præsentation af data



Andel af kuld med forhøjet forekomst på > 5% af hhv. tidligt døde, sent døde og deformt yngel i Nakskov Fjord 2002.



%-vis fordeling af forskellige typer af deformiteter (B-G) i Nakskov Fjord 2002.

Danmarks Miljøundersøgelser

Danmarks Miljøundersøgelser – DMU – er en forskningsinstitution i Miljøministeriet.
DMU's opgaver omfatter forskning, overvågning og faglig rådgivning inden for natur og miljø.

Henvendelser kan rettes til:

URL: <http://www.dmu.dk>

Danmarks Miljøundersøgelser
Frederiksborgvej 399
Postboks 358
4000 Roskilde
Tlf.: 46 30 12 00
Fax: 46 30 11 14

*Direktion
Personale- og Økonomisekretariat
Forsknings-, Overvågnings- og Rådgivningssekretariat
Afd. for Systemanalyse
Afd. for Atmosfærisk Miljø
Afd. for Marin Økologi
Afd. for Miljøkemi og Mikrobiologi
Afd. for Arktisk Miljø*

Danmarks Miljøundersøgelser
Vejlsøvej 25
Postboks 314
8600 Silkeborg
Tlf.: 89 20 14 00
Fax: 89 20 14 14

*Forsknings-, Overvågnings- og Rådgivningssekretariat
Afd. for Marin Økologi
Afd. for Terrestrisk Økologi
Afd. for Ferskvandsøkologi*

Danmarks Miljøundersøgelser
Grenåvej 12-14, Kalø
8410 Rønne
Tlf.: 89 20 17 00
Fax: 89 20 15 15

Afdeling for Vildtbiologi og Biodiversitet

Publikationer:

DMU udgiver populærfaglige bøger ("MiljøBiblioteket"), faglige rapporter, tekniske anvisninger samt årsrapporter.
Et katalog over DMU's aktuelle forsknings- og udviklingsprojekter er tilgængeligt via World Wide Web.
I årsrapporten findes en oversigt over det pågældende års publikationer.