

Etablering av test system til evaluering av påvirkning av utslipp fra petroleumsindustrien på arktiske og subarktiske arter av hoppekreps

Av Louise Kiel Jensen¹⁾, JoLynn Carroll¹⁾, Gunnar Pedersen¹⁾, Ketil Hylland²⁾ og Torgeir Bakke²⁾

1) Akvaplan NIVA

2) Norsk institutt for vannforskning (NIVA)

English summary

Establishing a test system for chronic exposure of arctic and subarctic copepod species to offshore discharges.

In order to assess the potential harm caused by chronic exposures to chemicals from the petroleum industry to the pelagic environment, we have established a laboratory culturing system that allows us to make available copepods for experimental use over multiple stages of development. Copepods, especially *Calanus*-species found at high latitudes, play a key role in the energy transfer from primary producers to higher-level secondary producers. Because of the dilution effects at sea, copepods experience chronic exposure to sublethal levels of contaminants which may have a long-term effect on individuals. Long-term exposure

studies on copepods are difficult to conduct in the field and therefore laboratory experiments present a viable alternative method of investigation. Using this newly developed culturing system we are able to maintain copepods for experimental use over multiple generations. A test system will be used in the future to assess the impact of different chemicals to pelagic, mainly arctic or subarctic copepods.

Sammendrag

For å evaluere mulige skadevirkninger av kronisk påvirkning av kjemikalier utledet fra oljeindustrien til det pelagiske miljø, har vi etablert kulturer med hoppekreps slik at vi har disse tilgjengelig for forsøk til enhver tid. Hoppekreps, og i våre områder hovedsakelig *Calanus*-arter, er viktige for energioverføringen fra primær- til

høyerestående sekundær-produserter. Grunnet fortynningseffekten i havet, vil hoppekrepser sannsynligvis bli utsatt for kroniske subletale doser av forurensningsstoffer som kan ha langtidseffekter på individene. Det er ikke mulig å følge hoppekrepser i havet for å kunne evaluere de potensielle skadelige effekter av en slik eksponering, og et mulig alternativ er derfor å utføre langtidsforsøk i laboratoriet. Ved å bruke kultursystemet utviklet her, kan vi holde hoppekrepser for forsøk over generasjoner. Et testsystem vil i fremtiden bli brukt for å evaluere påvirkningen fra forskjellige kjemikalier på hovedsakelig arktiske og subarktiske hoppekrepser.

Innledning

De senere år har det skjedd endringer av produksjonsmetodene på olje- og gass-installasjonene på norsk sokkel. I Nordsjøen har de fleste installasjoner blitt produksjonsfelt, og når disse blir eldre, øker utslippene av produsert vann, noe som vil fortsette de neste 10-15 år (OED 2002). Dessuten har det vært en overgang fra olje- til vannbasert boreveske, som grunnet større blandbarhet med vann vil bli spredd lengre og dermed ha en forholdsvis større påvirkning på pelagialen (Røe, 1998; Røe Utvik og Johnsen, 1999). I Barentshavet er det nå åpnet for prøveboring, og retningslinjene for operasjoner i dette område er bestemt til å være "null fysisk utslipp" (OED 2003). Dette betyr at mulig risiko for oljeforurensning i dette område skal være redusert til utslipp i forbindelse med lekkasjer ved uhell samt oljespill fra båt.

Pelagiske krepsdyr som hoppekrepser og krill er nøkkelarter når det gjelder energioverføring mellom primærproduzentene og høyere trofiske nivå. En særlig viktig art innen mesozooplanktonet i norske farvann er hoppekrepser *Calanus finmarchicus*, som utgjør hovedbestanddelen både i antall og biomasse (Wiborg, 1976; Tande 1989). Tradisjonelt har denne arten blitt ansett for å være ren herbivor, men senere års forskning har vist at den bør anses som omnivor (Harris, 1996). Dog er vår oppblomstringen i mars og april veldig viktig for *C. finmarchicus*, da den her genererer nok energi til å produsere årets første, og i områdene nord for Lofoten, årets eneste generasjon etter å ha vært i diapause som CIV eller CV (se neste setning) hele vinteren (Tande, 1982). I løpet av våren og sommeren går individene gjennom en utvikling med seks naupliestadier (NI-NVI), og der etter seks kopepodittstadier (CI-CVI), hvorav det siste er adultstadiet.

Grunnet nøkkelrollen i energioverføring som *Calanus* har, samt en gradvis større påvirkning av det pelagiske miljø fra oljeindustrien, er det fremover veldig viktig å forstå hvorledes disse dyr responderer på utslipp fra oljeinstallasjonene og andre relaterte forurensningskilder. Grunnet fortynningseffekten i sjøen, forventes det at zooplanktonet utsettes for subletale doser, som muligens kan gi langtidseffekter hos individene. Dette gjelder kanskje særlig i de nordlige områder, hvor denne arten har en ettårig livssyklus, og dermed potensielt lengre eksponeringstid, mot lengre sør, hvor

det finnes 2-3 generasjoner pr år. Det er ikke mulig å følge enkeltindivider av zooplankton i havet, og vi må derfor utføre forsøk i laboratorium for å undersøke mulige effekter.

For å kunne utføre langtidforsøk i laboratorium, må man ha erfaring med å holde dyrene i live gjennom lengre tid. Vi holder derfor på med å bygge opp et system for å holde hoppekreps i kultur over generasjoner. Etter det vi kjenner til, har det før lyktes å ha *C. finmarchicus* i kultur over nærmere 2 generasjoner (Campbell et al., 2001; Hansen et al. 2003). Begge disse studiene har fulgt en generasjon (egg-CVI), for deretter å måle eggproduksjonen hos adulte hunner.

Calanus i kultur

Metoden som ble brukt for å se hvordan oppveksten av *Calanus finmarchicus* arter seg i kultur var et enkelt statisk system, som hovedsakelig besto av flere 100 l polypropylen stamper. *C. finmarchicus* har før blitt holdt i et lignende system i nærmere to generasjoner (Campbell et al. 2001), og fordelene med å bruke et relativt stort volum er at det ikke så lett blir kontaminering av vannet. Kulturene ble startet i mars 2004 av dyr hentet i Grøtsundet nær Tromsø (68°N 19°Ø). Disse ble plassert i kjølerom på Havbruksstasjonen i Tromsø og basert på temperaturen på inntaksvannet ble temperaturen satt til 5 °C. Lyset i rommet var dempet, og lysregimet ble satt til lys:mørke 14:10. Utgangskulturer besto av 25 % Copepodit V, 65% adulte hunner og 10 % adulte hanner og konsentrasjonen var omtrent 10 individer l⁻¹.

Chaetoceros socialis ble brukt som fødekilde, og de ble dyrket i 25 l polyetylen plastposer. Næringstilsetning fra Substral® og silikat samt lys:mørke regime på 14:10 timer sikret god vekst i kulturene. Hoppekrepsene i hver stamp ble foret med 1*10⁸ celler (~18 µg C l⁻¹, karboninnhold i diatomeer: 0.11 pg C µm⁻³ (Strathmann, 1967)) *C. socialis* daglig.

Hver dag ble stampene rensed ved sifonering fra bunnen med en sifong med 300 µm planktonnett montert på for å hindre at kopepoditt-stadiene kom med ut. Dessuten ble vannet ført gjennom en sil med 50 µm planktonnett for å samle opp egg og fekaliepellets. Innholdet fra silen ble undersøkt i lupe for å sjekke forholdet mellom fekaliepellets og nedsunkne alger, samt om det fantes egg. Hvis det finnes mye nedsunkne alger, tyder det på at hoppekrepsen blir overført, hvilket igjen kan gi kontaminering, grunnet større mengde organisk materiale i stampen enn nødvendig.

Hvis det ble funnet egg ble disse plukket med pipette og tilsatt en egen stamp. Alle egg samlet inn i samme uke (i ukene 13-22, hvorav dyrene i stampene fra uke 13 og 16 døde ut tidlig, og disse er derfor ikke behandlet videre) ble overført til samme stamp. Startkonsentrasjonene varierte mellom 18-67 egg l⁻¹. Fordi verken egg eller de to første naupliestadiene tar til seg næring, ble foring startet 4 dager etter oppstarten av en ny stamp. Konsentrasjonen av tilsatt føde ble økt etter hvert, og de sene kopepodittstadier ble foret like mye som de adulte. Temperaturen ble gradvis økt

til 8 °C i slutten av juni (Uke 27) for å følge den naturlige endring i temperaturen på inntaksvannet på Havbruksstasjonen.

Stadiefordeling i Generasjon 1

Stadiefordelingen i de nye stampene ble overvåket ved å ta ut prøver omtrent hver tredje uke, og Figur 1 viser stadiefordelingen i de forskjellige stamper over tid. På denne figuren ser vi at det fantes voksne individer i alle stampene den siste uke disse ble overvåket (= Uke 35), og man kan også fra disse grafene avlese median utviklingstid, som er det tidspunkt hvor 50 % av individene har oppnådd adultstadiet (Hansen et al., 2003). Median utviklingstid er også oppført i Tabell 1, hvor verdiene for de to stamper fra uke 17 er slått sammen, fordi utviklingstiden var den samme, samt at uke 21/22 er utelatt, da vi ikke oppnådde 50 % adulte her. Gjennomsnittlig utviklingstid for hoppekrepsene i alle stamper var 15 uker, og man ser at de stamper som ble startet sist har en kortere utviklingstid enn de eldste. Vi undersøkte da hvor mange uker det hadde gått siden temperaturøkningen i Uke 27 til median utviklingstid var oppnådd, og dette antall er gitt nederst i Tabell 1. Her ser vi at alle stampene brukte 5-6 uker etter temperaturøkningen på å nå 50 % adulte, uavhengig av hvor langt de hadde kommet i utviklingen i uke 27. For eksempel, av de eggene som var blitt plukket i Uke 14 hadde ca 33 % utviklet seg til CIV, mens 67 % av individene var i stadiet CV, da temperaturen ble øket (Figur 1, Oppstarts-

uke 14, uke 13 etter oppstart), mens de eggene som var samlet i Uke 20 da hadde utviklet seg til hovedsakelig NV (~67 %), mens det også fantes noen CI (~33 %) (Figur 1, Oppstartsuke 20, uke 7 etter oppstart). Utviklingstiden gjennom de siste stadier var altså atskillig kortere for individene fra Uke 20 enn for de fra Uke 14.

Diskusjon

Sammenlignet med en studie gjort på utviklingstiden hos *Calanus finmarchicus* i mesokosmos nær Tromsø (Hansen et al., 2003), synes vår median generasjonstid på 105 dager å være svært realistisk. Hansen et al. (2003) fant en median generasjonstid på 91-128 dager, hvilket fremholdes som usikre estimater, da mindre enn 30 % av individene hadde nådd voksenstadiet ved avslutning av forsøket. Dette kan eventuelt skyldes at den naturlige syklus med å gå i diapause som CIV eller CV ble opprettholdt. I en annet studie gjennomført på utviklingstid i forhold til temperatur i et lukket statisk system, fant Campbell et al. (2001) en median utviklingstid på ~90, ~43 og ~30 dager ved henholdsvis 4, 8 og 12 °C og en fødekonsentrasjon på 500 µg C l⁻¹ (deres Figur 5, kolonnen til venstre). Dette forsøk ble gjennomført på individer hentet mellom Cape Cod og Georges Bank, USA, noe som kan være årsaken til noe av forskjellen mellom utviklingstidene i de to forsøkene. Det som er verd å merke seg ved disse resultatene er den store forskjellen mellom utviklingstiden ved 4 og 8 °C. Med en så stor forskjell mellom ellers likt behandlede individer,

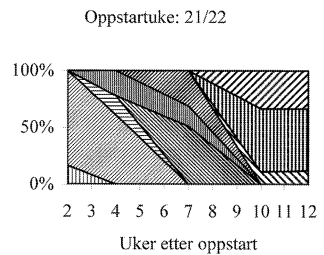
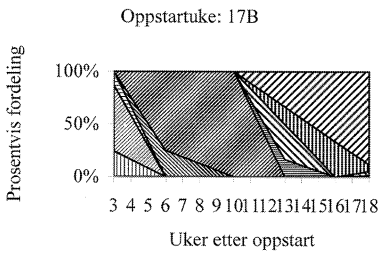
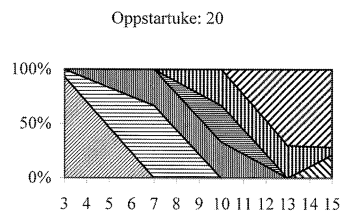
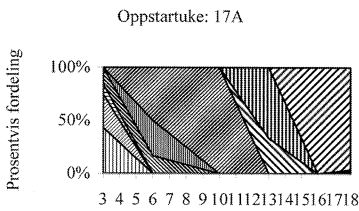
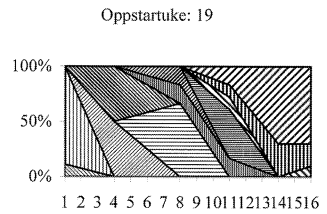
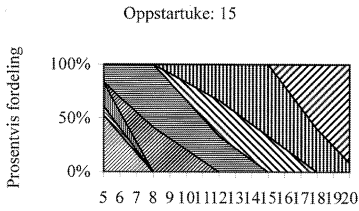
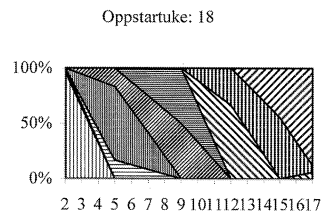
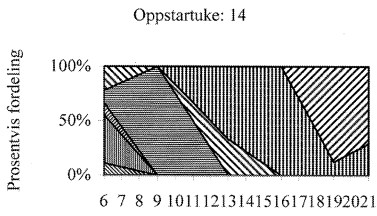
er det tydelig at temperatur har stor påvirkning på utviklingstiden hos *C. finmarchicus* og dette kan også være en mulig forklaring på resultatene fra våre kulturer. Her var utviklingstiden etter temperaturøkningen omtrent den samme uavhengig av hvilke stadier som dominerte før temperaturøkningen, og det synes derfor som om en temperaturøkning har større innvirkning på generasjonstiden jo tidligere den finner sted.

En annen faktor som kan ha betydning for generasjonstiden hos *C. finmarchicus* er fødetilgangen. I samme forsøk av Campbell et al. (2001), ble det funnet en median utviklingstid for *C. finmarchicus* ved 8 °C, på 79, 63 og 45 dager, når de fikk tilbudt henholdsvis 25, 50 og 500 $\mu\text{g C l}^{-1}$ (deres Figur 5, kolonnen til høyre). Om virkningen av fødetilgangen ikke er så stor som temperaturen, er den dog betydelig. Dette betyr at vi kanskje kunne ha oppnådd en lavere median utviklingstid ved å øke fødemengden fra de 18 $\mu\text{g C l}^{-1}$, som var maksimum i våre kulturer. Å øke konsentrasjonene er den eneste realistiske måte å oppnå en lavere generasjonstid på, hvis vi vil opprettholde vårt ønske om å kultivere arktiske hoppekreps, fordi en ytterligere temperaturøkning er urealistisk. Dette vil muligens bety en litt høyere

risiko for kontaminering i stamperne, som kan unngås ved å være nøye med det daglige renhold, samt å bytte stamper oftere. Dessuten viste undersøkelser av materialet som var blitt samlet i 50 mm silen, at det ikke var overskudd av alger når konsentrasjonene ble holdt under 18 $\mu\text{g C l}^{-1}$.

En økning i fødekonsentrasjonen vil også være med på å sikre videre drift av kulturene, da det er kjent at en lav fødemengde gir en høy dominans av hunner (Irigoiien et al., 2000). I uke 35 da den siste registrering av stadiefordelingen ble foretatt, fantes det veldig få hanner blant de adulte individene. Vi hadde en vis reproduksjon hos 1. generasjonshunnene, og det ble funnet individer opp til stadiet CI, men antallet var dessverre ikke høyt nok til å opprettholde kulturene videre.

Vi har i løpet av dette prosjekt vist at det er mulig å holde *C. finmarchicus* i kultur, og har samlet erfaring for å kunne gjennomføre eksperimenter for å undersøke langtidsvirkningene av ulike kjemikalier fra oljeindustrien på *C. finmarchicus*. Vi har sett hvordan temperatur og fødetilgang har innvirkning på generasjonstiden, og kan bruke denne viten for å optimalisere både kulturer og gjennomføring av forsøk.



■ NII ■ NIII ■ NIV ■ NV ■ NVI ■ CI ■ CII ■ CIII ■ CIV ■ CV ■ CVI

Figur 1: Stadiefordeling over tid av *Calanus finmarchicus* i de forskjellige oppstartsuken. Der er forskjell på skalaen på x-aksen, da denne angir hvor mange uker det har gått siden oppstart av den gitte stamp. Stadieforklaringene er like, og finnes nederst på figuren.

Tabell 1: Oversikt over median utviklingstiden (tid til 50 % av individer er adulte) i de forskjellige stamper, samt hvor mange uker det går mellom temperaturøkningen i kjølerommet og at 50 % av individene har oppnådd adultstadiet.

	Oppstartsuke 14	Oppstartsuke 15	Oppstartsuke 17	Oppstartsuke 18	Oppstartsuke 19	Oppstartsuke 20
Antall uker til 50 % adulte	18	18	15	15	13	12
Antall uker etter tempe- raturøkning at 50 % er adulte	5	6	5	6	5	5

Referanseliste:

Campbell, R. G., Wagner, M. M., Teegarden, G. J., Boudreau, C. A., Durbin, E. G. (2001) Growth and development rates of the copepod *Calanus finmarchicus* reared in the laboratory. Mar. Ecol. Prog. Ser., 221:161-183.

Hansen, B. W., Marker, T., Andreassen, P., Arashkewich, E., Carlotti, F., Lindeque, P., Tande, K. S., Wagner, M. (2003) Differences in life-cycle traits of *Calanus finmarchicus* originating from 60 °N and 69 °N, when reared in mesocosms at 69 °N. Mar. Biol., 142:877-893.

Harris, R. P. (1996) Feeding ecology of *Calanus*. Ophelia, 44:85-109.

Irigoien, X., Obermüller, B., Head, R. N., Harris, R. P., Rey, C., Hansen, B. W., Hygum, B. H., Heath, M. R., Durbin, E. G. (2000) The effect of food on the determination of sex ratio in *Calanus* spp.: evidence from experimental studies and field data. ICES J. Mar. Sci., 57:1752-1763.

OED (2002) Miljø 2002. Petroleumssektoren I Norge. Olje og energidepartementet, mars 2002.

OED (2003-2004) St. meld. Nr. 38. Om utredning av helårig petroleumsvirksomhet i området Lofoten – Barentshavet (ULB). Olje og energidepartementet, august 2004.

Røe, T. I. (1998) Produced water discharges to the North Sea:- a study of bioavailability of organic produced water compounds to marine organisms. Dissertation. Norwegian University of Science and Technology. ISBN 82-7861-099-1.

Røe Utvik, T. I. and Johnsen, S. (1999) Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in the North Sea. Env. Sci. Technol., 33:1963-1969.

Strathmann, R. R. (1967) Estimating the organic carbon contents of phytoplankton from cell volume or plasma volume. Limnol. Oceanogr., 12:411-418.

Tande, K. S. (1982) Ecological investigations on the zooplankton community of Balsfjorden, Northern Norway: Generation cycles, and variations in body weight and body content of carbon and nitrogen related to overwintering and reproduction in the copepod *Calanus finmarchicus* (Gunnerus). J. Exp. Biol. Ecol., 62:129-142.

Tande, K. S. (1989) *Calanus* in North Norwegian fjords and in the Barents Sea. In E. Sakshaug, Hopkins, C. C.

E., Øritsland, N. A. (Eds.) *Proceedings of the Pro Mare Symposium on Polar Marine Ecology, Trondheim, 12-16 May 1990. Polar Res.*, 10:389-407.

Wiborg, K. F. (1976) Quantitative distribution of zooplankton in the coast and bank areas of western and northwestern Norway March-June 1959-1966. Fiskeridirektoratets Skrifter, Serie Havundersøkelser, 16:259-277.

VATN - vårt viktigaste næringsmiddel!

- Brønnboring i fjell m/vannmengdegaranti
- Løsmassebrønner (diameter 50-500 mm)

Vi borer også for:

- Kabler/Ledninger
- Fundamentering
- Grunnundersøkelser

GRUNDFOS
PUMPEANLEGG



 **HALLINGDAL
BERGBORING**

3570 ÅL • Tlf 3208 5900 Faks 3208 5901