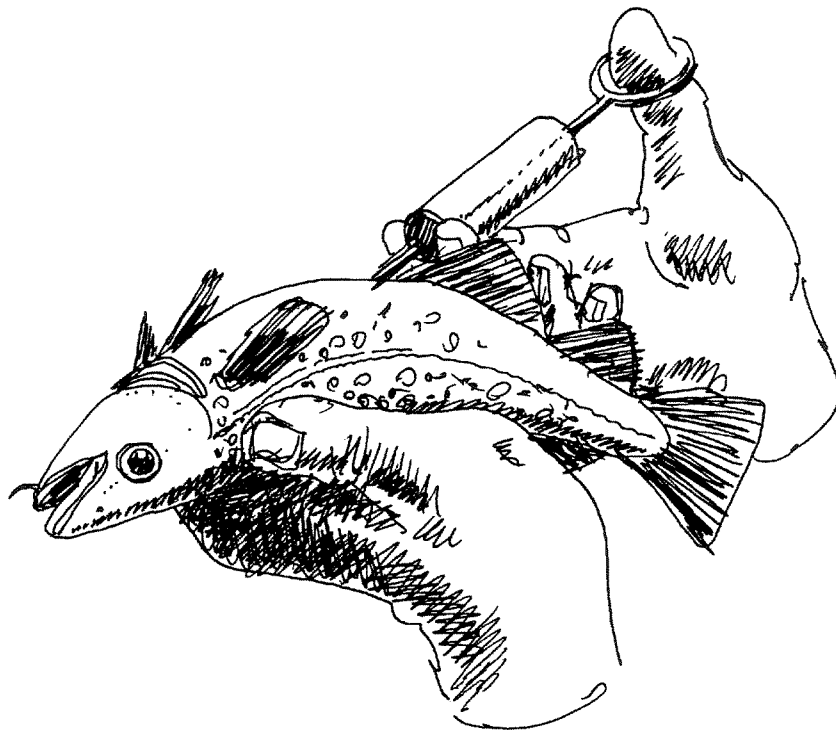


RAPPORT LNR 3422-96

Kartlegging av mulige østrogenlignende effekter i miljøet i Norge

a) Biologiske effekter



NIVA - RAPPORT

Norsk institutt for vannforskning  NIVA

Prosjektnr.: O-95199	Undernr.:
Løpenr.: 3422-96	Begr. distrib.:

Hovedkontor Postboks 173, Kjelsås 0411 Oslo Telefon (47) 22 18 51 00 Telefax (47) 22 18 52 00	Sørlandsavdelingen Televeien 1 4890 Grimstad Telefon (47) 37 04 30 33 Telefax (47) 37 04 45 13	Østlandsavdelingen Rute 866 2312 Ottestad Telefon (47) 62 57 64 00 Telefax (47) 62 57 66 53	Vestlandsavdelingen Thormøhlensgt 55 5008 Bergen Telefon (47) 55 32 56 40 Telefax (47) 55 32 88 33	Akvaplan-NIVA A/S Søndre Tollbugate 3 9000 Tromsø Telefon (47) 77 68 52 80 Telefax (47) 77 68 05 09
--	---	--	---	--

Rapportens tittel: Kartlegging av mulige østrogenlignende effekter i miljøet i Norge. a) Biologiske effekter.	Dato: 4/7-96	Trykket: NIVA 1996
	Faggruppe: Marin økologi	
Forfatter(e): Ketil Hylland Bjørn Braaten	Geografisk område: Sør-Norge	
	Antall sider: 44	Opplag: 100

Oppdragsgiver: Statens forurensningstilsyn (SFT).	Oppdragsg. ref.:
--	------------------

Ekstrakt:

Målet med prosjektet var å avklare hvorvidt østrogenlignende stoffer kan være et problem i norske kyst-farvann. Det ble gjort tre delstudier: (1) injeksjonsforsøk med marine fiskearter, (2) eksponering av marin fisk for fortennet avløp fra kloakkrensaneanlegg og (3) innsamling av villfisk langs Skagerrak-kysten og i indre Oslofjord. I forsøkene med fisk ble nivåer av proteinet vitellogenin (VTG) i plasma brukt som biomarkør. Dette er et protein som forekommer i høye konsentrasjoner i blodet til hunn-fisk i tilknytning til modning av gonadene, men som vil være svært lavt hos ungfisk eller hann-fisk. Resultatene viser at østrogenlignende stoffer er et mulig problem i norske kystfarvann. Det var imidlertid store forskjeller mellom ulike marine fiskearter i følsomheten for østrogenlignende stoffer; torsk og laks ga responser som ligner på dem som har vært funnet hos ferskvannsfisk tidligere, dvs. en sterk økning i plasma VTG. Torsk som ble eksponert for 20% avløp fra et tilfeldig valgt kloakkrensaneanlegg fikk forhøyede nivåer av VTG i plasma, men det var også effekter på torsk som ble eksponert for vann fra en småbåthavn. Det var forhøyede plasma-nivåer av VTG hos torsk fra noen kystområder. De høyeste verdiene ble funnet hos fisk som ble innsamlet i Grenlandsfjordene. Det konkluderes med at det er stoffer med østrogenlignende effekter i norske kystfarvann og at det bør gjøres mer arbeid for å identifisere kildene og stoffene som har slike effekter.

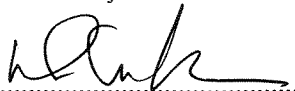
4 emneord, norske

1. Vitellogenin
2. Torsk
3. Østrogenlignende stoffer
4. Alkylfenol

4 emneord, engelske

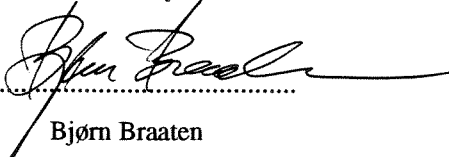
1. Vitellogenin
2. Atlantic cod
3. Environmental estrogens
4. Alkylphenol

Prosjektleder



Ketil Hylland

For administrasjonen



Bjørn Braaten

ISBN 82-577-2956-6

Norsk institutt for vannforskning

O-95199

**Kartlegging av mulige østrogenlignende effekter i
miljøet i Norge
a) Biologiske effekter**

Oslo,

4. juli 1996.

Prosjektleder:

Ketil Hylland

Medarbeider:

Bjørn Braaten

Forord

Denne rapporten er finansiert av Statens Forurensningstilsyn (SFT) og representerer den første undersøkelsen vedrørende forekomst av hormonforstyrrende stoffer i norsk miljø. Opplegget ble diskutert med SFT og kontaktpersoner har vært Berit Eyde Kjuus og Erik Høygaard.

Undersøkelsene har blitt ledet av Ketil Hylland med assistanse av Oddbjørn Pettersen og Einar Johannessen. Frank Knudsen ved Universitetet i Oslo deltok i eksperimentet knyttet til kloakkrensaneanlegget på Fuglevik. Driftssjef på Fuglevik kloakkrensaneanlegg, Erik Pettersen, takkes for samarbeidet. Alle analyser for vitellogenin ble utført ved NIVA av Ketil Hylland. Analyser for vitellogenin i plasma ville ikke ha vært mulige uten antistoffer mot vitellogenin fra ulike fiskearter; en gave fra Carl Haux, Gøteborgs Universitet.

Prøvetaking av villfisk fra Skagerakkysten ble utført i samarbeid med Havforskningsinstituttet forskningsstasjon, Flødevigen, ved deres årlige tokt langs Skagerakkysten og indre/ytre Oslofjord. Tøktet ble ledet av Ådne Sollied og Jakob Gjøsæther var faglig ansvarlig. Blodprøvene ble tatt av Jan Terje Arntzen og Randi Gaarder, Universitetet i Oslo.

Oslo, 4. juli 1996.

Bjørn Braaten

Innhold

Forord	2
Sammendrag	4
1. Innledning	5
2. Materiale og metoder.....	6
2.1. Fisk brukt i forsøk.....	6
2.2. Beskrivelse av delprosjekter	6
2.3. Prøvetaking.....	8
2.4. Analyse av vitellogenin.....	8
2.5. Kvalitetssikring av VTG-analyser	8
3. Resultater og diskusjon.....	9
3.1. Effekter av injisert østradiol og 4-nonylfenol.....	9
3.2. Effekter av eksponering for avløp fra kloakkrensaneanlegg.....	11
3.3. VTG i viltfanget fisk fra Skagerrak-kysten.....	12
4. Konklusjoner.....	14
4.1. Effekter av injisert østradiol og 4-nonylfenol.....	14
4.2. Effekter av eksponering for avløp fra kloakkrensaneanlegg.....	14
4.3. VTG i viltfanget fisk fra Skagerrak-kysten.....	15
4.4. Samlet vurdering av forsøkene	15
5. Anbefalinger	15
6. Referanser.....	16
VEDLEGG 1: Oversikt innsamlingsområder.....	17
VEDLEGG 2: Rådata fisk - injeksjonsstudie	23
VEDLEGG 3: Rådata fisk - eksponering kloakkrensaneanlegg.....	28
VEDLEGG 4: Rådata fisk - innsamlet villfisk.....	32
VEDLEGG 5: Metode ELISA	36

Sammendrag

Hvert år introduseres det nye stoffer til miljøet og det dukker jevnlig opp stoffer som har uventede effekter. En type effekter som har fått økende oppmerksomhet de siste årene er påvirkning av hormon-regulering hos både fisk, alligatorer og dyr på land. Det viser seg slike effekter kan forårsakes både av kjente miljøgifter og av andre stoff-grupper som har vært antatt å være uten alvorlige miljøeffekter, slik som komponenter i industrivaskemidler (alkylfenoletoksilater) og plastmyknere (ftalater). Noen av de klareste effektene i miljøet har vært forårsaket av stoffer som ligner hormonet østrogen, såkalte "østrogen-lignende" stoffer.

Denne undersøkelsen er en innledende studie av hvorvidt det er effekter av østrogen-lignende stoffer i norske kystfarvann. Dette har ikke tidligere vært undersøkt i Norge, men tilstedeværelsen av slike stoffer i det akvatiske miljø har blitt påvist i en rekke andre land, deriblant England, USA og Tyskland. I disse landene har østrogen-effekter i stor grad blitt knyttet til komponenter i avløp fra kloakkrensaneanlegg. Det er særlig stoffer som i hovedsak brukes i industrivaskemidler, såkalte alkylfenoletoksilater, og deres nedbrytningsprodukter som har vært knyttet til disse effektene, men andre fremmedstoffer gir også slike effekter.

Den best etablerte metoden til å kvantifisere østrogen-effekter er ved måling av en protein, vitellogenin (VTG), i plasma hos fisk. Dette proteinet produseres normalt i lever og skilles ut i blodet hos hunn-fisk før og under dannelsen av rogn, men vil forekomme i svært lave konsentrasjoner hos upåvirket hann-fisk eller ung-fisk. Siden produksjonen av dette proteinet reguleres av østrogen, og derfor også vil bli påvirket av østrogen-lignende stoffer i miljøet, kan høye nivåer av proteinet i hann-fisk eller ung-fisk brukes som en biomarkør for østrogen-effekter.

Innen dette prosjektet er det gjort tre delstudier: (1) injeksjonsforsøk med ulike marine fiskearter, (2) eksponering av marin fisk for utblandet avløp fra kloakkrensaneanlegg, (3) innsamling av fisk fra ulike områder langs Skagerrak-kysten og indre/ytre Oslofjord. I alle studiene ble VTG-konsentrasjon i plasma brukt som mål for østrogen-effekter.

Det er store forskjeller mellom ulike marine fiskearter når det gjelder responser på østrogen eller østrogen-lignende stoffer. Vitellogenin hos torsk og laks økte dramatisk etter injeksjon med 4-nonylfenol eller østradiol. Hos bergnebb hadde 4-nonylfenol tilsynelatende en anti-østrogen effekt på hunn-fisk, mens det ikke hadde effekter på hann-fisk.

Torsk som ble eksponert for utblandet avløp fra kloakkrensaneanlegg fikk forhøyde nivåer av VTG. Kontroll-gruppen, som mottok sjøvann fra en småbåthavn, fikk imidlertid også forhøyde VTG-nivåer i forhold til de samme fiskene ved eksponeringens start.

Torsk innsamlet fra Risør, Grenland og Vrengen hadde forhøyde nivåer av VTG sammenlignet med torsk holdt ved Marin Forskningsstasjon Solbergstrand (MFS). Det var ingen tydelige forskjeller mellom stasjonene for VTG-nivåer i bergnebb eller skrubbe. Det er imidlertid ikke mulig å knytte resultatene direkte til spesifikke stoffer eller stoff-grupper.

Resultatene fra prosjektet viser at torsk er den marine arten som egner seg best i overvåking av effekter av østrogen-lignende stoffer i miljøet. Det er østrogen-lignende stoffer tilstede i avløp fra kloakkrensaneanlegg og i norske kystfarvann. Det må imidlertid utføres mer omfattende undersøkelser før omfanget av en eventuell påvirkning kan fastslås. Videre arbeid bør også omfatte kartlegging av stoffer eller stoff-grupper som har østrogen-effekter.

1. Innledning

I 1990-årene har det utkommet et økende antall rapporter om stoffer som har en hormonforstyrrende virkning på både pattedyr, krypdyr, fugl og fisk ved at de påvirker kjønnsutvikling og andre vitale funksjoner (Colborn og Clement, 1992). Colborn et al. (1993) presenterte en liste på 46 stoffer og stoffgrupper med stor utbredelse i miljøet som er rapportert å ha skadelige effekter på reproduksjon eller hormonbalanse hos dyr. Noen av disse stoffene binder seg til intracellulære reseptorer for steroide hormoner og forstyrrer hormonsyntesen eller stimulerer nedbrytningen av hormoner. Dette kan skape permanente forandringer i den kjønnsmessige differensieringen hos den arten som påvirkes, samt skader på immunsystem, nervesystem og stoffskifte. Felles egenskaper for mange av de hormonforstyrrende stoffene er at de er persistente, lipofile og fordampes lett. Dette gjør at de kan fraktes over store avstander og spres med vind og nedbør.

En av de aktuelle stoffgruppene er alkylfenoletoksilater (APEs), som kan finnes som delkomponentet i vaske- og rengjøringsmidler, bindemidler i maling og lakk og befruktningshindrende kremer og salver. Stoffene finnes i husholdningsprodukter og brukes i jordbruk- og industri (årlig forbruk i Norge omkring 500 tonn). Etoksilatkjeden har fra en til hundre repeterende enheter, og nonylfenoletoksilater (NPEs) er den vanligste typen av APEs.

Både oktylfenol og nonylfenol har en veldokumentert østrogen effekt både *in vivo* (på levende dyr) og *in vitro* (laboratorietester med celler og vev). En undersøkelse i engelske elver (Purdom et al. 1994) viste at avløpsvann fra renseanlegg inneholdt stoffer som hadde en østrogen effekt på fisk i bur som ble plassert i resipienten. Av de aktuelle stoffene som kom i søkelyset var utskilte hormonstoffer fra prevensjonspiller (etinyl østradiol) og alkylfenoler. De engelske undersøkelsene ble satt igang fordi fiskere hadde observert hermafroditisk fisk i avløpslagunene fra renseanleggene.

Konsentrasjonen av APEs i kloakkvann kan varieres fra nanogram til milligram pr. liter (Jobling og Sumpter, 1993). Etter rensing faller konsentrasjonen i vann til 1/10 del og brytes ned til alkylfenoletoksilater med korte kjeder eller til alkylfenol. Nonylfenol og oktylfenol er de vanligste nedbrytningsproduktene. Siden stoffene er hydrofobe vil mesteparten av stoffene etter rensing bli funnet i slammet.

Vitellogenin (VTG) er et protein som syntetiseres i leveren hos hunnfisk i forbindelse med kjønnsmodning under regulering av østrogen og transporteres med blodet til gonadene der det brytes ned under dannelsen av eggeplommeprotein. Proteinet VTG vil normalt være tilstede hos hannfisk eller ungfisk i svært lave konsentrasjoner. Dersom VTG finnes hos hannfisk i større mengder tyder det på at østrogen eller østrogenliknende stoffer er tilstede. Det vil være artsavhengig hvor stor betydning en økning vil ha for at det skal føre til effekter på reproduksjonen, slik som hermafroditiske hann-fisk.

Foreliggende undersøkelse er en innledende studie av hvorvidt det er effekter av østrogen-lignende stoffer i norske kystfarvann. Engelske undersøkelser (Harries et al. 1995) viser at avløpsvann fra renseanlegg inneholder stoffer med østrogen-lignende effekter på regnbueørret, men man vet ikke med sikkerhet hvilke stoffer som er aktive. Eksperimentelle studier (White et al. 1994) har imidlertid vist at alkylfenoler som 4-oktylfenol, 4-nonylfenol, 4-nonylfenoksykarboksylsyre og 4-nonylfenoldietoksylat hver for seg var istand til å stimulere VTG produksjon i regnbueørret. Oktylfenol var det mest potente av stoffene, men allikevel 1000 ganger mindre aktivt enn naturlig østrogen.

Det beste verktøyet i dag til påvisning av APEs eller andre østrogen-lignende stoffer i miljøet er å måle effekter på fisk ved bruk av VTG som en markør. Denne metoden vil ikke gi informasjon om

hvilke stoffer det gjelder eller den absolutte konsentrasjonen av stoffene, men gi signal om at de aktuelle organismene har blitt eksponert for østrogen-lignende stoffer. I de engelske undersøkelsene ble alle VTG-forsøk utført på ferskvannsfisk. I foreliggende undersøkelse ble det besluttet å benytte de marine artene skrubbe, bergnebb og torsk. Det ble også benyttet sjøvannsadaptert laks.

De biologiske undersøkelsene ble lagt opp som tre delstudier. I utgangspunktet skulle det utføres et injeksjonsforsøk med flere ulike arter først for å kunne velge ut den/de beste artene til videre arbeid. Deretter skulle den/de aktuelle artene brukes i to andre undersøkelser: Innsamling i felt og eksponering for fortennet avløp fra kloakkrenseanlegg. På grunn av tidspress ble alle tre studiene utført samtidig, noe som medførte at flere arter ble inkludert i begge de siste studiene. Resultatene vil her bli presentert i en "naturlig" rekkefølge i forhold til den opprinnelige planen.

Den første delstudien hadde som mål å karakterisere VTG-responsen hos ulike aktuelle marine fiskearter etter injeksjon med østradiol og et alkylfenol (4-nonylfenol). Formålet med denne undersøkelsen var å finne fram til de best egnede artene til framtidige undersøkelser, fordi det var forventet at ulike arter ville reagere forskjellig. Dette forsøket ble utført på Marin Forskningsstasjon Solbergstrand (MFS). I delstudie 2 ble fisk eksponert direkte for et fortennet avløp fra kloakkrenseanlegg gjennom eksponering over tre uker, med ukentlig prøveuttak. Den tredje delstudien omfattet studier av villfisk som ble samlet inn fra områder uten kjente punktkilder av stoffer som kunne tenkes å ha østrogen-lignende aktivitet (kanskje med unntak av en lokalitet - Sandebukta). Lokalitetene kunne imidlertid inndeles i tre "forurensede" og tre "rene", vurdert ved nærhet til byer eller områder med kjent miljøgift-forurensning. Innsamlingen ble utført i forbindelse med Havforskningsinstituttets årlige tokt langs Skagerrak-kysten og indre/ytre Oslofjord.

2. Materiale og metoder

2.1. Fisk brukt i forsøk

De aktuelle marine fiskene ble skaffet til veie av fiskere - torsk og bergnebb fra ytre Oslofjord, skrubbe fra Ellingsgårdkilen (Hankø). Laks ble innkjøpt fra oppdrettsanlegg. All fisk ble holdt på MFS i minst en uke før start av forsøk. Torsken var alle 1-årige, altså ikke kjønnsmodne - torsk blir kjønnsmoden ved 2-3 års alder. Bergnebbene var alle trolig 1-årige (vurdert i forhold til størrelsen) - bergnebb gyter når de blir 2 år og dør deretter. Skrubbene var alle kjønnsmodne; siden det ikke er mulig å bestemme kjønn ved ytre kjennetegn på denne årstiden var det både hunner og hanner i karene. Laksen var alle 0-gruppe, altså ikke kjønnsmodne.

2.2. Beskrivelse av delprosjekter

2.2.1. Effekter av injisert østradiol og 4-nonylfenol

Forsøket ble gjennomført på marin forskningsstasjon, Solbergstrand (MFS). Temperaturen under forsøket var 10°C og saliniteten 34.5 psu. Grupper av hver av artene torsk, bergnebb, skrubbe og laks (hhv. 5, 8, 10 og 8 individer i hver gruppe) ble injisert intraperitonealt¹ med jordnøtt-olje (kontroll), østradiol (positiv kontroll) og 4-nonylfenol (test-substans). Østradiol og 4-nonylfenol ble innblandet i jordnøtt-olje før injeksjon (hhv 0.5 mg/kg og 200 mg/kg).

¹ intraperitonealt - i bukhulen

Alle fisk i forsøket ble merket individuelt med Panjet merkepenn og Alcian blue farge løst i 0.9% NaCl-løsning. Det ble tatt blodprøver av all fisk på dag 0 (før injeksjon), samt på dag 6, 10 og 16. Torsk og skrubbe ble prøvetatt oftere. Prøvetaking var uproblematisk for torsk og bergnebb. Det ble forsøkt med injeksjon og prøvetaking av laks uten bedøvelse, noe som førte til høy dødelighet. Forsøk med laks måtte derfor startes på nytt etter et par uker (bedøvelse med benzocain). Det var videre økende dødelighet i skrubbe-gruppene gjennom forsøket. Årsaken til dette er sannsynligvis at skrubbe er følsom for hudsår; de gjentatte prøvetakingene førte til redusert blodtilførsel til halen som igjen ga sårskader. Det er ikke usannsynlig at stress vil påvirke syntesen av VTG negativt gjennom interaksjoner mellom kortisol (stress-hormon) og østrogen's regulering av syntesen via østrogen-reseptoren.

2.2.2. Effekter av eksponering for avløp fra kloakkrenseanlegg

Det ble utført et innledende ferskvannsforsøk med regnbueørret ved Bækkelaget renseanlegg der eksponeringssystemet fungerte tilfredsstillende - det ble kun benyttet ferskvann.

Det viste seg at det ikke var mulig å utføre forsøkene på Bækkelaget med marin fisk grunnet mangel på sjøvann. På kort varsel ble forsøket derfor flyttet til Fuglevik renseanlegg, Moss.

Torsk, laks, skrubbe og bergnebb ble transportert fra MFS og overført til akvarier med sjøvann tatt inn fra 2 m dyp i en småbåthavn (kontroll) eller det samme sjøvannet innblandet 20% avløp. Det ble plassert 10 fisk av hver art i hvert akvarium. Laks tålte transporten dårlig - det ble uakseptabelt høy dødelighet allerede etter få dager. Forsøket ble derfor utført uten laks. Til tross for små størrelsesforskjeller viste det seg også at torsk spiste bergnebb i forsøket. En årsak til dette var også at bergnebb tålte salinitetsreduksjonen dårlig og derfor ble et lett bytte. Det ble imidlertid tatt prøver av overlevende bergnebb. Skrubbe og bergnebb ble analysert ved start-tidspunkt og etter en uke (fem fisk), mens torsk ble analysert ved start, etter 1, 2 og 3 uker (5-10 fisk). I dette forsøket ble ikke fisken fulgt individuelt, men det ble tatt prøver av alle fisk i hver kar til hvert tidspunkt.

2.2.3. Vitellogenin i viltfanget fisk fra Skagerrak-kysten

I forbindelse med et årlig tokt langs Skagerrak-kysten, ytre og indre Oslofjord ble det tatt blodprøver av 0-gruppe torsk (ikke kjønnsmodne), 0-årig/1-årig bergnebb (vurdert fra størrelsen) og kjønnsmoden skrubbe på 6 utvalgte områder. Bergnebb ble kjønnsbestemt ved vurdering av gonadenes størrelse og utseende (en vurdering som korresponderte bra med senere analyser av VTG), skrubbe etter gonadenes utseende og størrelse. Tre av områdene var fra områder med kjent forurensningsbelastning (Grenland - fra Herøya/Skienselva; Indre Oslofjord - generelle tilførsler; Sandebukta - fra treforedling), mens de tre andre ble antatt å være "rene" (se tabell 1). Det viste seg å være problematisk å få full dekning av de tre artene på alle stasjonene; det var lite bergnebb på stasjon 6 - Sandebukta og lite skrubbe i indre Oslofjord (stasjon 5). Fisk av hver art i kar på MFS (i vann fra 60-m dyp) ble brukt som referanse-gruppe. Bergnebb og torsk på MFS hadde gått i kar i minst 4 uker, mens skrubbe ble innsamlet en uke før prøvetaking (fra Hvaler-området). Torsken som ble innsamlet i felt var alle 0-gruppe, mens fisken på MFS var ett år gamle. Torsk blir ikke kjønnsmoden før etter 2-3 år, så begge grupper er juvenile og skal derfor ha lave verdier av VTG i plasma. Kovarians-analyser av felt-innsamlet torsk ga ikke holdepunkter for at størrelsen har betydning for vitellogenin-nivåene (som det imidlertid hadde for bergnebb, se nedenfor).

Tabell 1. Oversikt over områder der fisk ble innsamlet og antall fisk av hver art fra hvert område. Tall etter områdebetegnelse er referanse til stasjoner i Havforskningens tokt (se kart i vedlegg 1).

Område	status	antall skrubbe	antall bergnebb	antall torsk
Risør - 121, 122, 141	"ren"	19	30	20
Grenland - 191, 194, 199, 200	"forurenset"	12	39	19
Vrengen; Nøtterøy-Tjøme - 234-238	"ren"	14	30	20
Indre Oslofjord - 293, 296	"forurenset"	17	30	9
Sandebukta - 255-257*/251-154**	"forurenset"	6	-	5
Hvaler - 341-343, 347-349	"ren"	11	20	19
Solbergstrand (i nærheten av 345)	referanse	20	20	10

* torsk, ** skrubbe

2.3. Prøvetaking

Blod fra alle fiskeartene ble tatt fra kaudalvenen med en sprøyte forbehandlet med protease-inhibitoren aprotinin (50% i destillert vann) og heparin. Torsk, skrubbe og bergnebb ble prøvetatt uten bedøvelse, mens laks ble bedøvet med benzocain før prøvetaking. For å forhindre nedbrytning av VTG, ble blodet sentrifugert umiddelbart (2000 x g i 1-4 min), plasma sugd av med pasteur-pipette og frosset i flytende nitrogen.

2.4. Analyse av vitellogenin

Vitellogenin ble indusert i kjønnsmodne individer av torsk, skrubbe, bergnebb og laks ved gjentatte injeksjoner av 5 mg/kg østradiol (Silversand & Haux, 1989). Plasma fra disse ble brukt både som standard og som kompetitivt antigen i ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

Det var tilgjengelig antisera mot VTG i torsk, piggvar og steinbit (en gave fra Carl Haux, Gøteborgs Universitet, se Silversand et al. 1993). Innledningsvis ble det undersøkt hvorvidt VTG fra østradiol-behandlet torsk, skrubbe, bergnebb og laks ville kryss-reagere med de tilgjengelige antiseraene. Dette ble gjort ved elektroforetisk separasjon av plasma fra de aktuelle artene med etterfølgende overføring til en PVDF-membran og merking med hver av de tre tilgjengelige antistoffene (fortynnet 1:100 000-piggvar og steinbit, 1:200 000 - torsk). Detaljer omkring fremgangsmåten er beskrevet i Hylland et al. (1994).

2.5. Kvalitetssikring av VTG-analyser

Nedbrytning av VTG ved prøvetaking og lagring ble kontrollert med elektroforetisk separasjon. Vitellogenin fra alle de fire aktuelle artene vandret som et enkelt bånd under denaturerende betingelser (SDS-PAGE), noe som indikerer at metodene var tilfredsstillende. Alle prøver for hver art ble analysert med ELISA i tilfeldig rekkefølge (innen hver art). Det ble videre benyttet en referanse-prøve for hver art som ble inkludert på alle brett.

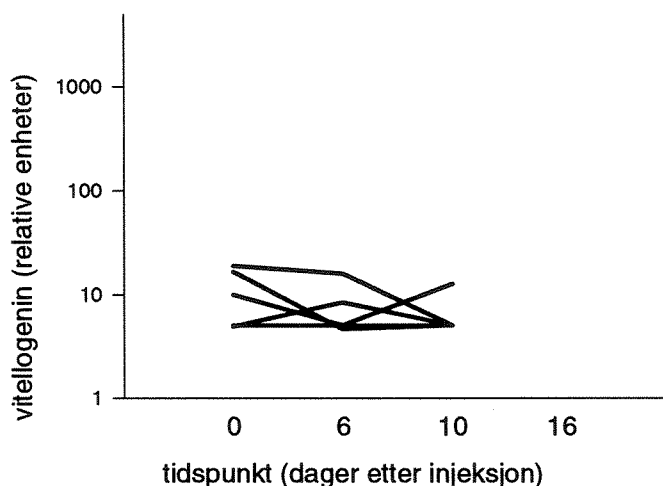
3. Resultater og diskusjon

3.1. Effekter av injisert østradiol og 4-nonylfenol

Grupper av torsk (1-årig), bergnebb (1-årig), skrubbe (kjønnsmodne) og laks (0-årig, se seksjon 2.1.) ble injisert intraperitonealt med jordnøtt-olje (kontroll), østradiol i jordnøtt-olje (positiv kontroll) eller 4-nonylfenol (test-substans). Det ble altså benyttet tre ulike grupper for hver art. Det ble tatt blodprøve umiddelbart før injeksjon, etter 6, 10 og 16 dager².

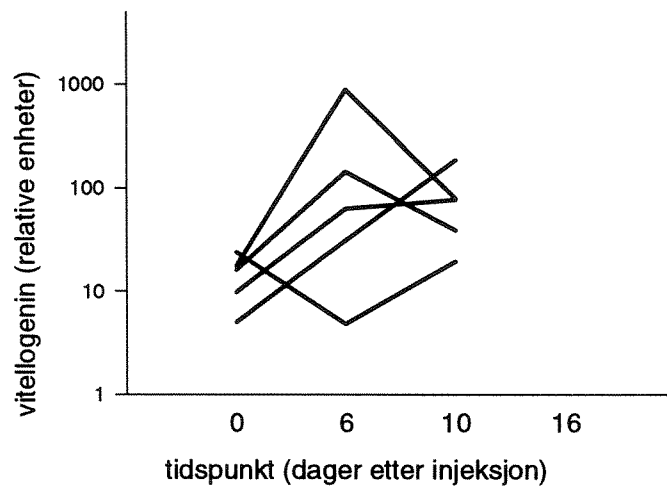
Torsk

Det var ingen forandring i VTG i plasma til torsk som ble injisert med jordnøtt-olje (figur 1). I fire av fem fisk var det en klar respons på injeksjon av 4-nonylfenol, 4-NF (figur 2). En kraftig respons ble funnet for fisk injisert med østradiol (figur 3). Hos torsk gir altså 4-nonylfenol en effekt som ligner østrogen (østradiol), men stoffet ble gitt i konsentrasjoner som var 400 x høyere enn 17 β -østradiol og ga allikevel en svakere effekt. Det er også individuelle variasjoner i responsen; en av torskene som fikk 4-NF ga ingen respons. Dette er sannsynligvis reelt -altså ikke et injeksjonsartefakt - og indikerer at det aktuelle individet ikke har hatt aktive østrogen-reseptorer. Stress er en faktor som kan hemme slike responser gjennom interaksjoner mellom kortisol (stress-hormon) og østrogen-reseptoren. Både etter injeksjon med 4-NF og østradiol synes det som om responsen er rask, og den avtar igjen etter 10 dager. I miljøet vil det altså kreves en kontinuerlig eller pulsvis belastning for at nivåene skal være forhøyde.

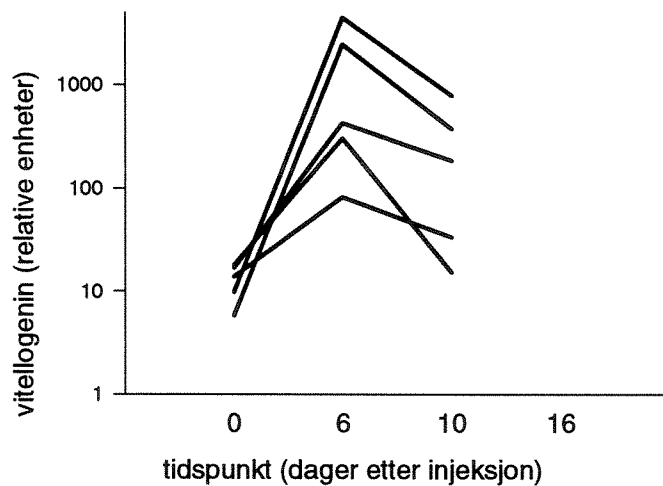


Figur 1. Vitellogenin i plasma til 1-årig torsk (dag 0, 6, 10) injisert med jordnøtt-olje. Hver av linjene er en fisk. Merk log-akse.

² det er også tatt prøver på andre tidspunkter, men det har ikke vært innenfor de økonomiske rammene til prosjektet å gjennomføre analysene.



Figur 2. Vitellogenin i plasma til 1-årig torsk (dag 0, 6, 10) injisert med 4-nonylfenol i jordnøtt-olje (200 mg/kg). Hver av linjene er en fisk. Merk log-akse.



Figur 3. Vitellogenin i plasma til 1-årig torsk (dag 0, 6, 10) injisert med østradiol i jordnøtt-olje (0,5 mg/kg). Hver av linjene er en fisk. Merk log-akse.

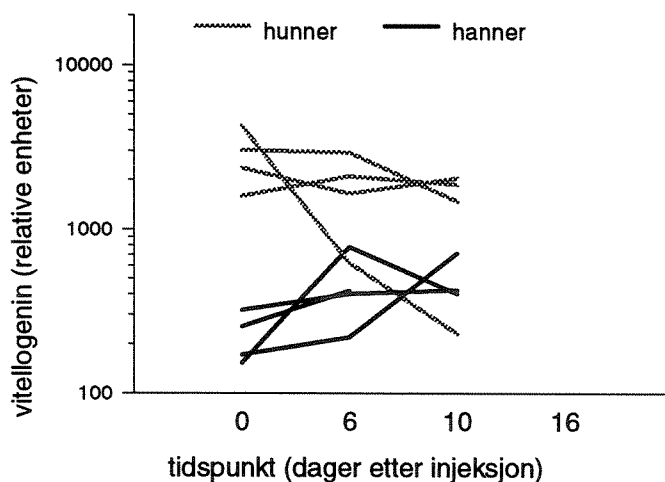
Bergnebb

Som nevnt ovenfor avvek responsene i bergnebb tildels kraftig fra de som ble funnet i torsk. Til tross for at det ikke var ytre kjennetegn som tilsa det, ble det klart fra utseende på gonader (ved avslutning av forskøket) og VTG-nivåene at omkring halvparten av fiskene var hunner, den andre halvparten hanner. Hunnene hadde omtrent 10 x høyere VTG-verdier enn hannene ved injeksjon (figur 4, 5, 6). En av hunnene som ble injisert med jordnøtt-olje fikk sterkt fallende VTG-verdier (figur 4), resten var uforandret. Det var en tendens til svak stigning i VTG hos bergnebb-hannene i kontroll-gruppa gjennom forsøksperioden.

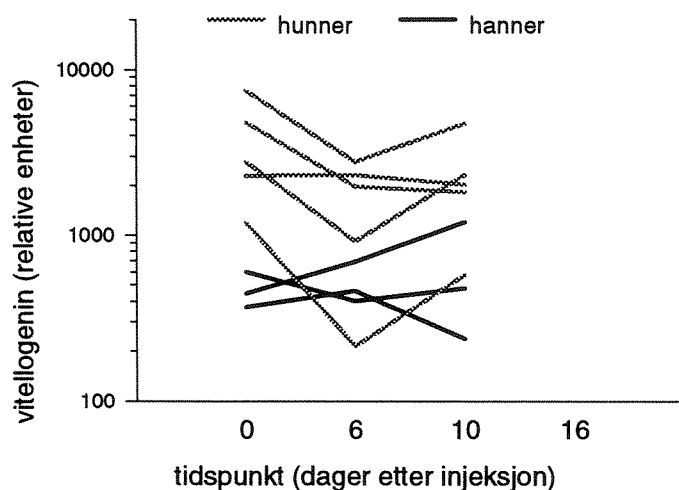
Hos bergnebb-hunner var det en klar respons på injeksjon med 4-nonylfenol - motsatt av hva som kanskje ville ha vært forventet; plasma VTG sank hos alle hunnene untatt en etter 6 dager, men verdiene steg igjen etter 10 dager (figur 5). Det var ingen respons hos hannene på nonylfenol-injeksjon, noe som er forventet hvis 4-NF er et anti-østrogen for denne arten.

Østradiol hadde ingen åpenbar effekt på hun-bergnebb og påvirket bare to av fem bergnebb-hanner (figur 6). Det er tydelig at bergnebb har en annen regulering av VTG enn de andre fiskene i forsøket. Årsaken til at bergnebb ble inkludert i studiet var at det er leppefisk som kan skifte kjønn i løpet av livet - de er først hunner og så blir de hanner. Det kunne derfor tenkes at leppefisk var særlig følsomme (eller ufølsomme) for belastning med østrogen-lignende stoffer. Betydningen av størrelse vil bli diskutert mer omfattende nedenfor (seksjon 3.3), men det som synes klart er at alle bergnebb, både de som skal bli hunner og de som skal bli hanner, har relativt høye konsentrasjoner av VTG i plasma fra de er små.

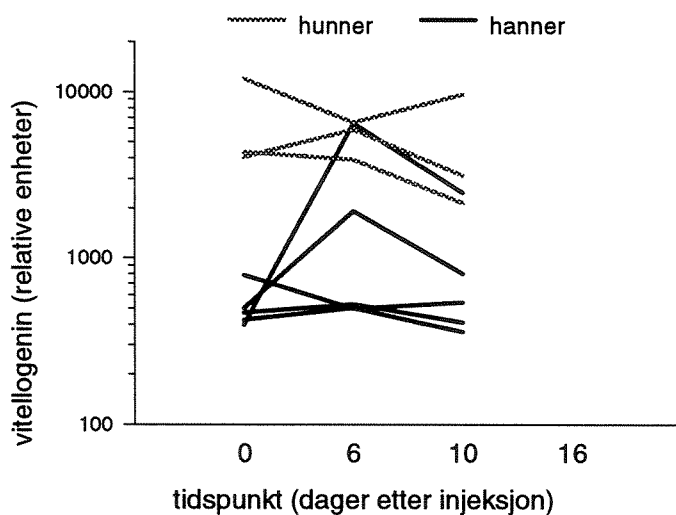
Dette forsøket ble utført med 1-årige bergnebb og på dette tidspunkt har hunnene vesentlig høyere verdier enn hannene. Det er imidlertid påfallende at hannene har såpass høye verdier. Resultatene kan tyde på at 4-NF er et anti-østrogen for bergnebb istedenfor et østrogen.



Figur 4. Vitellogenin i plasma til bergnebb (dag 0, 6, 10) injisert med jordnøtt-olje. Hver av linjene er en fisk. Merk log-akse. Fisk som starter på VTG-verdier over 1000 kalles hunner, de under, hanner.



Figur 5. Vitellogenin i plasma til bergnebb (dag 0, 6, 10) injisert med 4-nonylfenol i jordnøtt-olje (200 mg/kg). Hver av linjene er en fisk. Merk log-akse. Fisk som starter på VTG-verdier over 1000 kalles hunner, de under, hanner.

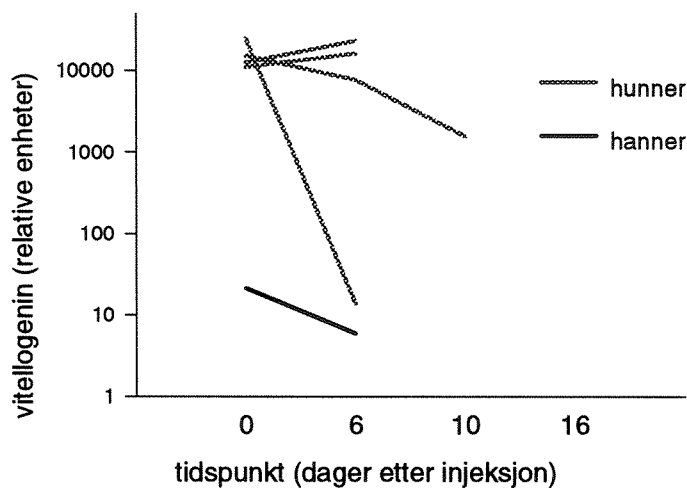


Figur 6. Vitellogenin i plasma til bergnebb (dag 0, 6, 10) injisert med østradiol i jordnøtt-olje (0,5 mg/kg). Hver av linjene er en fisk. Merk log-akse. Fisk som starter på VTG-verdier over 1000 kalles hunner, de under, hanner.

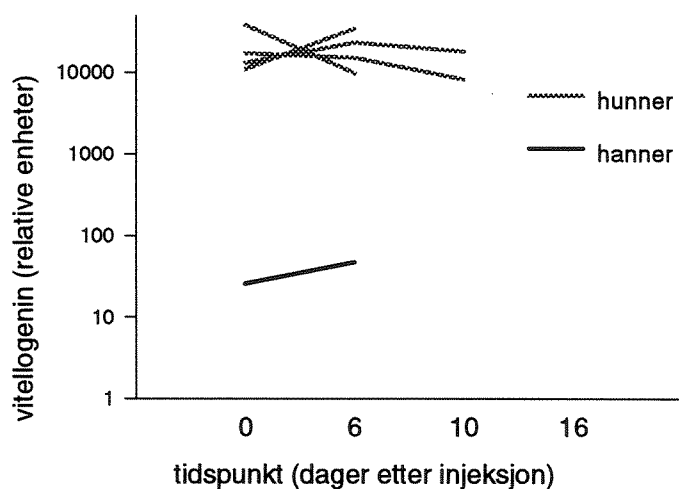
Skrubbe

Det var flere hunner enn hanner som klarte seg i alle gruppene, men det var ingen åpenbare effekter på noen av kjønnene ved noen av behandlingene. Det er imidlertid ikke mulig å trekke konklusjoner fra dette arbeidet siden bare en hann overlevde i hver behandling og at fisken åpenbart var like ved å dø (figurer 7, 8, 9). Som for bergnebb, ble det klart fra VTG-verdiene hvilke skrubber som var hunner og hvilke som var hanner. Årsaken til den høye dødeligheten er trolig at skrubba tålte den gjentatte prøvetakingen dårlig og at ble holdt under samme betingelser som de andre fiskene, ved

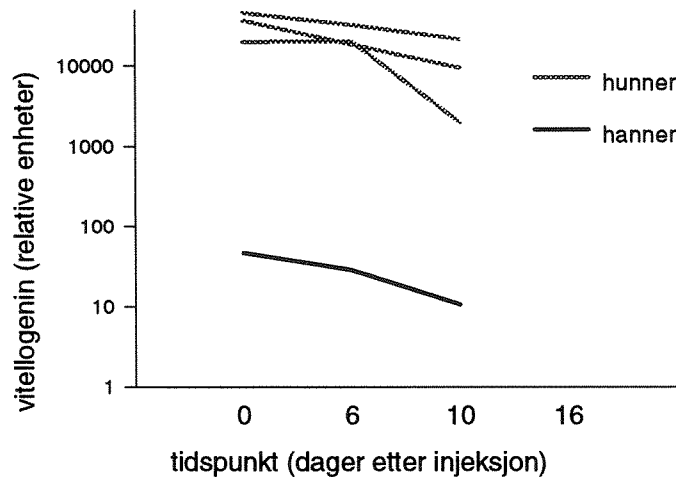
saltholdighet 35 psu, noe som er høyere enn optimalt for denne arten. Skrubbe er en art som er svært følsom for hudsår. Gjentatt prøvetaking førte til høy dødelighet, noe som vanskeliggjør tolkning av resultatene. En vil imidlertid ikke forvente at behandling med østrogen eller østrogen-lignende stoffer skal ha innflytelse på VTG-nivåene hos kjønnsmodne hunner. En enkelt hann, som var det som overlevde i hver behandling, er for lite til å kunne trekke konklusjoner om eventuelle effekter av behandlingen.



Figur 7. Vitellogenin i plasma (dag 0, 6, 10) til skrubbe injisert med jordnøtt-olje. Hver av linjene er en fisk. Merk log-akse. De øverste linjene er hunner, den nederste hann.



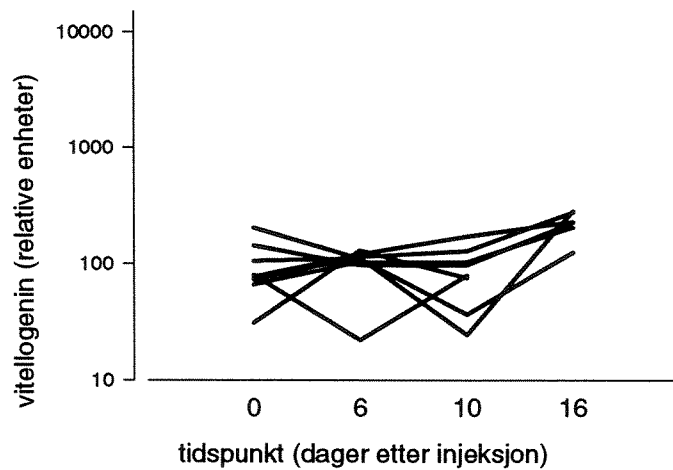
Figur 8. Vitellogenin i plasma (dag 0, 6, 10) til skrubbe injisert med 4-nonylfenol i jordnøtt-olje (200 mg/kg). Hver av linjene er en fisk. Merk log-akse. De øverste linjene er hunner, den nederste hann.



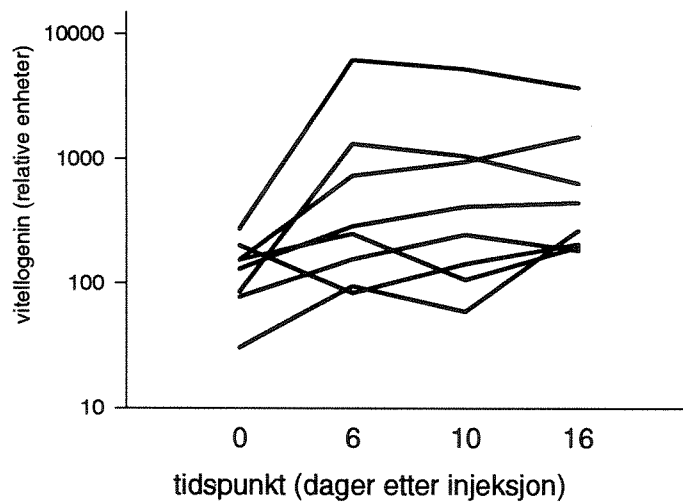
Figur 9. Vitellogenin i plasma (dag 0, 6, 10) til skrubbe injisert med østradiol i jordnøtt-olje (0,5 mg/kg). Hver av linjene er en fisk. Merk log-akse. De øverste linjene er hunner, den nederste hann.

Laks

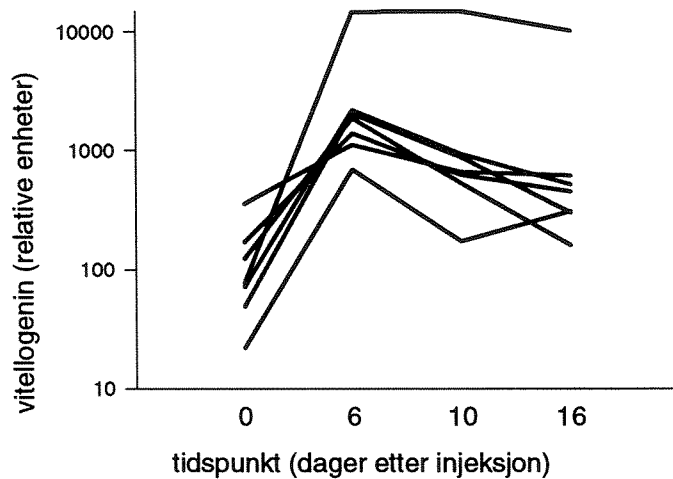
Responseren i laks var like klar som den for torsk; i kontroll-gruppen var det ingen forandringer i VTG-nivået i plasma (figur 10). For 7 av 8 fisk i gruppa som ble injisert med nonylfenol førte dette til en økning i VTG-innholdet i plasma etter 6 dager (figur 11). For de fleste individene holdt VTG-nivået seg høyt til etter dag 16 - i motsetning til torsk der verdiene begynte å synke ved dag 10. Responseren var like klar i gruppa som ble injisert med østradiol - det var en klar økning i VTG-innholdet i alle individene som var høyest på dag 6 men holdt seg ut forbi dag 16 (figur 12). Den relative økningen i VTG var av omtrent samme størrelsesorden i laks som i torsk ved begge behandlingene - 10-100 x økning. Til sammenligning kan nevnes at den relative økningen i VTG hos belastet regnbueørret i engelske studier har ligget så høyt som 100 000 x økning i forhold til verdiene i samme fisk før belastningen. I de engelske studiene blir imidlertid fisken eksponert kontinuerlig via vannet (3 uker), mens det her er snakk om en enkelt dose. Den store forskjellen kan også i noen grad være knyttet til ulike analysemetoder og ulike antisera, men andre resultater (se seksjon 3.2) tyder på at så ikke er tilfelle.



Figur 10. Vitellogenin i plasma (dag 0, 6, 10, 16) til laks injisert med jordnøtt-olje. Hver av linjene er en fisk. Merk log-akse.



Figur 11. Vitellogenin i plasma (dag 0, 6, 10, 16) til laks injisert med 4-nonylfenol i jordnøtt-olje (200 mg/kg). Hver av linjene er en fisk. Merk log-akse.



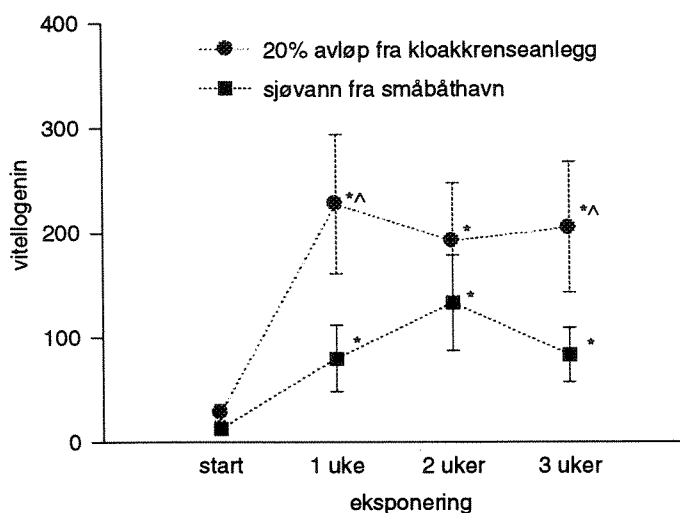
Figur 12. Vitellogenin i plasma (dag 0, 6, 10, 16) til laks injisert med østradiol i jordnøtt-olje (0,5 mg/kg). Hver av linjene er en fisk. Merk log-akse.

Resultatene fra injeksjonsforsøket viste klart at det er store forskjeller i responser mellom ulike arter. Torsk og laks ga respons som forventet, lik det som har vært funnet hos andre arter (regnbueørret), med økt VTG i plasma etter eksponering for 4-NF eller østradiol. Det var for få overlevende hannskrubbe til å kunne trekke konklusjoner, men det var overraskende lite respons i den ene fisken i hver av gruppene. Bergnebb hadde en annen respons enn de andre artene. 4-nonylfenol hadde tilsynelatende effekt som et anti-østrogen for hunnene, men ingen effekt på hanner. Østradiol påvirket også bare et mindretall av hannene.

3.2. Effekter av eksponering for avløp fra kloakkrensplanlegg

Det ble analysert fisk av hver art (torsk, bergnebb, skrubbe) fra et kontroll-kar (rent sjøvann) og et eksponerings-kar (20% avløp) ved start (etter utplassering i karene) og etter en ukes eksponering. I tillegg ble det analysert torsk etter to og tre ukers eksponering, siden denne arten syntes å gi klareste resultater. Torsk som ble eksponert for 20% avløp hadde forhøyd vitellogenin-nivå i plasma, både i forhold til samme fisk før eksponering og kontroll-gruppen (figur 13). Vitellogenin-nivået økte ikke videre etter en ukes eksponering, men holdt seg på samme nivå. Gruppen som ble eksponert for 20% avløp hadde signifikant høyere nivåer enn kontroll-gruppen, men vitellogenin økte også signifikant i kontroll-gruppen i forhold til start-verdier. Det er usannsynlig at dette skyldes stress siden slike responser ikke har blitt observert under forsøk på MFS. Økningen av VTG i torsk er av samme størrelsesorden som den som ble observert ved injeksjoner av 4-NF.

Inntaksvannet for Fuglevik tas fra 2 m dyp i båthavna ved Fuglevik. Dette er ikke i nærheten av kjente utslipp av noen art - avløpet fra rensplanlegget ligger på 50 m dyp 600 m fra land - men responsene tyder på at østrogen-lignende stoffer er tilstede også i sjøvannstilførselen. Resultatene tyder på at småbåt-havner, marinaer eller lignende kan være kilder til stoffer med østrogen-lignende effekter uten at det er mulig å si hvilke stoffer som er aktive.



Figur 13. Vitellogenin i plasma til 1-årig torsk eksponert for sjøvann og sjøvann innblandet 20%avløp fra Fuglevik kloakk-renseanlegg, Moss. Gjennomsnitt ± standard feil (n=5). * signifikant forskjellig fra start, ^ signifikant forskjellig fra sjøvannsgruppen (p<0.05).

Resultatene var mindre klare for bergnebb og skrubbe. Som nevnt ovenfor ble bergnebb spist av torsk i noen av akvariene og det var tegn til at de ikke tålte den reduksjonen i salinitet som innblanding av avløp medførte. Det var ingen åpenbare effekter av behandlingen, noe som også i noen grad kan skyldes stress tilknyttet problemer med osmoregulering (tabell 2). Materialet for skrubbe var tynt - hovedsakelig på grunn at for mange hunner ble tatt ut til analyse (det er ikke mulig å skille kjønnene ved ytre kjennetegn på denne tiden av året).

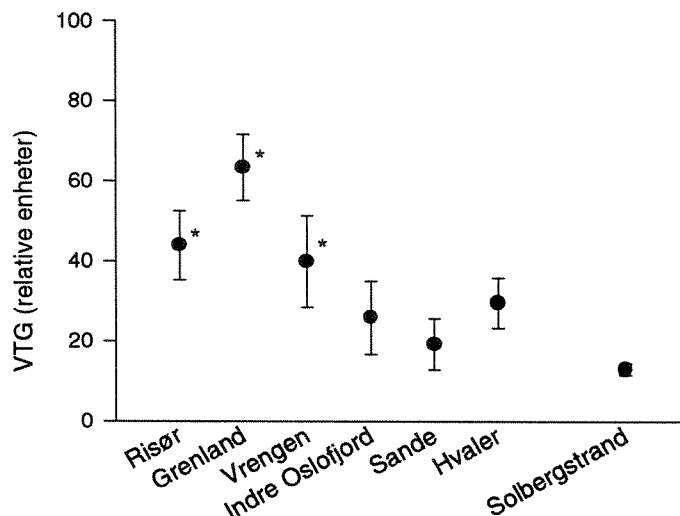
Tabell 2. Vitellogenin (VTG) i blod fra fisk eksponert for sjøvann eller 20% avløp innblandet med sjøvann. Verdier som min-maks (antall).

Art	kjønn	sjøvann		20% avløp	
		VTG - start	VTG - en uke	VTG - start	VTG - en uke
bergnebb	hunn	2500 (1)	1200-1730 (3)	728-997 (3)	1455 (1)
	hann	169-253 (3)	56 (1)	148-225 (4)	102-231 (3)
skrubbe	hunn	9620 (1)	2520-6140 (4)	1840-9700 (3)	3320-3980 (3)
	hann	21-386 (4)	22 (1)	94-299 (2)	607-1017 (2)

3.3. VTG i viltfanget fisk fra Skagerrak-kysten

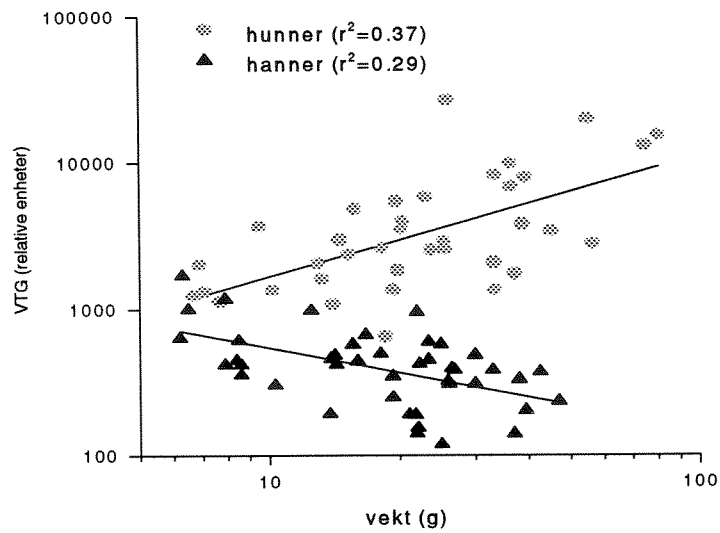
0-gruppe torsk, adult skrubbe og 1-årig bergnebb ble innsamlet på 6 stasjoner langs Skagerrak-kysten, i indre og ytre Oslofjord. Verdiene i villfisk ble sammenholdt med verdier for fisk holdt på MFS (torsk og skrubbe). Torsk innsamlet ved Risør, i Grenlandsområdet og i Vrengen (Nøtterøy/Tjøme) hadde høyere nivåer av VTG enn de andre gruppene og signifikant høyere VTG enn fisken som hadde blitt holdt på MFS (figur 14). VTG-nivåene i gruppene med høyest verdier var imidlertid lavere enn gruppen som ble eksponert for 20% avløp fra kloakkrenseanlegg. Den mest sannsynlige årsaken er at de viltfangede fiskene har blitt eksponert for lavere konsentrasjoner av

"østrogen-lignende" stoffer enn fisk holdt i 20% avløp. Det er ingen åpenbare forklaringer på hvorfor fisk fra Risør og Vrengen har høyere verdier enn kontroll-gruppen. Det ville ha vært forventet at fisk fra Sandebukta skulle ha forhøyde verdier grunnet utslipp fra papirmasse-industri og muligens Grenland/Indre Oslofjord med utgangspunkt i den generelle forurensningssituasjonen.



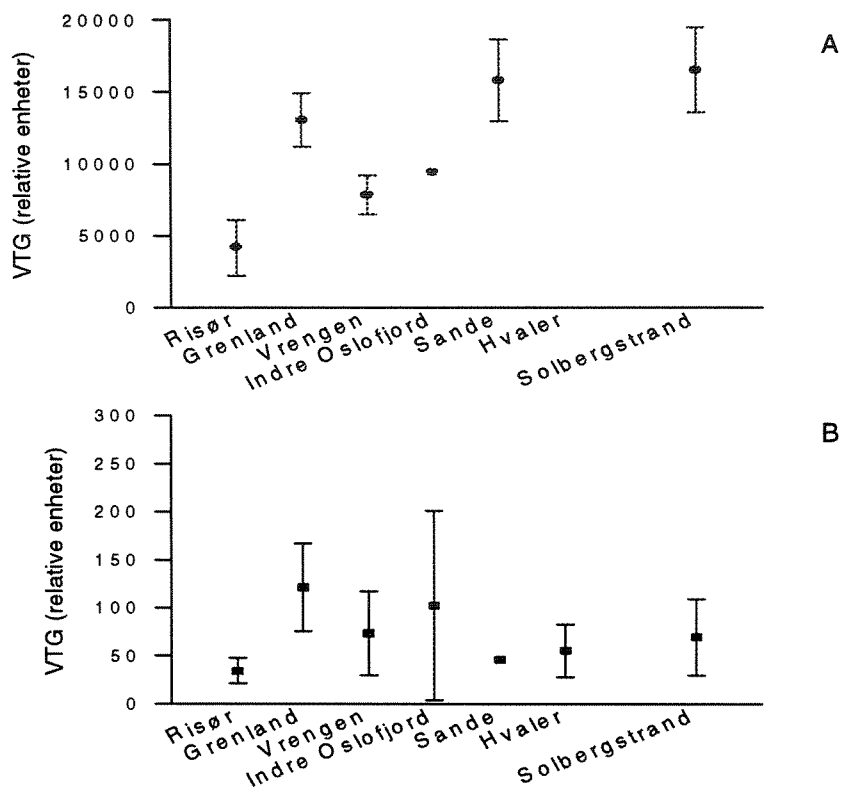
Figur 14. Vitellogenin i plasma til torsk innsamlet i 6 ulike områder langs Skagerrak-kysten, indre og ytre Oslofjord, samt torsk holdt på Marin Forskningsstasjon, Solbergstrand. Gjennomsnitt ± standardfeil (n=5-18). * signifikant forskjellig fra fisk på Solbergstrand ($p < 0.05$, Dunnett's test; ANOVA på log-transformerte verdier $p < 0.0001$).

Skrubbe og bergnebb ble også innsamlet; begge disse gruppene inneholdt både hunner og hanner. Kovariansanalyse av VTG med stasjon, vekt og kjønn som faktorer viste at størrelsen på bergnebb hadde betydning for mengden VTG tilstede i plasma (figur 15). I denne analysen bidro stasjon lite til å forklare variabiliteten i VTG - det var altså bare små forskjeller mellom stasjonene når det var tatt hensyn til størrelsesforskjell mellom fisk innsamlet på de ulike stasjonene. Bergnebb avvek på denne måten klart fra de andre artene, noe som også ble klart i injeksjonsforsøkene (se seksjon 3.4). Forskjeller i VTG-nivå hos bergnebb var altså tilsynelatende ikke påvirket av hvilken stasjon fisken var innsamlet på, men av kjønn og størrelse.



Figur 15. Vitellogenin i plasma til bergnebb i forhold til vekt. Fisken ble kjønnsbestemt i forbindelse med innsamling. Merk log-akser.

Det var bare små forskjeller i VTG-nivåene i skrubbe innsamlet på ulike steder, men mønsteret for hanner lignet det som ble observert for torsk - høyest verdier for fisk innsamlet i Grenlandsområdet (figur 16). Forskjeller i hunn-fisk er trolig knyttet til ulike gyte-tidspunkter for de ulike populasjonene og ikke påvirkning av østrogen-lignende stoffer. Referanse-gruppen (merket Solbergstrand) ble her holdt bare i noen få dager før prøvetaking - denne fisken hadde blitt innsamlet i Ellingsgårdkilen, innenfor Hankø.



Figur 16. Vitellogenin i plasma til skrubbe innsamlet i ulike områder langs Skagerrak-kysten, indre og ytre Oslofjord. Gjennomsnitt \pm standardfeil. A. Hunner (●) og B. hanner (■). Merk ulike akser for de to kjønnene. VTG i hunner fra Risør var signifikant forskjellig fra hunner på Solbergstrand (ANOVA, $p < 0.05$ etterfulgt av Dunnett's test); ingen av han-gruppene var forskjellige.

4. Konklusjoner

4.1. Effekter av injisert østradiol og 4-nonylfenol

- Plasma VTG i juvenil laks og torsk økte markant (10 - 100 x) ved injeksjon med 4-nonylfenol (200 mg/kg).
- VTG-nivået i nonylfenol- og østradiol-injisert fisk sank ved dag 10 i torsk, mens det holdt seg høyt forbi dag 16 i laks.
- Plasma vitellogenin i hun-fisk av bergnebb minket ved injeksjon med 4-nonylfenol, mens vitellogenin i han-fisk var uforandret.
- Skrubbe som ble brukt i injeksjonsforsøkene var trolig i en stress-situasjon grunnet stor følsomhet for gjentatt blodprøvetaking; det var ingen klare responser på noen av behandlingene.
- Torsk og laks er egnede arter til videre studier av effektene av østrogen-lignende stoffer i miljøet, men det bør brukes juvenile (0- eller 1-åringer); resultatene i den foreliggende undersøkelsen gir ikke klare svar om skrubbe's egnethet, men bergnebb er uegnet med dagens kunnskapsnivå om denne artens reproduksjonsbiologi.

4.2. Effekter av eksponering for avløp fra kloakkrensplanlegg

- En ukes eksponering for avløpet fra Fuglevik rensplanlegg i Moss førte til en økning i plasma vitellogenin hos juvenil torsk, noe som indikerer at det er stoffer tilstede i avløpet som enten er østrogen-lignende eller anti-androgener. VTG-verdiene forble imidlertid på samme nivå både etter to og tre uker.
- Både etter en, to og tre uker var VTG-verdiene i torsk eksponert for "rent" sjøvann høyere enn ved start noe som peker i retning av tilstedeværelsen av stoffer med østrogen-lignende effekter i båtthavna der inntaket er.
- Eksponeringssystemet fungerte ikke tilfredsstillende for bergnebb, skrubbe og laks - resultater for disse artene er derfor ikke egnede til å trekke konklusjoner fra.
- Det er stoffer tilstede i avløp fra kloakkrensplanlegg som gir østrogen-lignende effekter; resultatene i den foreliggende undersøkelsen tyder også på at det er slike stoffer tilstede i sjøvann i tilknytning til båtthavner.
- Torsk egner seg til eksponeringsforsøk med innblandet avløp; laks og bergnebb egner seg ikke, men status er uavklart for skrubbe (en bør eventuelt bruke 0- eller 1-årig skrubbe).

4.3. VTG i villfanget fisk fra Skagerrak-kysten

- Det var høyere vitellogenin-nivåer i plasma fra all villfanget torsk i forhold til torsk holdt på MFS og det høyeste gjennomsnittet ble funnet for fisk i Grenlandsområdet. VTG var signifikant høyere i fisk fra Risør, Grenland og Vrengen sammenlignet med fisk holdt på MFS.
- Variasjoner i plasma vitellogenin i villfanget bergnebb kunne forklares ved kjønns- og størrelsesforskjeller; det var ingen forskjeller mellom stasjoner når disse forskjellene var tatt hensyn til.
- Det var ingen vesentlige forskjeller i plasma vitellogenin mellom ulike populasjoner av villfanget skrubbe, hverken han-fisk eller hun-fisk.
- Torsk (og sannsynligvis andre torskefisk) er egnet til overvåking av østrogen-lignende stoffer i det marine miljø.
- Det er ikke mulig å peke på spesifikke stoffer eller stoff-grupper som årsak til de observerte effektene.

4.4. Samlet vurdering av forsøkene

Denne undersøkelsen er den første undersøkelsen av hormonforstyrrende stoffer i norsk miljø. Resultatene er interessante og bør følges opp av mer detaljerte studier. Det viste seg å være større artsforskjeller mellom ulike marine fisk enn det som har vært observert for ferskvannarter. Økningen som ble sett hos både torsk og laks ved injeksjonsforsøkene (10-2000 x) er mindre enn den som har vært sett i regnbueørret eksponert for avløp fra kloakkrenseanlegg (inntil 100 000 x - Harries et al. 1995). Det er imidlertid usikkert om dette er et resultat av ulike analysemetoder, artsforskjeller eller ulik belastningssituasjon. I felt-innsamlet torsk var VTG i den høyeste gruppen omkring 6 x forhøyd, mens det var en 20 x økning i torsk eksponert for avløp fra et kloakkrenseanlegg og henholdsvis 15 x og 150 x økning i torsk injisert med 4-nonylfenol eller østradiol. Det er store individuelle forskjeller i responser, noe som må tas hensyn til i planlegging av fremtidige studier; i hver gruppe bør det være minst 20 fisk for å kunne identifisere en dobling av plasma VTG.

5. Anbefalinger

- Avløp fra flere kloakkrenseanlegg bør testes for tilstedeværelsen av østrogen-lignende stoffer;
- Lokale og regionale kilder til stoffer med østrogen-lignende effekter bør identifiseres, f.eks. med burforsøk;
- Det bør gjennomføres overvåking av utvalgte ferskvann mhp østrogen-lignende effekter;
- Feltdata med villfanget fisk tyder på at deler av kystområdene kan være forurensset av østrogen-lignende stoffer, men undersøkelsene forteller ikke hvilke stoffer som er aktive. Det bør gjøres en innsats for å søke å identifisere de aktuelle stoffene eller stoff-gruppene.
- Mulige østrogen-lignende stoffer bør uttestes ved eksponeringsforsøk med fisk. I slike forsøk bør en evaluere eksponering både via vann og via injeksjoner.

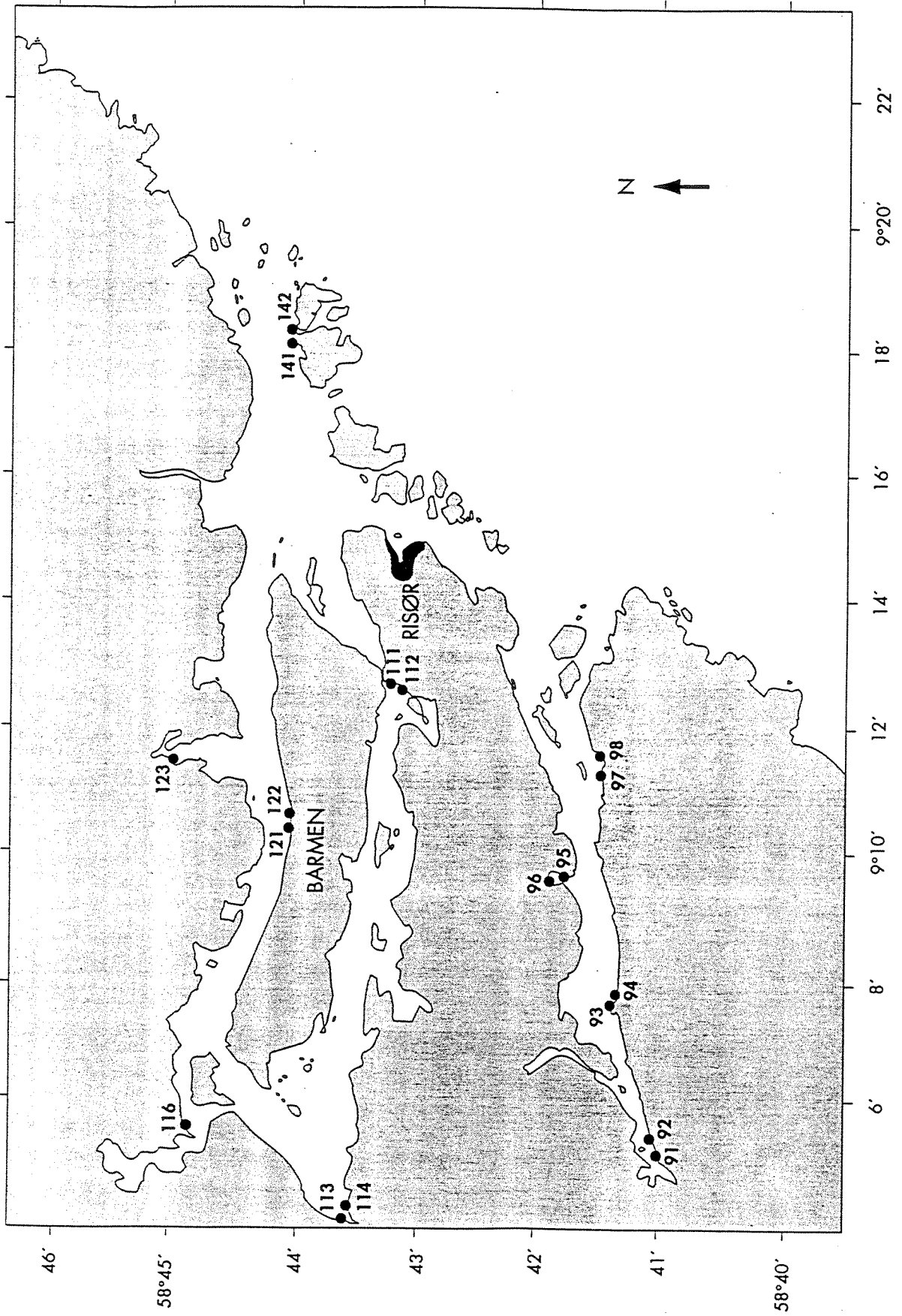
6. Referanser

- Colborn, T., Clement, C. (1992) Chemically-induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection. Princeton, N.J., Princeton Scientific, 403 s.
- Colborn, T., Vom Saal, F.S., Soto, A.M. (1993) Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Hlth. Perspect.*, 103, 378-384.
- Harries, J.E., Jobling, S., Matthiessen, P., Sheahan, D.A., Sumpter, J.P. (1995) Effects of trace organics on fish - phase 2. FWR, FR/D 0022, 85 s.
- Hylland, K., Haux, C., Hogstrand, C., Sletten, K., Andersen, R.A. (1994) Properties of cod metallothionein, its presence in different tissues and effects of Cd and Zn treatment. *Fish Physiol. Biochem.*, 13, 81-91.
- Jobling, S. and J.P. Sumpter (1993) Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes, *Aquat. Toxicol.*, 27, 361-372.
- Purdom, C.E., Hardiman, P.A., Bye, V.J., Eno, N.C., Tyler, C.R., Sumpter, J.P. (1994) Estrogenic effects of effluents from sewage works., *Chem. Ecol.*, 8, 275-285.
- Silversand, C., Haux, C. (1989). Isolation of turbot (*Scophthalmus maximus*) vitellogenin by high-performance anion-exchange chromatography. *J. Chromatogr.* 478, 387-397.
- Silversand, C., Hyllner, S. J., Haux, C. (1993). Isolation, immunochemical detection, and observations of the instability of vitellogenin from four teleosts. *J. exp. Zool.*, 167, 587-597.
- Specker, J.L., Anderson, T.R. (1994) Developing an ELISA for a model protein - vitellogenin. I: Biochemistry and molecular biology of fishes, vol 3. Hochachka, P.W., Mommsen, T.P. (red), s. 567-578.
- White, R., Jobling, S., Hoare, S.A., Sumpter, J.P., Parker, M.G. (1994) Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic., *Endocrinol.*, 135, 175-182.

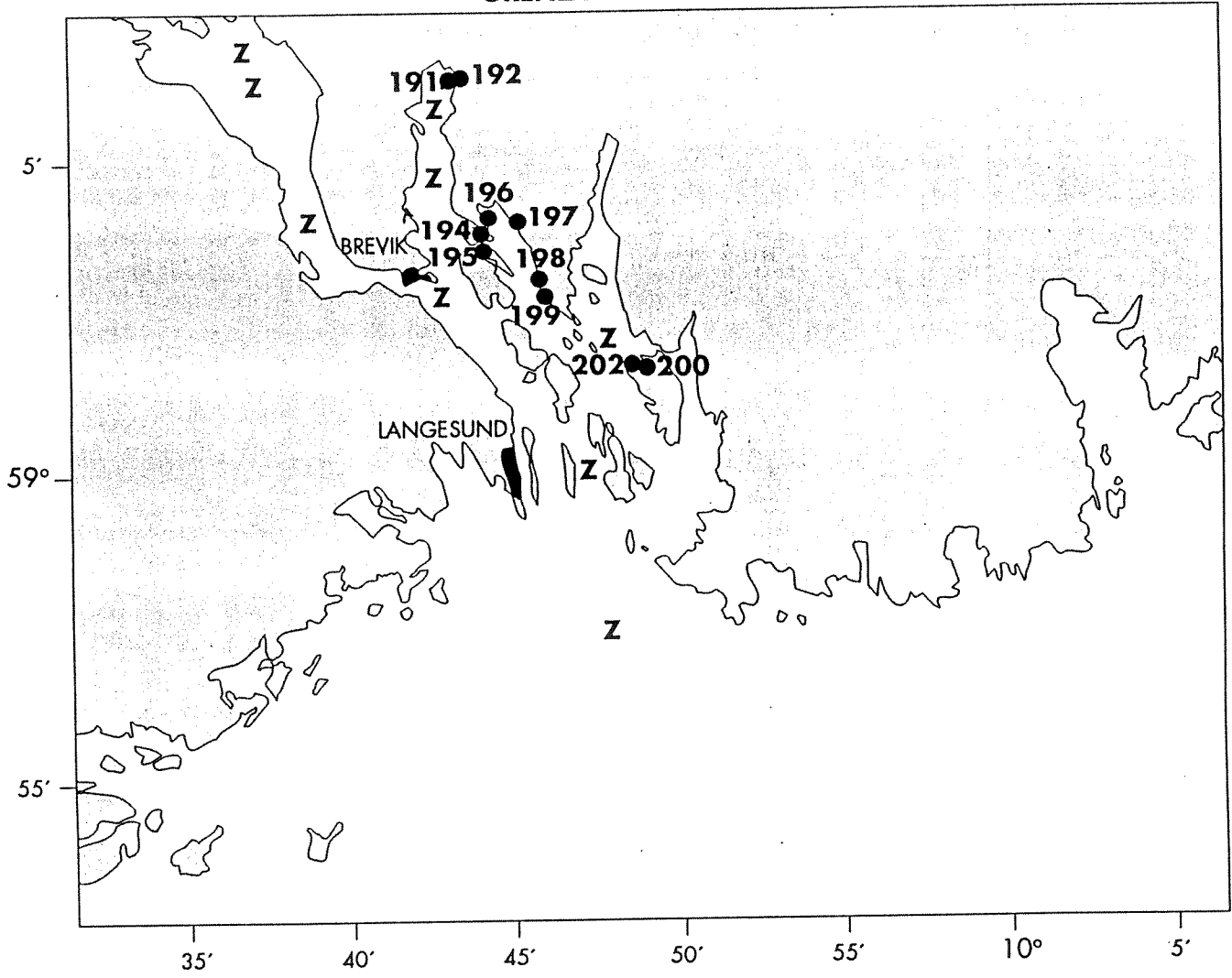
VEDLEGG 1: Oversikt innsamlingsområder

(kartene er fra Havforskningsinstituttet, Flødevigen)

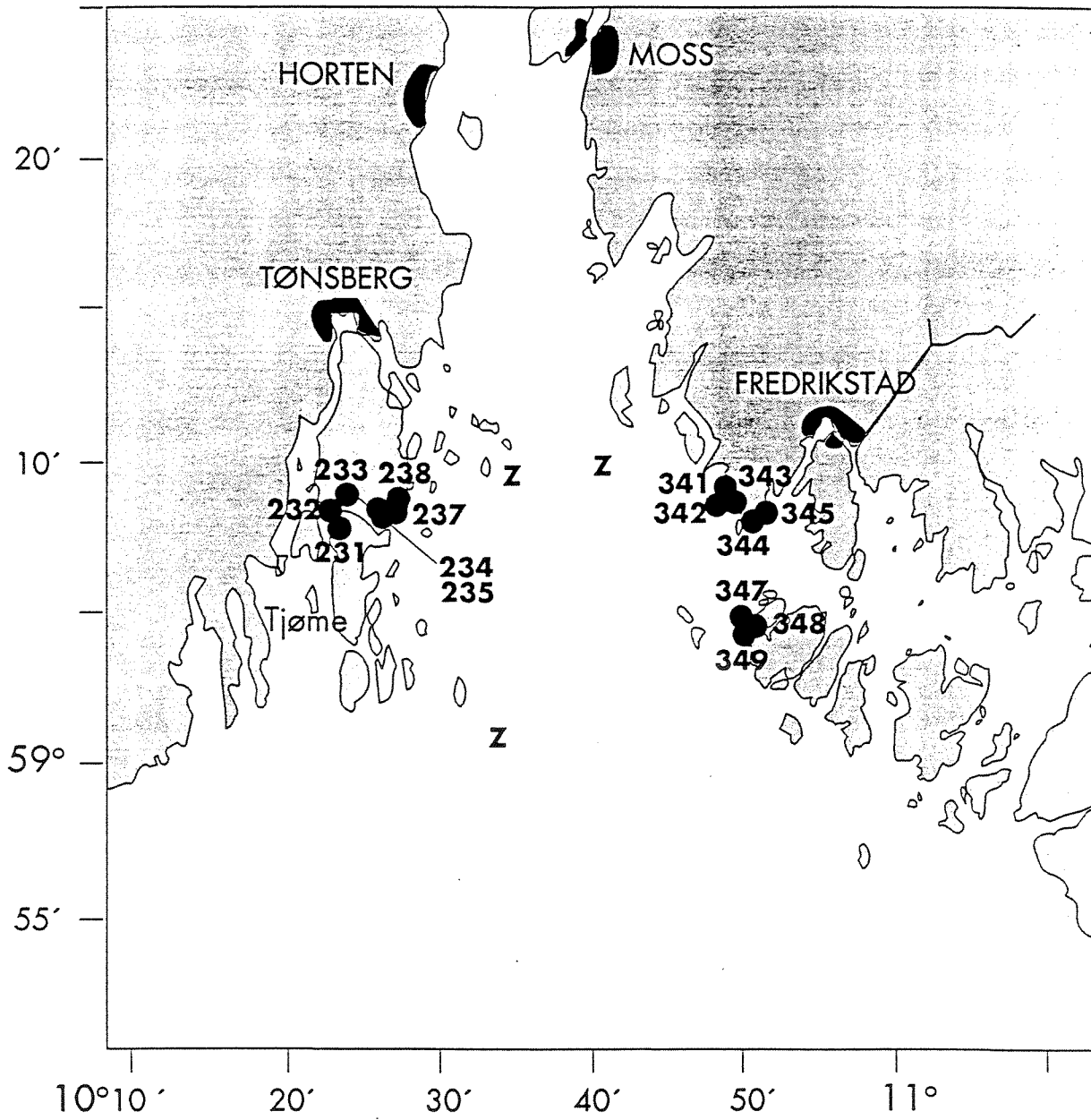
RISØRFJORDENE



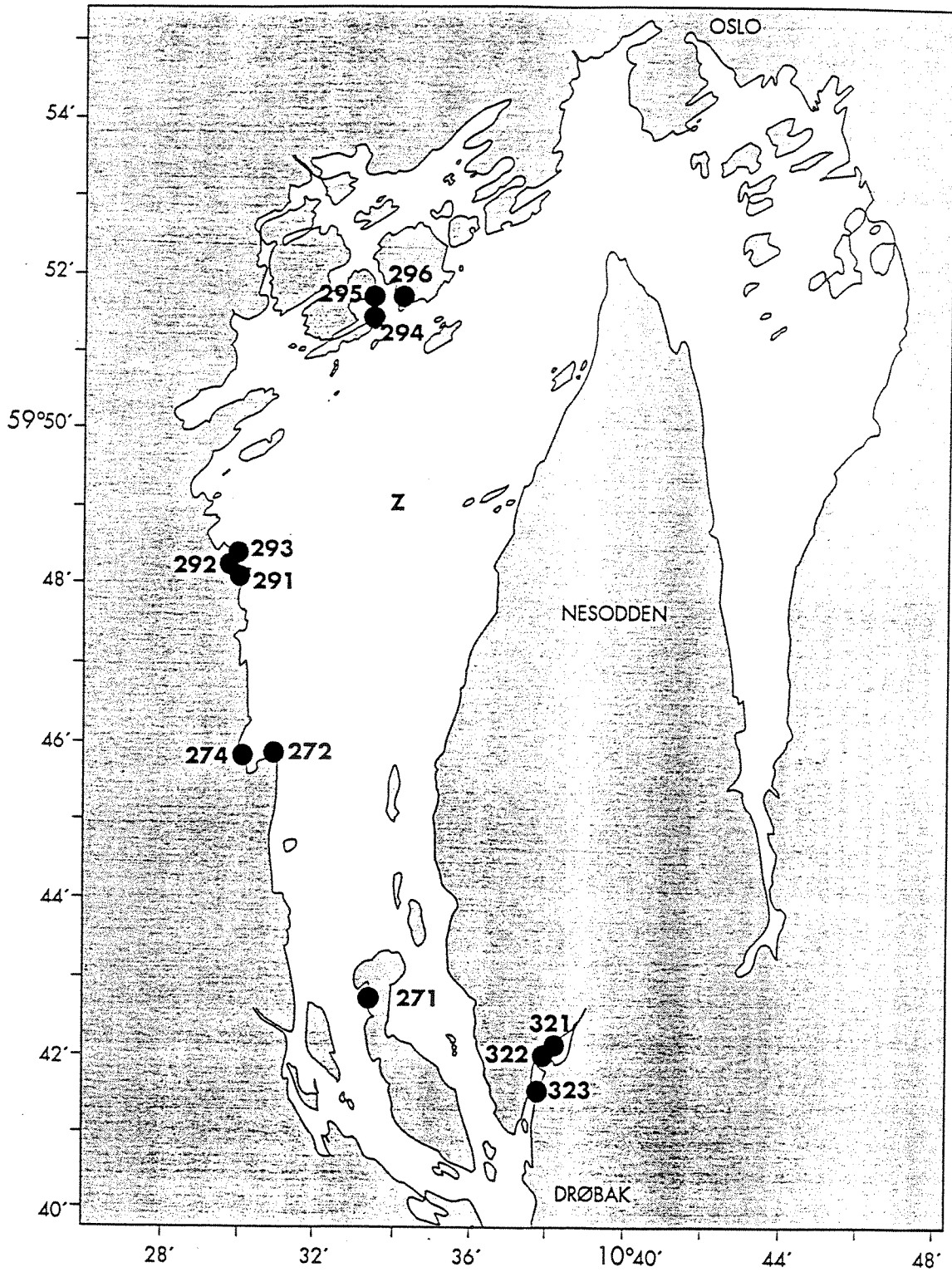
GRENLANDSFJORDENE



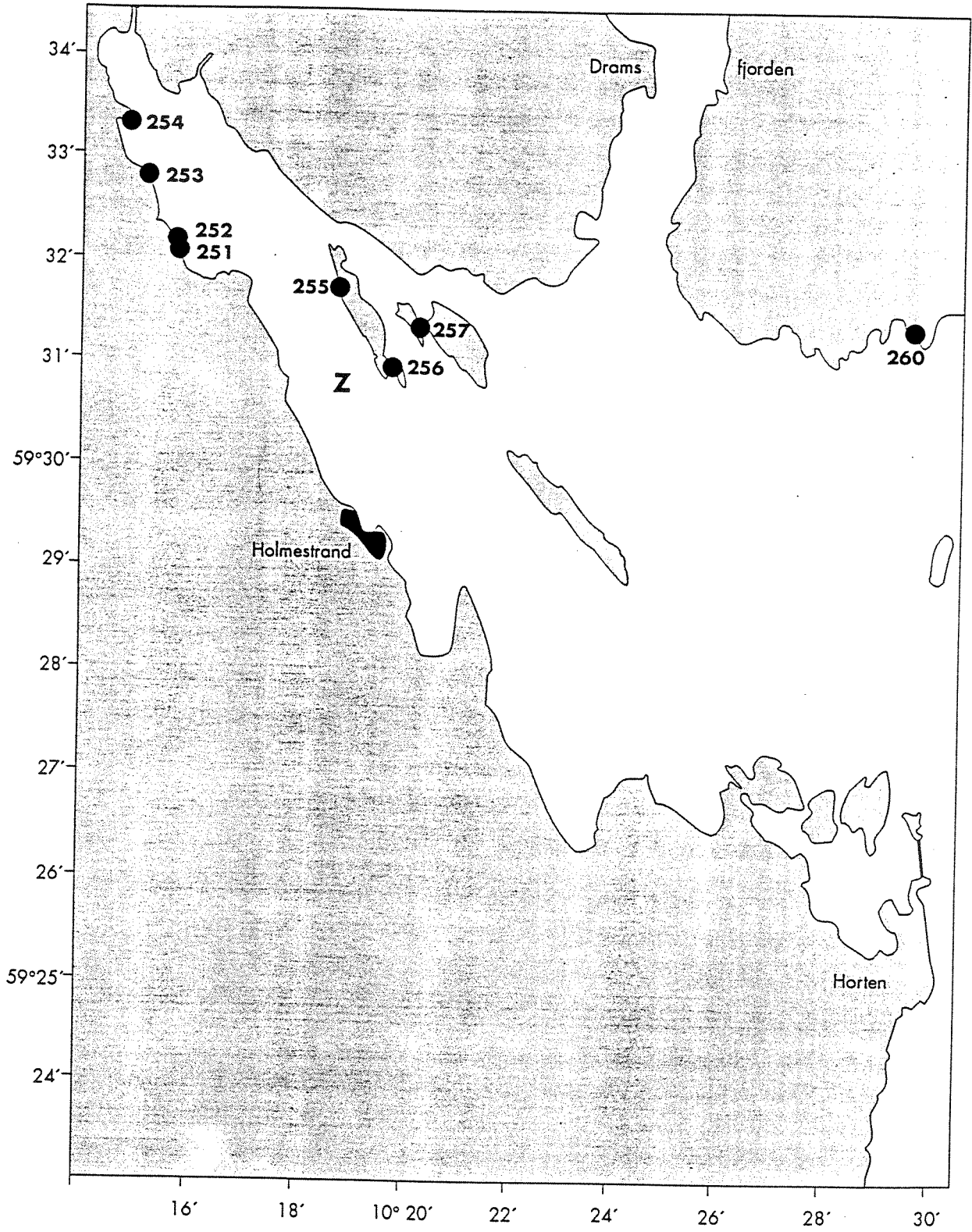
YTRE OSLOFJORD



INDRE OSLOFJORD



HOLMESTRANDSFJORDEN



VEDLEGG 2: Rådata fisk - injeksjonsstudie

torsk -injeksjonsforsøk

kode	dato	gruppe	VTG-mean	vekt (g)
1	17-okt	K	5	140
1	23-okt	K	5	
1	02-nov	K	5	
10	17-okt	K	5	225
10	23-okt	K	8	
10	02-nov	K	5	
11	17-okt	K	10	200
11	23-okt	K	5	
11	02-nov	K	13	
100	17-okt	K	19	145
100	23-okt	K	16	
100	02-nov	K	5	
101	23-okt	K	5	150
110	17-okt	K	17	140
110	23-okt	K	5	
110	02-nov	K	5	
111	23-okt	K	5	150
1	17-okt	NF	16	280
1	23-okt	NF	141	
1	02-nov	NF	39	
10	23-okt	NF	8	145
11	17-okt	NF	24	185
11	23-okt	NF	5	
11	02-nov	NF	19	
100	17-okt	NF	5	235
100	23-okt	NF	31	
100	02-nov	NF	182	
101	17-okt	NF	10	150
101	23-okt	NF	63	
101	02-nov	NF	76	
110	17-okt	NF	18	175
110	23-okt	NF	881	
110	02-nov	NF	79	
1	17-okt	OE	17	155
1	23-okt	OE	422	
1	02-nov	OE	183	
10	17-okt	OE	18	150
10	23-okt	OE	301	
10	02-nov	OE	15	
101	17-okt	OE	16	275
101	02-nov	OE	246	
110	17-okt	OE	10	230
110	23-okt	OE	4465	
110	02-nov	OE	786	
111	17-okt	OE	14	150
111	23-okt	OE	82	
111	02-nov	OE	33	
1000	17-okt	OE	6	210
1000	23-okt	OE	2449	
1000	02-nov	OE	373	

kode	dato	gruppe	VTG	vekt (g)
1	17-okt	K	2362	22
1	23-okt	K	1655	
1	02-nov	K	2052	
10	17-okt	K	1587	32
10	23-okt	K	2108	
10	02-nov	K	1868	
11	17-okt	K	152.8	26
11	23-okt	K	780.8	
11	02-nov	K	400.6	
100	17-okt	K	4262	25
100	23-okt	K	624.2	
100	02-nov	K	229.7	
101	17-okt	K	3040	20
101	23-okt	K	2921	
101	02-nov	K	1479	
110	17-okt	K	253.6	34
110	23-okt	K	417.3	
111	17-okt	K	368.3	50
111	23-okt	K	281.2	
111	02-nov	K	419.1	
1000	17-okt	K	198.7	35
1000	23-okt	K	185.2	
1000	02-nov	K	714.5	
1	17-okt	NF	2277	32
1	23-okt	NF	2304	
1	02-nov	NF	2016	
10	17-okt	NF	598.5	26
10	23-okt	NF	362.4	
10	02-nov	NF	476.6	
11	17-okt	NF	4779	42
11	23-okt	NF	1954	
11	02-nov	NF	1815	
100	17-okt	NF	443.2	50
100	23-okt	NF	691.8	
100	02-nov	NF	1196	
101	17-okt	NF	2755	40
101	23-okt	NF	912.5	
101	02-nov	NF	2294	
110	17-okt	NF	286.6	26
110	23-okt	NF	460.3	
110	02-nov	NF	237.4	
111	17-okt	NF	7425	36
111	23-okt	NF	2774	
111	02-nov	NF	4713	
1000	17-okt	NF	1185	30
1000	23-okt	NF	213.6	
1000	02-nov	NF	571.8	
1	17-okt	OE	791	38
1	23-okt	OE	493.8	
1	02-nov	OE	537.8	
10	17-okt	OE	295.5	38
10	23-okt	OE	6463	
10	02-nov	OE	2475	
11	17-okt	OE	572	38
11	23-okt	OE	1913	
11	02-nov	OE	802.4	
100	17-okt	OE	4048	54
100	23-okt	OE	5898	
100	02-nov	OE	3124	
101	17-okt	OE	11997	48
101	23-okt	OE	6504	
101	02-nov	OE	9617	
110	17-okt	OE	423.4	36
110	23-okt	OE	354.3	
110	02-nov	OE	309.4	
111	17-okt	OE	4325	20
111	23-okt	OE	3891	
111	02-nov	OE	2147	
1000	17-okt	OE	467.6	18
1000	23-okt	OE	525.1	
1000	02-nov	OE	410.6	

skrubbe - injeksjonsforsøk

kode	dato	gruppe	VTG-mean
10	17-okt	K	15126
11	17-okt	K	10065
11	17-okt	K	22621
11	23-okt	K	7725
11	23-okt	K	7613
11	23-okt	K	8600
11	02-nov	K	1545
100	17-okt	K	10917
100	23-okt	K	16073
101	17-okt	K	24625
101	23-okt	K	14
110	17-okt	K	12356
110	23-okt	K	22743
111	17-okt	K	27824
1000	17-okt	K	21
1000	23-okt	K	6
1001	17-okt	K	80
10	17-okt	NF	8595
10	17-okt	NF	15324
10	23-okt	NF	3947
10	23-okt	NF	34247
101	17-okt	NF	38787
101	23-okt	NF	9787
110	17-okt	NF	16969
110	23-okt	NF	15005
110	02-nov	NF	8245
111	17-okt	NF	16
1000	17-okt	NF	26
1000	23-okt	NF	48
1001	23-okt	NF	14359
1001	02-nov	NF	1278
1010	17-okt	NF	13111
1010	23-okt	NF	23157
1010	02-nov	NF	18227
1	17-okt	OE	13
10	17-okt	OE	262
11	17-okt	OE	36637
11	23-okt	OE	18261
11	02-nov	OE	9281
101	17-okt	OE	19751
101	23-okt	OE	19975
101	02-nov	OE	1996
110	17-okt	OE	45561
110	23-okt	OE	32603
110	02-nov	OE	21404
1000	17-okt	OE	15186
1010	17-okt	OE	46
1010	23-okt	OE	28
1010	02-nov	OE	10

kode	dato	behandling	VTG-mean
1	1	K	31
1	2	K	128
1	3	K	75
10	1	K	80
10	2	K	22
10	3	K	79
11	1	K	105
11	2	K	111
11	3	K	24
11	4	K	282
100	1	K	143
100	2	K	96
100	3	K	96
100	4	K	224
101	1	K	66
101	2	K	103
101	3	K	102
101	4	K	203
110	1	K	202
110	3	K	36
110	4	K	124
111	1	K	73
111	2	K	114
111	3	K	127
111	4	K	275
1000	1	K	77
1000	4	K	227
1	1	NF	129
1	2	NF	286
1	3	NF	415
1	4	NF	444
10	1	NF	153
10	2	NF	249
10	3	NF	107
10	4	NF	194
11	1	NF	30
11	2	NF	94
11	3	NF	59
11	4	NF	266
100	1	NF	201
100	2	NF	83
100	3	NF	143
100	4	NF	207
101	1	NF	153
101	2	NF	730
101	3	NF	946
101	4	NF	1490
110	1	NF	85
110	2	NF	1317
110	3	NF	1050
110	4	NF	633
111	1	NF	78
111	2	NF	155
111	3	NF	247
111	4	NF	183
1000	1	NF	275
1000	2	NF	6185
1000	3	NF	5204
1000	4	NF	3725
1	1	OE	49
1	2	OE	2042
1	3	OE	868
1	4	OE	298
10	1	OE	71
10	2	OE	2181
10	3	OE	919
10	4	OE	513
11	1	OE	22
11	2	OE	690
11	3	OE	172
11	4	OE	306
100	1	OE	123
100	2	OE	1868
100	3	OE	526
100	4	OE	158
101	1	OE	155
110	1	OE	77
110	2	OE	14521
110	3	OE	14751
110	4	OE	10051
111	1	OE	170
111	2	OE	1381
111	3	OE	614
111	4	OE	448
1000	1	OE	353
1000	2	OE	1106
1000	3	OE	655
1000	4	OE	605

VEDLEGG 3: Rådata fisk - eksponering kloakkrensaneanlegg

tidspunkt	kode	gruppe	VTG-mean	vekt
1	1	K3	39	62
1	11	K3	5	200
1	100	K3	32	128
1	111	K3	18	124
1	1000	K3	47	190
2	1	K3	110	62
2	10	K3	696	90
2	11	K3	85	200
2	100	K3	212	128
2	101	K3	83	112
2	110	K3	481	212
2	111	K3	107	124
2	1000	K3	292	190
2	1010	K3	162	82
2	1100	K3	43	
3	1	K3	62	62
3	100	K3	326	128
3	101	K3	54	112
3	110	K3	443	212
3	111	K3	204	124
3	1000	K3	326	190
3	1010	K3	56	82
3	1100	K3	63	
4	1	K3	20	62
4	10	K3	579	90
4	11	K3	148	200
4	100	K3	266	128
4	101	K3	26	112
4	110	K3	345	212
4	111	K3	108	124
4	1000	K3	303	190
4	1010	K3	47	82
1	1	K4	15	112
1	110	K4	5	220
1	1000	K4	23	220
1	1110	K4	7	
2	1	K4	29	
2	10	K4	89	176
2	11	K4	9	136
2	101	K4	385	112
2	111	K4	28	88
2	1000	K4	5	220
2	1000	K4	79	220
2	1001	K4	69	182
2	1010	K4	80	206
2	1011	K4	76	
2	1110	K4	27	
3	1	K4	69	
3	10	K4	59	
3	11	K4	52	112
3	101	K4	331	112
3	1011	K4	87	
3	1110	K4	199	
4	1	K4	19	
4	10	K4	50	
4	11	K4	96	112
4	101	K4	281	112
4	110	K4	39	220
4	111	K4	71	88
4	1000	K4	48	220
4	1001	K4	46	182
4	1010	K4	96	206

bergnebb - Fuglevik

tidspunkt	kode	gruppe	VTG
1	1010	K3	173
1	100	K3	203
1	10	K3	225
2	10	K3	148
2	1010	K3	231
?	100	K3	102
1	1010	K4	169
1	110	K4	188
1	10	K4	253
2	101	K4	56
1	1	K4	728
1	11	K4	997
2	1	K3	1198
2	1000	K3	1226
2	100	K4	1455
2	101	K3	1733
1	101	K3	2500

skrubbe - Fuglevik

tidspunkt	kode	gruppe	VTG-mean
1	111	K3	298.9
1	1	K3	93.94
2	1010	K3	607.3
2	111	K3	1017
1	100	K4	21.45
1	110	K4	79.78
1	10	K4	117.8
1	1	K4	385.9
2	100	K4	22.25
1	1	K3	1843
1	1010	K3	4797
1	1010	K3	9695
2	101	K3	3321
2	1	K3	3564
2	110	K3	3980
1	1010	K4	9619
2	1000	K4	2515
2	101	K4	2747
2	111	K4	6075
2	101	K4	6143

VEDLEGG 4: Rådata fisk - innsamlet villfisk

stasjon	kode	VTG	vekt	lengde (cm)
1	1	50	12	16
1	3	124	18	12.6
1	4	17	17	12.9
1	5	56	10.5	11.3
1	7	54	10.8	10.6
1	10	35	19.3	13.5
1	11	53	13	17.1
1	12	21	16	12
1	13	46	13.2	11.5
1	17	5	23	14
1	18	5	21	17.5
1	19	67	12.4	11.5
1	20	37	20	13.8
2	1	35	8.2	10.5
2	2	49	5.4	9
2	3	76	6.4	9.4
2	4	77	11.5	13.3
2	6	44	12	11.5
2	9	56	4.5	8.5
2	11	42	3.2	7.5
2	12	87	3.3	7.4
2	13	133	7.4	2.8
2	15	59	6.5	9.5
2	16	10	17.3	13
2	17	52	10	10.5
2	18	58	11.3	11.1
2	19	105	9.4	10.5
4	2	39	10.3	10.4
4	3	46	5.8	8.3
4	6	5	7.1	9.7
4	7	60	6.2	9.5
4	9	17	5.8	8.9
4	12	36	6.1	8.9
4	15	118	5.9	9.1
4	16	8	5.4	9
4	18	29	5.1	8.9
5	2	62	33.8	15.5
5	4	7	17.1	13.1
5	5	21	26.7	14.9
5	6	13	18.7	13.1
5	7	6	42.6	17.9
5	9	44	7.7	9.6
6	2	12	28.2	15.4
6	3	5	48.8	19
6	4	31	38.8	26.7
6	5	29	22.5	14.8
7	2	18	5.2	8.9
7	3	23	6.4	10.3
7	5	47	5.2	8.9
7	6	35	6.8	9.1
7	7	17	5.6	9.5
7	11	12	4.2	8.9
7	17	64	3.8	8.4
7	18	21	5.8	9.5
8		5		140
8		5		225
8		10		200
8		19		145
8		17		140
8		16		280
8		24		185
8		5		235
8		10		150
8		18		175
8		17		155
8		18		150
8		16		275
8		10		230
8		14		150
8		6		210

stasjon	kode	VTG	kjønn	lengde (cm)	vekt (g)
1	2	331	F	13.2	38
1	3	140	F	12.9	37
1	4	141	M	11.1	22
1	6	8146	F	12.5	33.5
1	8	382	M	12.8	33
1	9	980	M	9	12.5
1	10	2038	M	9.2	13
1	13	666	M	10.2	16.7
1	14	2742	F	15.5	56.5
1	15	6738	M	13	36.5
1	16	233	M	14.5	47
1	18	26544	F	12	26
1	19	483	M	12.1	30
1	20	597	M	11.5	23.4
1	21	190	F	11	21.1
1	24	308	M	13	30
1	28	394	M	12.4	26.5
1	30	323	M	11.6	26
2	1	14980	F	16.5	80.3
2	2	12846	F	16.5	74.6
2	3	3354	F	14.5	45.2
2	6	2842	F	11	25.5
2	7	2510	M	11.5	23.8
2	8	574	M	12	25
2	9	3750	F	13.4	38.8
2	10	2550	F	11.5	25.6
2	13	5380	F	9.9	19.7
2	15	2050	M	12.7	33.3
2	20	371	M	13.8	42.5
2	22	19408	F	14.5	54.9
2	24	9726	F	13.3	36.4
2	25	203	M	13.9	39.4
2	28	5800	F	11.4	23.1
2	29	189	M	10.4	21.8
4	2	461	M	9.9	13.9
4	3	7810	F	14.1	39.4
4	4	309	M	13.9	26.1
4	6	497	M	10.9	18.1
4	7	1717	F	13.7	37.3
4	8	644	F	11	18.6
4	12	1351	F	10.5	19.4
4	13	452	M	11.6	23.4
4	14	1818	F	11.8	19.9
4	16	1343	F	13.1	33.5
4	18	4762	F	11.2	15.8
4	21	3488	F	11	20.3
4	23	3958	F	11	20.4
4	24	153	M	11.5	22.1
4	25	249	M	10.9	19.3
4	28	1074	F	10.1	14.1
4	29	2596	F	11.7	18.3
5	3	1229	F	7.6	6.7
5	4	1307	F	7.6	7.1
5	7	1178	M	8.1	7.9
5	8	418	M	7.9	7.9
5	9	418	M	8.1	8.6
5	11	303	M	9	10.3
5	12	448	M	8.4	8.4
5	14	1121	F	7.9	7.7
5	17	357	M	8.4	8.6
5	20	482	M	9.7	14.2
5	21	421	M	9.6	14.3
5	23	1001	M	7.5	6.5
5	24	1602	F	9.4	13.3
5	25	1702	M	7.3	6.3
7	1	2346	F	10.6	15.3
7	2	118	M	12.1	25.1
7	3	421	M	11.5	22.3
7	4	1327	F	9.1	10.2
7	5	2942	F	10.2	14.6
7	6	348	M	10.4	19.3
7	7	384	M	12.6	26.9
7	9	2002	M	7.8	6.9
7	10	957	M	11.3	22
7	12	192	F	9.9	13.8
7	13	573	M	10.4	15.6
7	15	442	M	10.5	16
7	17	612	M	8.7	8.5
7	18	3616	F	8.6	9.5
7	19	638	M	7.8	6.2

skrubbe - felt

stasjon	kode	VTG-mean	kjønn	lengde (cm)	vekt (g)	levervt
1	6	5091	F	28.5	274	5.2
1	8	6959	F	25.8	175	2.7
1	16	424	F	25.5	221.9	3.6
2	4	16330	F	33.5	453.5	10.7
2	8	9168	F	30.2	312.5	4.7
2	11	16091	F	34.5	468.5	10.7
2	12	10612	F	35	528.5	10.8
4	1	10739	F	27.7	222.5	30.4
4	5	11321	F	28.9	266	4
4	6	6561	F	28.8	223.1	3.7
4	7	5722	F	26.9	225.7	2.6
4	9	4812	F	31.1	301	3.5
5	1	8926	F	38	642.1	11.3
5	4	9869	F	35.1	600.8	18.4
6	1	10838	F	32.9	368.6	6.7
6	3	17501	F	26.3	192.3	2
6	4	16555	F	29.2	267.1	4.4
6	5	25130	F	28.6	287.1	2.2
6	6	8999	F	27	227.4	1.8
1	3	21	M	33.5	339	3.9
1	5	36	M	32.4	326.5	4.3
1	9	70	M	29	224	2.8
1	14	9	M	30	238.5	3.2
2	1	170	M	17.5	59.8	0.6
2	2	8	M	10.8	14.5	0.5
2	3	274	M	24.5	178.2	0.9
2	7	40	M	30	355	7.4
2	9	212	M	20.5	86.5	0.7
2	10	23	M	10	12.5	
4	3	201	M	20.5	91.8	
4	8	77	M	23.5	159.8	2.1
4	11	4	M	15	133.3	
4	12	46	M	25.4	148.1	
4	14	44	M	19.5	90.1	
5	2	74	M	32.9	283.4	3.3
5	3	20	M	30.2	288.8	4.4
6	2	86	M	28.3	301.5	
7	1	85	M	22	119.5	
7	4	15	M	20.8	86.6	
7	5	136	M	18.7	66.6	
7	11	26	M	12.6	18.4	

VEDLEGG 5: Metode ELISA

Det ble benyttet en kompetitiv, indirekte ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) til kvantifisering av VTG i plasma fra de fire artene. Innledende kalibrering viste at passende fortynninger av antisera ville være 1:50 000 (anti-steinbit VTG antiserum) for skrubbe, bergnebb, laks og 1:150 000 (anti-torsk VTG antiserum) for torsk. Metodene som er beskrevet i Specker & Anderson (1994) ble brukt med visse modifikasjoner. I korthet inkuberes brønnene i 96-brønners mikrotiterplater (Immunosorp, Nunc, Roskilde Danmark) over natt (4°C) med en gitt mengde VTG (estimert til 100-200 ng/mL) - kompetitivt antigen. 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 salt-løsning med 0.05% Tween-20). Prøve eller standard og fortynninger av det aktuelle primære antistoff - anti-torske VTG for torsk (1:150 000) og anti-steinbit VTG (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). Den absolutte mengden VTG i hver av standard-plasmaene har ikke blitt bestemt, så verdier angis i relative enheter - men alle verdier for hver enkelt art er sammenlignbare. Deteksjonsgrenser for analysen ble bestemt i forhold til standard-kurven og variabilitet i målingene - den var 10 (relative enheter) for torsk og laks, 30 for bergnebb og 50 for skrubbe. Hver prøve ble målt i triplikat (tre brønner) og typisk variabilitet (CV) var 5-15% - lavere variabilitet for høye verdier.

Norsk institutt for vannforskning

Postboks 173 Kjelsås
0411 Oslo

Telefon: 22 18 51 00
Telefax: 22 18 52 00

Ved bestilling av rapporten,
oppgi løpenummer 3422-96

ISBN 82-577-2956-6