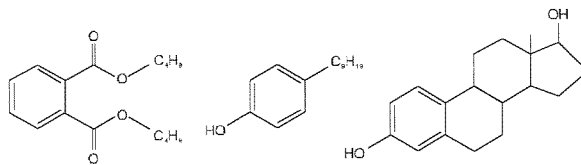
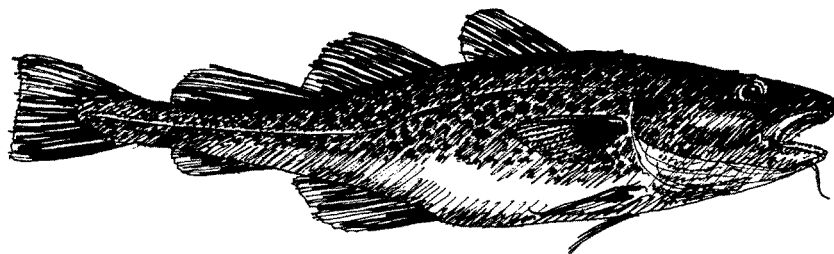


NIVA



RAPPORT LNR 3668-98

# Effekter av østrogen- lignende stoffer i norske kystfarvann



**Hovedkontor**

Postboks 173, Kjelsås  
0411 Oslo  
Telefon (47) 22 18 51 00  
Telefax (47) 22 18 52 00  
Internet: www.niva.no

**Sørlandsavdelingen**

Televeien 1  
4890 Grimstad  
Telefon (47) 37 29 50 55  
Telefax (47) 37 04 45 13

**Østlandsavdelingen**

Sandvikaveien 41  
2312 Ottestad  
Telefon (47) 62 57 64 00  
Telefax (47) 62 57 66 53

**Vestlandsavdelingen**

Nordnesboder 5  
5008 Bergen  
Telefon (47) 55 30 22 50  
Telefax (47) 55 30 22 51

**Akvaplan-NIVA A/S**

9015 Tromsø  
Telefon (47) 77 68 52 80  
Telefax (47) 77 68 05 09

Tittel Effekter av østrogen-lignende stoffer i norske kystfarvann	Løpenr. (for bestilling) 3668	Dato 25. juni 1998
	Prosjektnr. Underrn. 96250	Sider Pris 71
Forfatter(e) Ketil Hylland John Arthur Berge Anders Goksøyr	Odbjørn Pettersen Torgunn Sætre Harry Efraimsen	Fagområde Miljøgifter sjøvann
		Distribusjon
	Geografisk område	Trykket NIVA

Oppdragsgiver(e) Statens Forurensningstilsyn (SFT)	Oppdragsreferanse Berit Eyde Kjuus Siri Sorteberg
---	---

<p>Sammendrag</p> <p>Målet med undersøkelsen var å kartlegge eventuelle effekter av østrogen-lignende stoffer i norske kystfarvann. Torsk ble samlet inn fra Singlefjorden, Hvaler, Sandebukta, Langesundsfjorden og Frierfjorden. Torsk fra Arendal (1996) og Ytre Oslofjord (1997) ble satt ut i bur i Iddefjorden, Hvaler, syd for Moss, ved NIVAs forskningsstasjon på Solbergstrand, i Drøbak, i Sandebukta, i Langesundsfjorden, i Frierfjorden. Torsk innsamlet i Bergen ble satt ut to steder i Bergensområdet i 1996, i et forurenset område (Sandviken) og i et ikke-forurenset område (Fanafjorden). I Oslofjord/Skagerrak området ble det utført innsamling og utsetting (i bur) både i 1996 og 1997. Det ble tatt blodprøve av alle fiskene ved innsamling, før utsetting og etter tre ukers opphold i burene. Vitellogenin (Vg) ble målt i blodprøver fra all fisk. Det ble også analysert for nonylfenoler og nonylfenoletoksilater i sediment i noen utvalgte områder. Samlet tyder resultatene på at det er lave nivåer av miljø-østrogener i gjennomblandet vann og moderate konsentrasjoner av nonylfenol/nonylfenoletoksilater i sediment i de undersøkte områdene. Det var gjennomgående noe forhøyde nivåer av plasma Vg i torsk fanget i eller holdt i Grenlandsfjordene sammenlignet med andre områder, men årsaken til dette er ikke klarlagt. Resultatene gir ikke grunnlag for å anbefale bruk av eggesskallsprotein framfor vitellogenin som markør for miljø-østrogener.</p>
---

<p>Fire norske emneord</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. vitellogenin</li> <li>2. torsk</li> <li>3. bur-forsøk</li> <li>4. miljø-østrogener</li> </ol>	<p>Fire engelske emneord</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. vitellogenin</li> <li>2. Atlantic cod</li> <li>3. caging</li> <li>4. environmental estrogens</li> </ol>
--	--



**Ketil Hylland**  
Prosjektleder

ISBN 82-577-3231-1



**John Arthur Berge**  
fung. Forskningsjef

O-96250/E-97473

**Effekter av østrogen-lignende stoffer i norske  
kystfarvann**

## Forord

Dette arbeidet er en oppfølging av en tidligere undersøkelse av effekter av østrogen-lignende stoffer (miljø-østrogener) på marin fisk i norske kystområder, bestilt av SFT (utført i 1995). Kontaktpersoner for SFT har vært Alvhild Hedstein, Berit Eyde Kjuus og Siri Sorteberg. Målet med denne undersøkelsen var å avklare om det kan spores effekter av miljø-østrogener i gjennomblandet vann i ulike områder langs kysten. Prosjektleder i første del av prosjektet var John Arthur Berge og prosjektleder for andre og tredje del av prosjektet har vært Ketil Hylland. Oddbjørn Pettersen har hatt hovedansvar for prøvetaking, Torgunn Sætre for analytisk arbeid med HPLC og Harry Efraimsen for vitellogenin-analyser ved NIVA. Ansvarlig for utsetting og prøvetaking i Bergensområdet, samt analyser av eggeskallsproteiner, har vært Anders Goksøyr, Universitetet i Bergen.

Oslo, 29. juni 1998

*Ketil Hylland*

---

# Innhold

<b>Sammendrag</b>	<b>6</b>
<b>Summary</b>	<b>7</b>
<b>1. Innledning</b>	<b>8</b>
1.1 Miljø-østrogen	8
1.2 Undersøkelser i andre land	9
1.3 Målet med undersøkelsen	9
<b>2. Utplassering og innsamling av torsk</b>	<b>10</b>
2.1 Utplassering av torsk i bur	10
2.2 Innsamling av villfisk	14
2.3 Forurensningssituasjonen i de utvalgte områdene	14
<b>3. Metoder</b>	<b>15</b>
3.1 Prøvetaking av fisk og sediment	15
3.2 Analyse av vitellogenin og eggeskallsprotein	15
3.3 Statistiske analyser	15
<b>4. Resultater</b>	<b>16</b>
4.1 Viltfanget torsk	16
4.2 Torsk holdt i bur	16
4.2.1 Resultater fra 1996	16
4.2.2 Resultater fra 1997	18
4.3 Faktorer som hadde betydning for vitellogenin-nivåer	19
4.4 Nonylfenol og nonylfenoletoksilater i sediment	20
4.5 Sammenligning mellom vitellogenin og eggeskallsprotein	21
<b>5. Diskusjon</b>	<b>22</b>
5.1 Viltfanget torsk	22
5.1.1 Effekter av miljø-østrogen på villfisk	22
5.1.2 Innvirkning av andre faktorer	22
5.2 Torsk holdt i bur	23
5.3 Konsentrasjoner av nonylfenol og nonylfenoletoksilater i sediment	23
5.4 Samlet vurdering - undersøkelser i 1995, 1996 og 1997	23
5.5 Sammenligning mellom vitellogenin og eggeskallsprotein	24

---

<b>6. Konklusjoner</b>	<b>25</b>
<b>7. Litteraturhenvisninger</b>	<b>26</b>
<b>Vedlegg A. Kartgrunnlag</b>	<b>29</b>
<b>Vedlegg B. Rådata - utplassert torsk 1996</b>	<b>42</b>
<b>Vedlegg C. Rådata - viltfanget torsk 1996</b>	<b>46</b>
<b>Vedlegg D. Rådata – utplassert torsk 1997</b>	<b>49</b>
<b>Vedlegg E. Rådata viltfanget torsk – 1997</b>	<b>53</b>
<b>Vedlegg F. Stasjonsbeskrivelser</b>	<b>57</b>
<b>Vedlegg G. ELISA - metoder og evaluering</b>	<b>61</b>
<b>Vedlegg H. Analyser av nonylfenol og nonylfenoletoksilater i sediment (ARISE)</b>	<b>64</b>

---

## Sammendrag

Det er stor oppmerksomhet omkring stoffer som enten er "hormon-hermere" eller "hormon-forstyrrende". Mange av de stoffene som har slike effekter er kjente miljøgifter slik som noen PCBer, dioksiner, noen DDT-metabolitter og enkelte metaller. I tillegg har det vist seg at andre stoffer som tidligere har vært ansett som mindre miljøskadelige, slik som enkelte plastmyknere og forbindelser i vaske- og rengjøringsmidler (alkylfenoler og alkylfenoletoksilater) også forstyrrer hormonsystemer. Den effekten som har vært mest undersøkt tilskrives "østrogen-lignende stoffer" eller miljø-østrogener. Dette er stoffer som direkte eller indirekte påvirker prosesser som reguleres av kjønnshormonet østrogen. Eksempler på dette er syntesen av eggeplomme-protein og produksjonen av eggeskallsprotein hos egg-leggende dyr (fisk, krypdyr, fugl). Disse proteinene vil normalt være tilstede i svært lave konsentrasjoner i blodet til individer som ikke er kjønnsmodne og i blodet til hanner, og en eventuell økning i denne vil være et tegn på at det aktuelle individet har vært eksponert for østrogen eller fremmedstoffer som ligner østrogen.

Målet med denne undersøkelsen var å kartlegge eventuelle effekter av miljø-østrogener i utvalgte områder langs kysten. Det ble samlet inn ungfisk av torsk fra Singlefjorden/Iddefjorden, Hvaler, Sandebukta, Langesundsfjorden og Frierfjorden i 1996 og 1997.

Videre ble torsk fra Arendal (1996) og ytre Oslofjord (1997) satt ut i bur i Iddefjorden, Hvaler, ved Moss, ved NIVAs forskningsstasjon på Solbergstrand, i en småbåthavn i Drøbak, i Sandebukta, i Langesundsfjorden og i Frierfjorden. Torsk som ble samlet inn i Bergensområdet ble satt ut to steder i 1996, en forurenset (Sandviken) og en referanse (Fanafjorden).

Det ble tatt blodprøve av alle fiskene ved innsamling, før utsetting og etter tre-fire ukers opphold i burene. Vitellogenin (Vg) ble målt i blodprøver fra all fisk. Sediment fra de utvalgte områder ble analysert for nonylfenoler og nonylfenoletoksilater. Nonylfenol er et miljø-østrogen.

Samlet tyder resultatene på at det er lave nivåer av miljø-østrogener i gjennomblandet kystvann i de undersøkte områdene. Det ble ikke satt ut bur med fisk i nærheten av punktkilder. Resultatene i 1996 og 1997 var ulike, noe som tilskrives at undersøkelsene ble foretatt til to ulike tider på året. Undersøkelsen i 1996 ble foretatt i november/desember, mens 1997-undersøkelsen ble gjort i oktober/november. I overensstemmelse med tidligere undersøkelser ble det funnet noe forhøyde verdier av plasma Vg hos torsk samlet inn eller holdt i bur i Grenlandsfjordene, men det er usikkert hva som er årsaken til dette.

Konsentrasjonene av nonylfenol og nonylfenoletoksilater i sediment var på nivå med konsentrasjoner i estuarier i andre europeiske land.

Noen av prøvene fra 1996-undersøkelsen ble analysert for både vitellogenin og eggeskallsprotein. Resultatene gir ikke holdepunkter for å anbefale bruk av eggeskallsprotein framfor vitellogenin som mål for effekter av miljø-østrogener.

## Summary

Title: Effects of environmental estrogens in Norwegian coastal waters

Year: 1998

Author: Ketil Hylland, John Arthur Berge, Anders Goksøyr, Oddbjørn Pettersen, Torgunn Sætre, Harry Efraimssen

Source: Norwegian Institute for Water Research, ISBN No.: ISBN 82-577-3231-1

The objective of this study was to clarify whether there are effects of environmental estrogens in Norwegian coastal waters. Juvenile Atlantic cod was collected at two sites in the Hvaler estuary, in Sandebukta, and in Langesundsfjord and Frierfjord in November/December 1996 and October/November 1997. In addition, juvenile cod from unpolluted areas were collected both years and caged for three weeks in Iddefjord, in the Hvaler estuary, close to Moss (near a sewage outlet), at NIVAs research station (Solbergstrand), in Drøbak (a small harbour), in Sandebukta (in the vicinity of a paper mill), in Langesundsfjord and in Frierfjord (industrial area) each year. Similarly, cod were collected in Bergen and caged at two sites, one contaminated (Sandviken) and one reference (Fanafjord) in 1996.

Vitellogenin was quantified in blood plasma of all fish using ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Sediment was sampled at some of the sites and analysed for content of nonylphenol and nonylphenol etoxylates.

There appears to be an obvious seasonal component in the ability of cod to respond to environmental oestrogens. The results indicate that there appear to be low levels of environmental oestrogens in coastal water in the indicated areas. However, there is a hitherto unexplained, consistent trend of elevated Vg in fish collected in or caged in the Grenland area.

Sediment concentrations of nonylphenol etoxylates were similar to those found in estuaries in other European countries.

The results of this study does not suggest that eggshell-proteins (vitelline envelope proteins, zona-radiata proteins) are better indicators than vitellogenin for the effects of xenoestrogens.



# 1. Innledning

Det forekommer både naturlige og fremmede stoffer i miljøet som påvirker hormonelle prosesser i akvatiske organismer. Hormoner er signalstoffer som skiller ut i spesielle vev i en organisme og transporteres med vevsvæsker til målorganet eller -organene. Felles for de fleste hormoner er at de har spesifikke effekter, virker ved lave konsentrasjoner på utvalgte organer, er strengt regulert ved ulike tilbakekoblingsmekanismer og brytes raskt ned etter å ha utført sin funksjon (Hardie, 1991). Hormoner styrer blant annet utvikling, differensiering, vekst, skallskifte og kjønnsmodning. I tillegg vil hormoner påvirke mange sentrale livsprosesser indirekte, slik som immunforsvaret og atferd knyttet til reproduksjon og fødeinntak. Det er derfor lett å tenke seg at stoffer som på en eller annen måte påvirker hormon-nivåer eller etterligner hormoner vil kunne ha store konsekvenser. Lista over slike "hormonforstyrrende" eller "hormon-hermende" stoffer har etterhvert blitt lang (se Colborn et al. 1993) og inkluderer de fleste kjente miljøgifter (f.eks. DDT-metabolitter, noen PCBer og PCB-metabolitter, metaller og dioksiner), men også endel stoffer som ikke tidligere har vært tenkt på som miljøgifter (enkelte plastmyknere og komponenter i industrivaskemidler). Det er også viktig å være klar over at mange naturlige stoffer, deriblant også hormoner, også forekommer i det akvatiske miljøet og at disse som oftest er langt mer potente enn hormon-hermerne. I denne sammenhengen har det foreløpig vært mest oppmerksomhet omkring steroler fra planter og hormoner fra mennesker og husdyr.

## 1.1 Miljø-østrogener

Diskusjonen omkring hormon-forstyrrende stoffer har hovedsakelig vært fokusert på stoffer som etterligner steroide hormoner og da særlig østrogen. Det er to hovedårsaker til dette: For det første har konsentrasjonene av og forholdet mellom kjønnshormonene testosteron og østrogen avgjørende betydning i kritiske faser av en organismes livsløp (deriblant kjønnsdifferensiering og -modning) og enhver forstyrrelse vil kunne være ødeleggende (Crews et al. 1995). Den andre hovedårsaken er at det eksisterer gode metoder til å kvantifisere responsen til østrogen-lignende stoffer, nemlig syntesen av proteiner knyttet til produksjon av egg hos hunn-dyr. Mest brukt er et forstadium til eggeplomme-protein, vitellogenin, som finnes hos alle egg-leggende vertebrater (altså fisk, fugl, krypdyr og amfibier; Heppell et al. 1995) og mange evertebrater (se f.eks. Bonnier and Baert, 1992). Eggeskallsproteiner har også vært foreslått som en slik markør for østrogen-lignende stoffer i miljøet (Arukwe et al. 1997). Det er imidlertid ikke bare de absolutte nivåene av kjønnshormoner som er viktige, men også interaksjoner med andre hormoner og balansen mellom de "hannlige" androgenene (som testosteron) og "hunnlige" østrogenene (som østrogen). Disse hormonene vil i noen grad motvirke og balansere hverandre og en burde derfor ha metoder som kunne identifisere begge typene effekter og også helst interaksjonene mellom dem. Det finnes dessverre ingen gode metoder til å kvantifisere effekter av stoffer med androgen effekt eller eventuelle interaksjoner med østrogen. I tillegg til stoffer som har effekter som ligner på de opprinnelige hormonene finnes det også stoffer i miljøet som inhiberer effektene av naturlige hormoner, anti-østrogener og anti-androgener. Det er foreløpig lite som er kjent om tilstedeværelsen av annet enn østrogen-lignende stoffer.

Det er etterhvert også en betydelig faglig diskusjon om korrektheten av begrepet "hormonforstyrrende stoffer" (endocrine disruptors) og hvordan det benyttes. I de fleste sammenhenger har dette begrepet kommet til å bety det samme som østrogen-lignende stoffer, men det er en lang rekke stoffer som kan ha alvorlige effekter i økosystemet som ikke fanges opp innen denne definisjonen (Kime, 1995). Et åpenbart eksempel her er spormetallet sink (Zn): Mangel på sink vil kunne føre til hormonforstyrrelser og for høy belastning med sink kan føre til det samme (Kime et al., 1997). Et annet eksempel er at miljøgifter kan forstyrre "luktesansen" til fisk slik at han-fisk hos noen arter produserer mindre melke

(melke-produksjonen initieres hos blant annet laksefisk ved at hun-fiskene skiller ut et progesteron-derivat som han-fisken lukter).

I tillegg til de sentrale kjønns-hormonene hos vertebrater og evertebrater er det også andre steroide hormoner, slik som "stress-hormoner" (kortikosteroider) hos vertebrater og skall-skifte hormoner (ekdyson) hos noen evertebrater (ledd-dyr). Det er foreløpig lite som tyder på at hormon-lignende stoffer i miljøet interagerer direkte med stress-hormoner eller deres reseptorer, men det er ikke usannsynlig at noen stoffer kan påvirke skall-skifte hos f.eks. krepsdyr via interaksjoner med skallskifte-hormonet ekdyson.

## 1.2 Undersøkelser i andre land

En av årsakene til at det etterhvert har blitt stor oppmerksomhet omkring de mulige effekter av miljø-østrogener er undersøkelsene i engelske elver (Harries et al. 1997; Harries et al. 1996). I England har de funnet effekter på fisk, dvs. økning i vitellogenin i regnbueørret (han-fisk), i avløp fra alle undersøkte kloakk-rensanlegg unntatt et (Harries et al. 1995). De har også gjort et omfattende arbeid på å identifisere de aktive stoffene i avløpet, blant annet ved hjelp av en genmodifisert gjær (Routledge and Sumpter, 1996). De første resultatene tydet på at alkylfenoler forårsaket de observerte effektene (Harries et al. 1995), men i nyere undersøkelser har de konkludert med at det er tilstrekkelig østrogen (fra mennesker og/eller husdyr) i avløpet til å forklare effektene (Thomas, 1997). Videre har nyere undersøkelser vist at mort fra en rekke ulike elver også har forhøyde nivåer av vitellogenin, men i tillegg er en vesentlig andel av disse "intersex" (kjønnsorganene er en blanding av ovarier og testes) (Jobling et al., 1997). Det meste av arbeidet i England er gjort i elver med ferskvannsfisk. Nylig har det imidlertid utkommet et arbeid der det også påvises effekter på skrubbe i estuarier som mottar avløp fra kloakk-rensanlegg (Lye et al. 1997). Hennes resultater har blitt underbygget av resultatene fra en nyere undersøkelse av Allen (1997) der de fant ekstremt forhøyde nivåer av vitellogenin i hann-skrubbe fra de fleste undersøkte estuarier i England.

Det har lenge vært forventet at ulike typer miljøgifter vil forstyrre reproduksjon hos fisk og dette har også vært dokumentert i studier fra USA (Casillas et al. 1991; Johnson et al. 1993). Dette har imidlertid vært fisk som kommer fra svært belastede områder. Det er også sannsynlig at belastningen fra utslipp fra kloakkrensanlegg i engelske estuarier er langt større enn den en vil finne i norske kystområder.

## 1.3 Målet med undersøkelsen

Målet med denne undersøkelsen var å få klarlagt om det forekommer nivåer av østrogen-lignende stoffer som gir effekter på fisk i norske kystområder.

Det ble valgt ut områder langs kysten med ulike typer forurensningsbelastning. Noen stasjoner ble plassert i områder med kjent tidligere eller nåværende industriell forurensning. Det ble også benyttet referansestasjoner der en forventet at det ikke skulle være vesentlig forurensningsbelastning.

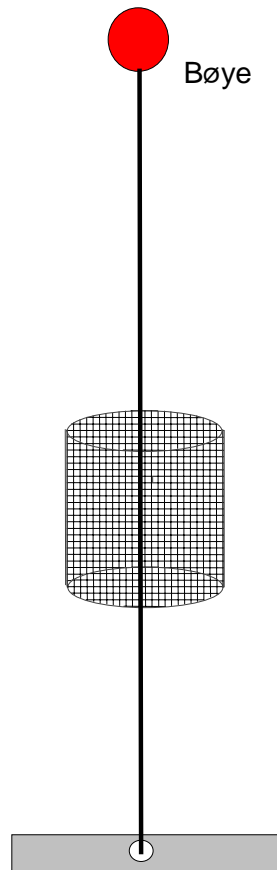
I tillegg til hovedmålet var det delmål å:

1. sammenholde resultatene med resultatene fra undersøkelsen i 1995,
2. sammenholde resultatene med nivåer av nonylfenol og nonylfenoletoksilater i sediment,
3. sammenligne to metoder for måling av effekter av miljø-østrogener, induksjon av vitellogenin og eggeskallsprotein.

## 2. Utplassing og innsamling av torsk

### 2.1 Utplassing av torsk i bur

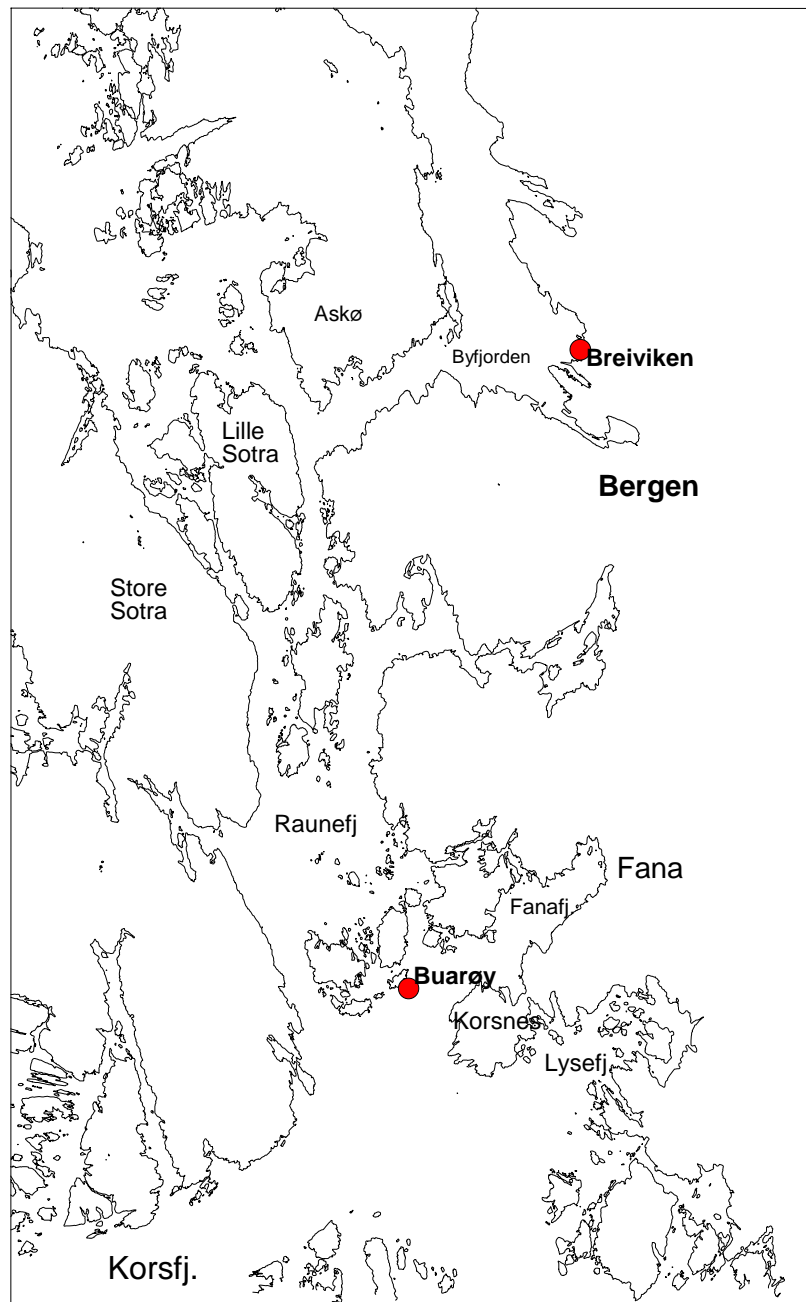
Forsøk med fisk i bur (se **Figur 1**) ble utført på 10 lokaliteter i 1996 og 8 lokaliteter i 1997. To av stasjonene i undersøkelsen i 1996 er i Bergensområdet (**Figur 2**) mens de resterende 8 stasjonene ligger i fjordområder/estuarier på kyststrekningen fra Svenskegrensa til Langesund (**Figur 3**).



**Figur 1.** Prinsippkisse av bur brukt i forsøk. Forsøksbur laget av syrefast netting. Høyde 510 mm, bredde 410 mm, hull 6 mm. Åpning i toppen av buret. Lodd ca 25 kg.

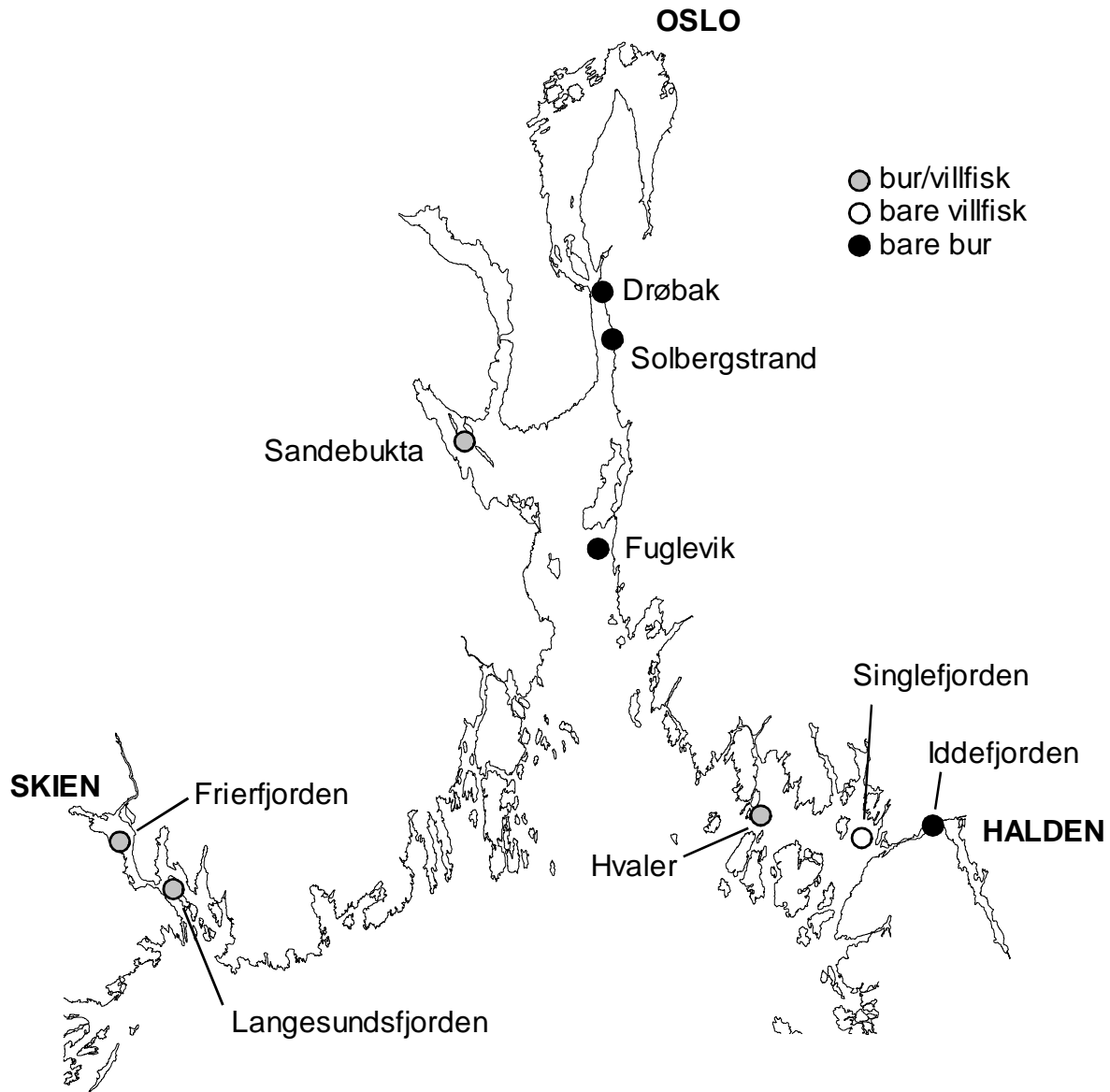
Fisken som ble satt ut i bur i ytre Oslofjord/Skagerrak i 1996 ble innsamlet med strandnot nær Nidelvens munning (Arendal) tidlig i november 1996. Fisken ble den 12. november etter et kort opphold (ca en uke) ved Havforskningens biologiske stasjon i Flødevigen fraktet til NIVAs forskningstasjon på Solbergstrand (MFS) i et transportkar (1000 l) med oksygenert sjøvann. Ved MFS ble fisken holdt i et kar på 1000 l som ble tilført vann fra 20 m dyp fra fjorden utenfor inntil den ble satt ut i sjøen i de sylindformede burene på de enkelte lokalitetene (**Figur 2** og **Figur 3**).

Fisken som ble satt ut i bur i ytre Oslofjord/Skagerrak i 1997 ble innsamlet med ruser sør for Hurumlandet i september/oktober 1997. Etter formalinbehandling på MFS ble fisken utplassert på de 8 stasjonene som er angitt i **Figur 3**.



**Figur 2.** Kart som viser forsøkslokalitene i Bergensområdet (utsnitt av sjøkart som viser hver enkelt lokalitet finnes i vedlegg A).

Under transport med bil til utsettingsområde ble fisken satt i kar som ble tilført oksygen. Under overføring av fisken fra transportkaret til båten som skulle brukes ved utsettingen, ble fisken plassert i merket bøtte med sjøvann. Burene ble plassert med en avstand fra havbunnen på minst 1,5 m. Ved avslutning av eksponeringsperioden (3-4 uker) ble samme prosedyre gjentatt i omvendt rekkefølge. Der burene var plassert, ble det målt dybde, salinitet og temperatur (**Tabell 1**).



**Figur 3.** Kart som viser forsøksområdene på strekningen fra Sverige til Langesundsområdet (utsnitt av sjøkart som viser hver enkelt lokalitet finnes i vedlegg A).

Tidspunkt og antall fisk brukt i utsettingsforsøkene er vist i **Tabell 2**. Vekt av den samme fisken sees i **Tabell 3** og **Tabell 4**. I 1996 var det problemer med lukkemekanismen til burene på tre steder, mens hele riggen ble borte på en stasjon i 1997 (se **Tabell 4**).

Burene som ble benyttet til utsetting av torsk i Hvaler-området hadde litt større maskevidde enn de andre. Alle burene ble testet før bruk, men det er sannsynlig at torsken gikk ned såpass i vekt under eksponeringen at den kunne slippe ut gjennom maskene. De største fiskene ble igjen i buret (**Tabell 4**).

**Tabell 1.** Dybde for utplassering av bur samt temperatur og saltholdighet ved avslutning av forsøket.

Lokalitet	1996			1997		
	Dyp (m)	Temp (°C)	Salinitet	Dyp (m)	Temp (°C)	Salinitet
Solbergstrand (MFS)	10	7.8	30.8	20	9.7	30.9
Båthavna i Drøbak	4	7.6	29.7	4	9.2	29.4
Fuglevik (Moss)	-*	-	-	-*	-	-
Iddefjorden	-*	-	-	20	10.7	27.3
Hvaler	17	5.2	31.0	20	9.7	22.5
Frierfjorden	20	8.7	31.7	18	12.7	31.4
Langesundsfjorden	10	5.1	30.4	10	12.3	32.3
Sandebukta	-*	-	-	20	10.9	31.6
Sandviksbukten i Byfjorden (Bergen)	-*	-	-	-**	-	-
Fanafjorden (Bergen)	-*	-	-	-**	-	-

\* parametre ikke målt, \*\* ikke utført 1997

**Tabell 2.** Utsetting og inntak av merket fisk i 1996 og 1997. Det ble satt ut 20 fisk i hvert bur.

Lokalitet	utsetting-innsamling 1996	utsetting-innsamling 1997	Inntak 1996	Inntak 1997
Solbergstrand	22/11-13/12	16/10-12/11	8	19
Båthavna i Drøbak	22/11-13/12	16/10-12/11	18	19
Fuglevik (Moss)	29/11-23/12	14/10-11/11	all fisk tapt	bur tapt
Iddefjorden	5/12-3/12	21/10-18/11	all fisk tapt	20
Hvaler	5/12-27/12	21/10-18/11	10	3
Frierfjorden	27/11-17/12	9/10-4/11	19	19
Langesundsfjorden	27/11-17/12	9/10-4/11	17	19
Sandebukta	2/12-20/12	14/10-11/11	all fisk tapt	19
Sandviksbukten (Bergen)	21/11-12/12	-*	19	-*
Fanafjorden (Bergen)	21/11-12/12	-*	20	-*

\* ikke utført 1997

**Tabell 3.** Antall, lengde og vekt av fisk satt ut i bur i 1996. Det ble satt ut 20 fisk i hvert bur.

Lokalitet	Antall fisk prøvetatt etter forsøket	Midlere vekt (g) ved utsetting (min-maks)	Midlere vekt (g) ved inntak (min-maks)	Vekt-tap (%)
Solbergstrand	8	31.8 (19-50)	29.4 (20.6-43.)	11.5
Båthavna i Drøbak	18	33.4 (21-49)	31.4 (19.3-45.5)	6.6
Fuglevik (Moss)	Alle tapt	17.2 (7-32)	-	-
Iddefjorden	Alle tapt	14.3 (10-24)	-	-
Hvaler	10	19.2 (11-28)	19.8 (10.7-29.9)	14.8
Frierfjorden	19	73.8 (56-98)	67.4 (50.1-87.5)	8.2
Langesundsfjorden	17	38.2 (26-64)	34.2 (20.1-54.3)	13.7
Sandebukta	Alle tapt	16.8 (12-31)	-	-
Sandviksbukten (Bergen)	19	129 (93-182)	117 (80-168)	9.1
Fanafjorden (Bergen)	20	133 (72-191)	122 (66-169)	8.1

**Tabell 4.** Antall, lengde og vekt av fisk satt ut i bur i 1997. Det ble satt ut 20 fisk i hvert bur.

Lokalitet	Antall fisk prøvetatt etter forsøket	Midlere vekt (g) ved utsetting (min-maks)	Midlere vekt (g) ved inntak (min-maks)	Vekt-tap (%)
Solbergstrand	19	137 (96-184)	112 (82-151)	16.6
Båthavna i Drøbak	19	146 (84-194)	123 (70-162)	15.9
Fuglevik (Moss)	Alle tapt	-	-	-
Iddefjorden	20	118 (68-170)	99 (58-145)	18.1
Hvaler	3	120 (70-168)	138 (128-143)	16
Frierfjorden	19	117 (78-160)	95 (60-138)	19.1
Langesundsfjorden	19	131 (92-178)	109 (70-151)	16.5
Sandebukta	18	161 (88-218)	138 (68-185)	18.2

## 2.2 Innsamling av villfisk

Innsamling av villfisk for umiddelbar prøvetaking av blod ble gjennomført på 5 lokaliteter i 1996 og 1997 (se **Figur 3**), i samme område som 5 av bur-lokalitetene. Det ble imidlertid ikke innsamlet villfisk fra Iddefjorden. Derimot ble det innsamlet fisk i Singlefjorden nær Iddefjordens munning. Innsamlingstidspunkt og vekt av denne er vist i **Tabell 5**. Villfisken som ble fanget inn på de fem lokalitetene ble fraktet til MFS i transportkar der det ble tatt blodprøver av fisken. All innsamlet fisk ble målt, veid og kjønnsbestemt (der dette var mulig).

**Tabell 5.** Antall, lengde og vekt av innfanget villfisk i 1996 og 1997.

Lokalitet	tidspunkt 1996	antall 1996	Midlere vekt (min-maks) (g)	tidspunkt 1997	antall 1997	Midlere vekt (min-maks) (g)
Singlefjord/Iddefjorden	5/12	18	98 (48-219)	2/10	20	81 (52-126)
Hvaler	6/12	9	231 (166-377)	23/10	18	83 (52-126)
Frierfjorden	27/11	11	72 (22-158)	9/10	20	144 (56-230)
Langesundsfjorden	27/11	20	53 (26-84)	9/10	20	81 (48-136)
Sandebukta	2/12	12	82 (12-156)	3/10	20	97 (62-136)

## 2.3 Forurensningssituasjonen i de utvalgte områdene

Detaljkart for hvert av områdene kan finnes i vedlegg A og nærmere beskrivelse av forurensningssituasjonen i vedlegg F. De fleste kjente miljøgifter har vist effekter på hormonregulering hos test-organismer, men det er også naturlig forekommende stoffer som har slike effekter. Lite er kjent om de spesifikke virkningsmekanismene hos fisk for de fleste av disse stoffene. I England har en identifisert naturlig østrogen og alkylfenoler som to stoffgrupper som har betydning for observerte østrogen-effekter på viltlevende fisk. Klorerte miljøgifter (dioksiner, PCB) og deres metabolitter har også vært knyttet til hormon- og reproduksjonsforstyrrelser hos eggleggende dyr, men lite er kjent om eventuelle effekter på fisk. Metaller er trolig mindre viktige i denne sammenhengen. Med utgangspunkt i dagens kunnskap vil mulige kilder til miljø-østrogenener kunne være: Kloakk-utslipp, deponier, elver, avrenning (jordbruksområder/byer), tekstilindustri, plastindustri, treforedlingsindustri og småbåthavner.

## 3. Metoder

### 3.1 Prøvetaking av fisk og sediment

Før utsetting av fisken, ble den individuelt merket, tatt blodprøver av, målt og veiet. Dette ble alltid gjort samme dag som fisken ble satt ut. Merking av fisken ble gjort med PanJet merkepenn med fargestoffet Alician blue. Blod fra fisken ble tatt med sprøyte forbehandlet med heparin og aprotinin. Blodet ble separert ved sentrifugering og plasma ble plassert på merkete prøverør og lagt ned i flytende nitrogen.

Sediment ble prøvetatt med en Niemistö kjerneprøvetager. De øverste 2-3 cm av sedimentet ble tatt og frosset ved -20 C. Sedimentprøvene ble sendt til ARISE, Universitetet i Amsterdam, i frosset tilstand. Se vedlegg H for analysemetoder. Referansesediment ble innsamlet på JAMP<sup>1</sup>-stasjon 77S, i Skagerrak utenfor Arendal (58°24.20N, 09°01.80E).

### 3.2 Analyse av vitellogenin og eggeskallsprotein

Det ble benyttet en direkte ELISA til analyse av prøvene tatt i 1996 og en kompetitiv ELISA til analyse av prøvene tatt i 1997. Årsaken til dette var at de innledende analysene på plasma fra fisk innsamlet i 1996 viste at nivåene lå nær deteksjonsgrensen for den kompetitive metoden som hadde blitt benyttet til da (Hylland & Braaten, 1996). For å unngå gjentatt tining og frysing av prøvene ble det derfor bestemt å benytte en direkte metode som hadde lavere deteksjonsgrense. Ulempen med denne metoden er at den ikke kan benyttes til å gi absolutte konsentrasjoner (det er problematisk å etablere en korrekt standardkurve). Før 1997-materialet skulle analyseres hadde det blitt etablert en mer følsom kompetitiv ELISA og alle prøvene kunne analyseres kvantitativt. Se Vedlegg G. for detaljer omkring analysemetodene. Mengdene av eggeskallsprotein ble kvantifisert med en direkte ELISA (Arukwe et al., 1997).

### 3.3 Statistiske analyser

Endring eller totalkonsentrasjonene av Vg i plasma til torsk holdt i bur eller innsamlet på de ulike lokalitetene ble sammenlignet med enveis variansanalyse, ANOVA, på log-transformerte verdier (Sokal and Rohlf, 1981). Bidrag fra andre faktorer til variasjon i Vg-konsentrasjon i individuelle torsk ble undersøkt med kovariansanalyse, ANCOVA (Draper and Smith, 1981).

---

<sup>1</sup> JAMP – Joint Assessment and Monitoring Programme, Oslo & Paris Commission (OSPARCOM)



## 4. Resultater

### 4.1 Viltfanget torsk

Torsk ble samlet inn fra Singlefjorden, Hvaler, Sandebukta, Langesundsfjorden og Frierfjorden i både 1996 og 1997. I en tidligere undersøkelse (1995; Hylland & Braaten, 1996) ble det samlet inn fisk fra noen av de samme stasjonene. Resultatene fra de tre årene er presentert samlet i **Figur 4**. Stasjonene i 1995 var ikke identiske med de som ble benyttet i 1996 og 1997, men i de samme områdene. I 1995 ble fisk samlet inn i september/oktober, i 1996 i desember og i 1997 i oktober/november.

Ingen av torskene var tilsynelatende kjønnsmodne og det kunne ikke detekteres noen forskjeller mellom kjønnene når det gjaldt konsentrasjoner av vitellogenin i plasma.

Torsken innsamlet i Bergensområdet (Fanafjorden) hadde lavere nivåer av vitellogenin enn fisk fra noen av de andre områdene. Nivåene av plasma Vg hos all fisk lå imidlertid langt lavere i 1996 enn det som ble funnet i 1995-undersøkelsen. I 1997 ble det samlet inn fisk fra de samme stasjonene. Det var signifikant høyere nivåer av Vg i plasma til torsk innsamlet i Langesund enn i plasma til torsk samlet inn i Singlefjorden (**Figur 4**). Vitellogenin-nivåene i de andre gruppene lå mellom disse.

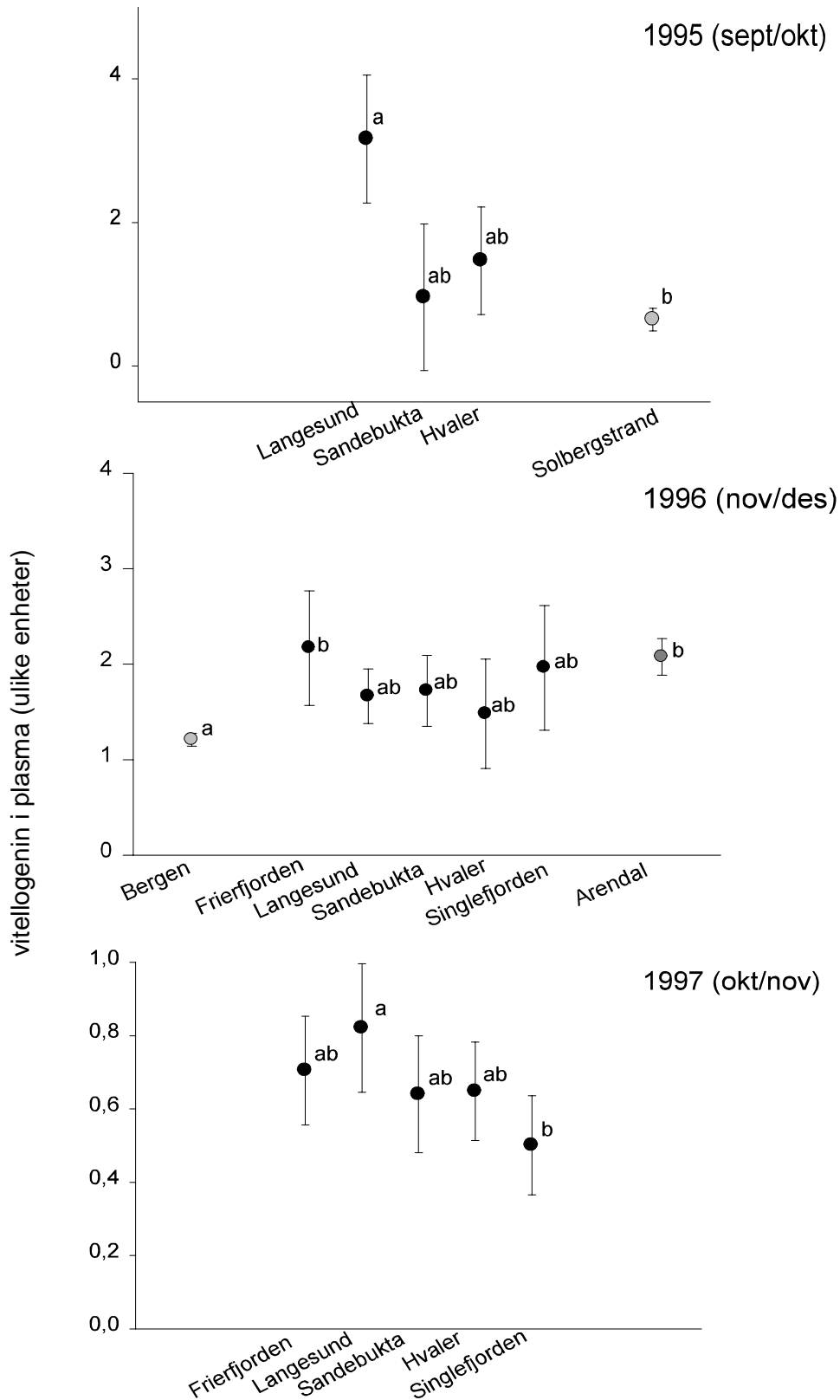
### 4.2 Torsk holdt i bur

#### 4.2.1 Resultater fra 1996

Siden alle torskene ble merket og prøvetatt før utsetting oppgis resultatene som endring i plasma vitellogenin (Vg). Det var ingen signifikante forskjeller mellom de undersøkte områdene med hensyn til endring av plasma Vg hos torsk holdt i bur i 1996 (**Figur 5**).

Det var tegn til at torsk holdt i Sandviken hadde noe større variasjon i Vg-respons enn torsk holdt i Fanafjorden, men gjennomsnittet forandret seg ikke signifikant ved noen av stasjonene.

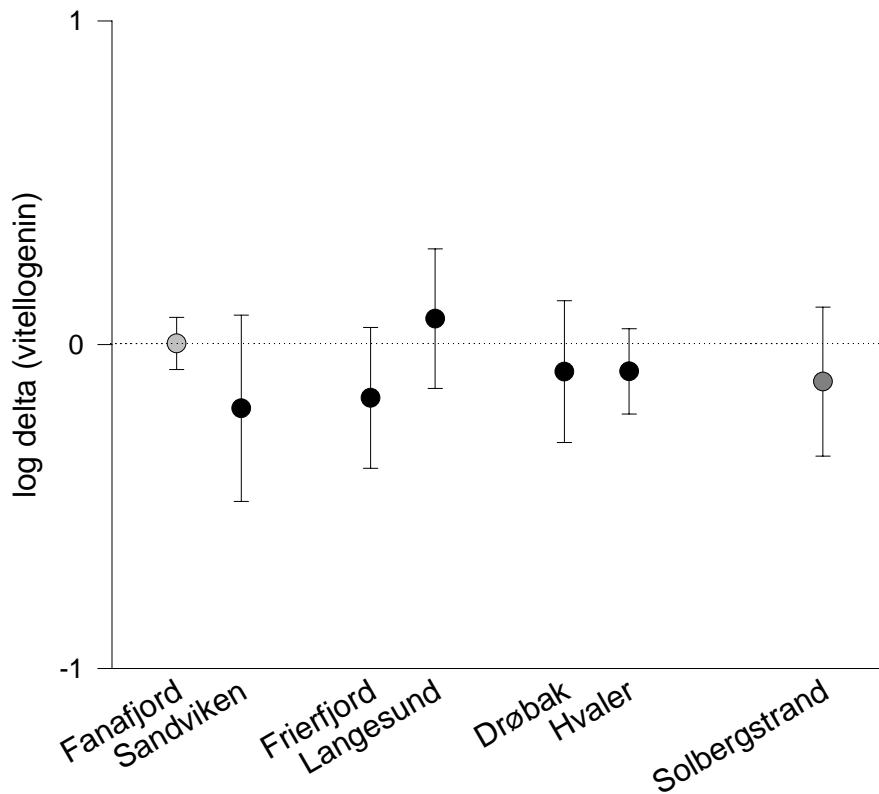
Det var også små endringer i Vg hos torsk holdt i bur i Frierfjorden i tre uker. Et trekk som også ble funnet hos torsk holdt i andre områder var at plasma Vg hos individer som hadde nivåer over eller omkring 2 (relative enheter) fikk lavere konsentrasjoner av Vg mens individer som hadde lave nivåer nesten uten unntak fikk forhøyde Vg-konsentrasjoner etter eksponering. Det var større variabilitet i plasma Vg hos torsk satt ut i Langesundsfjorden og denne holdt seg også etter tre ukers eksponering. Det var også gjennomsnittlig noe større endring i plasma Vg hos torsk holdt i Langesundsfjorden enn torsk holdt andre steder (**Figur 5**).



**Figur 4.** Vitellogenin i plasma til torsk innsamlet i 1995, 1996 og 1997. Gjennomsnitt med 95% konfidensintervall. Data for Solbergstrand (1995) gjelder fisk holdt på NIVAs stasjon, data for Bergen og Arendal (1996) gjelder 0-verdier for fisk brukt i utsettingsforsøk. Merk at det er ulike enheter for de tre årene.  $n = 9-20$  for ulike grupper og år. Grupper med samme symbol (a, b) er ikke signifikant ulike ( $p < 0.05$ ).

Det var liten forandring i plasma Vg hos torsk holdt i småbåthavna i Drøbak. Plasma Vg hos individer med verdier over 2 ved start sank til lavere nivåer, mens de øvrige viste en svak økning eller ingen endring. Et tilsvarende mønster ble funnet for referansegruppen holdt utenfor NIVAs forskningsstasjon ved Solbergstrand, sør for Drøbak. Individer med plasma Vg over 2 fikk alle lavere konsentrasjoner av Vg etter tre uker eksponering, mens den ene torsken som hadde lavere konsentrasjon ved start fikk forhøyd Vg. Det var noe dødelighet i denne gruppen, derfor er det et mindre antall fisk her enn for de foregående gruppene.

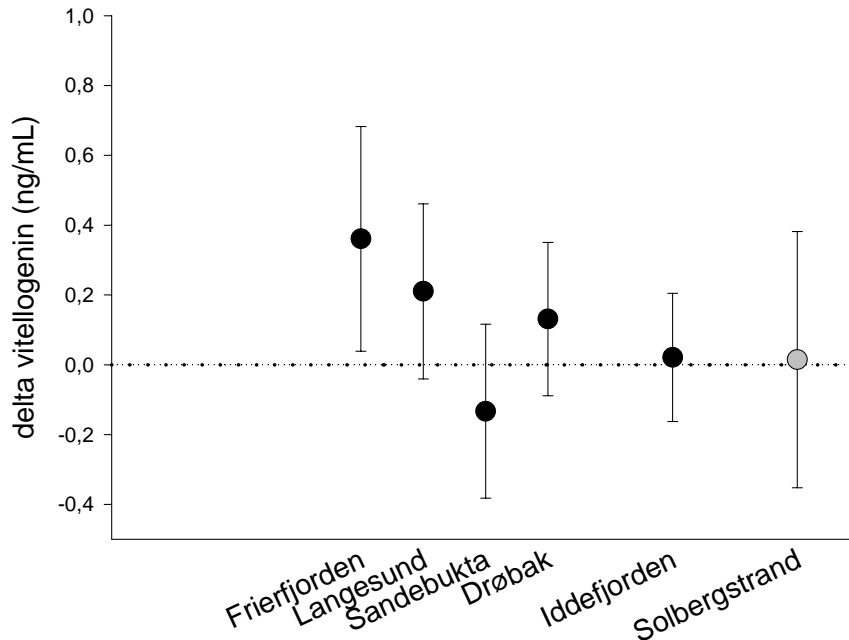
Det var ingen forandring i plasma Vg hos torsk holdt i Hvaler-området.



**Figur 5.** Endring i plasma vitellogenin (slutt-start) hos torsk holdt i bur i de angitte områdene i 1996. Gjennomsnitt og 95% konfidensintervall. Linjen ved 0 representerer ingen endring fra start til slutt.  $n = 12, 13, 17, 16, 13, 5, 6$  for de respektive gruppene (fra venstre). Merk log-transformerte data.

#### 4.2.2 Resultater fra 1997

I 1997 ble det ikke utplassert fisk i Bergensområdet. På en stasjon, Fuglevik ved Moss, var hele riggen borte og på en stasjon, i Hvalerområdet, hadde fisken trolig blitt så "tynn" at den klarte å slippe ut gjennom maskene i buret. Siden alle torskene ble merket og prøvetatt før utsetting oppgis resultatene som endring i plasma Vg. Det var ingen forskjeller mellom områdene med hensyn til endring i plasma Vg (**Figur 6**). Fisk holdt i Grenlandsfjordene hadde noe forhøyde verdier av Vg sammenlignet med de andre gruppene, men forskjellene var ikke signifikante.



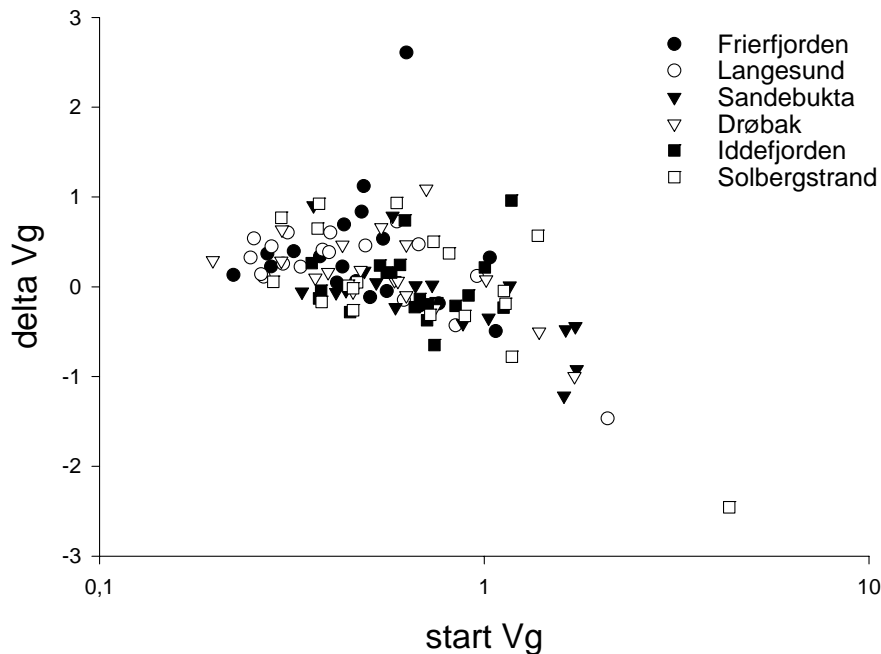
**Figur 6.** Endring i plasma vitellogenin (slutt-start) for torsk holdt i bur i de angitte områdene i 1997. Gjennomsnitt og 95% konfidensintervall er presentert for alle områdene. Linjen ved 0 representerer ingen endring fra start til slutt. n = 19, 18, 17, 19, 19, 19 for de respektive gruppene (fra venstre).

### 4.3 Faktorer som hadde betydning for vitellogenin-nivåer

Det ble ikke funnet at kjønn hadde innflytelse på nivået av plasma vitellogenin hos utplassert torsk i noen av årene, hverken totalnivåer eller endring. Det var imidlertid visse tegn til at størrelsen til torsken kunne ha betydning. Fisken som ble satt ut i Bergen i 1996 var noe større enn de andre, men endringen i plasma vitellogenin var lik den i de andre gruppene. I 1997-dataene var det tegn til at startnivået av Vg kunne ha betydning for potensialet til økning (**Figur 7**). Dette kan indikere at torsken som ble benyttet har vært pre-eksponert og derfor ikke ga maksimal respons.

I en kovariansanalyse med endring i Vg som avhengig faktor var det kun start-Vg som hadde signifikant bidrag (resultater ikke vist). Faktorer som sted, kjønn, vekt og vekt-endring bidro ikke til å forklare variabiliteten i Vg-endring.

Tilsvarende kovariansanalyse med Vg i viltfanget torsk ga et noe annet resultat. I denne analysen hadde sted og vekt signifikante bidrag. Som nevnt ovenfor var det signifikant mer Vg i plasma til torsk fra Langesund sammenlignet med torsk fra Iddefjorden, noe som også ble reflektert her. I tillegg var det tilsynelatende noe høyere nivåer av Vg i større fisk. Kjønn, vekt eller kondisjon bidro ikke til å forklare variabilitet i plasma Vg.



**Figur 7.** Sammenheng mellom start-nivå av vitellogenin og endring etter eksponering (1997). Merk log-akse for start-nivå av vitellogenin.

Andre naturlige faktorer som vil kunne ha betydning er vanntemperatur, endring i vanntemperatur, fødetilgang (i den grad det er noen) og begynnende kjønnsmodning. Det var lavere temperatur i Hvaler (omkring 5°C) og Langesundsfjorden (omkring 8°C) ved innhenting av fisken enn i de andre områdene. Fisk fra Grenlandsområdet hadde de høyeste gjennomsnittlige endringen i plasma vitellogenin i begge år, men fisken fra Hvaler-området grupperte seg sammen med torsk holdt i Drøbak og ved Solbergstrand (**Figur 5** og **Figur 6**). Disse resultatene tyder ikke på at temperaturen på innhentingstidspunktet hadde direkte betydning for Vg-nivået i plasma.

Det var også noe ulike vekt-tap i de ulike gruppene, både i 1996 og 1997. Torsk holdt i Drøbak og Frierfjorden hadde minst vekt-tap (7-8%), mens fisk i Hvaler og Langesundsfjorden hadde høyest vekt-tap (13-15%). Resultatene tyder imidlertid ikke på at en større eller mindre nedgang i vekt påvirket vitellogenin-nivåene i plasma.

#### 4.4 Nonylfenol og nonylfenoletoksilater i sediment

Det var lave konsentrasjoner av nonylfenol og nonylfenoletoksilater i sediment fra alle stasjoner (**Tabell 6**). Konsentrasjonene av nonylfenol var under deteksjonsgrensen i alle prøver unntatt sediment innsamlet i Langesundsfjorden. Det var større forskjeller i nivåer av etoksilater, der de høyeste konsentrasjonene ble funnet i sediment fra Hvaler. Den laveste konsentrasjonen av etoksilater ble funnet i sediment fra referanseområdet utenfor Arendal.

**Tabell 6.** Konsentrasjoner av nonylfenol (NP) og nonylfenoletoksilater (NPE) i sediment fra angitte områder. Verdier er angitt i  $\mu\text{g/g}$  tørt sediment.

område	dato	NP	sum NPE	NPE tilstede
Arendal (referanse)	9-10-97	<0.007	0.012	NP(2-4)E
Frierfjorden	15-10-97	<0.006	0.037	NP(1-3)E
Langesundsfjorden	14-9-97	0.008	0.054	NP/NP(1-4)E
Sandebukta1	5-10-97	<0.002	0.021	NP(1-4)E
Drøbak	16-10-97	<0.006	0.052	NP(2-4)E
Hvaler	21-10-97	<0.015	0.145	NP(1-4)E
Iddefjorden	21-10-97	<0.007	0.039	NP(1-3)E
Solbergstrand	16-10-97	<0.004	0.052	NP(1-4)E

#### 4.5 Sammenligning mellom vitellogenin og eggeskallsprotein

I plasma fra torsk prøvetatt i Bergensområdet i 1996 ble det analysert for både vitellogenin og for eggeskallsproteiner (zona-radiata proteiner). Det var ingen stasjonsforskjeller i plasma vitellogenin eller eggeskallsprotein for torsk holdt i bur i Fanafjorden og Sandviken. Vitellogenin har imidlertid større spenn i konsentrasjoner enn eggeskallsprotein og vil derfor kunne tenkes å gi et bedre grunnlag til å kunne detektere forskjeller (**Tabell 7**). Det syntes ikke å være kjønnsforskjeller med hensyn på hverken vitellogenin eller eggeskallsprotein, noe som kanskje ikke er så overraskende med tanke på at dette er fisk som ikke er kjønnsmoden.

**Tabell 7.** Konsentrasjoner av vitellogenin og zona-radiata protein i torsk innsamlet i Bergensområdet. Fisken var ikke kjønnsmoden, men kunne allikevel klassifiseres etter kjønn.

parameter	område	kjønn	median	minimum	maksimum
vitellogenin	Fanafjorden	hann	1.17	0.67	1.38
		hunn	1.12	0.75	1.86
	Sandviken	hann	0.91	0.08	1.86
		hunn	1.15	0.31	2.41
eggeskallsprotein	Fanafjorden	hann	0.33	0.31	0.40
		hunn	0.37	0.32	0.67
	Sandviken	hann	0.34	0.31	0.44
		hunn	0.34	0.29	0.42

## 5. Diskusjon

All torsk som ble samlet inn i november og desember 1996 hadde lave nivåer av både vitellogenin og eggeskallsproteiner i plasma. Det virket sannsynlig at det kunne være andre faktorer som spilte inn enn at det eventuelt var lave konsentrasjoner av miljø-østrogener. Undersøkelsen ble derfor gjentatt i 1997, men tidligere på høsten (oktober/november). I begge år ble det innsamlet villfisk og torsk ble satt i bur i 3-4 uker i utvalgte områder. Torsken som ble holdt i bur ble alltid plassert i gjennomblandet vann og ikke nær punktutslipp.

### 5.1 Viltfanget torsk

#### 5.1.1 Effekter av miljø-østrogener på villfisk

For torsk som ble samlet inn i november og desember 1996 var det høyere konsentrasjoner av plasma vitellogenin (Vg) hos torsk fra Arendal og Frierfjorden sammenlignet med torsk fra Bergen. Det var små forskjeller i plasma vitellogenin hos torsk fra andre områder. Det var imidlertid svært lave nivåer av vitellogenin i plasma hos all fisk.

Også for torsk innsamlet i 1997 var det forskjeller mellom gruppene. Torsk som ble samlet inn i Langesund hadde signifikant høyere nivåer av plasma vitellogenin enn torsk innsamlet i Singlefjorden. Torsk fra andre områder hadde verdier som lå mellom disse ytterpunktene. Forskjellene i plasma vitellogenin er små sammenlignet med forskjeller som har vært funnet i andre studier, særlig i England (Harries et al. 1997; Harries et al. 1996; Jobling et al. 1996). En bør imidlertid være oppmerksom på at fisken i dette arbeidet ikke ble eksponert for en punktkilde, men holdt i gjennomblandet vann i kystområder. I undersøkelsene i England har fisken (regnbueørret) som oftest blitt plassert i nesten ufortynnet avløp fra renseanlegg. Det nærmeste sammenligningsgrunnlaget er studiene av skrubbe i engelske estuarier (Lye et al. 1997). Lye et al. (1997) fant klare responser (økt vitellogenin) hos skrubbe fra forurensningsbelastede estuarier, noe som ikke kan sies om responsen hos torsk i norske kystfarvann.

#### 5.1.2 Innvirkning av andre faktorer

Det er særlig to faktorer som vil kunne påvirke vitellogenin-responsen hos villfisk, nemlig fotoperiode og vanntemperatur (Andersson et al. 1992). Begge disse faktorene er viktige for synkronisering av modning og gytetidspunkt for kjønnsmoden fisk, men vil også trolig kunne påvirke ikke-kjønnsmoden fisk. Det er flere studier som viser at temperatur påvirker vitellogenin-syntesen hos fisk (Korsgaard et al. 1986; Mackay and Lazier, 1993). Dette vil kunne skje direkte gjennom nedsatt metabolisme og protein-syntese ved lavere temperatur (fisk er jo vekselvarme) og/eller forskyvning av modningsprosesser. Den direkte effekten vil kunne forsterkes ved at konsentrasjoner i plasma (som jo er det som måles) trolig øker ikke-lineært med økt syntese i lever. Med økt vitellogenin-syntese i lever vil plasma-konsentrasjonen av vitellogenin kunne øke eksponensielt (Olin & von der Decken, 1989). Det er imidlertid ingen publiserte undersøkelser som viser at årstid har effekter på hvordan villfisk påvirkes av miljø-østrogener. Resultatene som ble funnet i denne undersøkelsen tyder på at det er en klar effekt av årstid på hvordan viltlevende fisk (og fisk holdt i bur) vil kunne gi respons på eksponering for miljø-østrogener. Det er ikke egnet å gjøre overvåking av miljø-østrogener i desember, men det er fremdeles uavklart hvordan responsen varierer gjennom resten av året.

Resultatene som ble funnet her tyder også på at utgangsnivået av Vg i plasma kan ha betydning ved lave Vg-nivåer (se nedenfor) og at det er en mulig effekt av størrelse. Begge disse effektene var svake og vil trolig ha liten betydning for responsen ved eksponering for høyere konsentrasjoner av østrogen-lignende stoffer.

## 5.2 Torsk holdt i bur

Det var ikke signifikant forandring i plasma vitellogenin hos torsk holdt i bur i 1996 eller 1997 (sluttnivå – startnivå hos individuelle fisk). Det var imidlertid tilsynelatende en effekt av årstid på nivåer (og responser) av plasma vitellogenin. Både nivåer og endringer av plasma vitellogenin var langt lavere i 1996 enn i 1997, noe som knyttes til at undersøkelsen ble foretatt senere på året i 1996 enn i 1997.

Med utgangspunkt i tidligere undersøkelser (Hylland & Braaten, 1996) er det grunn til å anta at tilstedeværelse av miljø-østrogen ville ha ført til økning i Vg hos torsk holdt i bur i oktober/november 1997. Mangelen på økning i plasma Vg hos utplassert torsk må tolkes dithen at det er lave nivåer av miljø-østrogen i gjennomblandet kystvann. Som nevnt ovenfor betyr ikke dette at det ikke kan være påvirkning nærmere eventuelle kilder for slike miljøgifter.

Økning i Vg hos fisk er den mest veletablerte markøren for fremmedstoffer med østrogen effekt. Resultatene som er funnet her kan åpenbart ikke utelukke at det finnes andre hormonforstyrrende stoffer i miljøet. Foreløpig eksisterer det imidlertid ikke gode metoder til å detektere effekter på andre hormonelle systemer hos akvatiske organismer.

## 5.3 Konsentrasjoner av nonylfenol og nonylfenoletoksilater i sediment

Konsentrasjonene av nonylfenol og nonylfenoletoksilater i sedimentene lå i samme konsentrasjonsområde som prøvene fra ulike europeiske estuarier analysert under DIFFCHEM-programmet (OSPAR, 1997). Nivået av etoksilater ved Arendal (referanselokaliteten) var på samme nivå som de laveste verdiene i den undersøkelsen, mens konsentrasjonene i Hvaler (høyest i denne undersøkelsen) lå på samme nivå som Glomma, Göta älv, Rhinen og Seinen. Konsentrasjonene var høyere i ett engelsk estuarie, nemlig Mersey (der det også har vært funnet klare effekter på skrubbe, P. Matthiessen, MAFF, pers. medd.). I de fleste estuariene lå imidlertid konsentrasjonene på omtrent samme nivå som de som ble funnet for de øvrige stasjonene her (30-80 ng/g tørt sediment).

Det er foreløpig et begrenset sammenligningsgrunnlag for denne typen stoffer. Det er imidlertid kanskje litt overraskende at det er like mye nonylfenoletoksilater i sediment fra Hvaler som i sediment fra engelske og tyske estuarier, der en vil forvente en høyere forurensningsbelastning. De laveste verdiene i denne undersøkelsen ble funnet i sediment fra Skagerrak (12 ng/g tørt sediment) og de høyeste fra Hvaler (145 ng/g tørt sediment). I DIFFCHEM-arbeidet var de laveste konsentrasjonene på 12-13 ng/g (Vadehavet og Terschelling, Nederland) og den høyeste på 390 ng/g tørt sediment (Mersey-estuariet i England).

Det var ingen sammenheng mellom forhøyde konsentrasjoner av nonylfenoletoksilater i sediment og Vg-respons hos torsk. Konsentrasjonene av nonylfenoletoksilater var høyest i sediment fra Hvaler-estuariet, men der ble det ikke funnet forhøyde nivåer av Vg hos torsk. Alle verdiene for nonylfenol lå nær deteksjonsgrensen, men den høyeste verdien (den eneste over deteksjonsgrensen) ble funnet i sediment fra Langesundsfjorden. Dette overensstemmer med de observerte responsene i Vg, men siden nonylfenol-nivåene er såpass lave er det ikke mulig å gi klare konklusjoner.

## 5.4 Samlet vurdering - undersøkelser i 1995, 1996 og 1997

Resultatene fra undersøkelsene i alle tre år tyder på at det er lave nivåer av miljø-østrogen i gjennomblandet kystvann. Det er ikke mange undersøkelser å sammenligne med, men belastningen er åpenbart mye lavere enn i engelske estuarier. Det er imidlertid verdt å merke seg at det



gjennomgående har vært noe forhøyde nivåer av plasma Vg i torsk samlet inn i Grenlandsfjordene. Årsaken til dette er ikke klarlagt.

Resultatene fra de tre årene viser at det er en forskjell i hvordan ungfisk av torsk påvirkes av miljø-østrogener til ulike årstider. Mens det ble funnet effekter i 1995 og 1997, var det svært lave nivåer av vitellogenin i all fisk og ingen respons i 1996. Torsk ble innsamlet i september-november i 1995 og 1997, mens den ble samlet inn i desember i 1996. Det var videre klarere effekter i 1995, da torsken ble samlet inn i månedsskiftet september/oktober, enn i 1997, da fisken ble samlet inn i oktober/november. Disse forskjellene kan skyldes flere faktorer: (1) at fisken ble innsamlet på noe forskjellige steder, (2) forskjeller i belastning av miljø-østrogener i de to årene, (3) forskjeller i temperatur og temperaturutvikling i de to årene, (4) at fisken ble samlet inn med en måneds mellomrom. Med utgangspunkt i resultater for torsk holdt under kontrollerte betingelser i samme periode synes det sannsynlig at det er faktorer relatert til forholdene i felt ((2) og (3) ovenfor) som har hatt størst betydning.

Resultater for alle tre årene tyder ikke på at temperatur eller saltholdighet (innen det området som ble funnet her) har direkte effekter på Vg-nivåene hos torsk. Videre synes det ikke som om kjønn eller størrelse hos ungfisk av torsk (hovedsakelig 0+, 1+ og 2+) har stor effekt på Vg-konsentrasjoner i plasma. Det er imidlertid viktig å understreke at variasjonene er relativt små i dette materialet og at faktorene som er nevnt ovenfor kan ha effekter ved høyere konsentrasjoner av miljø-østrogener.

Det er foreløpig begrenset kunnskap om eventuelle punktkilder for miljø-østrogener i Norge og ingen kunnskap om nivåer i elver eller innsjøer eller effekter på fisk i ferskvann.

## **5.5 Sammenligning mellom vitellogenin og eggeskallsprotein**

Det var ikke respons (forskjell i nivå før og etter opphold i bur) i hverken vitellogenin eller eggeskallsprotein hos torsk på de stasjonene der begge proteinene ble målt. Det var imidlertid større variasjon i vitellogenin- enn eggeskallsprotein-konsentrasjonene. På grunn av manglende respons er det umulig å trekke klare konklusjoner om den ene er "bedre" enn den andre. Det kan sees som en fordel at det er et bredt spekter av "mulige" nivåer i forhold til eksponering til lave konsentrasjoner av miljø-østrogener. På den annen side vil bruk av eggeskallsproteiner kunne gi mindre variasjon innen gruppene (hvis en eksponering fører til økt syntese). Det har tidligere vært funnet resultater som tyder på at syntesen av eggeskallsprotein kan induseres ved lavere konsentrasjoner enn det som er nødvendig for å øke syntesen av vitellogenin (Arukwe et al. 1997). Det er imidlertid flere mulige feilkilder. Det er kjent at polyklonale antistoffer mot eggeskallsprotein under noen betingelser vil kunne kryssreagere med andre plasmaproteiner slik som fibrinogen og derved gi en høy bakgrunn eller gale verdier (Carl Haux, pers. medd.). Videre vil resultatene i enhver slik undersøkelse være avhengig av deteksjonsgrensen for bestemmelse av hvert protein. Dette er ikke kjent siden metodene gir relative mål for proteinkonsentrasjon. Det eksisterer et omfattende datagrunnlag for bruk av plasma vitellogenin som mål for effekter av miljø-østrogener, men lite er kjent om eventuelle responser i de tre eggeskallsproteinene (alfa, beta og gamma) under naturlige forhold. Resultatene fra denne undersøkelsen gir ikke grunnlag til å foreslå eggeskallsprotein framfor vitellogenin som markør for eksponering for miljø-østrogener.

## 6. Konklusjoner

1. Samlet tyder resultatene fra undersøkelser fra 1995, 1996 og 1997 på at det er miljø-østrogener tilstede i norske kystfarvann, men at nivåene er lave i gjennomblandet vann.
2. Det er gjennomgående noe forhøyde nivåer av plasma Vg i torsk innfanget i eller holdt i Grenlandsfjordene.
3. Det er foreløpig begrenset kunnskap om eventuelle punktkilder for miljø-østrogener i Norge og ingen kunnskap om situasjonen i norske elver eller innsjøer.
4. Det synes å være en klar effekt av årstid på hvordan viltfanget fisk og fisk holdt i bur kan gi respons på eksponering for miljø-østrogener. Slike undersøkelser med fisk bør derfor ikke utføres i vinter-månedene.
5. Konsentrasjoner av nonylfenol og nonylfenoletoksilater i de utvalgte områdene lå på samme nivå som i estuarier i andre europeiske land. Det var ingen klar sammenheng mellom forhøyde nivåer av disse stoffene i sediment og Vg-respons hos torsk fra samme område.
6. Det er ikke grunn til å anta at eggeskallsprotein er en bedre markør for eksponering for miljø-østrogener enn vitellogenin.

## 7. Litteraturhenvisninger

- Allen, Y.T. et al. (1997) Effects of marine environmental estrogens. Presentert ved 7. årlige møte, SETAC, Amsterdam 6-10. april 1997.
- Andersson, E., Borg, B. and Goos, H.J. (1992) Temperature, but not photoperiod, influences gonadotropin-releasing hormone binding in the pituitary of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Gen.Comp.Endocrinol.* 88, 111-116.
- Arukwe, A., Knudsen, F.R. and Goksoyr, A. (1997) Fish zona radiata (eggshell) protein: a sensitive biomarker for environmental estrogens. *Environ.Health Perspect.* 105, 418-422.
- Berge, J.A. og Helland, A. (1993) Overvåkingsundersøkelser i Iddefjorden 1991/92. Miljøgifter i sediment, ål, torsk og taskekrabbe. NIVA-rapport nr. 2953-93, 56s.
- Berge, J.A., Helland, A., Holtan, G., Magnusson, J., Moy, F., Sørensen, K., Rygg, B., Walday, M. (1996) Overvåking av Hvaler-Singlefjorden og munningen av Iddefjorden 1990-1994. Sammenendragsrapport. Statlig program for forurensning, rapport 678/96, NIVA-rapport 3445, 74 s.
- Braaten, B., Berge, J. A., Berglind, L. og Bækken, T. (1996) Occurrence of phthalates and organotins in sediments and water in Norway. NIVA-rapport nr. 3552-96, 45s.
- Bonnier, P. and Baert, J.-L. (1992) Vitellogenesis in the sand worm, *Nereis diversicolor*. *Comp.Biochem.Physiol.* 102B, 785-790.
- Casillas, E., Misitano, D., Johnson, L.L., Rhodes, L.D., Collier, T.K., Stein, J.E., McCain, B.B. and Varanasi, U. (1991) Inducibility of spawning and reproductive success of female English sole (*Parophrys vetulus*) from urban and nonurban areas of Puget Sound, Washington. *Mar.environ.Res.* 31, 99-122.
- Colborn, T., vom Saal, F.S. and Soto, A.M. (1993) Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ.Health Perspect.* 103, 378-384.
- Crews, D., Bergeron, J.M. and McLachlan, J.A. (1995) The role of estrogen in turtle sex determination and the effects of PCBs. *Environ.Health Perspect.* 103 (Suppl. 7), 73-77.
- Draper, N.R. and Smith, H. (1981) Applied regression analysis, 2 edn. New York: John Wiley & Sons.
- Green, N.W. (1997) Joint Assessment and Monitoring program (JAMP). National Comments to the Norwegian Data for 1995. NIVA-rapport no. 3597-97, 124s.
- Hardie, D.G. (1991) Biochemical messengers: hormones, neurotransmitters and growth factors, London: Chapman & Hall.
- Harries, J.E., Jobling, S., Matthiessen, P., Sheahan, D.A. and Sumpter, J.P. (1995) Effects of trace organics on fish - phase 2. FR/D 0022, pp.1-85. Marlow: Foundation for Water Research.
- Harries, J.E., Sheahan, D., Jobling, S., Matthiessen, P., Neall, P., Sumpter, J.P., Tylor, T. and Zaman, N. (1997) Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged rainbow trout. *Environ.Toxicol.Chem.* 16, 534-542.
- Harries, J.E., Sheahan, D.A., Jobling, S., Matthiessen, P., Neall, P., Routledge, E.J., Rycroft, R., Sumpter, J.P. and Tylor, T. (1996) A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters. *Environ.Toxicol.Chem.* 11, 1993-2002.
- Helland, A. og Walday, M. (1996) Overvåking av Iddefjorden 1994. Undersøkelser av hardbunnsfauna, sedimenterende materiale og bunnsedimenter. NIVA-rapport nr. 3502-96, 90s.

- Heppell, S.A., Denslow, N.D., Folmar, L.C. and Sullivan, C.V. (1995) Universal assay of vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. *Environ.Health Perspect.* 103 (Suppl. 7), 9-15.
- Holtan, G. (1996) Overvåking av Hvaler - Singlefjorden og munningen av Iddefjorden 1990 - 1994. Forurensningstilførsler 1970 - 93. Niva-rapport nr. 3444. 81 s.
- Hylland, K., Braaten, B. (1996) Kartlegging av mulige østrogenlignende effekter i miljøet i Norge. a) biologiske effekter. NIVA-rapport 3422-96, 44 s.
- Hylland, K., Haux, C. (1997) Effects of environmental oestrogens on marine fish species. *Trends analyt.Chem.* (In Press)
- Jobling, S., Nolan, M., Brighty, G., Tyler, C.R., Sumpter, J.P. (1997). British rivers contain a high proportion of intersex roach (CYPRINIDAE; PISCES). Presentert ved 7. årlige møte, SETAC, Amsterdam 6-10. april 1997.
- Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J.A., Matthiessen, P. and Sumpter, J.P. (1996) Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ.Toxicol.Chem.* 15, 194-202.
- Johnson, L., Casillas, E., Sol, S., Collier, T.K., Stein, J.E. and Varanasi, U. (1993) Contaminant effects on reproductive success in selected benthic fish. *Mar.environ.Res.* 35, 165-170.
- Kime, D.E. (1995) The effects of pollution on reproduction in fish. *Rev.Fish Biol.Fish.* 5, 52-96.
- Kime, D.E. et al. (1997) Heavy metals as endocrine disruptors of reproduction in fish. Presentert ved 7. årlige møte, SETAC, Amsterdam 6-10. april 1997.
- Knutzen, J., Magnusson, J. og Skei, J., (1978) Nasjonalt program for overvåking av vannressurser. Pilotprosjekt Iddefjorden 1977. O-38 / 75, 74 s.
- Knutzen, J., Biseth, A., Brevik, E., Green, N., Schlabach, M. og Skåre, J.U. (1995) Overvåking av Grenlandsfjordene 1994. NIVA-rapport nr. 3363, 165s.
- Korsgaard, B., Mommsen, T.P. and Saunders, R.L. (1986) The effect of temperature on the vitellogenic response in Atlantic salmon post-smolts (*Salmo salar*). *Gen.Comp.Endocrinol* 62, 191-203.
- Lye, C.M., Frid, C.L.J., Gill, M.E. and McCormick, D. (1997) Abnormalities in the reproductive health of flounder *Platichthys flesus* exposed to effluent from a sewage treatment works. *Mar.Pollut.Bull.* 34, 34-41.
- Mackay, M.E. and Lazier, C.B. (1993) Estrogen responsiveness of vitellogenin gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) kept at different temperatures. *Gen.Comp.Endocrinol.* 89, 255-266.
- Næs, K. og Oug, E., (1991) Sedimentenes betydning for forurensningstilstanden i Frierfjorden og tilgrensende områder. Rapport 1. Konsentrasjoner og mengder av klororganiske forbindelser, polysykliske aromatiske hydrokarboner, kvikksølv og pyrolyseolje. NIVA-rapport 2570, 193 s.
- Olin, T. and von der Decken, A. (1989) Vitellogenin synthesis in Atlantic salmon (*Salmo salar*) at different acclimation temperatures. *Aquaculture* 79, 397-402.
- OSPAR (1997) Report of the results of the one-off survey DIFFCHEM. SIME 97/6/1-E.
- Routledge, E.J. and Sumpter, J.P. (1996) Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ.Toxicol.Chem.* 15, 241-248.
- Silversand, C., Hyllner, S.J. and Haux, C. (1993) Isolation, immunochemical detection, and observations of the instability of vitellogenin in four teleosts. *J.exp.Zool.* 267, 587-597.

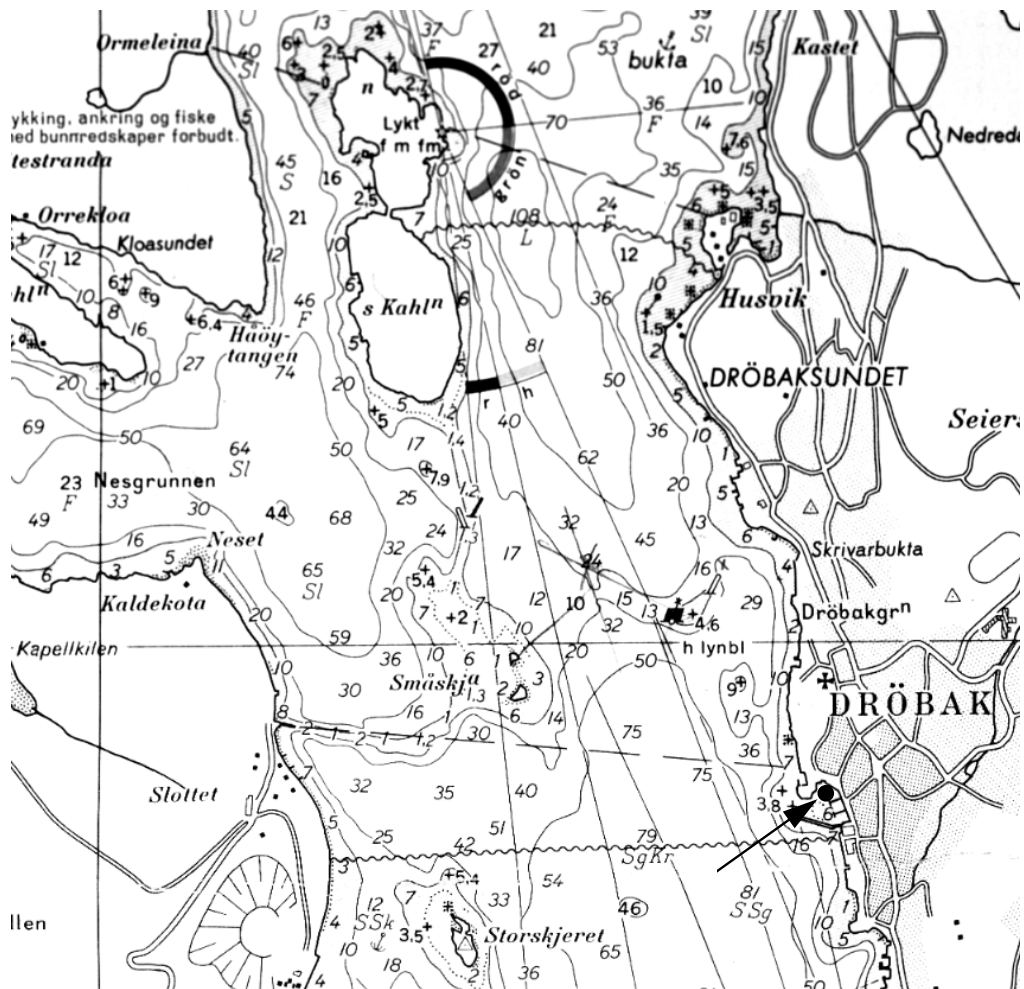
- Skei, J., Knutzen, J. og Klungsøyr, J. (1994) Miljøgiftundersøkelser i Bergen og Byfjorden 1993. NIVA-rapport nr. 3018, 88s.
- Skei, J., (1984) Basisundersøkelser i Hvaler og Singlefjorden, 1980-83. Konklusjonsrapport. Niva-rapport nr. 1688, 43s.
- Sokal, R.R. and Rohlf, F.J. (1981) *Biometry*, 2 edn. New York: W.H. Freeman & Co.
- Specker, J.L. and Anderson, T.R. (1994) Developing an ELISA for a model protein - vitellogenin. In: Mommsen, T.P. and Hochachka, P.W., (Eds.) *Biochemistry and molecular biology of fishes*, pp. 567-578. London: Academic Press]
- Thomas, K.W. (1997) Application of bioassay-directed fractionation in environmental assessment. Presentert ved 7. årlige møte, SETAC, Amsterdam 6-10. april 1997.

## **Vedlegg A. Kartgrunnlag**

Kart over Arendalsområdet som viser innsamlingssted for torsk brukt i alle utsettningsforsøkene utført på Østlandet i 1996 (Kart er kopiert fra Statens Kartverk, Norges sjøkartverk, Kartblad nr. 7. 1:50.000)

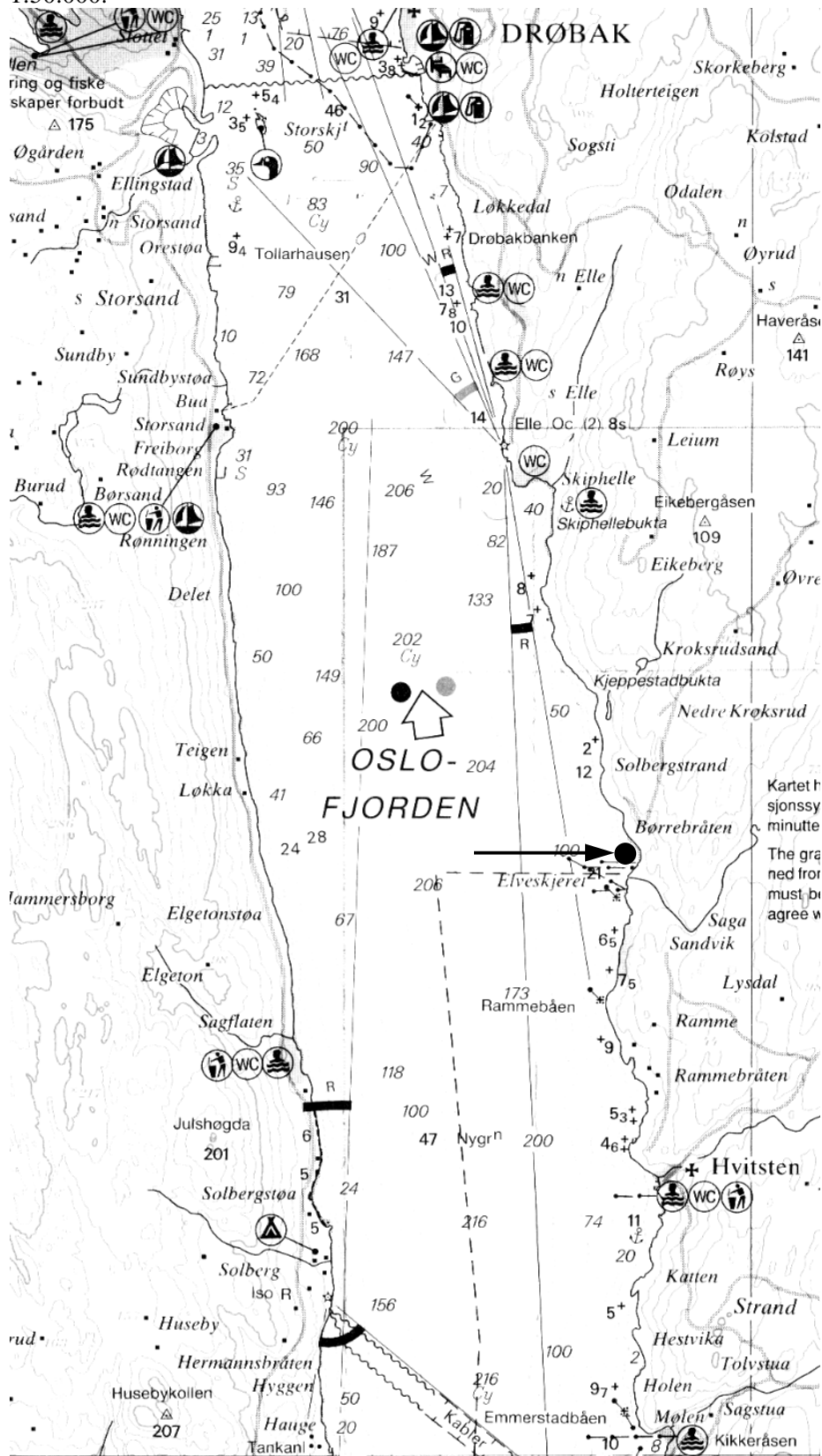


Drøbak. Kopiert fra Statens Kartverk, Norges sjøkartverk, Kartblad nr. 402 1:25.000



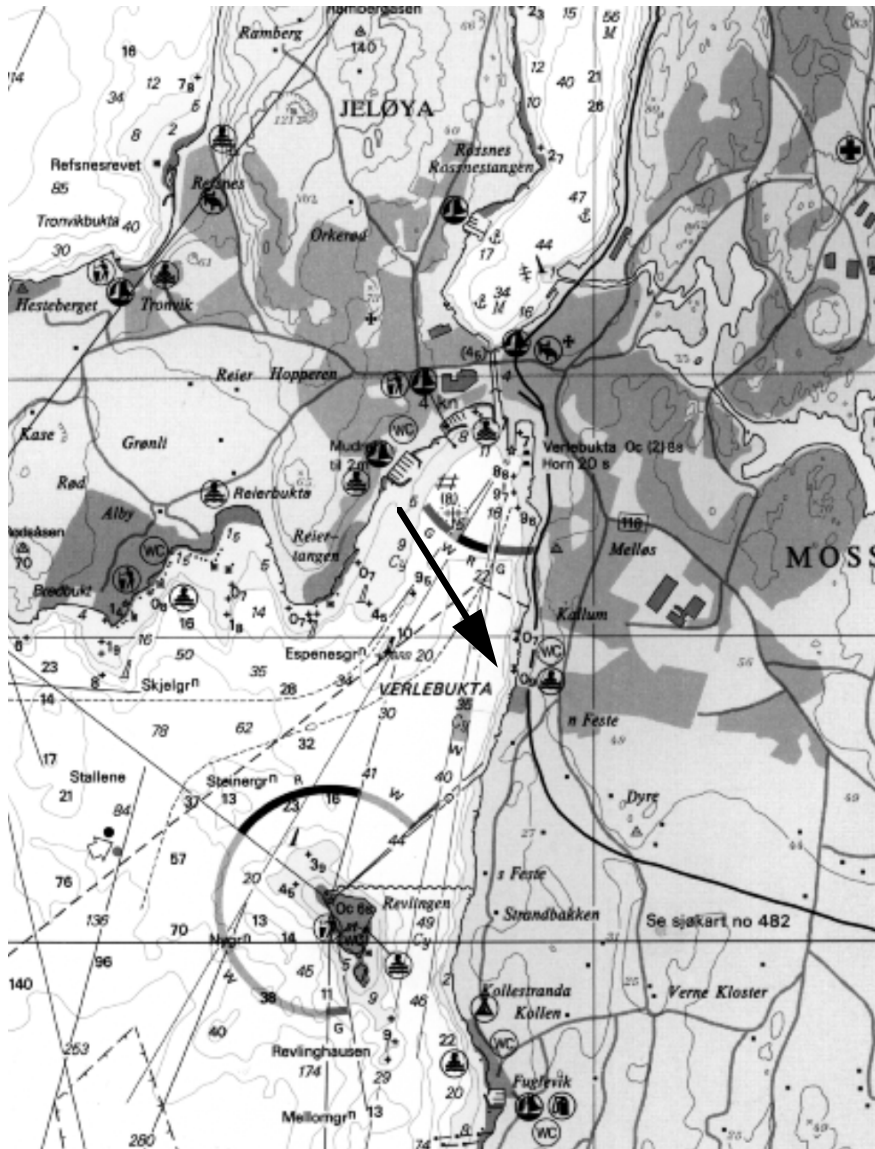


Drøbak - Solbergstrand. Kopiert fra Statens Kartverk, Norges sjøkartverk, Båtsportkart nr. 702 1:50.000.

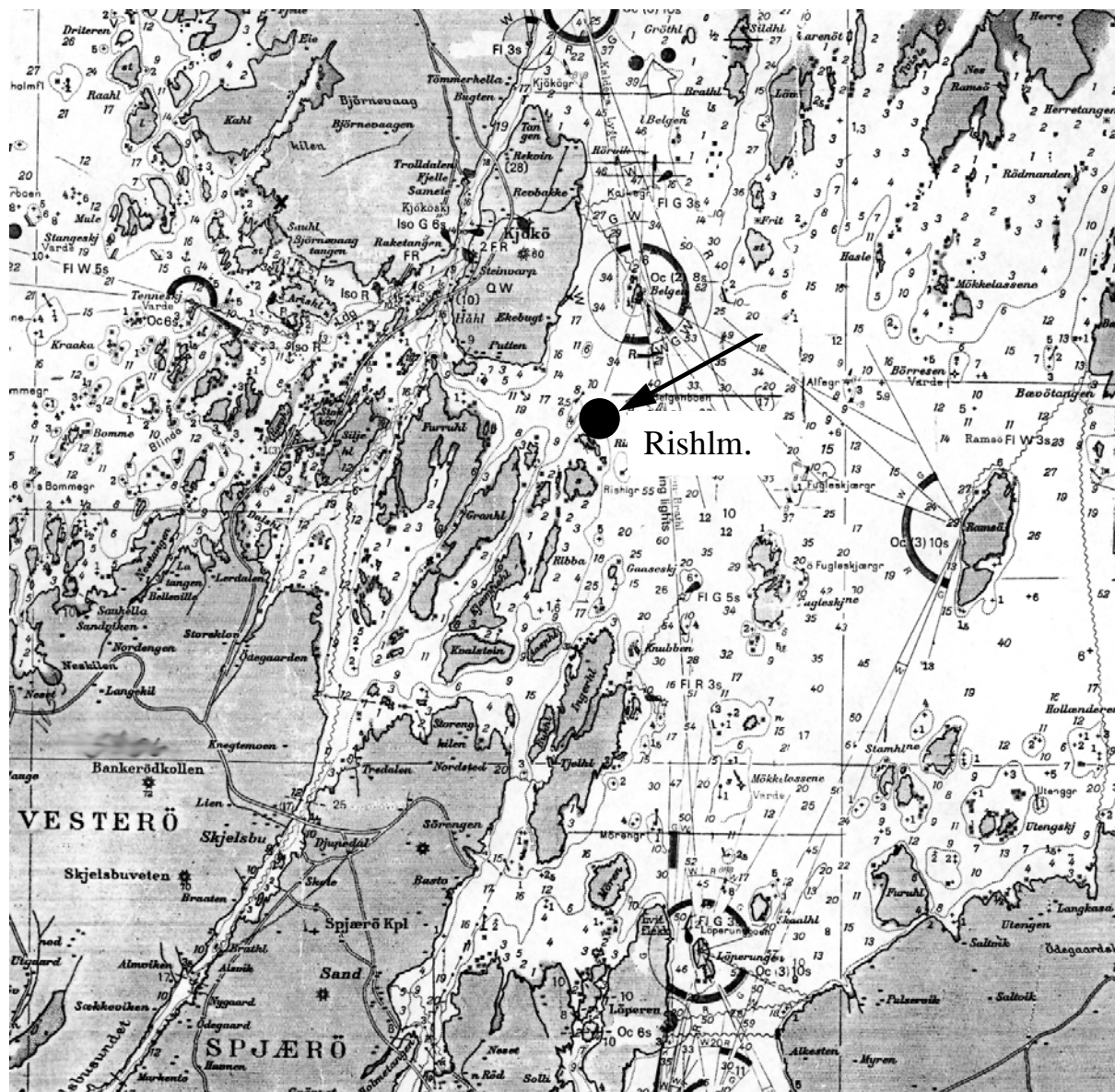


Kartet h  
sjonssy  
minutte  
The gra  
ned for  
must be  
agree w

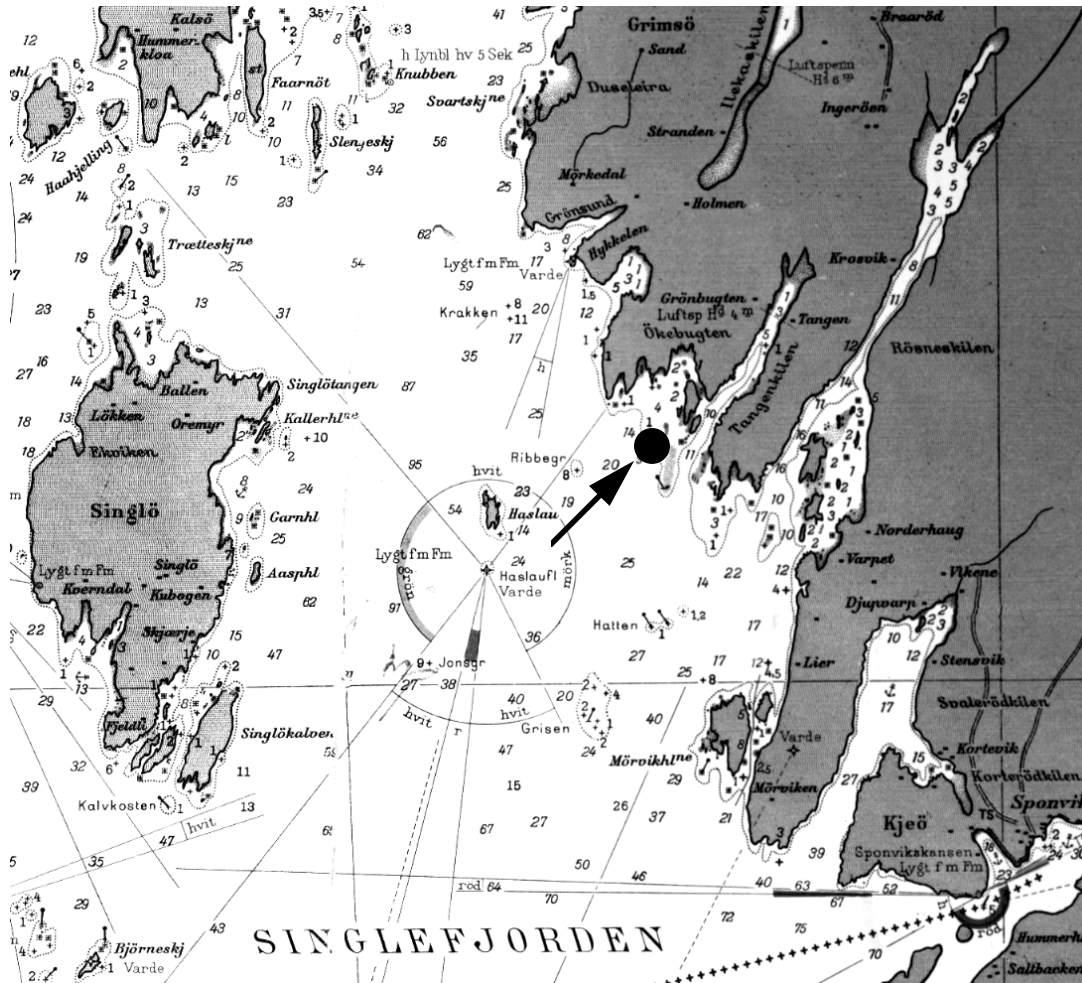
Mossesundet - Verlebukta. Kopiert fra Statens Kartverk, Norges Båtsporkart, Kartblad nr. A-705. 1:50.000.



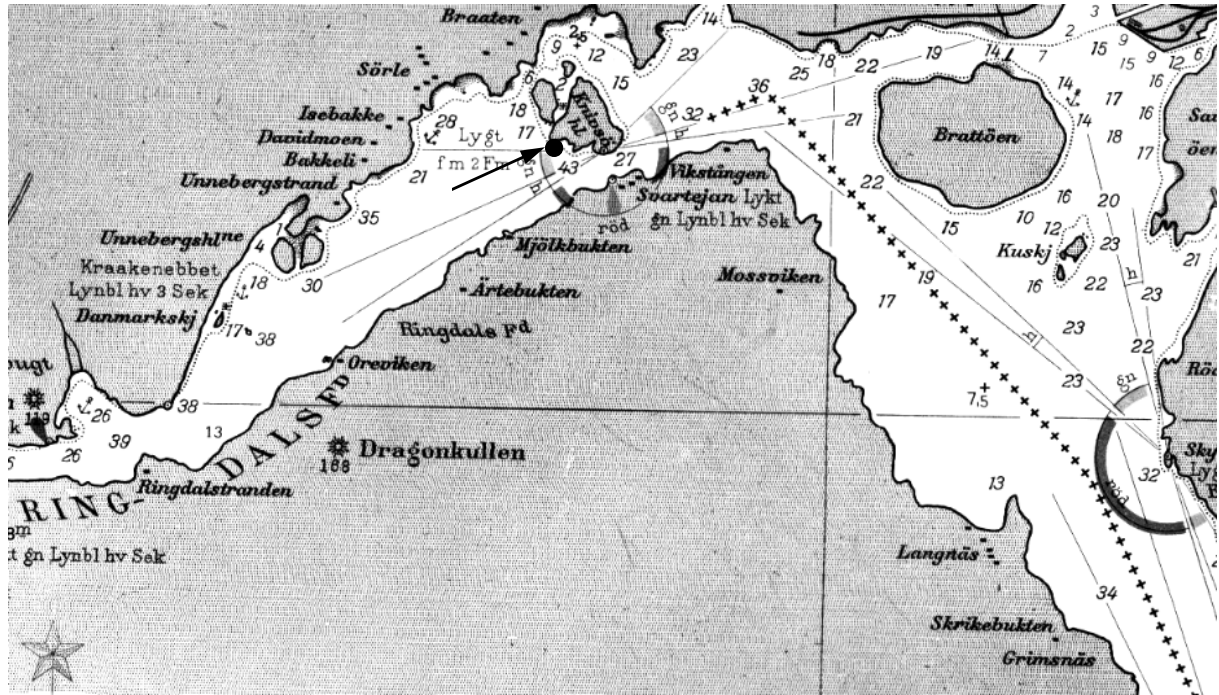
Hvaler - Rishlm. Kopiert fra Statens Kartverk, Norges sjøkartverk, Kartblad nr. 1 1:50.000.



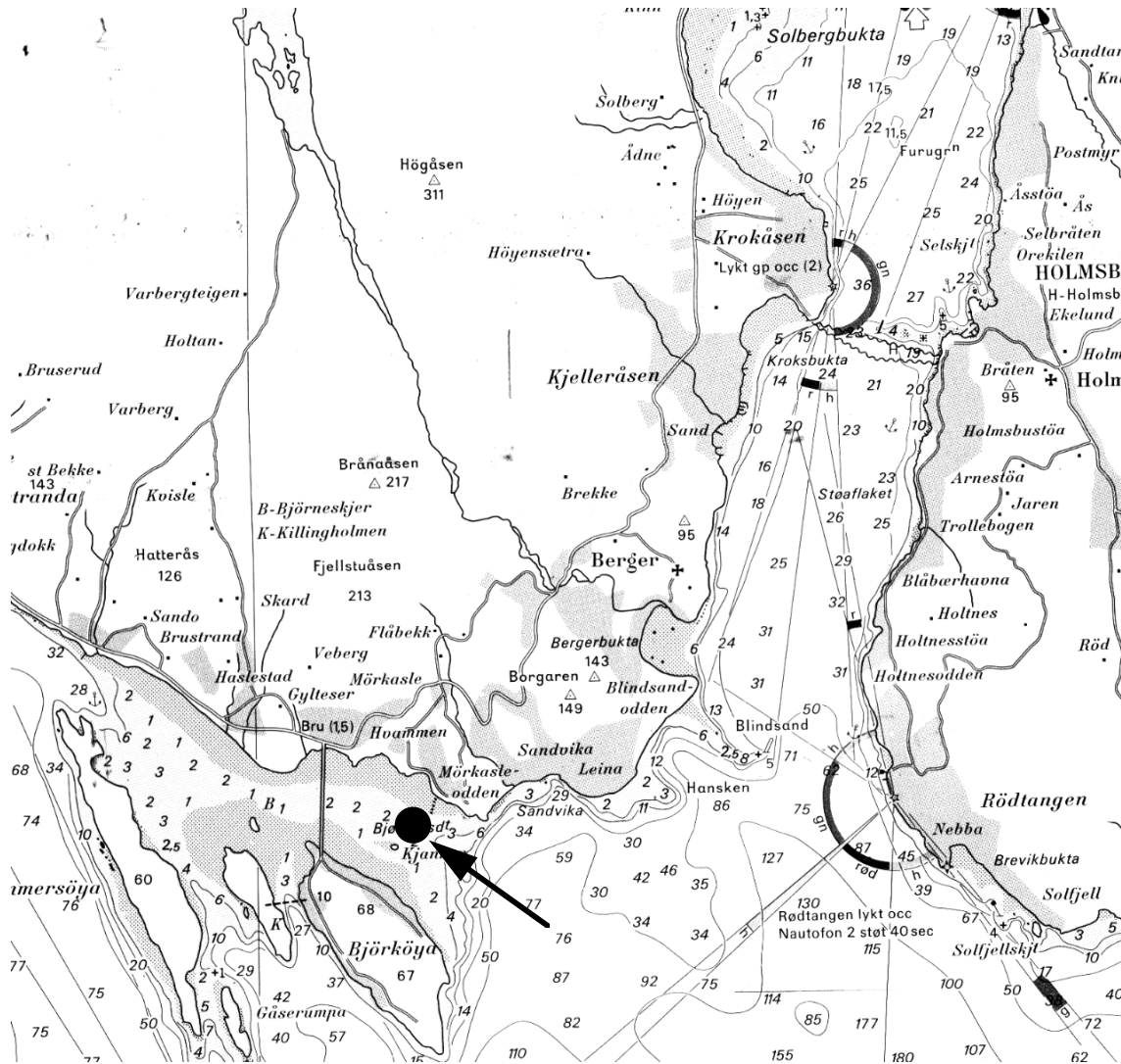
Singlefjorden - Tangenkilen. Kopiert fra Statens Kartverk, Norges sjøkartverk, Kartblad nr. 1  
1:50.000.



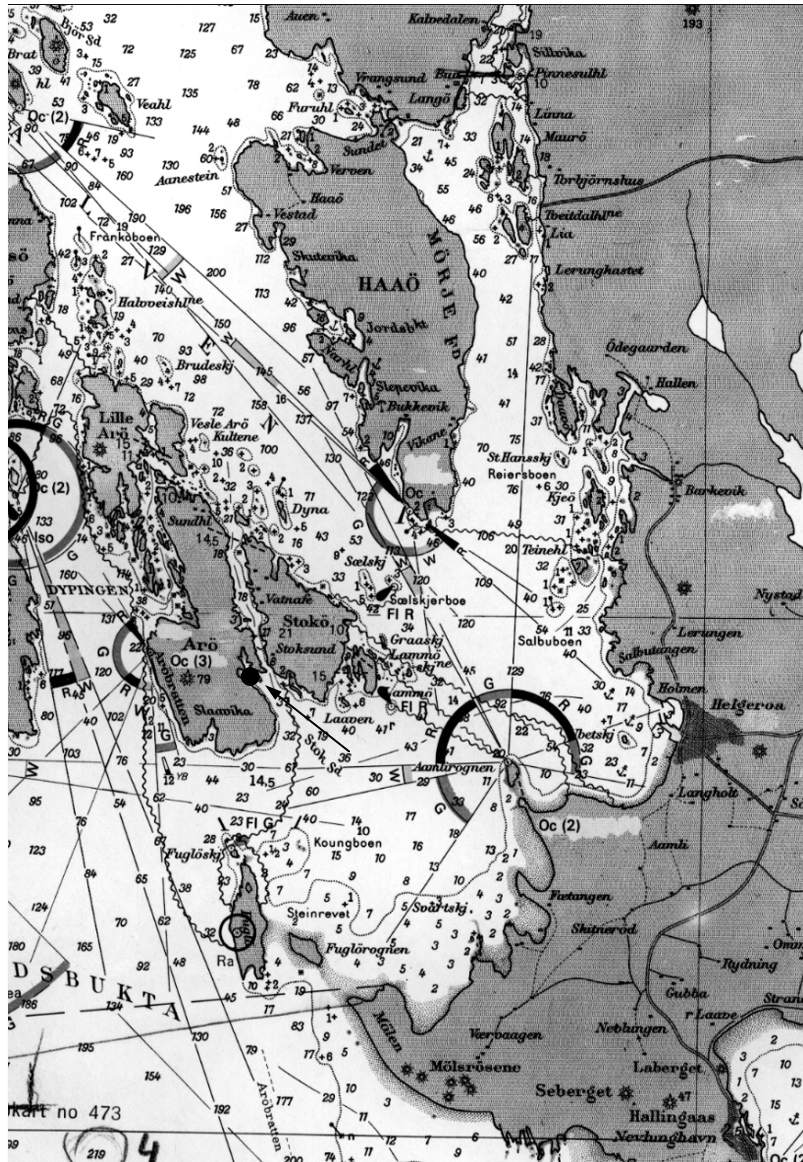
Iddefjorden - Knivsøyhl. Kopiert fra Statens Kartverk, Norges sjøkartverk, Kartblad nr. 1 1:50.000.



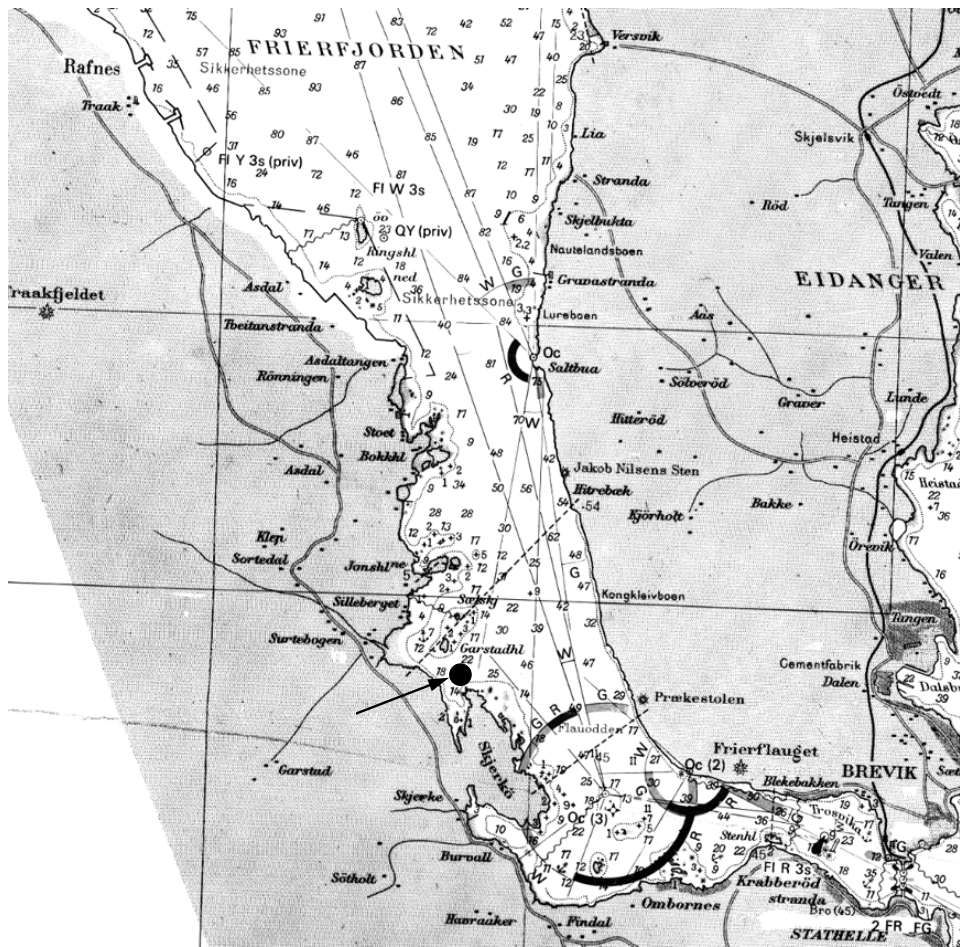
Drammen - Holmestrand - Kopiort fra Statens Kartverk, Norges sjøkartverk, Kartblad nr. 3.  
1:50.000



Langesundsfjorden . Kopiert fra Statens Kartverk, Norges sjøkartverk, Kartblad nr. 5 1:50.00

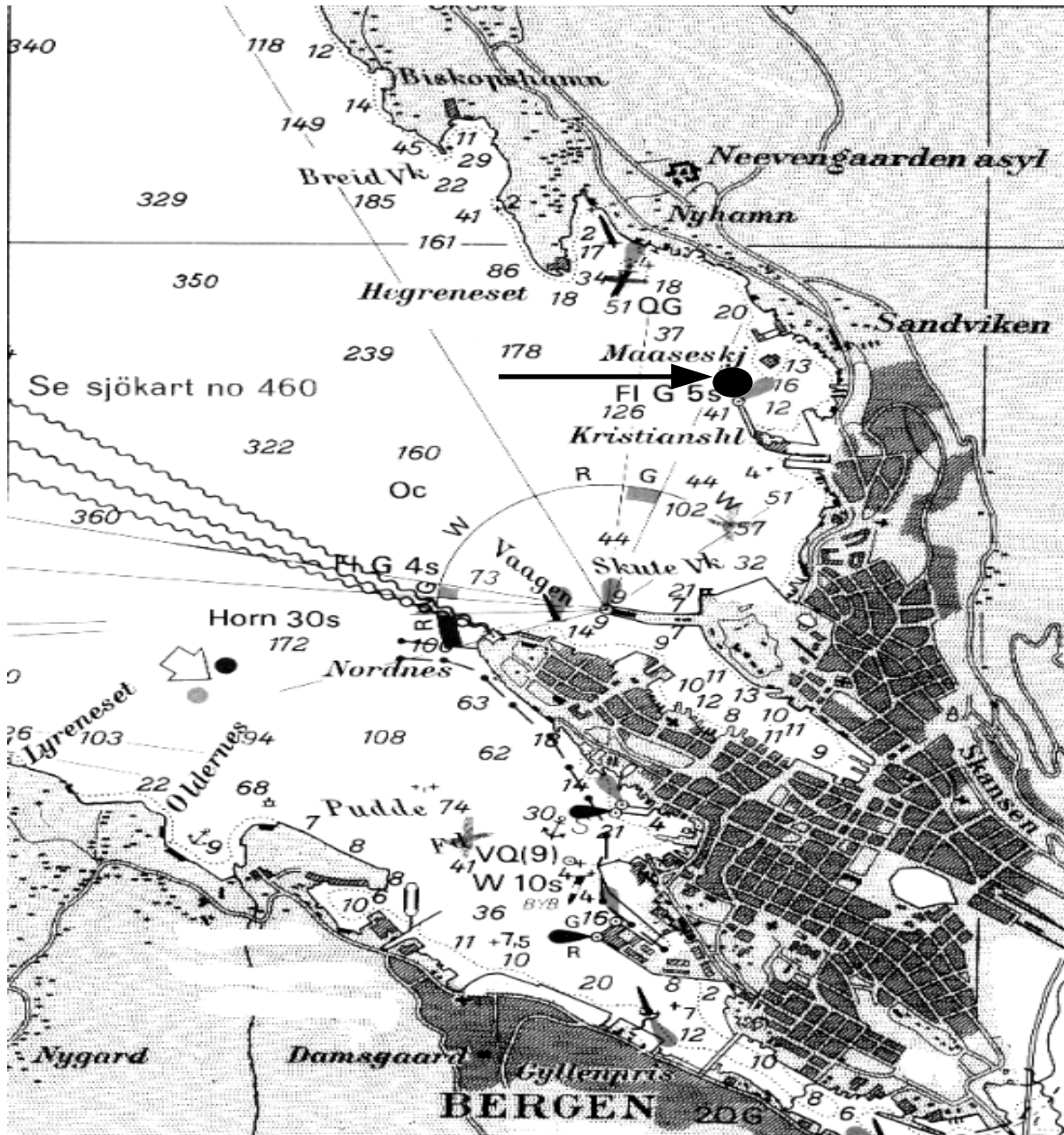


Frierfjorden. Kopiert fra Statens Kartverk, Norges sjøkartverk, Kartblad nr. 5 1:50.00

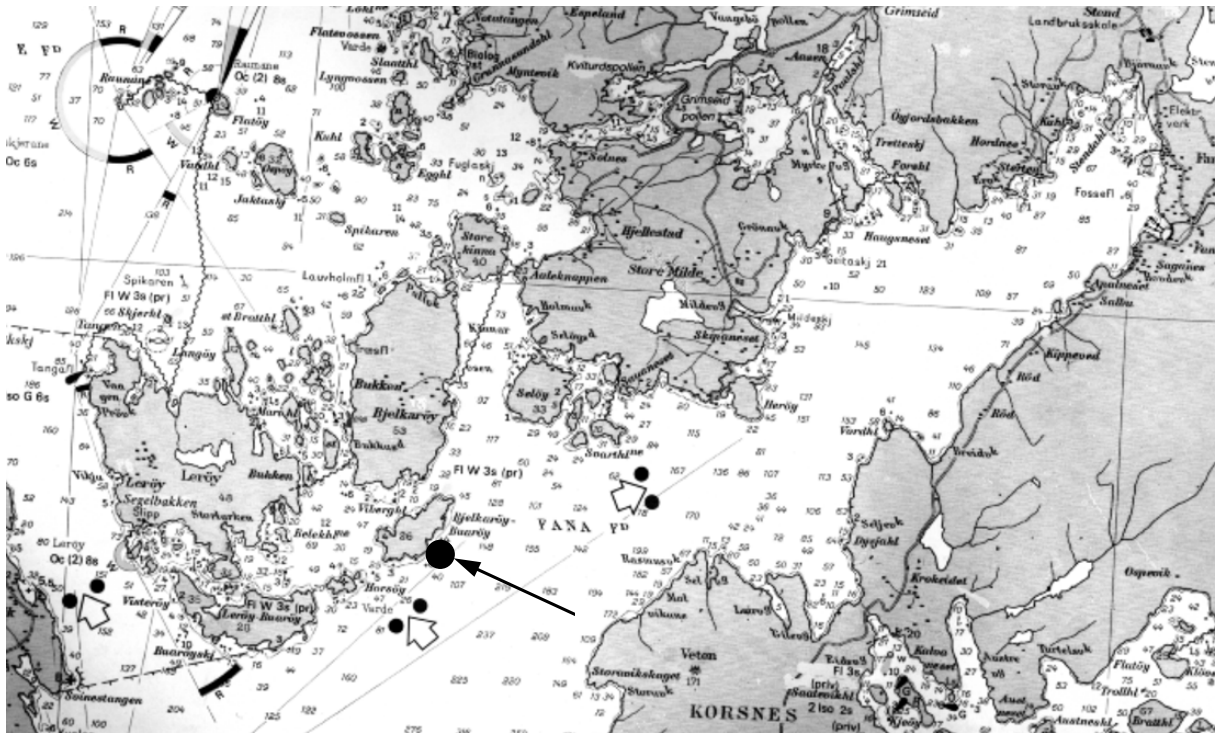




Bergen - Sandviksbukta. Kopiert fra Statens Kartverk, Norges sjøkartverk, Kartblad nr. 21.  
1:50.000



Raunefjorden - Fanafjorden . Kopiert fra Statens Kartverk, Norges sjøkartverk, Kartblad nr. 21.  
1:50.000.



## **Vedlegg B. Rådata - utplassert torsk 1996**

## Vedlegg B.1. Rådata for torsk fra Bergen

kode	vtg-før	vtg-etter	kjønn	stasjon	zrp-etter	lengde	vekt	lsi
96814	1.337	1.018	f	fanafjorden	0.412	21	70	7.14
96821	1.04	0.792	f	fanafjorden	0.321	24	119	9.24
96828	1.337	1.462	f	fanafjorden	0.321	23	107	8.41
96830	1.226	2.016	f	fanafjorden	0.378	20	66	9.09
96837	1.226	1.622	f	fanafjorden	0.673	27	169	10.06
96843	1.189	1.146	f	fanafjorden	0.36	25	134	8.21
96826	1.114	1.225	m	fanafjorden	0.306	24	119	10.08
96831	1.077	1.107	m	fanafjorden	0.404	25	166	9.04
96832	1.094	1.265	m	fanafjorden	0.328	23	112	8.93
96841	1.263	0.672	m	fanafjorden	0.333	23	111	9.91
96847	0.754	0.87	m	fanafjorden	0.351	24	128	9.38
96849	1.337	1.383	m	fanafjorden	0.331	26	168	9.52
96813	0.981	0.657	f	sandviken	0.329	22	97	10.31
96834	0.83	1.146	f	sandviken	0.288	23	90	8.89
96836		1.671	f	sandviken	0.423	23	122	10.66
96838	1.077	2.411	f	sandviken	0.381	22	80	8.75
96848	1.189	1.1	f	sandviken	0.341	26	157	10.19
96851	1.132	0.309	f	sandviken	0.331	22	81	8.64
96853		1.186	f	sandviken		24	117	9.4
96854			f	sandviken		22	91	9.89
96810	1.189	0.695	m	sandviken	0.436	25	142	9.15
96811	1.152	0.514	m	sandviken	0.306	26	146	9.59
96812	1.077	0.909	m	sandviken	0.338	26	168	10.12
96835	1.263	1.858	m	sandviken	0.321	23	102	0
96840	1.337	0.077	m	sandviken	0.364	22	89	7.87
96844	1.3	0.909	m	sandviken	0.337	24	131	9.92

## Vedlegg B.2. Rådata for torsk fra Drøbak

kode	vtg-før	vtg-etter	vekt	lengde	syk
1	2.468	1.501	24.9	15	f
10					
11	2.175	1.032	43.2	18	f
100	0.849	1.549	44.7	18.5	f
101	1.885	2.008	26	15	f
110	2.008	1.499	44.1	18.5	f
111		1.145	32.2	17.5	f
1000	1.949		45.5	18.5	f
1001			33.9	17	s
1010	2.233		23.7	14	f
1011	2.152	1.159	28.1	16	
1100			30	16	f
1101	2.601				f
1110		1.208	32.3	16.5	f
1111	2.056	2.258	33.9	17.5	
10001	1.318	1.512	25.9	15	f
10010	1.069	2.037	28.3	15.5	f
10011	2.690	0.386	19.3	11.5	s
10100	1.465	2.263	27	15.5	f
10101	2.134		21.5	11.5	s

## Vedlegg B.3. Rådata for torsk fra MFS (Solbergstrand).

kode	vtg-før	vtg-etter	vekt	lengde	syk
1	2.362	1.477	21.9	14.5	f
10	1.641				
11	2.517	2.241	43.2	18	f
100	2.513				
101	3.167	1.756	27.9	16	f
110	2.468				
111	2.082				
1000	2.274	1.087	34.6	17	f
1001	1.098				
1010	2.202				
1011	0.000		27.5	15	f
1100	2.657				
1101	2.613				
1110	2.962				
1111	2.522	1.801	27.5	16	f
10001	1.329				
10010	1.773				
10011	1.292	2.527	20.6	14.5	f
10100		2.337	31.7	15	f
10101	2.134				

## Vedlegg B.4. Rådata for fisk fra Hvaler.

kode	vtg-før	vtg-etter	vekt	lengde	syk
1	2.348				
10		1.885	24.1	15.5	f
11		1.337	22.8	14	f
100	2.558	1.885	20.8	14	f
101	1.631	1.811	19.7	14.5	f
110		1.152	18	13.5	f
111	1.292	1.337	29.9	14.5	f
1000	2.801		10.7	12.5	s
1001	2.522				
1010		1.263	13	13	f
1011	3.126				
1100				13	f
1101	2.455	1.560	12.5		f
1110					
1111	1.291				
10001	2.175				
10010	1.713				
10011					
10100					
10101	1.756	1.26	26	15	f

## Vedlegg B.5. Rådata for fisk fra Langesund.

kode	vtg-før	vtg-etter	vekt	lengde	syk
1	2.633	1.648	44.8	18.5	f
10	2.056	3.042	26.5	16	f
11	1.882	1.004	31.9	17	f
100	1.683	1.098	24.4	15.5	f
101	2.170				
110	2.436	1.770	38.2	17.5	f
111	1.561	0.232	33.5	17	f
1000	1.683	2.842	44.5	18.5	f
1001	1.993	2.274	54.3	19	f
1010	1.172	3.084	28.3	15.5	f
1011	2.170	1.949	30	16	f
1100	1.733	3.582	30.9	17	f
1101		2.433	29	15.5	f
1110	0.000	2.002	21.7	15	f
1111	2.477				
10001	2.312	2.419	34.3	17	f
10010	1.143	3.126	20.1	15	f
10011	9.072				
10100	0.842	5.071	46.8	18.5	f
10101	0.959	2.680	42.2	18	f

## Vedlegg B.6. Rådata for fisk fra Frierfjorden.

kode	vtg-før	vtg-etter	vekt	lengde	syk
1	2.227	0.960	87.5	21.5	f
10	2.214	1.199	64.1	20.5	f
11	2.116	1.291	57.8	19	f
100	1.263	1.106	62	19.5	f
110	1.292	0.848	54.9	19	f
111	0.116	1.756	55.6	19	f
1000	2.122	0.915	72.4	20.5	f
1001	2.469	0.842	64.3	20	f
1010	1.370	0.232	74.2	20	f
1011	0.806		78.3	21	
1100	0.560	2.072			f
1101	1.801	1.285	50.1	19	f
1110	1.236	0.927	81.5	21.5	f
1111	1.514	1.032	81.9	22	f
10000			60.1	19.5	
10001		1.025	87.5	22.5	f
10010	3.664	2.192	50.9	19	f
10011	1.773	2.214	82.8	21.5	f
10100	1.422	0.579	56.4	19	f
10101	2.398	1.639	57.6	19.5	f

## **Vedlegg C. Rådata - viltfanget torsk 1996**

## Vedlegg C.1. Rådata for torsk innsamlet i Singlefjorden.

<u>kode</u>	<u>vtg</u>	<u>vekt</u>	<u>lengde</u>
1	1.675	67.9	20.5
2	1.675	163.3	23.5
3	1.046	72.8	20.5
4	2.249	60.9	19
5	1.506	71.7	20.5
6	4.644	94.9	22.5
7	0.701	68.8	20.5
8	0.775	68.9	20.5
9	2.347	65.8	20
10		78.5	21.5
11	1.589	48	18
12	1.743	120.1	24.5
13	2.770	97.9	22
14	2.072	80.7	21
15	1.542	119.8	25
16	1.255	94.3	22.5
17	5.226	175.3	27.5
18	0.549	218.8	30

## Vedlegg C.2. Rådata for torsk innsamlet i Hvaler.

<u>kode</u>	<u>vtg</u>	<u>vekt</u>	<u>lengde</u>
1	2.152	181.5	29
2	1.197	291	32.5
3	0.591	376.7	35
4	1.771	231	31
5	2.646	165.8	28.5
6	0.549	184.7	30
7	0.952	177.7	29
8	1.282	198.7	30
9	2.170	275.5	33

## Vedlegg C.3. Rådata for torsk innsamlet i Sandebukta.

<u>kode</u>	<u>vtg</u>	<u>vekt</u>	<u>lengde</u>
1	1.841	82.1	22.5
2	1.814	132.6	26.5
3	2.802	43.3	17.5
4	1.069	64.9	20
5	0.915	91.5	21.5
6	1.814	156	27
7	2.426	12.3	12
8	1.917	99.2	22.5
9	1.506	93	22.5
10	1.991	75.6	21
11	1.733	61.2	19.5
12	0.812	70.2	20.5



## Vedlegg C.4. Rådata for torsk innsamlet i Langesundsfjorden.

---

<u>kode</u>	<u>vtg</u>	<u>vekt</u>	<u>lengde</u>
1	1.885	56.8	19.5
2	0.541	54	19
3	1.034	45.8	18
4	2.441	77.4	20.5
5	1.328	83.7	22
6	2.569	40.1	17
7	1.662	51.8	18.6
8	2.042	50.7	18.4
9	1.380	62.5	20.5
10	1.721	30	16
11	1.670	55.9	19.5
12	2.480	59.4	19.5
13	1.152	37	17
14	2.160	72.6	20.5
15	1.182	62.3	19.5
16		65.8	20.5
17	0.739	34.4	16.5
18	2.480	32.8	16.5
19	1.636	67.6	20.5
20	1.506	26.3	15

---

## Vedlegg C.5. Rådata for torsk innsamlet i Frierfjorden.

---

<u>kode</u>	<u>vtg</u>	<u>vekt</u>	<u>lengde</u>
1	3.763	21.7	14
2	1.197	35.5	17
3	3.219	34.3	16.5
4	2.274	58	20.5
5	2.391	44.8	17.5
6	1.846	111	23.5
7	1.004	66.8	20.5
8	2.760	75.3	21
9	2.509	43.2	17
10	1.025	138.8	24.5
11	1.860	158.3	26.5

---

## **Vedlegg D. Rådata – utplassert torsk 1997**

Individuelle data for torsk plassert i bur i 1997.

sted	kode-bur	vtg-st	vtg-sl	delta-vtg	vekt-st	lengde	delta-vekt	kjønn
drøbak	1	0,74	0,50	-0,24	188	27	0,16	Hunn
drøbak	2	0,30	0,93	0,64	100	23	0,16	Hann
drøbak	3	0,72	0,54	-0,18	86	23	0,14	Hann
drøbak	4	0,63	0,53	-0,10	170	28	0,16	Hann
drøbak	5	0,54	1,20	0,66	182	29	0,12	Hann
drøbak	6	0,58	0,66	0,07	138	26	0,16	Hunn
drøbak	7	0,46	0,40	-0,05	144	26	0,18	Hunn
drøbak	8	0,43	0,89	0,47	84	22	0,17	Hann
drøbak	9	0,30	0,59	0,29	120	25	0,20	Hunn
drøbak	10	0,60	0,66	0,06	168	28	0,19	Hann
drøbak	11	0,48	0,66	0,19	106	24	0,21	Hann
drøbak	12	1,01	1,09	0,08	188	29	0,14	Hann
drøbak	13	0,36	0,46	0,10	178	28	0,11	Hann
drøbak	14	0,63	1,10	0,47	154	27	0,16	Hunn
drøbak	15	1,02	0,55	-0,46	160	28	0,15	Hann
drøbak	16	0,39			148	27		Borte
drøbak	17	1,39	0,89	-0,50	138	25	0,19	Hann
drøbak	18	1,72	0,72	-1,00	194	29	0,18	Hann
drøbak	19	0,20	0,49	0,29	120	24	0,10	Hunn
drøbak	20	0,71	1,80	1,09	156	27	0,15	Hann
frierfjorden	1	0,32	0,72	0,40	112	24	0,20	Hann
frierfjorden	2	1,03	1,36	0,33	116	24	0,17	Hann
frierfjorden	3	0,55	1,08	0,53	160	27	0,14	Hunn
frierfjorden	4	0,28	0,51	0,23	120	26	0,22	Hunn
frierfjorden	5	0,22	0,36	0,13	80	22	0,25	Hunn
frierfjorden	6	0,46	0,53	0,06	120	25	0,25	Hann
frierfjorden	7	0,48	1,32	0,84	90	23	0,18	Hunn
frierfjorden	8	0,63	3,24	2,61	128	25	0,08	Hunn
frierfjorden	8	0,43	0,65	0,22	114	24	0,28	Hunn
frierfjorden	9	1,07	0,58	-0,49	114	24	0,16	Hunn
frierfjorden	10	0,68	0,47	-0,21	132	26	0,12	Hunn
frierfjorden	11	0,27	0,64	0,37	148	27	0,15	Hann
frierfjorden	12	0,37	0,71	0,34	130	27	0,23	Hunn
frierfjorden	13	0,51	0,39	-0,12	78	21	0,23	Hann
frierfjorden	14	0,49	1,61	1,12	142	26	0,17	Hann
frierfjorden	15	0,56	0,51	-0,05	90	22	0,18	Hann
frierfjorden	17	0,43	1,13	0,69	110	24	0,15	Hann
frierfjorden	18	0,41	0,46	0,05	146	26	0,18	Hunn
frierfjorden	19	0,76	0,58	-0,19	88	23	0,30	Hann
frierfjorden	20	0,53			130	25		
hvaler	1	0,94			122	25		
hvaler	2	0,34			114	25		
hvaler	3	0,45			100	24		
hvaler	4	0,31			152	27		
hvaler	5	0,68			96	24		
hvaler	6	0,45			80	22		
hvaler	7	1,65			72	22		
hvaler	8	0,46			132	25		
hvaler	9	0,42	0,46	0,04	158	27	0,19	Hunn
hvaler	10	0,34			92	23		

hvaler	11	0,49			144	26		
hvaler	12	0,92			120	25		
hvaler	13	0,69			144	26		
hvaler	14	0,41			70	21		
hvaler	15	0,43			148	26		
hvaler	16	0,52			82	22		
hvaler	17	0,35			120	26		
hvaler	18	0,34	0,18	-0,16	166	28	0,14	Hunn
hvaler	19	0,32	1,42	1,10	168	27	0,15	Hunn
hvaler	20	0,41			136	26		
iddefjorden	1	0,16			68	22		Hann
iddefjorden	2	1,18	2,14	0,96	142	26	0,17	Hunn
iddefjorden	3	0,62	1,36	0,74	130	26	0,22	Hann
iddefjorden	4	1,12	0,89	-0,23	106	25	0,17	Hann
iddefjorden	5	1,00	1,22	0,22	112	25	0,16	Hunn
iddefjorden	6	0,74	0,09	-0,65	82	23	0,17	Hann
iddefjorden	7	0,56	0,72	0,16	122	26	0,15	Hunn
iddefjorden	8	0,60	0,85	0,25	164	26	0,15	Hann
iddefjorden	9	0,36	0,62	0,26	170	28	0,16	Hann
iddefjorden	10	0,38	0,33	-0,04	92	24	0,17	Hann
iddefjorden	11	0,57	0,73	0,16	104	24	0,21	Hann
iddefjorden	12	0,71	0,34	-0,37	98	24	0,12	Hunn
iddefjorden	13	0,68	0,54	-0,14	114	24	0,16	Hann
iddefjorden	14	0,91	0,81	-0,10	112	25	0,20	Hunn
iddefjorden	15	0,71	0,52	-0,20	86	22	0,16	Hunn
iddefjorden	16	0,66	0,43	-0,23	144	27	0,18	Hann
iddefjorden	17	0,45	0,17	-0,28	78	22	0,26	Hunn
iddefjorden	18	0,84	0,63	-0,21	146	28	0,15	Hunn
iddefjorden	19	0,37	0,24	-0,13	122	26	0,33	Hunn
iddefjorden	20	0,54	0,77	0,24	170	27	0,15	Hunn
langesund	1	0,59	1,32	0,73	112	24	0,18	Hann
langesund	2	0,62	0,47	-0,15	98	23	0,18	Hunn
langesund	3	0,33	0,56	0,22	138	28	0,14	Hunn
langesund	4	0,31	0,91	0,60	150	27	0,19	Hunn
langesund	5	0,27	0,38	0,11	124	24	0,21	Hunn
langesund	6	0,38	0,79	0,41	162	28	0,11	Hann
langesund	7	0,66			138	26	0,17	Hann
langesund	8	0,75			140	25		
langesund	9	0,25	0,57	0,33	120	26	0,07	Hann
langesund	10	0,49	0,95	0,46	108	25	0,07	Hunn
langesund	11	0,40	1,00	0,60	108	23	0,19	Hunn
langesund	12	0,84	0,41	-0,43	142	26	0,17	Hunn
langesund	13	2,09	0,63	-1,47	142	26	0,20	Hunn
langesund	14	0,28	0,73	0,45	94	23	0,23	Hann
langesund	15	0,26	0,40	0,14	134	25	0,16	Hunn
langesund	16	0,30	0,56	0,26	92	23	0,24	Hunn
langesund	17	0,96	1,08	0,12	178	28	0,15	Hann
langesund	18	0,40	0,78	0,39	146	25	0,11	Hann
langesund	19	0,25	0,79	0,54	140	26	0,21	Hunn
langesund	20	0,68	1,15	0,47	152	27	0,16	Hunn
mfs	1	1,13	1,08	-0,05	138	25	0,16	Hunn
mfs	2	0,37	1,02	0,65	110	25	0,22	Hunn
mfs	3	1,38	1,95	0,57	156	27	0,17	Hann

mfs	4	0,72	0,41	-0,31	100	24	0,14	Hunn
mfs	5	0,47	0,52	0,05	96	23	0,15	Hann
mfs	6	0,28	0,34	0,06	168	28	0,20	Hunn
mfs	7	0,59	1,53	0,93	160	28	0,15	Hunn
mfs	8	0,37	1,30	0,93	116	25	0,14	Hunn
mfs	9	0,74	1,24	0,50	184	26	0,18	Hann
mfs	10	4,33	1,88	-2,46	132	26	0,18	Hunn
mfs	11	1,14	0,95	-0,19	154	27	0,14	Hunn
mfs	12	1,18	0,40	-0,78	112	26	0,13	Hunn
mfs	13	0,46	0,19	-0,26	104	24	0,19	Hann
mfs	14	0,81	1,18	0,37	146	26	0,19	Hann
mfs	15	0,44	0,46	0,01	132	26	0,17	Hunn
mfs	16	0,89	0,57	-0,33	120	25	0,18	Hann
mfs	17	0,38	0,21	-0,17	124	26	0,16	Hunn
mfs	18	0,30	1,07	0,77	172	28	0,14	Hunn
mfs	19	0,46	0,44	-0,02	140	25	0,16	Hunn
mfs	20				170	28		
sandebukta	1	0,25			92	24		
sandebukta	2	0,75	0,59	-0,16	206	29	0,18	Hunn
sandebukta	3	0,66	0,68	0,01	112	26	0,20	Hunn
sandebukta	4	1,63	1,15	-0,48	210	30	0,14	Hunn
sandebukta	5	1,74	0,82	-0,92	202	29	0,18	Hann
sandebukta	6	1,03	0,68	-0,35	208	29	0,11	Hann
sandebukta	7	1,17	1,18	0,01	218	30	0,18	Hunn
sandebukta	8	0,41	0,35	-0,06	146	24	0,15	Hunn
sandebukta	9	0,73	0,75	0,02	152	27	0,13	Hunn
sandebukta	10	0,34	0,28	-0,06	186	29	0,23	Hunn
sandebukta	11				112	24	0,25	Hunn
sandebukta	12	0,44	0,40	-0,04	218	30	0,19	Hann
sandebukta	13	0,59	0,36	-0,23	160	27	0,23	Hann
sandebukta	14	0,36	1,27	0,91	132	26	0,21	Hann
sandebukta	15	0,49	0,66	0,18	108	25		
sandebukta	16	0,58	1,37	0,79	134	25	0,16	Hann
sandebukta	17				134	26	0,19	Hunn
sandebukta	18	0,88	0,47	-0,41	88	23	0,23	Hunn
sandebukta	19	0,52	0,57	0,05	206	28	0,16	Hann
sandebukta	20	1,73	1,29	-0,44	196	29	0,17	Hann

## **Vedlegg E. Rådata viltfanget torsk – 1997**

Individuelle data for torsk samlet inn i 1997.

sted	vtg	vekt	lengde	kjønn
frierfjorden	0,361	160	28,5	Hunn
frierfjorden	1,379	132	25,5	Hunn
frierfjorden	0,33	120	24	Hann
frierfjorden	1,189	136	24	Hunn
frierfjorden	0,417	74	21	Hunn
frierfjorden	0,68	124	25	Hunn
frierfjorden	0,635	124	25	Hunn
frierfjorden	0,38	118	24,5	Hunn
frierfjorden	0,967	94	22,5	Hann
frierfjorden	0,699	142	26	Hann
frierfjorden	0,349	172	27,5	Hunn
frierfjorden	0,641	134	26	Hunn
frierfjorden	0,503	56	18,5	Hunn
frierfjorden	0,723	230	30,5	Hunn
frierfjorden	0,655	110	23,5	Hann
frierfjorden	0,817	170	28	Hann
frierfjorden	0,406	196	27,5	Hann
frierfjorden	0,881	216	29	Hann
frierfjorden	1,324	200	29	Hann
frierfjorden	0,752	166	26,5	Hunn
hvaler	0,715	126	26,5	Hunn
hvaler	0,397	60	20,5	Hann
hvaler	0,903	94	24,5	Hunn
hvaler	0,482	52	19,5	Hann
hvaler	0,371	82	23	Hann
hvaler	0,658	80	22	Hann
hvaler	0,608	66	21,5	Hunn
hvaler	0,99	80	23	Hann
hvaler	0,634	76	22,5	Hann
hvaler	0,631	92	23,5	Hunn
hvaler	0,805	86	22,5	Hunn
hvaler	1,407	116	25,5	Hunn
hvaler	0,486	78	23,5	Hann
hvaler	0,516	92	24	Hann
hvaler	0,864	86	23,5	Hunn
hvaler	0,33	92	23	Hann
hvaler	0,5	82	22,5	Hunn
hvaler	0,367	56	20	Hunn
iddefjorden	1,506	128	25	Hunn
iddefjorden	0,159	80	23	Hunn
iddefjorden	0,426	64	20,5	Hann
iddefjorden	0,562	110	25,5	Hunn
iddefjorden	0,417	76	22	Hunn
iddefjorden	0,643	86	23,5	Hunn
iddefjorden	0,418	54	20	Hunn
iddefjorden	0,529	100	24,5	Hunn
iddefjorden	0,484	60	20,5	Hann
iddefjorden	0,4836	66	20,5	Hann
iddefjorden	0,457	50	20	Hunn
iddefjorden	0,576	50	19,5	Hunn
iddefjorden	0,3	82	23	Hunn

iddefjorden	0,491	80	23,5	Hunn
iddefjorden	0,893	70	21,5	Hann
iddefjorden	0,296	60	20	Hann
iddefjorden	0,198	66	21,5	Hann
iddefjorden	0,246	80	22,5	Hann
iddefjorden	0,525	80	22,5	Hann
iddefjorden	0,397	56	20,5	Hunn
langesund	1,057	56	20,0	
langesund	0,71	62	20,0	
langesund	0,813	70	21,0	
langesund	0,481	58	19,5	
langesund	0,666	102	25,0	
langesund	0,423	68	21,5	
langesund	1,11	122	24,5	
langesund	0,672	98	22,5	
langesund	1,026	104	23,5	
langesund	0,825	68	20,5	
langesund	0,825	98	22,5	
langesund	0,727	68	21,0	
langesund	0,478	96	23,0	
langesund	0,381	74	21,0	
langesund	0,867	88	21,5	
langesund	0,488	136	26,5	
langesund	1,899	60	19,5	
langesund	0,728	74	20,5	
langesund	1,702	76	21,0	
langesund	0,553	48	18,0	
moss	0,454			
moss	0,465			
moss	2,031			
moss	0,76			
moss	0,302			
moss	0,581			
moss	0,251			
moss	0,435			
moss	0,987			
moss	0,506667			
moss	0,429			
moss	0,389			
moss	0,4764			
moss	0,18			
moss	0,559			
moss	0,747			
moss	0,87			
moss	0,47			
moss	0,683			
moss	0,163			
sandebukta	0,205	100	24	Hann
sandebukta	0,369	126	26	Hunn
sandebukta	1,641	136	25,5	Hunn
sandebukta	0,629	78	21,5	Hann
sandebukta	0,452	72	21	Hann
sandebukta	0,601	110	23,5	Hunn



sandebukta	0,727	90	22	Hann
sandebukta	0,68	62	20,5	Hann
sandebukta	0,201	74	21,5	Hunn
sandebukta	1,264	122	25,5	Hann
sandebukta	0,483	76	20	Hann
sandebukta	0,584	92	24	Hunn
sandebukta	0,606	118	25	Hann
sandebukta	0,467	90	22,5	Hunn
sandebukta	0,438	66	20,5	Hann
sandebukta	0,429	80	21,5	Hann
sandebukta	0,543	106	24,5	Hann
sandebukta	0,88	128	25	Hunn
sandebukta	0,623	120	23,5	Hunn
sandebukta	0,97	102	24	Hunn

## Vedlegg F. Stasjonsbeskrivelser

### **Raunefjorden/Fanafjorden (Bergen)**

Stasjonen ligger i et antatt lite påvirket område utenfor Byfjord-systemet. Området har noe skipstrafikk, men det har ikke vært mulig å fremskaffe analysedata som belyser miljøgiftsituasjonen. En antar imidlertid at stasjonen er vesentlig mindre belastet enn stasjonen i Byfjorden (se nedenfor).

### **Sandviksbukten i Byfjorden (Bergen)**

Denne stasjonen ligger i et tett befolket, industrialisert område nær Bergen sentrum. Det er et utslipp av kloakk i nærheten.

Undersøkelser av nivået av miljøgifter i sedimenter og biologisk materiale er gjennomført for Byfjorden og havneområdene i Bergen (Skei et al. 1994) og i tilliggende fjordområder (Knutzen et al. 1995).

Undersøkelser av nivået av tungmetaller i sedimenter i Byfjorden og havneområdene i Bergen har avslørt høye konsentrasjoner av kvikksølv, bly, kobber, PCB og PAH (Skei et al. 1994). I lever av torsk innsamlet fra et område svært nær stasjonen der forsøkene er utført (Skuteviken) er det påvist høye konsentrasjoner av PCB (PCB<sub>7</sub>=2491 µg/kg v.v., Skei et al. 1994). Også innholdet av PCB i andre organismer innfanget i områder (Skei et al. 1994). viser at området er generelt påvirket av PCB (også non-orto PCB, særlig PCB 126). Dioksininnholdet i torskelever fra Puddefjorden og Eidsvåg og i krabbesmør fra Skuteviken var lavt/moderat (Skei et al. 1994) og utgjorde en relativ liten andel av toksisitetspotensialet som var dominert av PCB 126.

Analyser av blåskjell tyder på at området er betydelig påvirket av oljeavledet PAH mens innholdet i fisk og krabbe viser bare moderat eller lavt innhold av PAH

Analyser av metaller (Hg, Pb, Cd, Zn, Cr, Cu, Ni) i torsk fra Skuteviken viser tilnærmet normalverdier mens analyser av blåskjell tyder på en generell (diffus) overbelastning i hele området.

### **Frierfjorden**

Området der fisken ble satt ut og villfisk innfanget ligger på vestsiden noe ut i fjorden, nær Skjerkøya (se vedlegg A for detaljkart). Frierfjorden er sterkt industripåvirket og bærer også preg av eutrofiering. Utslippene fra Hydro Porsgrunns magnesiumsfabrikk og nå nedlagte kloralkalifabrikk har medført høye konsentrasjoner av henholdsvis persistente klororganiske forbindelser og kvikksølv i sedimentene. Overkonsentrasjoner av polyaromatiske hydrokarboner (PAH) i sedimentene kan i vesentlig grad tilskrives utslipp fra Elkem-PEA's ferromanganverk. Analyser av sedimenter innsamlet i Frierfjorden i 1989 viste overkonsentrasjoner av blant annet kvikksølv (ca. 15 ganger), heksaklorbenzen (ca. 1000 ganger), dioksiner/furaner målt som TCDD-ekvivalenter (ca 500 ganger), PAH (ca. 40 ganger) (Næs og Oug, 1991). De tidligere industriutslipp har medført at en fremdeles har høye konsentrasjoner av persistente klororganiske forbindelser i torskelever (ca 60 ganger for dioksiner/furaner) og skallinnmat av krabbe (ca 100 ganger for dioksiner/furaner) fra Frierfjorden Knutzen et al. (1995). Overkonsentrasjonene med dioksiner/furaner skyldes sannsynligvis at en har høye konsentrasjoner i byttedyr (Knutzen et al. 1995). Omregning av nivåene av polyklorerte naftalener og non/mono-orto PCB i lever av torsk fra Frierfjorden til toksisitetsekvivalenter medfører at disse forbindelsene gir et betydelig bidrag til den totale giftigheten av klororganiske forbindelser i torsk (Knutzen et al. 1995). De høye nivåene av klororganiske forbindelser i fisk og skalldyr fra området har medført at det er innført omsetningsforbud for fisk og skalldyr fanget innenfor Breviksbroen.

**Langesundsfjorden**

Stasjonen ligger mellom Arøya og Stokkøya innerst i Langesundsbukta.

Området er langt mindre industripåvirket enn Frierfjorden. Analyser av sedimenter innsamlet i Langesundsbukta i 1989 viste konsentrasjoner av kvikksølv på bakgrunnsnivå (Næs og Oug, 1991). Sedimentanalyser tyder imidlertid på at en har en transport av blant annet persistente klorerte forbindelser også til denne delen av fjordområdet (overkonsentrasjon av TCDD-ekvivalenter tilsvarende 10-30 ganger). Konsentrasjonen av dioksiner/furaner i torsk og krabbe avtar med økende avstand fra Frierfjorden. Dette fører til at en i Langesundsbukta har konsentrasjoner tilsvarende ca 7 ganger normalnivå sammenlignet med 50 -100 ganger i Frierfjorden (Knutzen et al. 1995). Analyser av taskekrabbe fra Arøya viser en nedgang i PCDF/PCDD innholdet fra 1988 til 1994/95, overkonsentrasjoner ble imidlertid også observert i 1994 og 1995. De noe høye nivåer av klororganiske forbindelser har medført at en i Langesundsfjorden har omsetningsforbud for krabbe og blåskjell men kan omsette torsk så lenge denne er sløyet og uten lever (Knutzen et al. 1995).

**Sandebukta**

Stasjonen ligger ytterst i Sandebukta nordøst for Bjørkøya. Inn i Sandebukta ligger treforedlingsbedriften Sande Paper mill. Analyser av skrubbe innsamlet i Sandebukta i 1995 tyder på at området i dag er lite forurenset av metaller og klororganiske forbindelser (Green 1997). Lokaliteten kan imidlertid antas å være påvirket av vann også fra Drammensfjorden.

**Drøbak**

Stasjonen ligger inne i selve småbåthavna i Drøbak. Området må antas å være relativt sterkt påvirket av lokale forhold (småbåthavn, fiskebåter).

**Solbergstrand**

Stasjonen ligger i Drøbaksundet ved NIVA's forskningsstasjon. Analyser av blåskjell innsamlet i 1995 tyder på at området er lite påvirket av metaller og dioksiner/furaner og moderat påvirket av PCB (Green 1997). Det renner ut en bekk i området som drenerer jordbruksområder, som i perioder med mye regn fører med seg mye partikulært materiale, og derved påvirker overflatevannet lokalt.

**Fuglevik, Moss**

Denne stasjonen ligger i Verlebukta i Oslofjorden syd for Moss nær utslippspunktet for et renseanlegg for kommunal kloakk fra Mosse-området. Lite er kjent om forureningsstilstanden lokalt i området. Analyser viser at renseanlegget slipper ut noe ftalater via sitt utslipp (Braaten et al. 1996.). Prøver fra området (74 m dyp) viser at sedimentene nær utslippspunktet likevel inneholder relativt lave konsentrasjoner av disse stoffene (Braaten et al. 1996.).

**Hvaler**

Hvalerestuaret har gjennom mer enn femti år og i økende grad frem til 80-tallet vært påvirket av forureningsstilførsler fra tettsteder, landbruk og industri. Undersøkelser foretatt av NIVA i Hvalerområdet i 1970 - 80 årene viste klare forureningspåvirkninger (Skei, 1984.). Vannmassene i Hvalerområdet er imidlertid også naturlig påvirket av vann fra Glomma som i perioder fører med seg store mengder løsmateriale, som påvirker siktedypet i estuariet og avsettes utover fra elvas munning. Som en følge av industriens investeringer i rensetiltak og igangsetting av flere kommunale renseanlegg har det skjedd en reduksjon i forureningsbelastningen til Hvalerområdet de senere år (Holtan 1996) og særlig i perioden etter 1985.

For de fleste metaller unntatt titan finner en i dag ikke spesielt høyere konsentrasjoner i sediment og sedimenterende materiale fra munningsområdet enn lenger ut i estuariet. De noe høyere konsentrasjoner av titan i munningsområdet må i vesentlig grad skyldes de tidligere store og nå reduserte (fra 1989) tilførsler fra lokal industri. Det ble registrert en reduksjon i innholdet av

kvikksølv, kadmium, bly og sink i bunnsedimentene fra 1980 til 1994 men ikke for jern, kobber og krom. Observerte forbedringer var størst i perioden frem til 1990 og ytterligere forbedringer var små i perioden 1990-1994. Titan som ikke ble analysert i sediment i 1980 viste imidlertid tegn på lavere konsentrasjoner i 1994 enn i 1990.

En nedgang i konsentrasjonen av kobber og sink ble observert i blæretang i perioden 1989-1994. Til tross for de utslippsreduksjoner som er gjennomført for jern og til dels også titan i perioden 1989-94 er det ikke observert en tilsvarende reduksjon av disse metallene i blæretang. Organismene i området fremstod i 1994 som lite til moderat forurenset med klororganiske forbindelser. Eksempelvis var innholdet av polyklorete bifenyler (PCB) i torskelever relativt lavt i 1994 sammenlignet med 1989 (Berge et al. 1996). Tributyltin (TBT) er et stoff som før 1990 ble brukt i bunnstoffer for mindre båter og som nå hovedsakelig brukes på båter større enn 25 m. Analyser av blåskjell er i tråd med resultater fra andre deler av landet og tydet på en klar spredning av TBT i norske kystfarvann, mest sannsynlig fra bunnstoffer.

Flommen i 1995 medførte at en over et kort tidsrom fikk en unormal høy tilførsel av partikulært materiale og medfølgende miljøgifter. Flommen har gitt en påvisbar men svak effekt på nivået av enkelte miljøgifter i organismer. I blæretang og blåskjell ble det observert en generell økning i konsentrasjonen av kobber, i blæretang også bly, mens en på enkelte stasjoner der en hadde høye konsentrasjoner av jern og titan i 1994 så en nedgang i 1995. Der en observerte høyere metallkonsentrasjoner i 1995 enn i 1994 førte dette til små eller ingen endring mht. karakterisering av områdets forurensningsgrad, (maksimum en klasse med unntak for bly i blæretang fra N-Asmaløy der en så en endring tilsvarende 2 tilstandsklasser). Analyser av polyklorete bifenyler (PCB) i blåskjell og torskelever viste en entydig i økning i konsentrasjon fra 1994 til 1995 og førte med unntak av blåskjell fra Papper til en endring i områdets forurensningsgrad tilsvarende maksimalt en tilstandsklasse (fra lite forurenset til moderat forurenset). Resultatet for PCB i skjell fra Papper medførte en endring i forurensningsgrad fra lite forurenset til markert forurenset. Deler av økningen i PCB konsentrasjon observert i blåskjell fra Papper skyldes sannsynligvis lokale forhold. De effekter som kan tilskrives flommen synes i hovedsak å være moderate og representerer sannsynligvis ikke noe vesentlig tilbakeskritt i forhold til de forbedringer av miljøtilstand som er observert frem til 1994.

### **Idddefjorden/Ringdalsfjorden**

Stasjonen ligger ved Knivsøyholmene i Ringdalsfjorden (se vedlegg A for detaljkart). Fjorden er en terskelfjord (terskeldyp ca 8.5m) som har hatt utslipp fra treforedlingsindustri i mer enn 100 år. Hovedutslippene er ført ut med Tista ved Halden. Ved Tista har det tidligere også ligget en batterifabrikk som har ført til en betydelig metallforurensning. I området der forsøkene ble utført ligger det i dag blant annet en kabelfabrikk og en rørfabrikk.

Metallforurensningen i Idddefjorden hadde i 1970 årene et betydelig omfang (Knutzen et al. 1978). I løpet av de siste 15 år har det imidlertid skjedd betydelige forbedringer mht. utslippsituasjonen i Idddefjorden. Blant annet har utslippene av klororganiske forbindelser fra klorbleking i treforedlingsindustrien opphørt fra 1991.

Undersøkelser av miljøgifter i organismer og sediment er sist gjennomført i henholdsvis 1992 (Berge og Helland, 1993) og 1994 (Helland og Walday, 1996). Disse undersøkelsene viser at det har skjedd klare miljøforbedringer i fjorden siden 1970 og 80 tallet. Innholdet av metallene bly, kobber, sink kadmium og kvikksølv i overflatesedimentene er markert redusert siden 1977. Fjorden kan på bakgrunn av metallkonsentrasjoner i sedimentet karakteriseres som lite til moderat forurenset (SFT kriterier) med unntak av kadmium som var markert forhøyet på alle stasjoner og bly som også var markert forhøyet ytterst i fjorden ved Svinesund.

I 1977 ble de høyeste metallverdiene registrert nær Halden mens en i dag ser de høyeste verdier i overflatesedimentet ytterst i fjorden. Dette skyldes raskere sedimentering og raskere tildekking med

"rent materiale" nær Halden enn lenger ut. Analyser av prøver fra en stasjon mellom Svinesund og Halden viste lave konsentrasjoner av polyklorerte bifenyl- (PCB) og dioksiner i overflatesedimentet. Pågående undersøkelser tyder imidlertid på at en i enkelte områder kan ha betydelige mengder PCB i sedimentet. Andre undersøkelser tyder på at en tidligere har hatt en dioksin/furan kilde i fjorden. Dioksiner/furaner utgjør imidlertid i dag ikke noe vesentlig miljøproblem i fjorden. Iddefjorden ble på bakgrunn av innholdet av metaller og utvalgte klororganiske forbindelser karakterisert som lite eller ubetydelig påvirket. Undersøkelser viser imidlertid at fisk og sedimenterende materiale i området så sent som henholdsvis i 1992 og 1994 inneholdt til dels betydelige nivåer av treforedlingsrelaterte klororganiske forbindelser. Også sedimentet i dypområdene kunne karakteriseres som markert forurenset av eksternt organisk bundet klor (Helland og Walday, 1996). Utslippsreduksjonene som er foretatt på 90-tallet har medført et betydelig rikere dyre- og planteliv på hardbunn i fjorden (Helland og Walday, 1996) samt forbedringer i bløtbunnsfaunaen.

Kloakk renseanlegget for Halden ligger noen km lenger inne ved Brattøya. Ftalatinholdet i sedimentene i nærheten av kloakkutslippet lå noe høyere enn det som er funnet i referanseområder (Braaten et al., 1996).

## Vedlegg G. ELISA - metoder og evaluering

### Analyse av vitellogenin

#### Direkte ELISA

Vitellogenin i plasma ble kvantifisert ved direkte ELISA med bruk av antistoffer mot vitellogenin fra torsk (Silversand et al. 1993). Årsaken til at en direkte ELISA ble benyttet og ikke kompetitiv ELISA som i Hylland & Braaten (1996) var at prøvene lå ned mot og under deteksjonsgrensen for den kompetitive metoden slik den er etablert. Det ble benyttet blank (kun coatingbuffer, karbonat-bikarbonat buffer, pH 9.6) og positiv kontroll (fortynnet plasma fra estradiol-behandlet torsk) på alle plater. 100 µL blank, kontroll eller prøve ble pipetert ut i fire replikate brønner på 96-brønners mikrotiterplater. Platene ble deretter inkubert over natt ved 4°C i et fuktig kammer. Påfølgende dag ble platene vasket 3 x 1.5 minutter med TTBS (0.5% Tween-20 i tris-bufret saltløsning, TBS) før de ble inkubert med 100 µL primært antistoff (anti-torsk vitellogenin, 1:20 000 i TTBS). Brettene ble dekket med tape og inkubert over natt ved 4°C. Etter 3 x 1.5 minutter vask med TTBS ble 100 µL sekundært antistoff (geit anti-kanin-IgG HRP-konjugert, 1:20 000 i TTBS). Brettene ble dekket med tape og inkubert i 6 timer ved 4°C. Etter 5 x 1.5 minutter vask i TTBS ble brettene fremkalt med OPD som substrat (i fosfat-citrat buffer, pH 5.0). Etter fremkalling i 30 minutter ble reaksjonen stanset ved tilsetning av 50 µL stoppløsning (4 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) i alle brønner. Optisk tetthet ble lest ved 492-405 nm. Blank-verdien ble trukket av og verdien standardisert til absorbans i kontroll-brønnene.

#### Kompetitiv ELISA

Det ble benyttet en kompetitiv, indirekte ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) til kvantifisering av Vg i plasma fra torsk. Metodene som er beskrevet i (Specker and Anderson, 1994) ble brukt med visse modifikasjoner (Hylland and Haux, 1997). I korthet inkuberes brønnene i 96-brønners mikrotiterplater (Immunosorp, Nunc, Roskilde Danmark) over natt (4°C) med 400 ng/mL Vg i en buffer med pH 9.6. Fire brønner inkuberes med "coating"-buffer uten antigen - til kvantifisering av blank og ikke-spesifikk binding. Deretter vaskes alle brettene 3 ganger med TTBS (tris-bufret saltløsning med 0.05% Tween-20). Prøve eller standard og fortyninger av det aktuelle primære antistoff - anti-torske Vg for torsk (1:150 000) og anti-steinbit Vg (1:50 000) i TTBS for de andre artene ble påsatt. Brønnene til blank og ikke-spesifikk binding ble påsatt bare TTBS. Brettene ble så inkubert ved 4°C over natt. Brettene ble deretter vasket som ovenfor og påsatt sekundært antistoff (geit anti-kanin IgG konjugert med HRP - 1:25 000) i alle brønner unntatt brønner til blank og ikke-spesifikk binding, som bare mottok TTBS. Brettene ble inkubert i 6-8 timer og deretter vasket som ovenfor, men 5 ganger. Fremkalling var ved tilsetning av OPD (O-fenylendiamin) i fosfat-bufret citrat og inkubering i 20-40 minutter. Fremkallingen ble avsluttet ved tilsetning av 25 µL 50% svovelsyre. Absorbansen ble så lest ved 490 nm og mengden relatert til standarder ved en 4-parameter kurvetilpasning (SOFTmax versjon 2.32, Molecular Devices). Konsentrasjonen av Vg ble så bestemt med utgangspunkt i en standardkurve for Vg (se nedenfor). Hver prøve ble målt i triplikat (tre brønner) og typisk variabilitet (CV) var 5-15% - lavere variabilitet for høye verdier.

#### Analyse av eggeskallsprotein (zona-radiata protein)

Eggeskallsprotein (zona radiata protein, zrp) i plasma ble kvantifisert ved bruk av en direkte ELISA. Antistoffene som ble brukt er fremstilt med torsk zrp som antigen og kryss-reagerer med alle tre isoproteinene (alfa, beta, gamma). Prøvene ble fortynt 1:2000 i coatingbuffer (karbonat-bikarbonat buffer, pH 9.6). I analysen ble det inkludert en positiv kontroll - plasma fra estradiol-behandlet torsk, fortynt 1:1000. Videre ble det benyttet en negativ kontroll - plasma fra juvenil torsk, fortynt 1:1000. 100 µL av hver prøve, blank eller kontroll ble pipetert ut i tre replikate brønner på 96-brønners mikrotiterplater i tilfeldig rekkefølge. Etter utpipettering ble platene dekket med aluminiumsfolie og inkubert over natt ved 4°C. Alle brett ble deretter vasket 3 ganger med TPBS (0.5% Tween-20 i fosfat-bufret saltløsning, PBS). Etter siste vask ble vaskeløsningen holdt i brønnene

i 5 min. Alle brønner ble deretter tilsatt 200 µL blokkeringsløsning (0.2% BSA i PBS) og inkubert i 60 minutter. Deretter ble brettene vasket 3 ganger som ovenfor og 100 µL primært antistoff tilsatt (anti-torsk zrp [alfa-beta-gamma-zrp-cod 6/5-96, AEA], 1:1000 i PBS). Brettene ble inkubert med primært antistoff i 120 minutter ved romtemperatur. Alle brett ble deretter vasket 3 ganger med TPBS som ovenfor før 100 µL sekundært antistoff ble tilsatt (geit anti-kanin-IgG HRP-konjugert, fortynnet 1:3000 i 0.1% BSA i PBS). Brettene ble inkubert med sekundært antistoff i 60 min ved romtemperatur. Etter 5 ganger vask med TPBS ble brettene fremkalt med OPD som substrat (løst i dH<sub>2</sub>O med 0.04% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Etter fremkalling i 30 minutter ble reaksjonen stanset ved tilsetning av 50 µL stoppløsning (4 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) i alle brønner. Brettene ble lest ved 492 nm.

### **Kvantifisering av vitellogenin i standardplasma**

Til fraksjonering av vitellogenin i serum ble det benyttet et høytrykks væskechromatografi system (HPLC).

### **Separasjonsbetingelser for plasma fra torsk**

Waters høytrykks væskechromatograf:600E gradient pumpe, 490 UV detektor, 717 autosamler, millennium 2000 software, fraksjonssamler

Separasjonskolonne:Superdex(r) 200, HR 10/30 Pharmacia Biotech

Mobil fase:0.1 M tris-HCl buffer pH 8.2 ved 5 °C

Væskeshastighet:0.1 ml/min

Injeksjonsvolum:25 µl

Bølgelengder:220, 250 og 280 nm.

Mobilfasen og oppsamlingsrørene i fraksjonssamleren ble satt på isbad for å redusere eventuell nedbrytning av proteinene.

### **Kjemikalier og utstyr**

Alle kjemikalier som ble brukt var av analytisk kvalitet.

Filter: Millex-GV4, porestørrelse 0.22 µm, til filtrering av prøvene.

Millipore HV filter, porestørrelse 0.45 µm, til filtrering av mobilfasen.

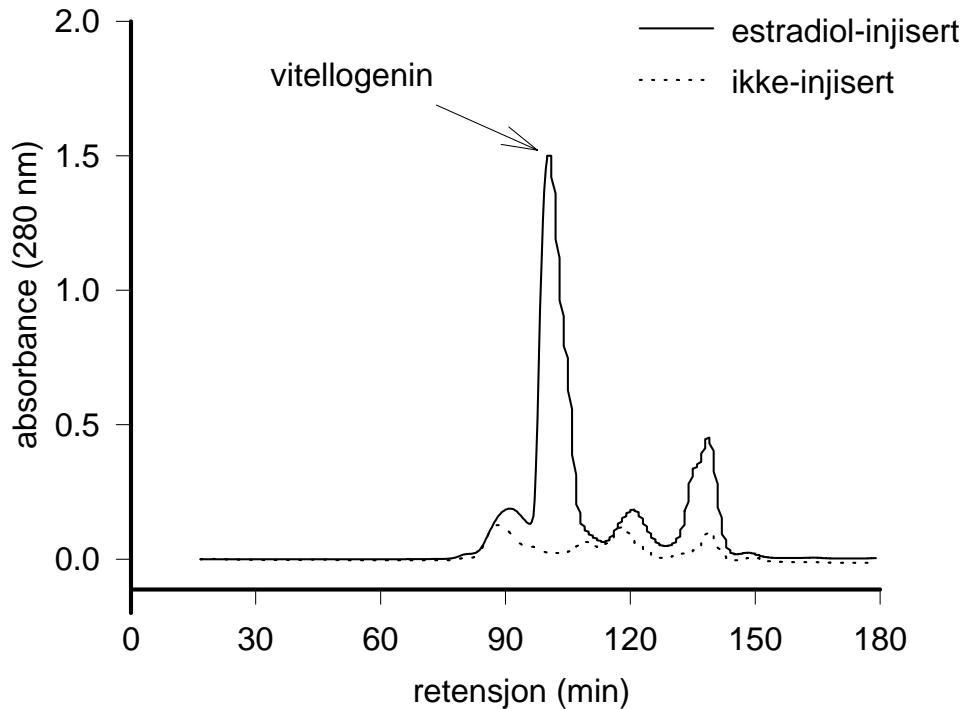
### **Fraksjonering**

Superdex(r) 200, HR 10/30 gel-filtreringskolonne ble kalibrert ved eluering av standarder med kjent molekylvekt. En serumprøve av østradiol-injisert torsk ble injisert i HPLC systemet for å bestemme retensjonstider for de ulike toppene i kromatogrammet. En serumprøve av torsk som ikke hadde vært eksponert for østradiol ble også injisert for å bestemme hvilken av toppene i kromatogrammet som var vitellogenin.

Da retensjonstidene var bestemt, ble ytterligere prøver fra torsk eksponert for østradiol og referanseprøver sentrifugert ved 20 000 g i 15 min ved 4 °C og filtrert før injeksjon i HPLC systemet. For enkelte av prøvene måtte det benyttes to filtre. Fraksjoner ble samlet opp. For torskeprøvene ble det samlet fraksjoner ut fra når topper ble observert i kromatogrammene. 10 fraksjoner à 1 ml ble samlet opp. De enkelte fraksjonene ble frosset ned ved -80 °C inntil videre analyse.

Det var intensjonen at plasmaprøvene fra torsk i denne undersøkelsen skulle analyseres ved bruk av den samme kompetitive ELISA som i tidligere undersøkelser (Hylland & Braaten 1996). For å få en absolutt konsentrasjon av vitellogenin og en kontroll på at det ikke var andre forstyrrende proteiner ble det foretatt en separasjon av proteinene i plasma fra torsk med HPLC. Vitellogenin utgjorde i underkant av 70% av alt protein i plasma til estradiol-injisert torsk, mens det ikke var detekterbart i plasma til ikke-injisert fisk (se figur nedenfor). Hver av toppene i eluatet ble testet i ELISA for tilstedeværelsen av vitellogenin eller nedbrytningsprodukter av vitellogenin, men det var bare hovedtoppen som hadde slik reaktivitet. Konsentrasjonen av vitellogenin i standardplasmaet fra torsk ble beregnet til 102.5 mg/mL. Tilsvarende analyser ble også foretatt for laks, bergnebb og skrubbe

(arter som ble benyttet i den forrige undersøkelsen). Resultater fra disse var i overensstemmelse med de som ble funnet for torsk.



Separasjon av proteiner i plasma fra torsk. Vitellogenin eluerte som et protein med størrelse 190-200 kDa.

### Evaluering av metoden

I denne undersøkelsen ble det benyttet en direkte ELISA framfor en kompetitiv ELISA som i den forrige undersøkelsen (Hylland & Braaten, 1996). Årsaken til dette var at det store flertall av prøvene lå ned mot deteksjonsgrensen for den kompetitive metoden. Det ble gjort noen forbedringer av metoden for å senke deteksjonsgrensen, men det ble foretrukket å benytte en direkte ELISA. Denne metoden gir ikke absolutte konsentrasjoner av vitellogenin (som den kompetitive), men ga altså lavere deteksjonsgrense enn den metoden som var tilgjengelig i 1996. Alt materialet som ble innsamlet i 1997 ble analysert med en forbedret kompetitiv ELISA.

Plasma fra estradiol-injisert torsk som er benyttet som standard ble separert med gel-filtrering for å kvantifisere mengden vitellogenin i plasmaet. Resultatene viser at det er akseptabelt å benytte et slikt plasma som standard siden vitellogenin utgjorde omkring 70% av alt protein i plasmaet (Hylland & Haux, 1997). Det var ikke tegn til nedbrytning av proteinet (noe som er et stort problem når rensset vitellogenin benyttes som standard) selv etter lagring i 18 måneder ved -80°C.



## **Vedlegg H. Analyser av nonylfenol og nonylfenoletoksilater i sediment (ARISE)**

**Identification and quantitation of  
alkylphenol and alkylphenol ethoxylates  
in sediment samples from Norway**

F. van der Wielen, M. Zhao, P. de Voogt

March 1998

Department of Environmental and Toxicological Chemistry  
Amsterdam Research Institute for Substances in Ecosystems  
University of Amsterdam  
Nieuwe Achtergracht 166  
1018 WV Amsterdam  
The Netherlands

## ***Introduction***

The Norwegian Institute for Water Research NIVA, in Oslo, Norway, commissioned the Department of Environmental and Toxicological Chemistry of the University of Amsterdam for the analysis of alkylphenol ethoxylates in waste water samples. Eight sediment samples from marine origin were sent for analysis of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates in October 1997. The samples had been shipped separately by air cargo from Norway to the Netherlands in glass jars. The corresponding airway bill is 4533 10 2873. The samples had been pretreated according to the protocol sent to NIVA (cf. annex 1). During transport, the samples were deep frozen and wrapped in isolating material. The samples were delivered on 30 October 1997 at the University of Amsterdam and subsequently stored until further analysis. This report presents a brief description of the methods of analysis and the results thus obtained.

## **Method**

The analytical method, which is briefly summarized below is based on a method that has been published in the literature (de Voogt et al., 1997). Further details can be obtained from that paper.

### **Sample pretreatment**

The samples were stored in the freezer (-20 °C) until analysis. Before analysis the samples were thawed at room temperature. The contents of the glass jars were homogenized by shaking, and an aliquot was transferred immediately to a preweighed bottle so as to obtain an aliquot representative of the entire "as received" sample. The total weight of the aliquot was thus recorded (weight A). Next, the total aliquot was centrifuged at 2200 rpm. The aqueous layer was then removed and weighed (B). The aqueous layer was not analysed, and stored in a refrigerator. From the remaining solid fraction (pellet, weight C) an aliquot was taken to determine its moisture content (% moist). A second aliquot was taken, weighed (D) and transferred quantitatively to a glass Soxhlet thimble.

### **Soxhlet extraction**

The samples were Soxhlet extracted overnight with basic methanol. Samples and blanks were extracted in batches of four samples. In each batch at least one blank sample (either spiked or non-spiked) was included. After extraction the extract was concentrated until approximately 20 ml. The extracts were neutralized with HCl and stored in the refrigerator (5°C) until further use.

### **Solid-phase extraction**

All extracts were further purified by solid-phase extraction (SPE). A C-18 SPE cartridge column was used to that end. The sample was introduced on the column in a matrix of water/methanol (60/40). After passing the entire sample volume, the column was eluted with 100% methanol. The latter (i.e. 100% methanol) fraction (containing the AP and APE) was evaporated to dryness.

### **Adsorption chromatographic clean-up**

Further clean-up of the SPE extracts was carried out with an adsorption chromatographic column consisting of (bottom to top) neutral deactivated Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, AgNO<sub>3</sub> impregnated silica and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The extract was redissolved in 2 ml dichloromethane/hexane 1:3, v:v) and transferred onto the column. A first fraction was eluted with 90 ml dichloromethane/hexane (1:3) and discarded. Next, the column was eluted with 90 ml dichloromethane/methanol (100:1). This fraction, containing the analytes of interest, was concentrated by evaporation and redissolved in methanol.

### **Reversed phase HPLC analysis**

The sample extracts were analysed by RP-HPLC with fluorescence detection. Separation in this system is based mainly on alkyl chain (e.g. C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>) length. A 125 x 4 mm C18 Lichrospher 100 RP-18 (5 µm) in Lichrocart 125-4 column was used. The fluorescence detector parameters were set at: excitation wavelength 230 nm, emission wavelength 290 nm. The samples were injected through a 20 µl injection loop and eluted isocratically with a 80:20 (v:v) methanol/water mixture at a flow of 1.0 ml/min.

### Normal phase HPLC analysis

A 100 x 4.6 mm NP-HPLC Hypersil 3 NH<sub>2</sub> (3 µm) column with fluorescence detection was used, applying the same excitation and emission wavelengths as in the RPHPLC system. Separation in the NP system is based on ethoxylate oligomers, i.e. ethoxylate chain length. The samples were injected through a 20 µl injection loop. The mobile phase composition and the gradient elution programme is given in table 1.

Table 1. Composition of mobile phase and gradient elution programme in normal phase HPLC analysis

Time (min)	Flow (ml/min)	% n-Hexane	% 2-propanol	% H <sub>2</sub> O	Gradient
0	1.5	98	2	0	-
3	1.5	78	20	2	Linear
20	1.5	50	47	3	Linear
22	1.5	50	47	3	-
23	1.5	0	97	3	Linear

### Identification and quantitation

Reversed phase HPLC runs were used both for the identification of the presence of octylphenol, nonylphenol, octylphenol ethoxylates (as group) and nonylphenol ethoxylates (as group), and for quantitative analysis. If any of these four categories was found to be present, the normal phase HPLC runs were used to identify the nature (i.e. ethoxylate chain length composition) of the ethoxylate groups. Quantitation was based on the external standard method, using commercially available standards of OP, OP8/9E NP, NP2E, NP4E and NP10E. These standards contain mixtures of the homologues and oligomers of APE. The numbers in the standard acronyms indicate the mean ethoxylate chain length of the mixture. Calibration levels were prepared daily from dilution of stock solutions of each mixture. Concentrations were calculated from the calibration plots thus obtained, using the standard mixture eluting closest to the actual sample peak observed.

## Results

Table 1 presents the relevant weighing data used for calculation of dry weights and “as received” weights. Characters A through D refer to the method section. Dry weight concentrations were calculated from sample intake D, corrected for the moisture content. The “as received” concentrations were calculated from the following equation:

$$[\text{Concentration “as received”}] (\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}) = [\text{dry weight concentration}] * (100 - \text{total moist \%}) / 100 \quad \text{eq. 1}$$

with “total moist %” equal to

$$100 * (B + \text{moist \%} * C) / A \quad \text{eq. 2}$$

Table 1. Sample intake (g) and moisture contents for sediment samples

Sample code	weight A	weight B	weight pellet C	Soxhlet intake D	% moist in pellet	total moist %
nw-1	80.1	33.5	46.6	22.1	50	70.9
nw-2	97.1	40.0	57.1	22.7	51	71.2
nw-3	86.3	26.7	59.6	22.3	57	70.3
nw-4	150.2	11.6	138.6	40.9	24	29.9
nw-5	103.1	16.6	86.5	31.7	29	40.4
nw-6	122.9	44.9	78.0	25.1	44	64.5
nw-7	32.4	13.4	19.0	10.7	49	70.1
nw-8	95.0	30.6	64.4	25.8	52	67.5

The resulting concentrations are given in Table 2. Concentrations are expressed in  $\mu\text{g}$  per gram of dry sediment as well as in  $\mu\text{g/g}$  “as received”, total sample. It is important to note that these “as received” figures are based on the assumption that the aqueous phase of the samples does not contain any surfactants.

NP (4-nonylphenol) was only found in sample Station 9, whereas in all other sediments it was found to be below the limit of detection (LOD). Reversed phase HPLC analysis revealed the presence of NPE at all stations with levels of between 0.01 and 0.15 (sum of NPE)  $\mu\text{g/g}$  on a dry weight basis. Normal phase analysis of NPE oligomers confirmed the presence of oligomers ranging generally from 1 to 4 ethoxylate units in most samples. At station 3, oligomers with up to 10 ethoxylate units were observed (see chromatogram). Neither octylphenol nor octylphenol ethoxylates were observed in the samples.

The levels thus observed are in agreement with levels in sediments from estuarine origins in Northwest Europe (de Voogt et al.) and lower than those found in a recent study in the St. Lawrence estuary in Canada (Bennie et al. 1997). The identities of the

NPE found in the present study are also in agreement with the Northwest European study, in which a predominance of oligomers containing 1-3 ethoxylate units was found.

### *Quality control*

Blank samples were processed batchwise according to the procedures outlined above and found to contain no or negligible amounts of OP, OPE, NP or NPE.

The recovery of the method was tested by processing and analysing spiked solutions of NP and NP4E, respectively. The recovery for NP amounted to 104%, whereas for NP4E a relatively high variability with values between 44% and 95% was observed. The high variability is currently under further investigation. The results in Table 2 have not been corrected for recoveries.

The repeatability of the analyses has been assessed in a previous study (de Voogt et al. 1997) by duplicate injections of purified extracts on the pertinent HPLC system. For normal phase HPLC a maximum deviation between duplicate injections of 16% was found. For reversed phase HPLC the maximum deviation observed between duplicate injections was 6.9%. Practical limits of detection depend on a number of factors, including actual interferences in the sample and sample intake. LODs were derived from signal to noise levels in blanks, and are given in table 2.

### *References*

Bennie DT, Sullivan CA, Lee H-B, Peart TE and Maguire RJ (1997). Occurrence of alkylphenols and alkylphenol mono- and diethoxylates in natural waters of the Laurentian Great Lakes basin and the upper St. Lawrence River. *Sci. Total Environ.* 193, 263-275.

De Voogt P, de Beer K and Van der Wielen F (1997). Determination of alkylphenol ethoxylates in industrial and environmental samples. *Trends Anal. Chem.* 16, 584-595.

Table 2

**Analysis of APE in Norwegian sediments**  
**NIVA spring 1998**  
*Summary report*

**Reversed phase HPLC**

**Sample code>>**

MTC code	NW-1 Station 1	NW-2 Station 3	NW-3 Station 4	NW-4 Station 5	NW-5 Station 6	NW-6 Station 7	NW-7 Station 8	NW-8 Station 9
NIVA code								
<b>Total conc dry wt. µg/g</b>								
NP	<lod	<lod	<lod	<lod	<lod	<lod	<lod	0.008
Sum NPE	0.037	0.076	0.039	0.021	0.052	0.145	0.012	0.054
Sum NPE+NP	0.037	0.076	0.039	0.021	0.052	0.145	0.012	0.062
Type of ethoxylates present*	NP(1-3)E	NP(2-10)E	NP(1-3)E	NP(1-4)E	NP(2-4)E	NP(1-4)E	NP(2-4)E	NP/NP(1-4)E
<b>Total conc 'as received' µg/g</b>	0.011	0.022	0.012	0.015	0.031	0.052	0.004	0.020

**LODs for each sample µg/g**

	NW-1	NW-2	NW-3	NW-4	NW-5	NW-6	NW-7	NW-8
OP8E lod	0.005	0.007	0.005	0.002	0.003	0.005	0.012	0.003
NP4E lod	0.001	0.001	0.001	0.0003	0.0004	0.001	0.002	0.0004
NP10E lod	0.008	0.010	0.009	0.003	0.004	0.008	0.019	0.004
4-NP lod	0.006	0.008	0.007	0.002	0.004	0.006	0.015	0.004

\* as confirmed by normal phase HPLC