



Titel: <b>Imposex og intersex i havsnegle</b>			
Dokumenttype: Teknisk anvisning	TA. nr.: M27	Version: 1	Oprettet: 01.11.2013
Forfatter: Jakob Strand	Gyldig fra: 01.11.2013		
	Sider: 30		
	Sidst ændret:		
TA henvisninger	M24 – M25 – M26 – M28		

## 0 Indhold

1 Indledning .....	1
2 Metode .....	3
2.1 Tid, sted og periode.....	3
2.2 Udstyr .....	5
2.3 Procedure.....	5
2.3.1 Indsamling, transport og opbevaring .....	6
2.3.2 Målinger af skalhøjden.....	7
2.3.3 Udtagning af bløddele.....	7
2.3.4 Bestemmelse af køn, kønsmodenhed og alder i konk- snegle .....	7
2.3.5 Kønsbestemmelse af strandsnegle .....	9
2.3.6 Bestemmelse af trematod-infektioner i havsnegle .....	11
2.3.7 Karakterisering af imposexstadier i konksnegle.....	11
2.3.8 Karakterisering af "vas deferens sekvens"-stadier .....	12
2.3.9 Karakterisering af "penisklassifikations"-stadier.....	13
2.3.10 Karakterisering af "andre synlige forandringer" som føl- ge af imposex i konksnegle .....	14
2.3.11 Bestemmelse af intersex i almindelig strandsnegl.....	15
2.3.12 Karakterisering af intersex-stadier.....	16
2.3.13 Måling af længde af prostatakirtel hos hunner.....	17
2.3.14 Måling af antallet af penialkirtler på penis hos hanner...	17
2.4 Tjekliste .....	18
2.5 Vedligehold af instrumenter.....	18
2.6 Særlige forholdsregler - faldgruber .....	18
3 Databehandling .....	19
4 Kvalitetssikring.....	21
4.1 Kvalitetssikring af metode .....	21
4.2 Kvalitetssikring af data og dataaflevering .....	21
5 Referencer .....	22
6 Bilag .....	25
6.1 Skema til bestemmelse af imposex i konksnegle .....	25
6.2 Skema til bestemmelse af intersex i almindelig strandsnegl.....	27
6.3 Kvalitetssikring af metode .....	29
7 Oversigt over versionsændringer .....	30

## 1 Indledning

Denne tekniske anvisning (TA) er udarbejdet for at sikre sammenlignelighed af målinger af forekomsten af og den tidlige udvikling af TBT-specifikke effekter i havsnegle. Undersøgelserne omfatter både kystnære områder og de åbne farvande. TA'en beskriver prøveindsamling, opbevaring og analyser til karakterisering af udviklingsgraden af imposex i fire arter af konksnegle og intersex i almindelig strandsnegl.

Imposex og intersex er to forskellige måder, hvorved unaturlige hormonforstyrrelser kommer synligt til udtryk i ellers særkønnede havsnegle. Disse fænomener er specifikt blevet sammenkædet med påvirkninger af den organiske tinforbindelse TBT samt af det beslægtede stof triphenyltin (TPHT), som kan komme til udtryk selv ved miljøkoncentrationer på mindre end 1ng/l i de mest følsomme arter af havsnegle. Hunsneglene begynder gradvist at udvikle irreversible hanlige kønskarakterer, der i værste fald kan medføre sterilitet, og dermed kan have stor betydning for populationerne.

Denne type overvågning har i Danmark hidtil omfattet fem arter af havsnegle (Fig. 1): almindelig strandsnegl (*Littorina littorea*) og fire arter af konksnegle, hhv. purpursnegl (*Nucella lapillus*), dværgkonk (*Hinia reticulata*), rødkonk (*Neptunea antiqua*) og almindelig konk (*Buccinum undatum*). I de åbne farvande omfatter overvågningen rødkonk og almindelig konk, mens dværgkonk, purpursnegl og almindelig strandsnegl overvåges i de kystnære farvande. Årsagen, til at der er anbefalet forskellige arter af havsnegle, er, at ikke alle arter er lige udbredte i alle farvandsområder i Danmark. Det skal desuden bemærkes, at ikke alle arter er lige følsomme over for udvikling af de TBT-inducerede hormonforstyrrelser. Dette er indbygget i de udviklede miljøvurderingskriterier, der gør, at resultater kan sammenlignes på tværs af arterne. Purpursnegl og rødkonk anses som hørende til blandt de mest følsomme arter, almindelig konk og dværgkonk tilhører mellemgruppen, hvorimod almindelig strandsnegl hører til blandt de mindst følsomme arter.

På grund af den lavere følsomhed hos almindelig strandsnegl er intersex i denne art kun velegnet til at vurdere belastningen ved punktkilder så som TBT-belastede havneområder. Derimod er de andre arter også velegnede som indikatorer i fjorde og/eller i de åbne farvande. Rødkonk har nogenlunde samme udbredelse i de danske farvande som almindelig konk, men rødkonk er i flere områder (f.eks. i Kattegat og Storebælt) ofte mindre hyppig end almindelig konk. Rødkonk foretrækker generelt lidt blødere bundforhold og er derfor ofte mere udbredt i store dele af Skagerrak og Nordsøen, men også visse steder i Øresund (Strand & Jacobsen, 2002).

Fremgangsmåden i denne tekniske anvisning følger de internationale procedurer for overvågning af imposex og intersex i havsnegle i det Nordatlantiske område (Gibbs, 1999, Oehlmann, 2004, OSPAR, 2008).



**Almindelig strandsnegl**  
(*Littorina littorea*)



**Purpursnegl**  
(*Nucella lapillus*)



**Almindelig konk**  
(*Buccinum undatum*)



**Rødkonk**  
(*Neptunea antiqua*)



**Dværgkonk**  
(*Hinia reticulata*)

**Figur 1** Udseende af almindelig strandsnegl og fire arter af konksnegle, hhv. purpursnegl, dværgkonk, rødkonk og almindelig konk, som er velegnede.

## 2 Metode

Ved valg af art skal der tages hensyn til nogle basale forudsætninger.

Den valgte art:

- skal være almindeligt forekommende, så der kan indsamles ca. 50 individer på den udvalgte station
- skal repræsentere den mest følsomme af de nævnte arter i tilfælde af, at flere arter forekommer i det pågældende område. I kystnære områder betyder det: purpursnegl > dværgkonk > almindelig strand-snegl og i de åbne farvande: rødskonk > almindelig konk.

Den samme art skal derefter i de efterfølgende år også anvendes som indikatorart for at kunne vurdere den tidlige udvikling i det samme område.

### 2.1 Tid, sted og periode

Moniteringsområder lokaliseres i forhold til en given TBT-kilde, der enten kan være en punktkilde som en havn eller marina eller i mere åbne områder sejlruter for fragtskibe og færger eller en klapplads, se Tabel 1.

Havsneglene skal indsamles/fanges i geografisk veldefinerede områder, dvs. stationer. Biologiske variable (skalhøjde, kønsmodenhed og eventuelt alder), som kan være af betydning ved en senere bedømmelse af resultatet, måles/vurderes og noteres. Bløddelene udtages skånsomt fra skallen og graden af imposex eller intersex kvantificeres ved at karakterisere stadierne i forhold til en index-skala.

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 løbet af den reproduktive periode, hvilket vil sige fra april til august dog for:

- dværgkonk: maj – august
- alm. strandsnegl: marts – maj
- øvrige snegle: april – september

**Tabel 1** Arter, typeområder, indsamlingsmetoder og det anbefalede antal individer pr. station/lokalitet i overvågningsprogrammet.

Art	Typer af indsamlingsområder	Indsamlingsmetoder	Antal per station
<b>Dværgkonk</b> <i>Hinia (Nassarius) reticulata</i>	Kystnære områder og ved punkkilder.  På dybder fra ca. 1 – 10 m i Limfjorden, Kattegat, Nordlige Bælthav og Øresund.	Fælder med muslinge-/fiskekød som madding (1 – 2 timer), eller indsamling med lille rammeskrab eller dykker.	40 *
<b>Purpursnegl</b> <i>Nucella lapillus</i>	Kystnære områder og ved punkkilder.  Tidevandszonen på vestkysten på hofder og ydersiden af havnemoler fra Blåvandsbuk til Skagen.	Manuel indsamling på store sten i tidevandszonen.	40 *
<b>Almindelig strandsnegl</b> <i>Littorina littorea</i>	Ved punkkilder som havne, fortrinsvist på indermoler i havnebassiner.  Tidevandszonen på sten fra Vadehavet, Vestkysten, Limfjorden, Kattegat, Bælthavet og Øresund.	Manuel indsamling på store sten i tidevandszonen.	40 *
<b>Almindelig konk</b> <i>Buccinum undatum</i>	Langs større sejlruiter i de åbne farvande, både blødbund og stenrev.  På dybder fra 15 – 100 m i Nordsøen, Skagerrak, Kattegat, Bælthavet og Øresund.	Fælder med muslinge-/fiskekød som madding (2 – 5 dage), eller indsamling med bundtrawl eller dykker.	100 *
<b>Rødkonk</b> <i>Neptunea antiqua</i>	Langs større sejlruiter både blødbund og stenrev.  Åbne farvande på dybder fra 15 – 100 m i Nordsøen, Skagerrak, Kattegat, Bælthavet og Øresund	Fælder med muslinge-/fiskekød som madding (2 – 5 dage), eller indsamling med bundtrawl eller dykker.	40 *

\* Det anbefalede antal, hvor der ideelt set er 50 % hunner

## 2.2 Udstyr

- Fælder formet som kurv eller dunk og maskevidde ca. 5 mm og madning i form af ikke fordærvet krabbe-, muslinge- eller fiskekød (til arter af konk)
- Bundtrawl med 2 cm maskevidde (til alm. konk og rødkonk)
- Rammeskrab med en bredde på 50 cm (til dværgkonk)
- Evt. dykker (til arter af konk)
- Beholdere/poser til dværgkonk, almindelig strandsnegl og purpurnegl samt dunke med havvand for at opbevare dem levende i laboratoriet frem til analyserne
- Poser til nedfrysning af almindelig konk og rødkonk
- 7 %-magnesiumdiklorid ( $MgCl_2$ )-opløsning til brug ved bedøvelse af dværgkonk, almindelig strandsnegl og purpurnegl umiddelbart før analyserne
- Skydelære
- Papegøjetang eller skruestik til at knuse skaller uden at beskadige bløddele
- Pincetter og dissektionssakse til brug ved analyserne
- Stereolup til brug ved karakterisering af imposex og intersex stadier

## 2.3 Procedure

Proceduren for indsamling, opbevaring og analyser af imposex eller intersex afhænger specifikt af, hvilken art af havsnegl, som skal undersøges, se også oversigt i Tabel 1.

Efter indsamling opbevares sneglene enten levende (gældende for dværgkonk, almindelig strandsnegl og purpurnegl) eller frosne (gældende for almindelig konk og rødkonk) frem til analyserne.

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

Analyser af imposex eller intersex stadier foretages ved brug af stereomikroskop.

Biologiske variable (skalhøjde, kønsmodenhed og eventuelt alder), som kan være af betydning ved en senere bedømmelse af resultatet, måles/vurderes

og noteres. Bløddelene udtages skånsomt fra skallen, hvorpå de kønsbestemmes.

Hos hanner måles blot penislængden, mens for hunner kvantificeres graden af imposex eller intersex for hvert individ ved at karakterisere stadiene i forhold til dels en index-skala, dels penislængden. Graden af imposex i en population af snegle fra et område beskrives med indekset VDSI, som er en gennemsnitsværdi af alle observerede imposexstadier. Tilsvarende beskrives graden af intersex med indekset ISI. For VDSI kan indekset variere på en skala fra 0 til maksimalt 6, mens ISI-værdien varierer mellem 0 og 4.

For dværgkonk, rødkonk og purpursnegl anbefales det, at der indsamles og undersøges 40 individer i alt per station, hvorimod det for almindelig konk fra åbne farvande anbefales at indsamle 100 individer per station. Der bør dog også tages højde for at ca. 10 % har infektioner med trematodeparasitter, og at de derfor bør ekskluderes fra dataanalyserne.

### **2.3.1 Indsamling, transport og opbevaring**

#### Indsamling

- Fælder placeres i det valgte område (se afsnit 2.1).
- For fangst af dværgkonk ligger fælderne i 1 -2 timer.
- For fangst af almindelig konk og rødkonk ligger fælderne i 2 – 5 dage
- Bundtrawl anvendes ved indsamling af almindelig konk og rødkonk ved sejltreder, især i Nordsøen og Skagerrak.
- Rammeskrab med en bredde på 50 cm kan anvendes til indsamling af dværgkonk ved sejltreder, især i Nordsøen og Skagerrak
- Dykkere kan manuelt indsamle dværgkonk, almindelig eller rødkonk
- Manuel indsamling på sten i tidevandszonen af almindelig strandsnegl eller purpursnegl

#### Transport og opbevaring:

- Transport af levende snegle (dvs. relevant for dværgkonk, almindelig strandsnegl og purpursnegl) foretages uden opbevaring i vand - fx i en køletaske - viklet ind i fugtigt klæde
- Frosne snegle (dvs. relevant for almindelig konk og rødkonk) transporteres og opbevares nedfrosne i hele perioden frem til analyserne

- Opbevaring af de levende snegle i laboratoriet med 5 °C havvand og lufttilførsel, hvor de kan nemt holdes i live i en uge.

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

### 2.3.2 Målinger af skalhøjden

Inden dissekering skal højden af samtlige snegle måles på 'den længste led' (se Fig. 1), dvs. med basis og apex mellem skydelærens kæber. Højden angivet til nærmeste mm noteres (se Bilag 6).

### 2.3.3 Udtagning af bløddele

Før de levende snegle (dvs. dværgkonk, almindelig strandsnegl og purpursnegl) bliver undersøgt skal de bedøves i 1 - 2 timer med en 7 %-MgCl<sub>2</sub>-opløsning for at opnå maksimal afslapning af muskler.

Frosne snegle (dvs. relevant for almindelig konk og rødkonk) optøs over nogle timer til stuetemperatur.

Skallen knækkes med en papegøjetang eller i en skruestik, og bløddelene udtages med pincet.

### 2.3.4 Bestemmelse af køn, kønsmodenhed og alder i konksnegle

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

Nedenstående generelle 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.

Kønsmodenheden af både hunner og hanner vurderes som enten adult eller immature afhængigt af, hvor veludviklet gonaden er i de sidste vindinger af fordøjelseskirtlen. Hos de konksnegle, der betragtes som adulte, er gonaden (ovarie eller testis) tydeligt gul eller orangerød og fremstår tydeligt adskilt fra fordøjelseskirtlen. Hos subadulte snegle vil gonaden ikke være synlig. Bemærk, at hvis konksneglene er inficeret med digene ikter (jf. afsnit 4.6) kan det påvirke de reproduktive organer betydeligt.

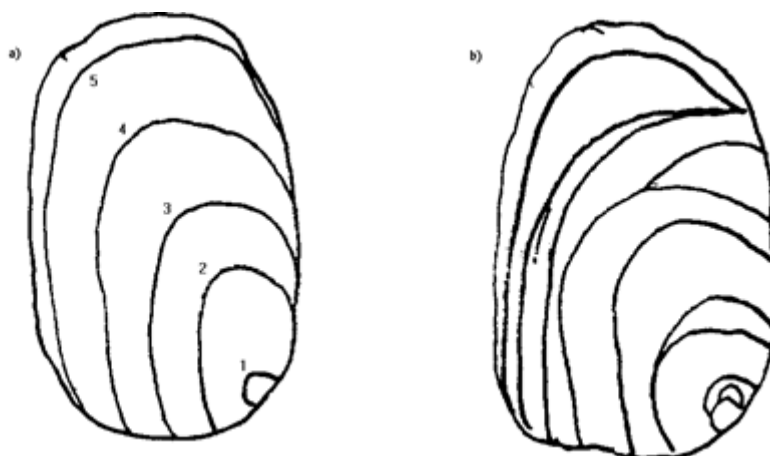
Bestemmelse af alder kan forholdsvist let udføres for de store konksnegle almindelig konk og rødkonk ved at tælle antallet af årringe i skallåget (operculum) (Figur 2), efter at det er hevet af foden i et samlet stykke. Det



kan i visse tilfælde være lettest at studere det tilbageværende aftryk på foden, hvor skallåget har siddet.

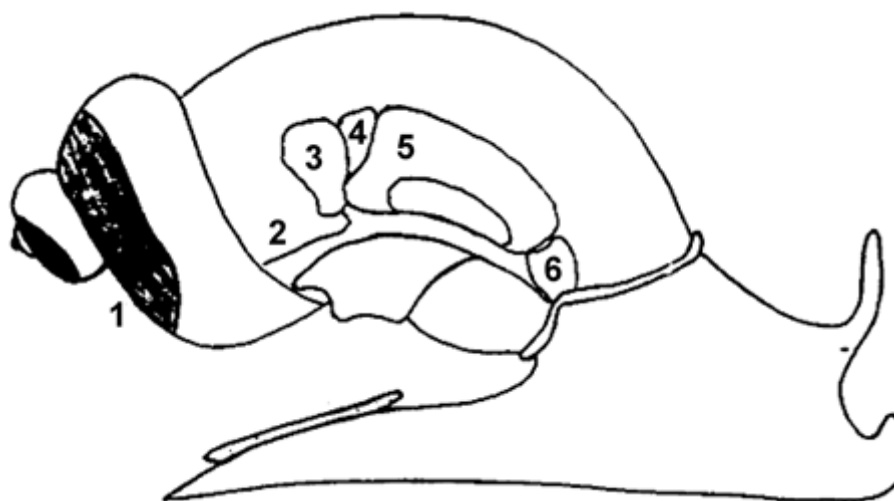
Antallet af årringe i skallåget er et udmærket mål for alder, idet de generelt repræsenterer en årlig tilvækst. Kun ca. 50 % fremviser tydeligt adskilte årringe (Kideys, 1996).

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



**Figur 2** Årringe i skallåg. a) Tydeligt adskilte årringe (~5 år), b) Et ikke entydigt antal af årringe (alder = ?).

### Hunnens reproduktive organer hos konksnegle



**Figur 3** Hunnens reproduktive organer. 1) Ovarie, 2) Ovidukt, 3) Æggehvidekirtel, 4) Sædgemme, 5) Ægkapselkirtel, 6) Bursa

I Figur 3 er placeringen af hunnens reproduktive organer vist. Det gulorange ovarie ligger oven på fordøjelseskirtlen i de sidste vindinger. Oviduk-

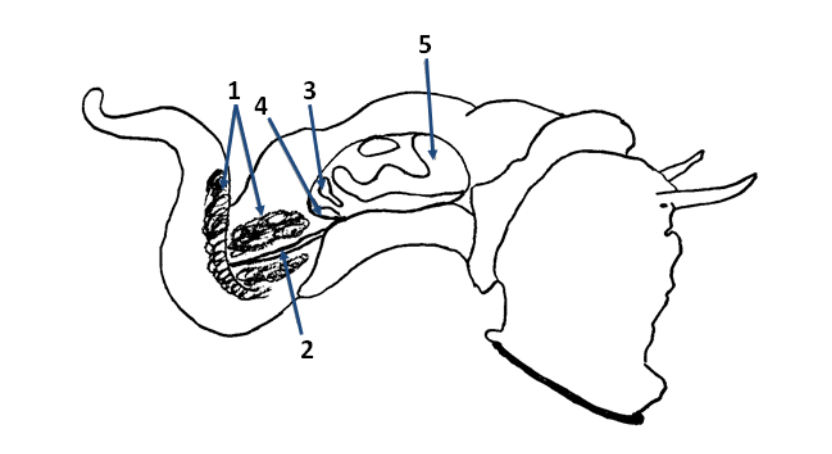
ten forbinder ovariet med den palliale ovidukt, der består af æggevidekirtel, sædgemme, ægkapselkirtel og bursa med den vaginale åbning. Disse organer ligger i forlængelse af hinanden på langs med kappehulen.

### 2.3.5 Kønsbestemmelse af strandsnegle

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

Nedenfor er henholdsvis hunnens og hannens reproduktive organer skitseret (hhv. Figur 4 og 5).

#### Hunnens reproduktive organer

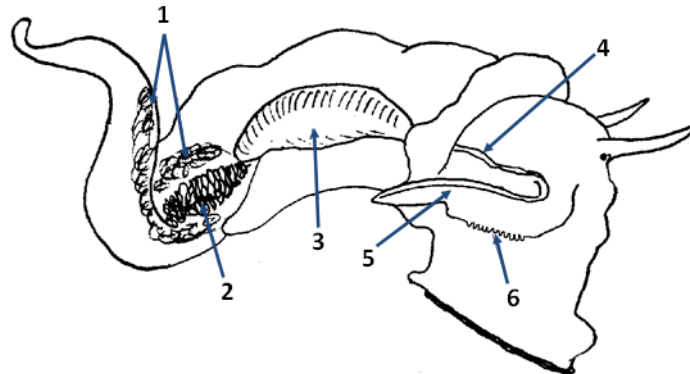


**Figur 4** Hunnens reproduktive organer. 1) ovarie, 2) ovidukt, 3) æggevidekirtel, 4) sædgemme, 5) ægkapselkirtel.

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 æggevidekirtel, sædgemme, ægkapselkirtel, "gelékirtel", bursa copulatrix og den vaginale åbning (se Figur 4).

## Hannens reproduktive organer

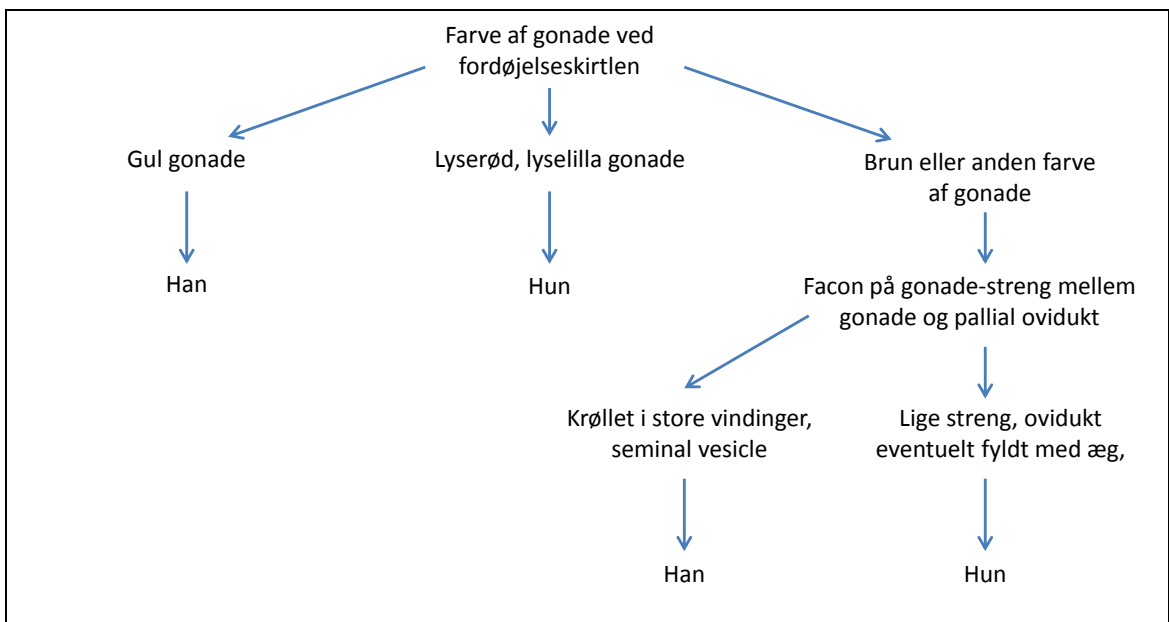


**Figur 5** Hannens reproduktive organer. 1) testis, 2) seminal vesikel, 3) prostata kirtel, 4) sædrende, 5) penis og 6) penial kirtler på penis.

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

Prostatakirtlen, 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 5).

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



**Figur 6** Skematisk oversigt for kønsbestemmelsen af almindelig strandsnegl (efter OSPAR, 2008).

### 2.3.6 Bestemmelse af trematod-infektioner i havsnegle

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

Infektionen synes ofte 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 imposex-intensiteter (Smith, 1971, 1980) med undtagelse af Relative Penis Længde Index (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 intet på, at de påvirker de reproduktive organer (Køie, 1969).

### 2.3.7 Karakterisering af imposexstadier i konksnegle

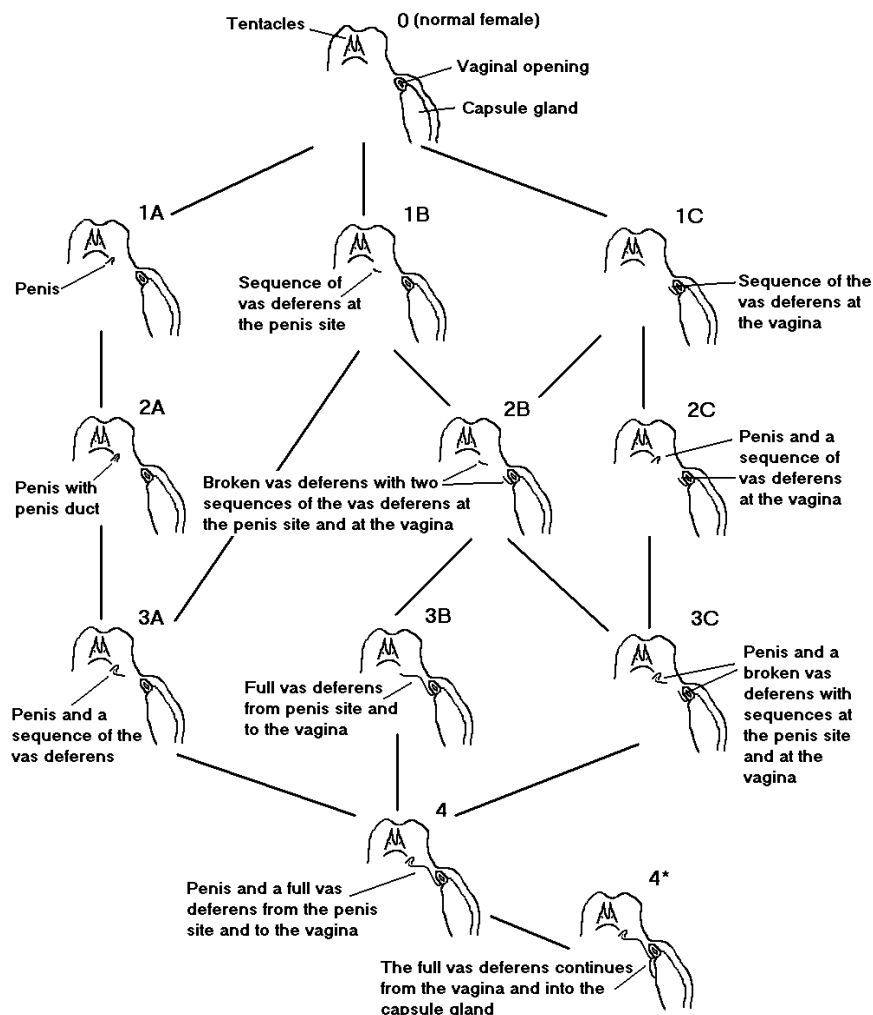
Udviklingen af imposex kan enten beskrives ud fra penislængde eller ved en stadienddeling på baggrund af forskellige udviklingstrin, der karakteriseres ud fra, hvor veludviklet pseudopenis og/eller sædleder er.

Tilstedeværelsen af eventuelle imposex-karakterer undersøges nemmest, hvis kappehulen klippes op i venstre side og generende slim tørres væk med en blød papirserviet.

Penislængde af både hanner og hunner måles med måleokular i stereolup eller skydelære med 0,1 mm nøjagtighed. Længden af penis måles fra rod til spids.

Hvor fremskredne stadier af imposex er i konksnegle kan beskrives på to forskellige måder: enten ved brug af "vas deferens sekvens"-stadier (vds) eller ved "penisklassifikations"-stadier (tidligere kaldet "mensink sekvens stadier", ms).

### 2.3.8 Karakterisering af "vas deferens sekvens"-stadier



**Figur 7** vds-stadier 0 - 4\* hos almindelig konk, rødkonk og dværgkonk, som er karakteriseret ud fra udvikling af vas deferens (sædleder) og penis. Imposex-udviklingen hos purpursnegl kan udvikle sig videre til stadie 5 og 6 (se også Gibbs, 2001, OSPAR, 2008).

De enkelte "vas deferens sekvens"-stadier (vds) beskrives ud fra, hvor veludviklet pseudopenis og vas deferens er.

vds-stadierne kan anvendes til at beskrive imposex-stadierne i alle arter af konksnegle.









De ovenfor skitserede stadier (Figur 7) kan forekomme hos dværgkonk og almindelig konk. Hos purpursnegl og rødkonk kan der også forekomme en c-type, som er nærmere beskrevet i OSPAR (2008).

Stadieværdierne for type a, b og c ligestilles og kun "tallet" bruges til udregning af gennemsnitlig VDSI-værdi:

$$\text{VDSI} = \sum \text{vds} / nF \text{ for hele populationen}$$

hvor vds er de enkelte stadieværdier og nF er antallet af hunner.

### 2.3.9 Karakterisering af "penisklassifikations"-stadier

Imposex stage	seen from above	seen from the side
0		
	No development of penis. Smooth epithelium at the site, where males have their penis.	
1		
	Small knob at penis site indicating the development of a penis.	
2		
	Small structure penis, which can wobble and be lifted up from the epithelium of the foot.	
3		
	Penis is bent and with a shape which tends to look like a normal male penis.	

**Figur 8** Karakterisering af imposex-stadier i henhold til penisklassifikationen, PCI (efter OSPAR, 2008).

Udviklingen af imposex kan beskrives ud fra forskellige "Mensink sekvens"-stadier (ms-stadier) (efter Mensink et al., 1997) også kaldet "penisklassifikations"-stadier.

Kun for almindelig konk skal ms-stadier anvendes ved karakterisering af intensiteten af imposex som supplement til vds-stadier. ms-stadierne skal

danne grundlag for en beregning af Penisklassifikationsindekset (PCI) (tidligere kaldet Mensink Sekvens Indeks (MSI)), som er en gradvis inddeling fra 0 – 3, se Figur 8.

Ved udvikling af brudstykke af sædleder øges PC-værdien med 0,5, så den maksimale PC-værdi er 3,5.

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

$$PCI = \sum ms / nF$$

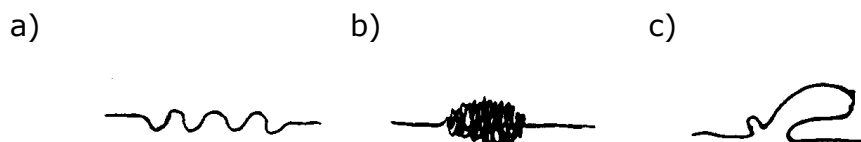
hvor ms er de enkelte stadietværdier, og nF er antallet af hunner.

### 2.3.10 Karakterisering af "andre synlige forandringer" som følge af imposex i konksnegle

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 dobbeltpenis (Figur 9).

Især sinuskurver og endnu mere fremskredne krølinger af ovidukten kan ofte medføre sterilitet, idet det blokerer for ægproduktionen.

Hvis der forekommer andre synlige forandringer, som beskrevet ovenfor, anføres dette ved rapportering under bemærkninger for det enkelte individ.

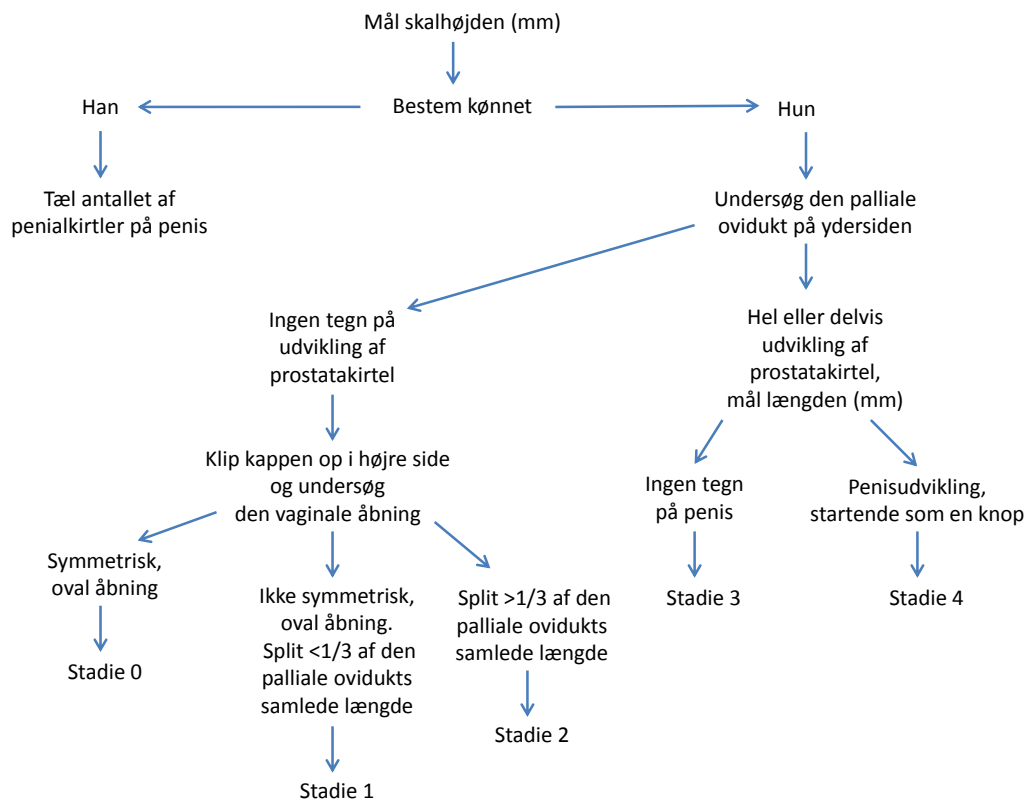


**Figur 9** a) En mindre krølning af ovidukt, b) en tydelig krølning af ovidukt, så den minder om hannernes seminale vesikel, c) dobbeltpenis.

### 2.3.11 Bestemmelse af intersex i almindelig strandsnegl

Intersex er ligesom imposex-fænomenet en maskulinisering af hunner, men morfologisk set er der forskelle. Intersex kommer til udtryk som misdannelser af hunnens reproduktive organer eller som en decideret omdannelse af hunnens reproduktive organer til hanlige organer. Udviklingsgraden af intersex-stadierne (ISI) kan karakteriseres i trinvis skala fra 0 til 4 samt ved længden af prostatakirtlen, der udvikles hos hunner i de fremskredne intersex-stadier.

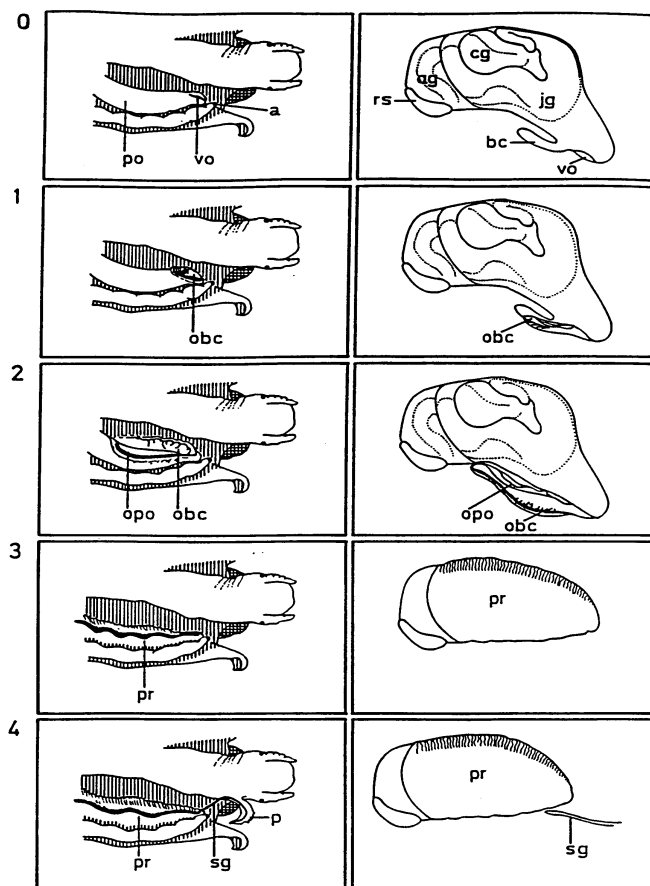
I tillæg til intersex-bestemmelsen hos hunsegle tælles også antallet af penialkirtler på hannens penis, da antallet kan være kraftigt reduceret i TBT-belastede havneområder (Bauer et al., 1997, Sterling, 2000). Det tyder på, at penialkirtlerne tilsvarende kan indikere TBT-effekter hos hannerne, selv om effekter af andre miljøforureninger i havneområder ikke kan udelukkes. Derudover tyder det på, at dette fænomen i modsætning til intersex er reversibelt, eftersom hannen hvert år afstøder sin penis, så det i højere grad afspejler et mere nutidigt TBT-niveau. Proceduren for bestemmelsen er skitseret i Figur 10.



**Figur 10** Skematisk beskrivelse af kønsspecifikke procedurer og mål for intersex hos almindelig strandsnegl (efter OSPAR 2008).



### 2.3.12 Karakterisering af intersex-stadier



**Figur 11** 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 (kopieret fra Bauer et al., 1995, Oehlmann, 2004).

Intersex-fænomenet kan karakteriseres ud fra 5 intersex-stadier (ISI). De enkelte stadier karakteriseres ved, hvor maskuliniseret den palliale ovidukt er:

- 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 deformite-

ter 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 sted som hos hanner. Stadie 4 forekommer kun i særdeles TBT-belastede områder.

I Figur 11 er der vist skitser af de forskellige udviklingstrin (Bauer et al., 1995).

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

$$ISI = \frac{\sum \text{intersexstadier af alle indsamlede hunner}}{\text{antal hunner}}$$

ISI-værdier større end 1,0 indikerer, at en vis del af hunnerne er blevet sterile på grund af udviklingen af intersex. Strandsnegle med ISI-stadierne 2 - 4 anses for at være sterile (Bauer et al., 1995).

### **2.3.13 Måling af længde af prostatakirtel hos hanner**

Længden af en eventuelt dannet prostatakirtel måles på langs med 0,1 mm nøjagtighed med måleokular i en stereolup.

Prostata kirtlen er kun til stede i de sterile ISI-stadier 3 og 4.

### **2.3. 14 Måling af antallet af penialkirtler på penis hos hanner**

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 de i lavt belastede områder kan have op til 25 - 40 penialkirtler på penis.

## 2.4 Tjekliste

- Indsamling af havsnegle fra en geografisk veldefineret station
- Dværgkonk og almindelig strandsnegle opbevares og analyseres levende, mens rødskonk og almindelig konk kan opbevares frosne frem til analysen
- Karakterisering af imposex i konksnegle ved at måle penislængde hos hanner og hunner samt karakterisere imposex-udvikling ud fra vds- og/eller ms-stadier. Intersex i almindelig strandsnegl karakteriseres med ISI-stadier, måling af længden af prostatakirtel hos hunner samt antallet af penialkirtler hos hanner.

## 2.5 Vedligehold af instrumenter

Forstørrelse og måleokular i stereolup kontrolleres før brug.

## 2.6 Særlige forholdsregler - faldgruber

Forveksling af den udvalgte art med andre arter af havsnegle, da selv nært beslægtede arter ikke nødvendigvis har samme følsomhed over for TBT med hensyn til udvikling af imposex eller intersex.

### 3 Databehandling

En udførlig beskrivelse af databehandlingen vil blive udarbejdet i en separat datateknisk anvisning knyttet til denne tekniske anvisning.

Hos konksnegle rapporteres for hver undersøgt han og hun følgende individuelle data for biologiske støtteparametre:

- Art
- Skalhøjde
- Køn
- Kønsmodenhed
- Alder (kun for almindelig konk og rødkonk)
- Forekomst af trematod parasitinfektioner

Derudover rapporteres følgende individuelle data for imposex i konksnegle:

- Penislængde af både hanner og hunner
- Imposex-stadie (vds) fra 0 -6 hos hunner
- Imposex-stadie (PCI) fra 0 – 3.5 hos hunner (kun relevant for almindelig konk)

Hos almindelig strandsnegl rapporteres for hver undersøgt han og hun følgende individuelle data for biologiske støtteparametre:

- Art
- Skalhøjde
- Køn
- Forekomst af trematod parasitinfektioner

Derudover rapporteres følgende individuelle data for intersex i almindelig strandsnegl:

- Intersex-stadie (is) fra 0 -4 hos hunner
- Længden af prostatakirtel hos hunner
- Antallet af penialkirtler på penis hos hanner

På stationsniveau rapporteres følgende værdier, som udtryk for udviklingsgraden af imposex eller intersex i de undersøgte populationer af konksnegle:

- Procentvis andel af hunner med imposex (%)
- Vas Deferens Sekvens Index (VDSI) =  $\sum vds / \text{antallet af hunner}$
- Penisklassifikationsindex (PCI) =  $\sum pc / \text{antallet af hunner}$
- Relative Penis Størrelse Index (RPSI) =  $FPL3 / MPL3$
- Relative Penis Længde Index (RPLI) =  $FPL / MPL$
- Intersex Index (ISI) =  $\sum is / \text{antallet af hunner}$
- Gennemsnitlig længde af prostatakirtel hos hunner af almindelig strandsnegl (FPrL)
- Andelen af sterile hunner (dvs. vds-stadie >4 samt hunner med krøllet ovidukt hos konksnegle eller is >1 hos almindelige strandsnegl)
- Gennemsnitligt antal af penialkirtler hos hanner (PKI) af almindelig strandsnegl.

I Tabel 2 ses de af OSPAR anbefalede stationsgenererede variable for imposex- eller intersex-udvikling (OSPAR, 2008).

**Tabel 2** De af OSPAR anbefalede stationsgenererede variable for imposex- eller intersex-udvikling i konksnegle eller almindelig strandsnegl (OSPAR 2008).

	<b>Purpur- snegl</b>	<b>Almin- delig konk</b>	<b>Rød- konk</b>	<b>Dværg- konk</b>	<b>Almindelig strandsnegl</b>
Procentvis andel af hunner med imposex (%)	X	X	X	X	X
Vas Deferens Sekvens Index (VDSI)	X	X	X	X	
Penisklassifikationsindex (PCI)		X			
Relative Penis Størrelse Index (RPSI)	X			X	
Relative Penis Længde Index (RPLI)				X	
Intersex Index (ISI)					X
Gennemsnitlig længde af prostatakirtel hos hunner (FPrL)					X
Andelen af sterile hunner	X		(X)		X
Gennemsnitligt antal af penialkirtler hos hanner (PKI)					X

## **4 Kvalitetssikring**

En udførlig beskrivelse af kvalitetssikringen vil blive udarbejdet i en separat datateknisk anvisning knyttet til denne tekniske anvisning.

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

### **4.1 Kvalitetssikring af metode**

Analyselaboratorierne skal kunne dokumentere deltagelse i tilbagevendende nationale eller internationale workshops eller ringtests, som fx udbydes under QUASIMEME ([www.quasimeme.org](http://www.quasimeme.org)) for at interkalibrere de forskellige observatørers karakteriseringer af imposex- og/eller intersex-stadier.

For at opnå en optimal ensartning af observationer er præparater, billeder og diskussioner væsentlige elementer i workshoppen.

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

### **4.2 Kvalitetssikring af data og dataaflevering**

Dataindberetning sker via MFSBasen på miljøportalen.

## 5 Referencer

- Bauer B., Fioroni P., Ide I., Liebe S., Oehlmann J., Stroben E. & Wattermann 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 *Littoreia 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.
- Fioroni P., Oehlmann J., Stroben E. (1991) The pseudohermaphroditism of prosobranchs - morphological aspects. *Zoologischer Anzeiger* 226(1-2): 1-26
- Gibbs, P.E. (1999) Biological effects of contaminants: Use of imposex in the dogwhelk, (*Nucella lapillus*) as a bioindicator of tributyltin (TBT) pollution. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences (TIMES)* No. 24, 29 pp.
- 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*.
- Oehlmann, J. (2004) Biological effects of contaminants: Use of intersex in the periwinkle (*Littorina littorea*) as a biomarker of tributyltin pollution. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences (TIMES)* No. 37, 22pp.
- OSPAR (2008) JAMP Guidelines for Contaminant-Specific Biological Effects. Technical Annex 3: TBT-specific biological effects monitoring. OSPAR Agreement 2008-09.
- OSPAR (2009) CEMP assessment report: 2008/2009. Assessment of trends and concentrations of selected hazardous substances in sediments and biota. OSPAR Monitoring and Assessment Series, OSPAR Commission, 80pp.

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 neogastro-pods from the Kattegat and Skagerrak: the common whelk *Buccinum undatum* and the red whelk *Neptunea antiqua*. – Marine Ecology Progress Series 244: 171-177.

Strand, J., Larsen, M. M., Næs, K., Cato, I., Dahllöf, I. (2006) Tributyltin (TBT): Forekomst og effekter i Skagerrak. Rapport fra Forum Skagerrak II, Uddevalla, Sweden, 39 s.

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



## 6 Bilag

### 6.1 Skema til bestemmelse af imposex i konksnegle

Art:

Station:

Position:

Dybde:

Dato:

Nr.	Skalhøjde (mm)	Antal ringer i skallåget	Køn	Kønsmodenhed (subad., ad.)	Penislængde (mm)	vds	ms	Trematoder	Bemærkninger





Nr.	Skalhøj- de (mm)	Køn	Kønsmodenhed (subad., ad.)	isi	prl (mm)	Trematoder	Antal peniskirtler

Art: *Littorina littorea*

Skalhøjdeinterval: -

Station	Antal hun/antal han	% intersex	ISI	FPrL (mm)
	/			

### **6.3 Kvalitetssikring af metode**

Prøvetagning kan eventuelt koordineres med prøvetagning af sediment, muslinger og fisk:

TA M24 Miljøfarlige stoffer i sediment

TA M25 Miljøfarlige stoffer i fisk

TA M26 Biologisk effektmonitoring i fisk

TA M28 Biologisk effektmonitoring i muslinger

## 7 Oversigt over versionsændringer

Version	Dato	Emne:	Ændring: