

NOVANA

Teknisk anvisning for marin overvågning

4.6 Biologisk effektmonitoring – imposex og intersex i havsnegle

Jakob Strand
Afd. for Marin Økologi

Miljøministeriet
Danmarks Miljøundersøgelser

4.6-1

4.6	Biologisk effektmonitoring – imposex	4.6-3
4.6.1	Formål	4.6-3
4.6.2	Kriterier	4.6-3
4.6.3	Principper	4.6-4
4.6.4	Prøvetagning	4.6-5
	4.6.4.1 Velegnede danske konksnegle	4.6-5
	4.6.4.2 Fangstmetoder, transport og opbevaring	4.6-6
	4.6.4.2.1 Fangstmetoder	4.6-6
	4.6.4.2.2 Transport og opbevaring	4.6-6
	4.6.4.2.3 Håndtering	4.6-6
4.6.5	Analysemetoder	4.6-7
	4.6.5.1 Bestemmelse af køn	4.6-7
	4.6.5.1.1 Hunnens reproduktive organer	4.6-7
	4.6.5.1.2 Hannens reproduktive organer	4.6-7
	4.6.5.2 Beskrivelse og karakterisering af imposexstadier	4.6-8
	4.6.5.2.1 Penislængde	4.6-9
	4.6.5.2.2 Vas deferens sekvens	4.6-9
	4.6.5.2.3 Mensink sekvens	4.6-9
	4.6.5.2.4 Andre synlige ændringer som følge af imposex	4.6-10
	4.6.5.3 Aldersbestemmelse	4.6-10
	4.6.5.3.1 Kønsmodenhed	4.6-10
	4.6.5.3.2 Skalhøjde	4.6-10
	4.6.5.3.3 Årringe i skallåget	4.6-11
	4.6.5.4 Infektion med parasitter	4.6-11
4.6.6	Kvalitetssikring	4.6-12
4.6.7	Dataindberetning	4.6-12
	4.6.7.1 Stationsbeskrivelse	4.6-12
	4.6.7.2 Beskrivelse af den enkelte snegl	4.6-12
	4.6.7.3 Udregning af parameterverdier	4.6-13
4.6.8	Referencer	4.6-13
4.6.9	Bilag 1	4.6-15
4.6.10	Bilag 2	4.6-16
4.6.11	Bilag 3 - Skema til bestemmelse af imposex	4.6-17
4.6.12	Supplement - Bestemmelse af intersex hos almindelig strandsnegl	4.6-18
4.6.13	Bilag 4	4.6-26
4.6.14	Bilag 5	4.6-27
4.6.15	Bilag 6 - Skema til bestemmelse af intersex	4.6-28

4.6 Biologisk effektmonitoring – imposex og intersex i havsnegle

4.6.1 Formål

Forekomsten af imposex hos konksnegle (Prosobranchia: *Neogastropoda*) kan anvendes til biomonitering af forureningen med tributyltin (TBT) i det marine miljø. TBT anvendes i vid udstrækning som antifoulings-middel i skibsmalinger på skibe længere end 25 m.

Imposex, også kaldet pseudohermafroditisme, er en maskulinisering af hunnerne, der giver udslag i synlige morfologiske ændringer, først og fremmest en udvikling af en pseudopenis og sædleder (vas deferens). Dværgkonk (*Hinia reticulata*) og almindelig konk (*Buccinum undatum*) anbefales som indikatorarter i de danske farvande i forbindelse med TBT-specifik biologisk effekt monitorering. Ved moitering i kystnære områder anvendes dværgkonk, hvorimod almindelig konk anvendes i de mere åbne farvande. Som supplement til almindelig konk kan rødskonk også (*Neptunea antiqua*) undersøges. Hvis dværgkonk ikke forekommer i et pågældende område, hvor der ønskes monitoreret for TBT, kan almindelig strandsnegl (*Littorina littorea*) anvendes som alternativ (se supplement: afsnit 4.6.12). Da almindelig strandsnegl er mindre følsom overfor TBT, skal dværgkonk anvendes hvis det er muligt. Hvis almindelig strandsnegl anvendes, skal det ske efter aftale med det marine fagdatacenter. Denne tekniske anvisning er modificeret efter JAMP 1997.

4.6.2 Kriterier

Monitoringsområder lokaliseres i forhold til en given TBT-kilde, der enten kan være en punktkilde som en havn eller marina eller i mere åbne områder sejlruiter for fragtskibe og færger eller en klappads.

Ved monitorering i forhold til en punktkilde anbefales at der udvælges der mindst 3 områder. Disse bør være lokaliseret på samme side af den forventede kilde i en afstand af 0 - 0,5, 3 - 5 og 10 - 15 km for at kortlægge en eventuel gradient i forureningsniveauer mellem det højeste effektniveau og et lokalt baggrunds niveau.

Ved monitorering i de mere åbne farvande placeres stationerne på langs af større sejlruiter for fragtskibe og færger. Det anbefales at der placeres 3 – 5 stationer i hvert farvandsområde.

Stationerne bør lægges ud fra et lokalkendskab til bund-, strøm- og sedimenteringsforhold samt andre mulige TBT-kilder. En forudsætning for stationsplanlægningen er, at den samme art af konksnegle findes i de udvalgte områder.

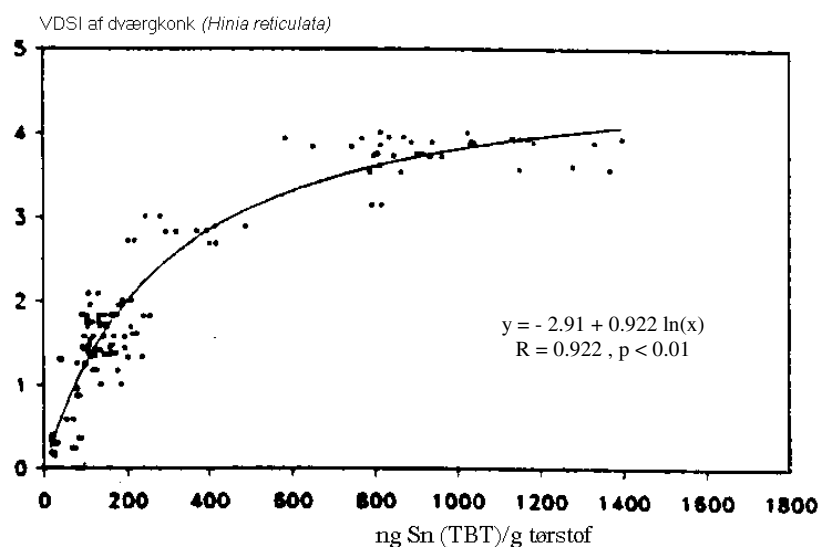
Selve stationerne skal være geografisk veldefinerede (DGPS), så det er muligt at gentage prøvetagningen for at følge eventuelle tidlige variationer.

Ved en vedvarende monitoring skal det efterstræbes, at tidspunktet for indsamlingen af snegle er det samme hvert år. Da der er sæsonmæssige variationer mht. størrelsen af penis (især gældende hos hanner af dværgkonk) bør indsamlingen foregå i slutningen af den reproduktive periode, dvs. juni - august. Med hensyn til almindelig konk er de sæsonmæssige variationer af mindre betydning.

Den endelige placering af stationer bør afgøres på baggrund af indledende baseline-undersøgelser.

4.6.3 Principper

Der er i flere undersøgelser påvist en sammenhæng mellem intensiteten af imposex hos konksnegle og TBT-niveauet i miljøet (*Bryan et al. 1987, Stroben 1994, Mensink et al. 1997*). Nedenfor er dette eksemplificeret med dværgkonk.



Figur 1 Sammenhængen mellem intensiteten af imposex (udtrykt ved VDSI) og indholdet af TBT i dværgkonk (efter *Stroben 1994*).

Der kan opstilles 5 forskellige parameterværdier til beskrivelse af intensiteten af imposex i en gruppe af konksnegle, henholdsvis frekvens (%), gennemsnitlig penislængde hos hunner (FPL), relativ penislængde indeks (RPLI), vas deferens sekvens indeks (VDSI) og Mensink sekvens indeks (MSI). De bygger enten på antallet af individer, der udviser imposexkarakterer, på den gennemsnitlige størrelse af penis eller på baggrund af middelværdien af udviklede imposexstadier.

Hvilke af parameterværdierne, der er mest velegnede i monitoringsøjemed afhænger af den specifikke art og TBT-niveau. På nuværende tidspunkt anbefales det, at alle værdierne udregnes.

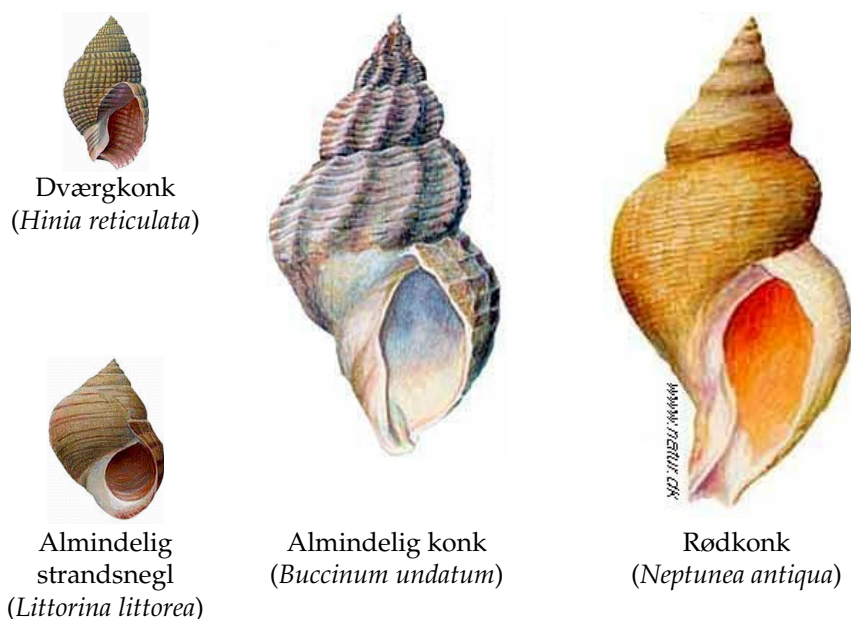
4.6.4 Prøvetagning

4.6.4.1 Velegnede danske konksnegle

Der findes i de danske farvande flere arter af konksnegle. De er ikke alle lige anvendelige som bioindikatorer for TBT. Det afhænger, dels af deres udbredelse og hvilket antal de er tilstede i, dels af hvor sensitive de er overfor TBT. Dværgkonk (*Hinia (Nassarius) reticulata*) (Stroben 1994) og almindelig konk (*Buccinum undatum*) (Mensink et al. 1997) er de mest velegnede som bioindikatorer i de danske farvande.

Dværgkonken er almindelig i Limfjorden, hele Kattegat-området og ned i den vestlige Østersø. Den forekommer især i kystnære områder, deriblandt i hovedparten af vore fjorde, på dybder fra 2 til 15 m. Dværgkonken anbefales som indikatorart overfor punktkilder som f.eks. havne. Bemærk: Dværgkonk kan forveksles med de beslægtede arter *H. pygmaea* og *H. incrassata*.

Almindelig konk har nogenlunde samme geografiske udbredelse i de indre danske farvande som dværgkonk, men den forekommer generelt på dybere vand (10 - 1000 m). Almindelig konk anbefales som bioindikator i forhold til sejlruiter.



Figur 2 Tegninger er fra www.dmu.dk ▷ Oplev miljøet ▷ Dyr og planter ▷ Havsnegle.

Der findes andre konksnegle i de danske farvande, der også er sensitive overfor TBT og derved kunne anvendes som bioindikatorer, deriblandt rødkonk (*Neptunea antiqua*) og purpursnegl (*Nucella lapillus*).

Rødkonk er imidlertid mindre hyppig end almindelig konk, men har nogenlunde samme udbredelse i de danske farvande. Rødkonken foretrækker generelt lidt blødere bundforhold og er derfor ofte mere udbredt i store dele af Skagerrak og Nordsøen. Undersøgelser tyder

på, at rødkonken er mere følsom overfor TBT end almindelig konk (*Strand & Jacobsen 2002*).

Purpursnegl forekommer spredt på den jyske vestkyst. Purpursneglen lever på store sten (ofte stenmoler) i tidevandszonen. Den er yderst følsom overfor TBT og kan let blive steriliseret pga. udviklingen af imposex. Den må af denne grund lokalt anses for at være truet omkring større havneområder (*Harding et al. 1992*).

4.6.4.2 Fangstmetoder, transport og opbevaring

4.6.4.2.1 Fangstmetoder

Fælde: En kurv med en maskevidde på ca. 5 mm og med ikke fordærvet krabbe-, muslinge- eller fiskekød som madding er en effektiv fangstmetode. Det anbefales, at lokkemaden vikles ind i et fintmasket trådned, så bl.a. fisk og krabber ikke kan komme til. Lokketid: 6 timer til 3 dage.

Bomtrawl med en maskevidde på 2 cm er en velegnet fangstmetode og anbefales især ved fangst af almindelig konk i sejlrender. Et rammeskrab med en bredde på 50 cm er velegnet til indsamling af dværgkonk.

Indsamling med dykkere er også en effektiv fangstmetode.

For dværgkonk, rødkonk og purpursnegl anbefales at der indsamles 40 individer i alt per station, hvorimod for almindelig konk fra åbne farvande anbefales 100 individer per station.

4.6.4.2.2 Transport og opbevaring

Konksneglene opbevares og transporteres levende under kølige forhold. Sneglene kan holdes i live i en uge ved opbevaring i 5°C saltvand med lufttilførsel.

Alternativt kan sneglene nedfryses indtil de bliver undersøgt, men det skal i så fald bemærkes under rapporteringen, da det i en vis grad kan påvirke imposexbestemmelsen. Nedfrysning vil påvirke penisstørrelse og derved RPLI, men ikke karakteriseringen af de enkelte imposexstadier.

Bemærk: Opbevaring i sprit eller formalin må ikke finde sted før bestemmelsen af imposex er tilendebragt.

4.6.4.2.3 Håndtering

Det anbefales at før sneglene bliver undersøgt levende bedøves de i 2 - 3 timer med en 7% MgCl₂-opløsning for at opnå maksimal afslapning af muskler. Skallen knækkes med en papegøjetang eller i en skruestik, og blødelene udtages med pincet. De videre undersøgelser foregår med stereolup.

4.6.5 Analysemetoder

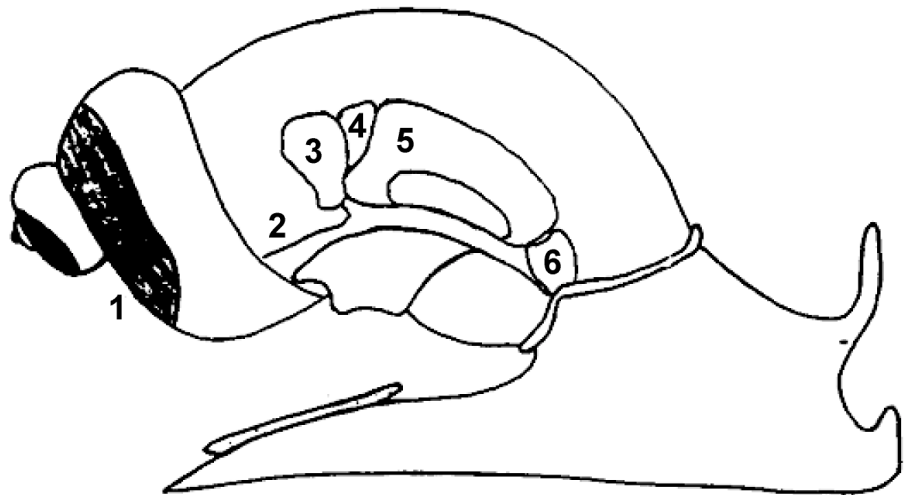
4.6.5.1 Bestemmelse af køn

Konksnegle er særkønnede, og på trods af mulige imposexkarakterer er der tydelige forskelle på adulte hunner og hanner. Det kan være mere vanskeligt at kønsbestemme subadulte individer.

Nedenstående skitseringer af henholdsvis hunnens og hannens reproduktive organer bygger på almindelig konk. Der er mindre arts-mæssige variationer, men overordnet set er placeringen af de enkelte organer de samme.

4.6.5.1.1 Hunnens reproduktive organer

Det gul-orange ovarie ligger oven på fordøjelseskirtlen i de sidste vindinger. Ovidukten forbinder ovariet med den palliale ovidukt, der består af æggehvidekirtel, sædgemme, ægkapsel-kirtel og bursa med den vaginale åbning. Disse organer ligger i forlængelse af hinanden på langs med kappehulen.

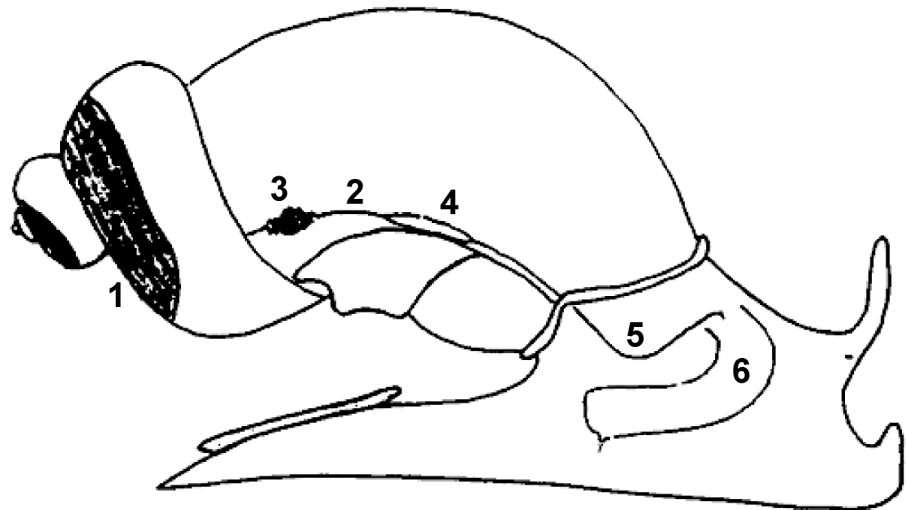


Figur 3 Hunnens reproduktive organer. 1) Ovarie, 2) Ovidukt, 3) Æggehvidekirtel, 4) Sædgemme, 5) Ægkapsel-kirtel, 6) Bursa.

Subadulte hunner kan kønsbestemmes på trods af ovarie og den palliale ovidukt ikke er udviklet. Med en skallængde > 30 mm (alm. konk) er ovidukten synlig som en tynd, lige streng, der løber oven på fordøjelseskirtlen og bøjer skarpt op mod den kommende æggehvidekirtel.

4.6.5.1.2 Hannens reproduktive organer

Det gul-orangerøde testis ligger ligesom ovariet hos hunnerne oven på fordøjelseskirtlen i de sidste vindinger. Sædlederen (vas deferens) løber fra testis til den seminale vesikel, der er en krøllet og foldet del af sædlederen lokaliseret i overfladen af fordøjelseskirtlen. Sædlederen løber videre gennem prostata kirtel på langs med kappehulen og derfra på overfladen af den øvre del af foden frem til penis. Penis er lokaliseret oven over den højre tentakel.



Figur 4 Hannens reproduktive organer. 1) Testis, 2) Sædleder (vas deferens), 3) Seminal vesikel, 4) Prostata kirtel, 5) Penis, 6) Penis duct.

Subadulte hanner kan kønsbestemmes på trods af at testis og den seminale vesikel ikke er udviklet. Ved en skallængde > 30 mm (alm. konk) er både penis og sædlederen synligt tilstede på overfladen af den øvre del af foden. Desuden kan det bemærkes at sædlederen løber som en tynd streng på overfladen af fordøjelseskirtlen og videre på langs med den komulære muskel.

4.6.5.2 Beskrivelse og karakterisering af imposexstadier

Imposexfænomenet defineres som "a superimposition of male characters onto females" (Smith 1971) og fremstår hos hunnerne af konksnegle primært som en udvikling af pseudopenis og/eller sædleder samme steds som hos hannerne, dvs. oven over den højre tentakel. Imposex hos konksnegle er et irreversibelt fænomen.

Udviklingen af imposex kan enten beskrives ud fra penislængde eller ved en stadietopdeling på baggrund af forskellige udviklingstrin, der karakteriseres ud fra hvor veludviklede pseudopenis og sædleder er. De langt udviklede stadier kan medføre sterilisering af hunner, som det bl.a. er observeret hos purpurneglen, idet den udviklede sædleder vokser henover den vaginale åbning og derved forhindrer æg-lægning (Bryan *et al.* 1987). Tilsvarende sterile stadier forekommer dog hverken hos dværgkonk eller almindelig konk (Stroben 1994, Mensink *et al.* 1997).

Nedenfor er angives de forskellige måder til at beskrive udviklingen af imposex samt de dertil hørende parameterværdier, der kan anvendes til at beskrive intensiteten af imposex i en gruppe af snegle.

Tilstedeværelsen af eventuelle imposexkarakterer undersøges nemmest, hvis kappehulen klippes op i venstre side og generende slim tørres væk med en serviet.

4.6.5.2.1 Penislængde

Penislængde af både hanner og hunner måles med stereolup med 0,1 mm's nøjagtighed. Længden af penis måles fra rod til spids.

Både den gennemsnitlige penislængde hos hunner (FPL) og relativ penislængde indeks (RPLI) udregnes. RPLI må betragtes som det bedste mål, da det kompenserer for eventuelle geografiske og tidslige variationer.

$$FPL = \Sigma \text{ penislængde hos hunner (mm) / antal hunner}$$

$$RPLI = 100\% * (\Sigma \text{ penislængde hos hunner/antal hunner}) / (\Sigma \text{ penislængde hos hanner/antal hanner})$$

Bemærk: Hvis intensiteten af imposex bestemmes hos purpursneglen anbefales det, at parameterværdien relativ penis størrelse indeks (RPSI = 100% * (RPLI/100)³) udregnes (JAMP 1997).

4.6.5.2.2 Vas deferens sekvens

Konksneglene studeres med stereolup.

De enkelte "vas deferens sekvens"-stadier (vds) beskrives ud fra, hvor veludviklet pseudopenis og vas deferens er. I bilag 1 er der vist skitser af de forskellige udviklingstrin.

Det skal bemærkes, at hos rødkonk og purpursnegl kan der forekomme andre morfologiske varianter af vds-stadier end i de bilag 1 beskrevne. Disse kan findes bl.a. i *Stroben 1994* og *JAMP 1997*.

Vas deferens sekvens indeks (VDSI) udregnes som middelværdien af imposexstadier i en gruppe af snegle.

$$VDSI = \Sigma \text{ imposexstadier af alle indsamlede hunner / antal hunner}$$

Forskelle på omkring 1 enhed mellem VDSI-værdier anses for at være signifikante (JAMP 1997).

4.6.5.2.3 Mensink sekvens

De enkelte "mensink sekvens"-stadier (ms) beskrives først og fremmest ud fra, hvor veludviklet pseudopenis er. I bilag 2 er der angivet skitser af de forskellige udviklingstrin (efter *Mensink et al. 1997*).

Denne metode skal kun anvendes ved karakterisering af imposexstadier hos almindelig konk. Det skal dog bemærkes, at karakteriseringen af grænsetilfælde mellem de enkelte stadier er vanskelig og bygger desværre i høj grad på den enkelte observatørs skøn.

Mensink sekvens indeks (MSI) udregnes som middelværdien af imposexstadier i en gruppe af snegle. Hvis vas deferens er tilstede i mere eller grad øges stadietværdien med værdien 0,5.

$$MSI = \Sigma \text{ imposexstadier af alle indsamlede hunner / antal hunner}$$

4.6.5.2.4 Andre synlige ændringer som følge af imposex

Der kan i langt udviklede imposexstadier forekomme andre synlige ændringer af de reproduktive organer (Fioroni *et al.* 1991). Deriblandt en krølning af ovidukt mellem ovarie og "albumin gland", eller en spaltning af pseudopenis, så den fremstår som en dobbelt penis.



Figur 5 a) En mindre krølning af ovidukt, b) en tydelig krølning af ovidukt, så den minder om hannernes seminale vesikel, c) dobbelt penis.

4.6.5.3 Aldersbestemmelse

Alderen af konksnegle er en væsentlig parameter, når intensiteten af imposex skal vurderes, dels ved relatering til et nutidigt TBT-niveau, dels ved sammenligning mellem geografiske og tidslige observationer. F.eks. almindelig konk kan blive ældre end 15 år, og da det tyder på at imposex primært udvikles i de første leveår (Mensink *et al.* 1997), kan det diskuteres om en given intensitet af imposex skyldes et tidligere eller "nutidigt" TBT-niveau.

Alderen hos konksnegle kan vurderes på 3 måder - ud fra kønsmodenhed, størrelse (skalhøjde), og i visse tilfælde ud fra antallet af årringe i skallåget.

Kun adulte konksnegle inden for et defineret størrelsesinterval (afhængigt af det geografiske område) anvendes ved udregning af parameterverdier. Derved frasorteres de yngste og ældste konksnegle. Med hensyn til almindelig konk defineres et størrelsesinterval, der omfatter adulte snegle med en alder på 3 - 10 år, hvilket vurderes på baggrund af antallet af årringe i skallåget (jf. afsnit 4.6.5.3.2 og 5.6.5.3.3).

4.6.5.3.1 Kønsmodenhed

Udelukkende adulte (kønsmodne) snegle skal indgå i datamaterialet.

Hos de konksnegle, der betragtes som adulte, er gonaden (ovarie eller testis) tydeligt gul eller orangerød og fremstår adskilt fra fordøjelseskirtlen. Hos subadulte snegle vil gonaen ikke være synlig. Bemærk at hvis konksneglene er inficeret med digene ikter (jf. afsnit 4.6) kan det påvirke de reproduktive organer betydeligt.

Alder for subadulte: 1 - 4 år (gældende for almindelig konk)

Alder for adulte: 2½ til ca. 15 år (gældende for almindelig konk)

4.6.5.3.2 Skalhøjde

Der udvælges et størrelsesinterval, da skalhøjden er et udemærket cirka-mål for alder. F.eks. for dværgkonk 15 - 25 mm og for almindelig konk 50 - 80 mm. Med hensyn til almindelig konk anbefales det at

størrelsesintervallet i det enkelte område udvælges på baggrund af årringe i skallåget (jf. afsnit 4.6.5.3.3).

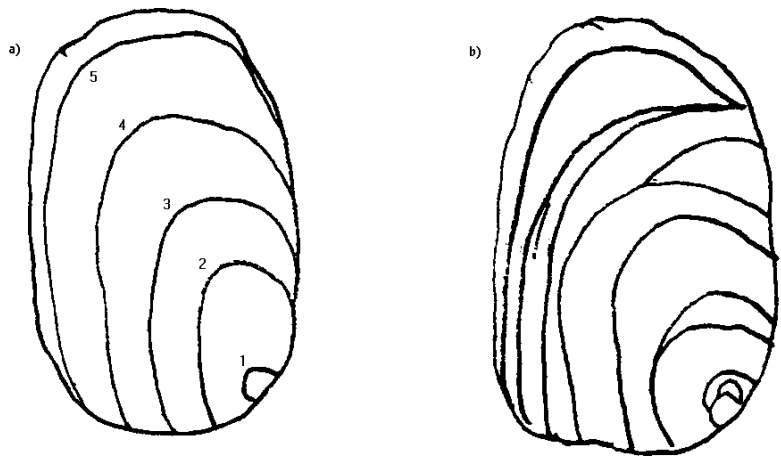
Bemærk: Højden af konksnegle afhænger bl.a. også af vandets salinitet i området. Der må derfor tages hensyn til geografiske variationer, når størrelsesintervallet fastlægges.

Skalhøjden måles med 0,1 mm's nøjagtighed med skydelære.

4.6.5.3.3 Årringe i skallåget

Hos almindelig konk og rødkonk kan det anbefales at antallet af årringe i skallåget (operculum) tælles efter at det er hevet af i et stykke af foden. Det kan i visse tilfælde være lettest at studere det tilbageværende aftryk på foden, hvor skallåget har siddet.

Antallet af årringe i skallåget er et udemærket mål for alder, idet de generelt repræsenterer en årlig tilvækst. Kun ca. 50% fremviser tydeligt adskilte årringe (Kideys 1996).



Figur 6 Årringe i skallåg. a) Tydeligt adskilte årringe (her 5 ≈ 5 år), b) Et ikke entydigt antal af årringe (alder = ?).

Angående almindelig konk: Kun konksnegle med en alder fra 3 til 10 år (dvs. 3 - 10 årringe) bør indgå i materialet. Derfor sammenholdes antallet af årringe med skalhøjden, hvorpå der på baggrund af det samlede materiale fra et område udvælges et interval mht. skalhøjde.

Antallet af årringe kan umiddelbart ikke så let at tælle hos de andre arter af konksnegle.

4.6.5.4 Infektion med parasitter

En eventuel tilstedeværelse af digene ikter (*Trematoda*) i gonade og/eller fordøjelseskirtel skal bemærkes, da konksnegle inficeret med digene ikter skal udelades fra datamaterialet.

Infektionen synes som en grålig hinde på fordøjelseskirtel eller gonade, i enkelte tilfælde som en hvid eller gullig plamage i fordøjelseskirtlen. Ved nærmere øjesyn er det 1 - 3 mm lange larver af miracidium-,

redie eller cercarie-stadie. Ca. 10% af populationen af almindelig konk må forventes at være inficeret med digene ikter, men der er betydelige geografiske variationer (Køie 1969).

Det kan diskuteres i hvor høj grad tilstedeværelsen af digene ikter vil kunne påvirke de forskellige parameterværdier for imposexintensiteter (Smith 1971, 1980) med undtagelse af RPLI, hvor det kan medføre en overestimering. Størrelsen af penis hos hanner kan blive mærkbart reduceret ved infektion med digene ikter (Køie 1969).

Bemærk: Infektioner med sporedyr (*Sporozoa*) og fimreorme (*Tubellaria*) forekommer hyppigt hos konksnegle, men disse former for infektioner ses der bort fra, da det tyder på, at de ikke påvirker de reproduktive organer (Køie 1969).

4.6.6 Kvalitetssikring

For at ensarte observationerne skal de angivne metoder i denne vejledning anvendes.

Derudover anbefales det, at der afholdes tilbagevendende workshops for at interkalibrere de forskellige observatørers karakteriseringer af imposexstadier. Præparater, billeder og diskussion er væsentlige elementer i workshoppen for at opnå en optimal ensartning af observationer.

Ved rapportering af data skal, der hvis muligt, henvises til deltagelse i nationale eller internationale workshops eller ringtests.

4.6.7 Dataindberetning

4.6.7.1 Stationsbeskrivelse

Følgende observationer noteres for hver station: Dato, position, dybde, afstand fra nærmeste større TBT-kilde(r) (havn eller sejlroute), fangstmetode, antallet af fangne konksnegle (antal hun/antal han).

Ved fangst af konksnegle med bomtrawl bør start- og slutposition og dybde noteres, samt bredde af trawl og størrelse af netmasker.

Stationerne samt mulige TBT-kilder inden for en afstand af 5 km indtegnes på et detaljeret kort.

4.6.7.2 Beskrivelse af den enkelte snegl

Følgende noteres for hver enkelt snegl (se også bilag 3): Skalhøjde, antal årringe i skallæg, køn, kønsmodenhed, penislængde, imposexstadier både ifølge vds og ms og eventuelle trematode-infektioner.

4.6.7.3 Udregning af parameterverdier

Følgende parameterverdier til beskrivelse af intensiteten af imposex i en gruppe af konksnegle udregnes: Frekvens (%), penislængde hos hunner (FPL), relativ penislængde indeks (RPLI), vas deferens sekvens indeks (VDSI) og Mensink sekvens indeks (MSI), også kaldet Penis Indeks (PI).

$$\text{Frekvens} = 100 \% * n_i / n_F$$

$$\text{FPL} = \Sigma pl_i / n_F$$

$$\text{RPLI} = 100\% * (\Sigma pl_i / n_F) / (\Sigma pl_M / n_M)$$

$$\text{VDSI} = \Sigma vds / n_F$$

$$\text{MSI} = \Sigma ms / n_F$$

hvor n_F er det totale antal af hunner

n_i er antallet af hunner med imposex

n_M er antallet af hanner

pl_i er længden af penis hos hunner med imposex

pl_M er længden af penis hos hanner

vds er imposexstadiet ud fra vas deferens sekvens

ms er imposexstadiet udfra Mensink sekvens

De 5 parameterverdier udregnes på en gruppe af konksnegle fra samme station. Der behøves 40 - 50 (minimum 30) konksnegle, hvoraf ca. halvdelen er hunner, i en gruppe for at kunne udregne pålidelige parameterverdier. For almindelig konk anbefales 100 konksnegle for stationer i åbne farvande (*JAMP 1997*). Kun konksnegle, der ikke er inficeret med digene ikter, skal indgå i materialet.

Angående dværgkonk: Adulte konksnegle med en skalhøjde inden for et defineret størrelsesinterval udvælges f.eks. 15 - 25 mm.

Angående almindelig konk: Adulte konksnegle med 3 - 10 årringe udvælges. Efter at antallet af årringe er sammenholdt med skalhøjden udvælges et interval mht. skalhøjde, f.eks. 50 - 80 mm.

Hvis datamaterialet er af en sådan størrelse, at parameterverdier også kan udregnes for subadulte konksnegle, kan dette anbefales.

4.6.8 Referencer

Bryan G. W., Gibbs P. E. Burt G. R. and Hummerstone L. G. 1987: The Effects of Tributyltin (TBT) Accumulation on adult dog-whelks, *Nucella lapillus*: Long-term field and laboratory experiments. – Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 6: 525-544.

Fioroni P., Oehlmann J. & Stroben E. 1991: The pseudohermaphroditism of prosobranchs; morphological aspects. – Zoologischer Anzeiger 226(1), 1-26.

Fretter V. & Graham A. 1985: The prosobranch molluscs of Britain and Denmark, part 8: Neogastropoda. – The Journal of Molluscan Studies supplement 15.

Harding M.J.C., Bailey S.K. & Davies I.M. 1992: UK Department of the Environment TBT imposex survey of the North Sea. Contract PECD 7/8/214, Annex 3: Denmark. – Scottish Fisheries Working Paper 12.

JAMP 1997: TBT-specific biological effect monitoring. – Joint Assessment Monitoring Programme, Technical annex 3. Revised 2003.

Kideys A. E. 1996: Determination of age and growth of *Buccinum undatum* L. (Gastropoda) off Douglas, Isle of Man. – Helgoländer Meeresuntersuchungen 50: 353-368.

Køie M 1969: On the endoparasites of *Buccinum undatum* L. with special reference to the trematodes. – Ophelia 6: 251-279.

Mensink B. P., van Hattum B., ten Hallers-Tjabbes C. C., Everaarts J. M., Kralt H., Vethaak A. D. & Boon J. P. 1997: Tributyltin causes imposex in the common whelk, *Buccinum undatum*. Mechanism and occurrence. – Nederlands Instituut voor Onderzoek der Zee, Rapport 6, Den Burg, Texel, the Netherlands.

Smith B. S. 1971: Sexuality in the american mud snail, *Nassarius obsoletus* Say. – Proceeding of the Malacological Society of London 39: 377-378.

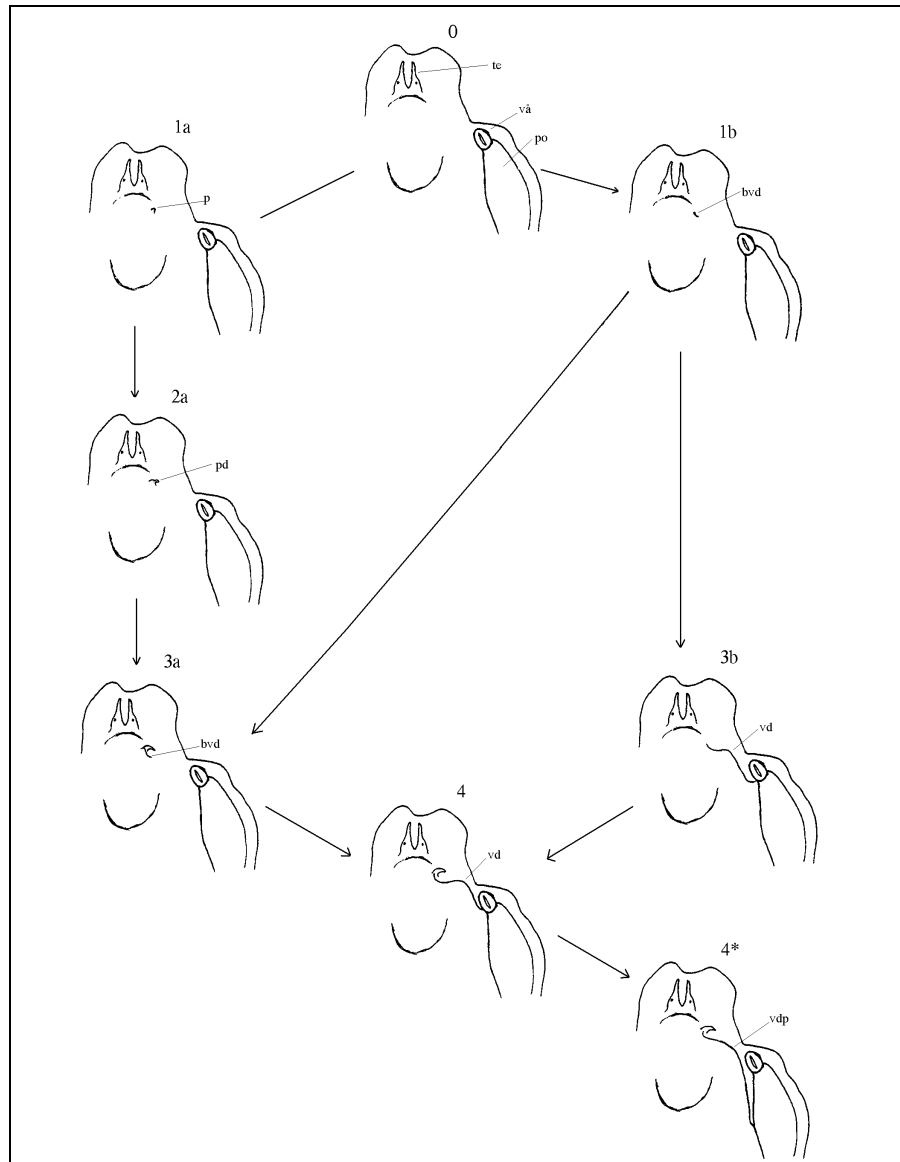
Smith B. S. 1980: The estuarine mud snail, *Nassarius obsoletus*: Abnormalities in the reproductive system. – Journal of Molluscan Studies 46: 247-256.

Strand J. & Jacobsen J.A. 2002: Imposex in two sublittoral neogastropods from the Kattegat and Skagerrak: the common whelk *Buccinum undatum* and the red whelk *Neptunea antiqua*. – Marine Ecology Progress Series 244: 171-177.

Stroben, E. 1994: Imposex und weitere effekte von chronischer TBT-intoxifikation bei einigen mesogastropoden und bucciniden (Gastropoda, Prosobranchia). Cuvillier Verlag, Göttingen, Tyskland.

4.6.9 Bilag 1

Udviklingen af imposex kan beskrives ud fra forskellige "vas deferens sekvens"-stadier. De nedenfor skitserede stadier kan forekomme hos dværgkonk og almindelig konk.



Figur 7 Vds-stadier 0 - 4* hos almindelig konk og dværgkonk. bvd: begyndende udvikling af vas deferens (sædleder), po: pallial ovidukt, vå: vaginal åbning, p: penis uden penisdukt, pd: penis med penisdukt, te: tentakel, vd: vas deferens, vdp: vas deferens løber forbi den vaginale åbning og videre ind under den palliale ovidukt.

Imposex stadietallet for type a og b ligestilles og kun "tallet" bruges til udregning af VDSI.

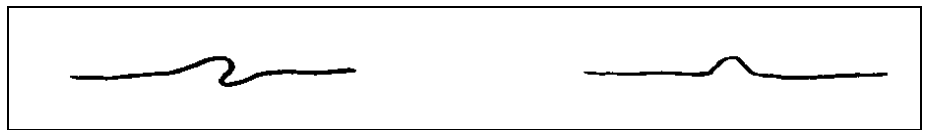
$$VDSI = \sum vds / n_f$$

hvor vds er de enkelte stadietallet og n_f er antallet af hunner.

4.6.10 Bilag 2

Udviklingen af imposex kan beskrives ud fra forskellige "Mensink sekvens"-stadier (efter *Mensink et al. 1997*) også kaldet "penis klassifikationsstadier". ms-stadier skal kun anvendes ved karakterisering af imposex hos almindelig konk, hvilket danner grundlag for beregning af Mensink Sekvens Indeks (MSI) også kaldet Penis Klassifikationsindekset (PCI).

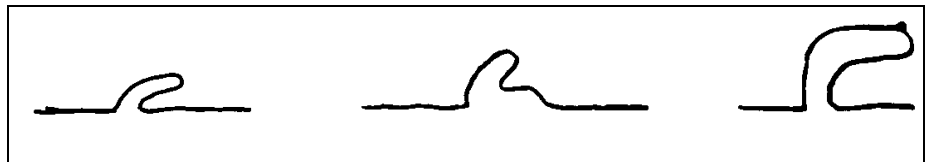
ms-stadie 0. Ingen imposexkarakterer er til stede hos hunnen.



ms-stadie 1. En mindre knop på "penis-site" oven over den højre tentakel. Penislængden er generelt mindre end 1.0 mm (alm. konk).



ms-stadie 2. Udvækst, der kan løftes op fra det underliggende epithelium.



ms-stadie 3. Penishomologen har begyndende penisfacon (begyndende krumning). Penislængden er generelt længere end 3 mm (alm. konk).

Hvis vas deferens (brudstykke eller hel) er til stede, angives det med værdien 0,5, dvs. under udregningen af MSI øges stadiet med 0,5.

$$MSI = \sum ms / n_f$$

hvor ms er de enkelte stadietværdier, og n_f er antallet af hunner.

4.6.12 Supplement - Bestemmelse af intersex hos almindelig strandsnegl

Formål

Forekomsten af intersexfænomenet hos almindelig strandsnegl (*Littorina littorea*) kan anvendes som alternativ til imposex hos dværgkonk, når der biomoniteres for tributyltin (TBT) i kystnære områder.

Intersex er ligesom imposexfænomenet en maskulinisering af hunner, men morfologisk set er der forskelle. Intersex giver sig udtryk som misdannelser af hunnens reproduktive organer eller i en decideret omdannelse af hunnens reproduktive organer til hanlige organer.

Intersexfænomenet betragtes i monitoringsøjemed som en mindre sensitiv parameter mht. TBT-niveauet sammenlignet med imposexfænomenet hos konksnegle (*Minchin et al. 1997*), hvorfor intersex kun bør anvendes som effektparameter, hvis dværgkonk ikke forekommer i det pågældende område. Hvis almindelig strandsnegl anvendes skal det ske efter aftale med det marine fagdatacenter.

Som supplement til intersex hos hunsnegle kan antallet af penial kirtler på penis hos hansegle også undersøges, da der indikationer på at antallet reduceres med stigende TBT-niveau (*Bauer et al. 1997, Sterling 2000*), men der behøves stadig en vis viden på dette område. Det tyder på, at penial kirtlerne kan belyse visse supplerende forhold sammenlignet med intersex. Det tyder dels på, at dette fænomen er reversibelt, så det i højere grad afspejler et mere nutidigt TBT-niveau, dels er antallet rimelig hurtigt at tælle, når man alligevel har fat i de enkelte snegle.

Denne tekniske anvisning er en modificering af *OSPAR 1997*.

Kriterier

Monitoringsområder lokaliseres i forhold til en kystnær punktkilde med TBT, dvs. en havn, marina eller skibsværft.

Det anbefales at der udvælges mindst 3 områder, der bør være lokaliseret på samme side af en forventet kilde, f.eks. i en afstand af 0-50, 500-600, 2500-10000 m for at kortlægge en eventuel gradient i forureningsniveauer mellem det højeste effektniveau og et lokalt baggrunds niveau.

Bemærk at afstandene mellem stationerne og TBT-kilden er mindre sammenlignet med situationen, hvor dværgkonk anvendes. Dette skyldes, at intersex hos strandsnegle er en mindre sensitiv effektparameter (*Minchin et al. 1997*).

Stationerne bør lægges udfra et lokalkendskab til bund- og strømforhold samt andre mulige TBT-kilder.

Selve stationerne skal være geografisk veldefinerede (DGPS), så det er muligt at gentage prøvetagningen for at følge eventuelle tidlige variationer.

Ved en vedvarende monitoring skal det efterstræbes, at tidspunktet for indsamlingen af snegle er det samme hvert år. Det anbefales, at indsamlingen foregår i periode marts - maj.

Principper

Der kan opstilles 3 forskellige parameterværdier til beskrivelse af intensiteten af intersex i en gruppe af almindelige strandsnegle, henholdsvis frekvens (%), intersex indeks (ISI) og gennemsnitlig længde af prostata kirtel hos hunner (FPrL). Alle 3 parameterværdier skal udregnes. Derudover kan penial kirtel indekset (PKI) udregnes for hansnegle udregnes, som et supplement til intersex hos hunsneglene.

Prøvetagning

Almindelig strandsnegl

Almindelig strandsnegl er udbredt overalt i de danske farvande helt ind i den vestlige Østersø. Den lever i tidevandszonen fortrinsvis på større sten og lignende fast underlag, men den kan også findes på sandbund.

Det skal indsamles ca. 50 individer per station.

Den almindelige strandsnegl kan forveksles med de beslægtede men mindre arter, levendefødende strandsnegl (*L. saxatilis*) og *L. neritoides*.

Fangstmetoder

Indsamlingen foregår lettest ved en manuel "plukning" af sneglene.

Transport og opbevaring

Strandsneglene opbevares og transporteres levende under kølige forhold. Sneglene kan holdes i live i en uge ved opbevaring i 5°C saltvand med lufttilførsel.

Bemærk: Opbevaring i sprit eller formalin må ikke finde sted før bestemmelsen af intersex er tilendebragt. Nedfrysning bør også undgås, men kan accepteres.

Håndtering

Skallen knækkes med en papegøjetang eller i en skruestik og blødelene udtages med pincet. De videre undersøgelser foregår med stereolup. Før sneglene undersøges bedøves de i 2 - 3 timer med en 7% MgCl₂-opløsning for at opnå maksimal afslapning af muskler.

Analysemetoder

Bestemmelse af køn

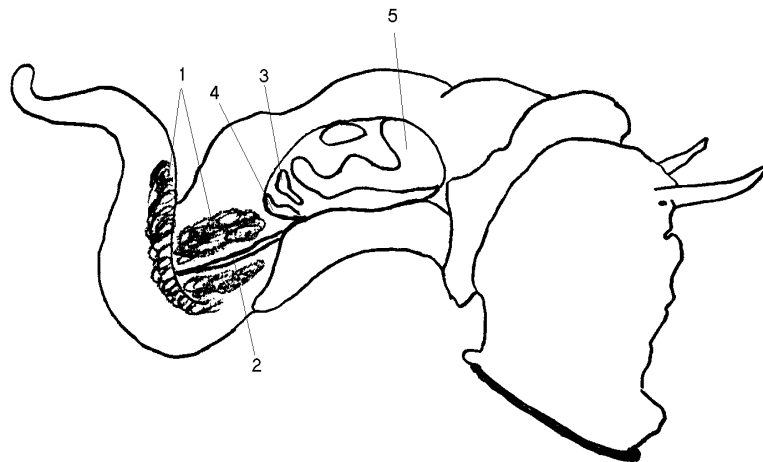
Almindelig strandsnegl er særkønnet og på trods af mulige intersex-karakterer er der forskelle på adulte hanner og hunner. Det kan være mere vanskeligt at kønsbestemme subadulte individer.

Nedenfor er henholdsvis hunnens og hannens reproduktive organer skitseret (se også bilag 5).

Hunnens reproduktive organer

De bedste kendetegn er hunnens lyserøde til mørkerøde ovarie, der ligger på langs med fordøjelseskirtlen, samt den rette (ikke krøllede) ovidukt (ofte fyldt med æg), der forbinder ovariet med den palliale ovidukt.

Den palliale ovidukt, der ligger på langs med kappehulen, består af æggehvidekirtel, sædgemme, ægkapselkirtel, "gelékirtel", bursa copulatrix og den vaginale åbning (se figur 8 samt bilag 4).

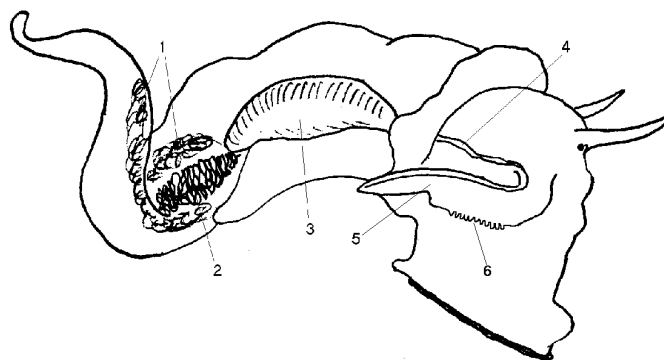


Figur 8 Hunnens reproduktive organer. 1) ovarie, 2) ovidukt, 3) æggehvidekirtel, 4) sædgemme, 5) ægkapselkirtel.

Hannens reproduktive organer

De bedste kendetegn er hannens gule testis, der ligger sammen med fordøjelseskirtlen, samt den krøllede seminale vesikel, der forbinder testis til prostata kirtlen.

Prostata kirtlen, der ligger på langs med kappehulen er kløvet med en sædrende, der løber videre til penis. Penis er placeret lige ved højre tentakel. Penialkirtlerne sidder som knopper på ydersiden af penis (se figur 9).



Figur 9 Hannens reproduktive organer. 1) testis, 2) seminal vesikel, 3) prostata kirtel, 4) sædrende, 5) penis og 6) penial kirtler på penis.

Bemærk: Hannerne kan i visse tilfælde helt afstøde deres penis (Deutsch & Fioroni 1992).

Beskrivelse og karakterisering af intersexstadier

Intersexfænomenet hos strandsnegle er en gradvis ændring af hannerne palliale ovidukt hen i mod en decideret omdannelse til en maskulin prostata kirtel samt udvikling af penis og sædrende.

Udviklingen af intersex kan enten beskrives ved en stadienddeling af de forskellige udviklingstrin for maskuliniseringen af den palliale ovidukt, eller ud fra længden af den eventuelt dannede prostata kirtel.

Eventuelle intersexkarakterer undersøges nemmest ved først at studere den palliale ovidukt fra oversiden af kappen for eventuelle begyndende dannelser af prostatakirtel. Derpå klippes kappehulen op i venstre side, så eventuelle spaltninger af den palliale ovidukt kan studeres fra indersiden af kappen.

Derudover kan antallet af penialkirtler på penis hos hansnegle tælles som supplement til intersex hos hunsnegle. Penialkirtlerne sidder som knopper på ydersiden af penis.

Intersex indeks

Intersexfænomenet kan karakteriseres ud fra 5 intersexstadier (isi). De enkelte stadier karakteriseres ved, hvor maskuliniseret den palliale ovidukt er. I bilag 4 er der vist skitser af de forskellige udviklingstrin (Bauer et al. 1995).

Stadie 0: Normal hun uden morfologiske ændringer.

Stadie 1: Den vaginale åbning er forstørret med et mindre snit og bursa copulatrix er splittet på langs.

Stadie 2: Hele den palliale ovidukt er splittet med mere end 2/3 på langs af en åben rende.

Stadie 3: Begyndende til fuldt udviklet prostatakirtel. En begyndende udvikling af prostatakirtel ses bedst uden på kappen, som deformiteter i den palliale ovidukt, der synes som en hvid plamage i géle- og ægkapselkirtel. Alternativt kan den palliale ovidukt være spaltet i hele sin længde. Bemærk at en begyndende udvikling af prostatakirtel kan finde sted selvom, at den palliale ovidukt kun blevet splittet svarende til stadie 1 og 2. Stadiet skal alligevel karakteriseres som stadie 3.

Stadie 4: En sædrende løber fra den dannede prostata kirtel og hen til en dannet penis oven over højre tentakel, samme steds som hos hanner. Stadie 4 forekommer kun i særdeles TBT-belastede områder.

Der kan udregnes et intersex indeks (ISI), der beskriver intensiteten af intersex i en gruppe af snegle. ISI udregnes som middelværdien af intersexstadier.

$$ISI = \Sigma \text{ intersexstadier af alle indsamlede hunner} / \text{ antal hunner}$$

ISI-værdier større end 1.0 indikerer, at en vis del af hunnerne er steriliseret på grund af udviklingen af intersex. Strandsnegle med isi-stadierne 2 - 4 anses for at være sterile (*Bauer et al. 1995*).

Forskelle på 0,5 enhed mellem ISI-værdier anses for at være signifikante.

Gennemsnitlig længde af prostata kirtel hos hunner

Længden af en eventuelt dannet prostata kirtel måles på langs med 0.1 mm's nøjagtighed med stereolup. Prostata kirtlen er kun tilstede i de sterile isi-stadier 3 og 4.

Parameterværdien, gennemsnitlig længde af prostata kirtel hos hunner (FPrL), udregnes som middellængden af prostata kirtlen hos alle hunner.

$$FPrL = \Sigma \text{ længde af prostata kirtel hos alle indsamlede hunner} / \text{ antal hunner}$$

FPrL-værdier større end 0.0 indikerer, at en hvis del af hunnerne er sterile.

Penial Kirtel Indeks

Antallet af penialkirtler på penis hos hanner tælles med brug af stereomikroskop. Hvis der presses om penis med en pincet kommer penialkirtlerne tydelige frem, hvorpå de er lettere at tælle. I meget belastede områder har hannerne ingen eller kun få penialkirtler, hvorimod i lavt belastede områder kan de have op til 25 - 40 penialkirtler.

Der kan udregnes et penial kirtel indeks (PKI), der er gennemsnitsværdien for antallet af penialkirtler (PKI) hos samtlige undersøgte

hanner. Hanner der har afstødt deres penis eller hvor penis kun er mindre udviklet bør ekskluderes fra denne udregning.

$PKI = \Sigma$ antallet af penialkirtler hos alle indsamlede hanner / antal hanner

Aldersbestemmelse

Alderen af strandsnegle er en væsentlig parameter, når intensiteten af imposex skal vurderes, dels ved relatering til et nutidigt TBT-niveau, dels ved sammenligning mellem geografiske og tidslige observationer. Almindelig strandsnegl kan blive op mod 10 år gamle, og da det tyder på at intersex primært udvikles i de første leveår (*Bauer et al. 1997*), kan det diskuteres om en given intensitet af intersex skyldes et tidligere eller "nutidigt" TBT-niveau.

Alderen hos almindelig strandsnegl vurderes på baggrund af kønsmodenhed og skalhøjde.

Kun adulte hunner af strandsnegle (med synligt rødligt ovarie) inden for et defineret størrelsesinterval på 15 - 25 mm anvendes ved udregning af parameterværdier. Derved frasorteres de yngste og ældste strandsnegle. Det anslås, at strandsnegle inden for dette størrelsesinterval ikke er ældre end 2 år (*OSPAR 1997*).

Skalhøjden måles med 0,1 mm's nøjagtighed med skydelære.

Parasit-infektioner

Strandsnegle inficeret med digene ikter (*Trematoda*) skal udelades af materialet, da sådanne infektioner kan påvirke udviklingen af de reproduktive organer (*Lauckner 1980*).

Strandsnegle med eroderede skaller, f.eks. på grund af spioniden, *Polydora ciliata* eller ruer bør også frasorteres. Især gamle strandsnegle kan være helt afgnavede i toppen af skallen.

Kvalitetssikring

For at ensarte observationerne skal de angivne metoder i denne vejledning anvendes.

Der vil blive afholdt tilbagevendende workshops, hvor de udførende institutioner skal deltage for at interkalibrere de forskellige observatørers karakterisering af intersexstadier. Præparater, billeder og diskussion er væsentlige elementer i workshoppen for at opnå en optimal sammenlignelighed af observationer.

Ved rapportering af data skal der, hvis muligt, henvises til deltagelse i nationale eller internationale workshops eller ringtests.

Hvis der forekommer afvigelser fra denne vejledning, skal det indberettes til det marine fagdatacenter.

Dataindberetning

Stationsbeskrivelse

Følgende observationer noteres for hver station: Dato, position, dybde, afstand fra nærmeste større TBT-kilde(r) (havn eller marina), antallet af indsamlede strandsnegle (antal hun/antal han).

Stationerne samt mulige TBT-kilder inden for en afstand af 5 km indtegnes på et detaljeret kort.

Beskrivelse af den enkelte snegl

Følgende noteres om hver enkelt snegl (se også bilag 6): Skalhøjde, køn, kønsmodenhed, intersexstadier, længde af prostata kirtel hos hunner og forekomsten af eventuelle trematode-infektioner.

Udregning af parameterverdier

Frekvens (%) med intersexkarakterer, intersex indeks (ISI) og den gennemsnitlige længde af prostata kirtel (FPrL) udregnes på baggrund 40 - 50 (ca. 20 hunner) strandsnegle fra samme station. På tilsvarende måde udrenes penial kirtel indeks (PKI) for hansnegle.

$$\text{Frekvens} = 100\% * n_i / n_f$$

$$\text{ISI} = \Sigma \text{isi} / n_f$$

$$\text{FPrL} = \Sigma \text{prl}_i / n_f$$

$$\text{PKI} = \Sigma \text{pki} / n_h$$

hvor n_f er det totale antal af hunner

n_h er antallet af hanner

n_i er antallet af hunner med intersex

prl_i er længden af prostata kirtel hos hunner med intersex

pki er antallet af penial kirtler hos de enkelte hanner.

Kun adulte strandsnegle inden for størrelsesintervallet 15 - 25 mm, der ikke er inficeret med digene ikter, skal indgå i materialet.

Referencer

Bauer B., Fioroni P., Ide I., Liebe S., Oehlmann J., Stroben E. & Watermann B. 1995: TBT effects on the female genital system of *Littorina littorea*: A possible indicator of tributyltin pollution. – *Hydrobiologia* 309: 15-27.

Bauer B., Fioroni P., Schulte-Oehlman U., Oehlmann J. & Kalbfus W. 1997: The use of *Littorea littorina* for tributyltin (TBT) effect monitoring - Results from the German TBT survey 1994/1995 and laboratory experiments. – Environmental Pollution 96(3): 299-309.

Deutsch U. & Fioroni P. 1992. The shedding of the penis in *Littorina littorea*: Some new aspects. – Proceedings of the third International Symposium on Littorinid Biology, p. 309-311.

Lauckner G. 1980: Diseases of Mollusca: Gastropoda. – I: Kinne, O. (Ed.); Diseases of marine animals, Vol. I. John Wiley & Sons, NY, USA, pp. 311-424.

Minchin D., Bauer B., Oehlmann J., Schulte-Oehlmann U. & Duggan C. B. 1997: Biological indicators used to map organotin contamination from a fishing port, Killybergs, Ireland. – Marine Pollution Bulletin 34(4): 235-243.

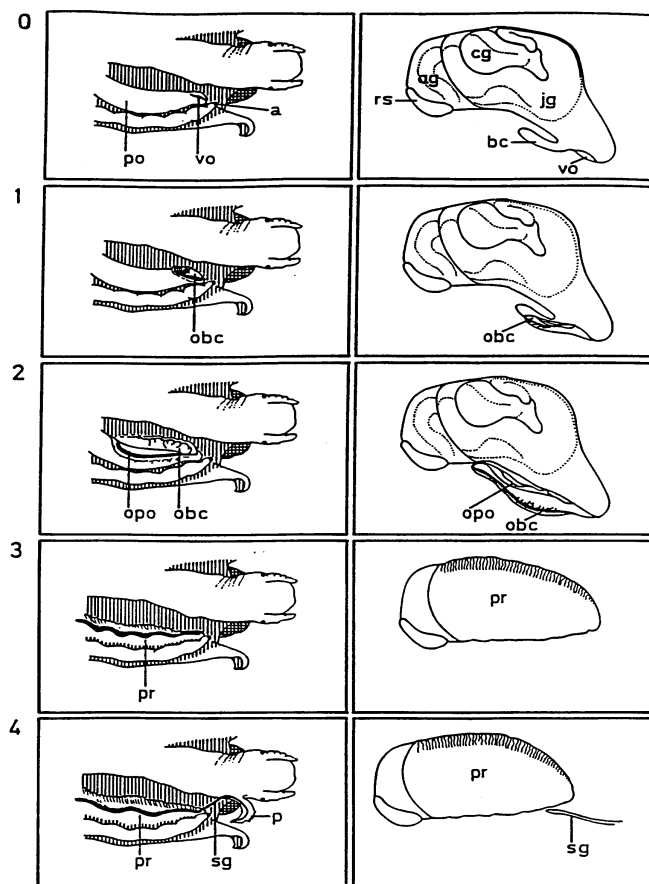
OSPAR 1996: Draft guidelines for TBT-specific biological effects monitoring. – Oslo and Paris conventions for the prevention of marine pollution ad hoc working group on monitoring, Stockholm, 4 - 8 nov.

OSPAR 1997: OSPAR Working Group on concentrations, trends and effects of substances in the marine environment (SIME). – Report on the TBT Training Workshop, Aberdeen Scotland, 24 - 26 September.

Sterling P. 2000: Effekter af tributyltin (TBT) på køns karakterer hos strandsneglen *Littorina littorea*. – Specialrapport fra Odense Universitet, Biologisk Institut.

4.6.13 Bilag 4

Udviklingen af intersex kan beskrives ud fra intersexstadierne 0 - 4 (OSPAR 1996).



Figur 10 Skematisk udvikling af intersex hos almindelig strandsnegl. a: anus, ag: albumin gland, bc: bursa copulatrix, cg: capsule gland, jg: jelly gland, obc: open bursa copulatrix, opo: open pallial oviduct, p: penis, po: pallial oviduct, pr: prostate gland, rs: receptaculum seminis, sg: sperm groove, vo: vaginal opening (OSPAR 1996).

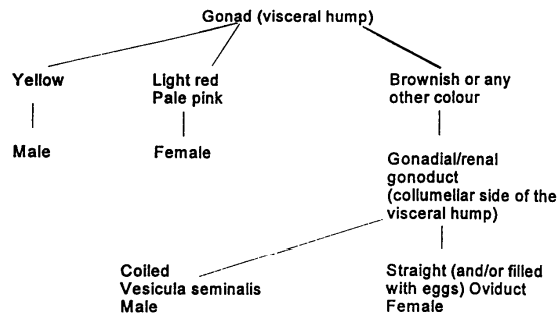
$$ISI = \sum isi / n_f$$

hvor isi er de enkelte stadietværdier og n_f er antallet af hunner.

4.6.14 Bilag 5

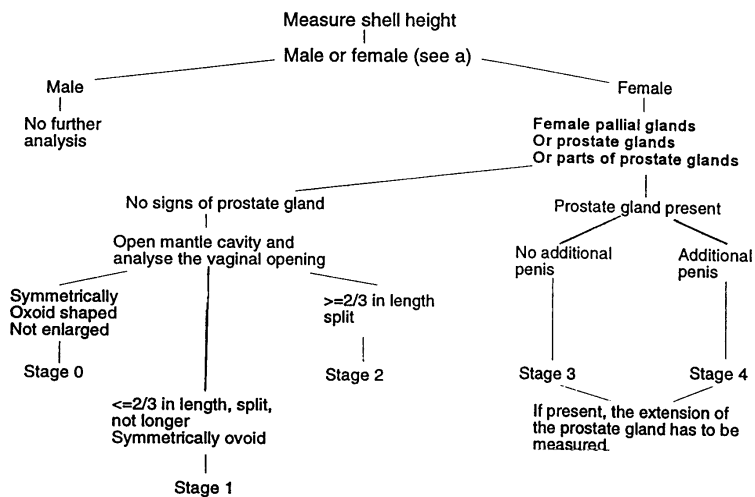
Skematisk beskrivelse af forskelle i a) køn og b) intersexstadier hos almindelig strandsnegl (*L. littorina*) (OSPAR 1997).

a) Separation of the sexes



b) Identification of the intersex stages

Identification showing how to distinguish between the sexes (a) of *Littorina littorea* and the intersex stages (b).



Samlet parameterliste for imposex og intersex

	<i>Nucella</i>	<i>Buccinum</i>	<i>Neptunea</i>	<i>Hinia</i>	<i>Littorina</i>
Andel af hunner med imposex eller intersex (%)	1	1	1	1	1
Vas Deferens Sequence Index (VDSI)	1	1	1	1	
Andelen af sterile hunner (%)	1				1
Relative Penis Size Index (RPSI)	1			1	
Relative Penis Length Index (RPLI)				1	
Intersex Stage Index (ISI)					1
Middellængde af prostatakirtel i hunner (FPrL)					1
Middelantallet af penial kirtler i hanner (PKI)					1
Mensink Sekvens Index (MSI)		1			