



Miljøministeriet
Naturstyrelsen

Eksponeeringsforsøg- med ålekvabbe

Kolofon

Titel:

Eksponeringsforsøg med ålekvabbe

URL:

www.nst.dk

Emneord:

Ålekvabbe, misdannelser, miljøfarlige stoffer, laboratorieforsøg, biomarkører.

ISBN nr. elektronisk version:

978-87-7279-278-1

Udgiver:

Naturstyrelsen

Udgiverkategori:

Statslig

Ansvarlig institution:

DCE - Nationalt Centre for Miljø og Energi, Aarhus Universitet og Syddansk Universitet

Resume:

Laboratorieforsøg viser, at visse miljørealistiske blandinger af miljøfarlige stoffer, og enkeltstoffer, har en tendens til at forøge andelen af misdannede unger i ålekvabber. En simpel dosisrespons sammenhæng kan dog ikke udledes.

Copyright:

Må citeres med kildeangivelser. Naturstyrelsen, Miljøministeriet

Naturstyrelsen vil, når lejligheden gives, offentliggøre rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, finansieret af Naturstyrelsen. Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Naturstyrelsens synspunkter. Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Naturstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

Forfattere:

Nanna Brande-Lavridsen, Poul Bjerregaard & Bodil Korsgaard, Syddansk Universitet. Jakob Strand & Ingela Dahllöf, Aarhus Universitet, Institut for Bioscience

Andre bidragydere

Birgit Søborg, Zhanna Tairova, Gitte Jakobsen, Jette Porsgaard, Anette Birk Vorup, Kim Gustavson.

Sprog:

Dansk

År:

2011

Indhold

Forord	5
Sammenfatning	7
Summary	9
Introduktion	11
Kandidatstoffer og doser.....	11
Biomarkører og optagelse/metabolisme af organismefremmede stoffer..	14
Metoder og prøvetagning	17
Indsamling.....	17
Kemikalier og blandinger	17
Forsøgsopstilling.....	18
Undersøgelse af voksne fisk og unger	19
Databehandling og statistik.....	22
Resultater	25
Eksposering af æg og unger.....	25
Overførsel fra moder til æg og unger.....	29
Biometri og kondition	30
Misdannelser i unger.....	32
Øvrige biomarkører	35
Diskussion	37
Eksposering	37
Misdannelser og abnorm udvikling af unger	37
Sammenhæng mellem eksposering og effekter	39
Konklusioner og anbefalinger	43
Referencer	45

Forord

I forbindelse med den nationale overvågning af vandmiljøet (NOVANA) i årene 2004-2008 er der fundet forhøjede forekomster af misdannede unger i kuld fra fisken ålekvabbe i en række danske fjorde. I andre lande, herunder Tyskland og Sverige, er der gjort lignende fund af misdannede ålekvabbeunger.

Der er tidligere blevet gennemført to litteraturstudier i Miljøministeriets regi: 1) Misdannet ålekvabbeunger og andre biologiske effekter i danske vandområder. Litteraturudredning (Stuer-Lauridsen et al. 2008), og 2) Kemiske stoffer der kan føre til misdannelser i fisk. Indkredsning af stoffer ud fra deres biokemiske virkemekanisme (Halling-Sørensen et al. 2008).

Konklusionerne fra disse udredninger var, at ålekvabbeunger med misdannelser er hyppigst forekommende i kystnære områder med menneskelig aktivitet, og at der er mistanke om, at fx klorerede organiske forbindelser, TBT, PAH, pesticider, tungmetaller, lægemidler og stoffer med hormonforstyrrende effekter er årsagen til fund af misdannelser, evt. ved additiv virkning fra flere stoffer.

FORMÅL-projektet ('Et undersøgelsesforløb til at **FOR**klare fund af **M**isdannede **Å**lekvabbeunger i danske fjorde') er en del af Miljøministeriets tilvejebringelse af viden, der er nødvendig, for at Naturstyrelsen kan opstille forslag til indsatser, der kan imødegå biologiske effekter i miljøet.

FORMÅL-projektet består af tre trin:

1. Et måleprogram, der kan tilvejebringe et fyldestgørende billede af vandmiljøets tilstand med hensyn til miljøfarlige stoffer for at indkredse årsagen til fund af misdannelser i ålekvabbeunger.
2. Laboratorieforsøg til etablering af viden om effektive niveauer for udvalgte kemiske stoffer i ålekvabber.
3. En tværgående analyse af de gennemførte aktiviteter og resultater fra andre projekter, der sammenfatter viden om årsager til forekomst og udbredelse af effekter og misdannelser i ålekvabber.

De overordnede resultater og konklusioner fra trin 1 er sammenfattet i 'Miljøfarlige stoffer og ålekvabbe – et feltstudie. FORMÅL - Trin 1 ud fra 3 delrapporter: I) Miljøfarlige stoffer i ålekvabbe, II) Biomarkører i ålekvabbe samt III) Miljøfarlige stoffer i sediment og muslinger.

Denne rapport omhandler resultaterne fra trin 2, hvor formålet var at undersøge, om den indikerede kausale sammenhæng mellem udsættelse for miljøfarlige stoffer og misdannelser i ålekvabbeunger kunne eftervises i laboratorieforsøg.

Sammenfatning

Projektet FORMÅL ("Et undersøgelsesforløb til at **FOR**klare fund af **Misdannede Å**Lekvabbeunger i danske fjorde") er fase 3 i Naturstyrelsens undersøgelsesforløb iværksat for at klargøre et eventuelt sammenhæng mellem miljøfarlige stoffer og misdannelser i fisken ålekvabbe (*Zoarces viviparus*). FORMÅL indeholder tre trin, hvor det første er et feltbaseret måleprogram, som vurderer vandmiljøets og ålekvabbens tilstand med hensyn til miljøfarlige stoffer. En sammenfatning af resultaterne af første trin findes i: 'Miljøfarlige stoffer og ålekvabbe – et feltstudie. FORMÅL - Trin 1'. Trin 2 er laboratoriebaserede eksperimenter med ålekvabber og relevante kandidatstoffer og trin 3 er en integreret analyse baseret på resultaterne af trin 1 og 2 af FORMÅL samt resultater fra andre relevante projekter om ålekvabber.

Litteraturstudier i de tidligere to faser har peget på, at bl.a. tungmetaller, organotin, tjærestoffer (PAH'er), klorerede aromatiske stoffer som fx dioxin og dioxinlignende PCB'er og bromerede flammehæmmere er de mest sandsynlige årsager til misdannelser i fisk. Disse miljøfarlige stoffer samt blødgørere (phthalater) og perfluorerede stoffer (PFAS) blev målt i æg, muskel og lever hos ålekvabbehunner og -unger indfanget i et feltstudie på tre forskellige lokaliteter. Stærke kandidatstoffer blev udpeget på baggrund af kraftigt forhøjede koncentrationer i ålekvabber fra to lokaliteter ved Roskilde og Frederiksværk, hvor mere end 5 % af kuldene havde mere end 5 % deformiteter, i forhold til Agersø, hvor der ikke er fundet tilsvarende forhøjede niveauer af misdannede unger hos ålekvabbe.

For at verificere at de stærke kandidatstoffer kan være årsag til misdannelser i ålekvabbeunger, gennemførtes et kontrolleret eksponeringsforsøg med de stærke kandidatstoffer i blandinger og som enkeltstoffer i relevante doser. Denne rapport omhandler disse eksponeringsforsøg.

Forekomst af miljøfarlige stoffer blev målt i æg fra én af eksponeringerne, samt i kontrolfisk, tre dage efter eksponering og i unger sidst i forsøget. Unger fra kontrol og de eksponerede ålekvabbehunner blev undersøgt for forekomst af misdannelser, samt for biometriske mål til vurdering af kondition. I hunner blev der målt for CYP1A-aktivitet i lever, og for calciumindhold i plasma og ovarievæske. PAH-metabolitter blev også målt i hunner som et mål for PAH-eksponering. Derudover blev hunners biometriske mål brugt til at beregne forskellige konditionsindeks.

Undersøgelsen viste, at visse miljørealistiske blandinger af miljøfarlige stoffer eller enkeltstoffer har en tendens til at forøge andelen af misdannede unger i ålekvabber i samme omfang, som bliver fundet i miljøet. En simpel dosis-respons sammenhæng kunne dog ikke påvises.

Hovedkonklusionerne fra forsøget er, at

- der er en tendens til øget forekomst af misdannelser i ålekvalbeunger, når de udsættes for såvel blandinger af miljøfarlige stoffer som enkelte miljøfarlige stoffer i miljørelevante koncentrationer.
- frekvenser af misdannelser og koncentrationer af miljøfarlige stoffer i forsøgene er på niveau med dem, som er fundet i miljøet.
- der er ikke simple dosis-respons sammenhæng, hvilket kan skyldes antagonistiske effekter af stofblandinger ved højere koncentrationer.

Summary

The Danish Ministry of the Environment has instigated a series of projects aiming to clarify whether observed deformities in eelpout (*Zoarces viviparous*) larvae are caused by environmentally hazardous substances.

FORMÅL is the third project with the aim to verify whether the candidate substances indeed are the cause of the observed deformities. In order to fulfil the aim, FORMÅL consists of three parts: 1) a field study, 2) laboratory experiments with eelpout, and 3) an integrated analysis based on both part 1 and 2 of FORMÅL, as well as on results from other on-going projects on eelpout.

The conclusions of earlier literature-based projects indicated that substances such as heavy metals, organotin, polyaromatic hydrocarbons (PAHs), and halogenated aromatic compounds like dioxins, PCBs and flame retardants were likely candidates to have caused the deformities.

These environmentally hazardous substances, as well as phthalates and perfluorinated compounds (PFSA) were found in the eggs, muscle and liver of eelpout females and larvae collected in a field study at three different sites. Strong candidate substances were pointed out based on high concentrations in eelpouts from two impacted sites where more than 5 % of the broods had more than 5 % deformed fry compared to a reference site where no deformities were observed.

To verify that the strong candidate substances could indeed be the cause of the deformities in the eelpout fry, a laboratory-based controlled environment experiment was conducted. Both mixtures and single substances were used in relevant concentrations. This report deals with the results of this experiment.

A thorough investigation of the occurrence of deformities in the fry of exposed eelpout females was carried out and various anatomical parameters were measured.

Moreover, various parameters and biomarkers were used to assess the uptake and metabolism of the exposure compounds, and what biological mechanisms are affected by hazardous substances and result in the observed deformities in eelpout larvae. The biomarkers used in this study were PAH-metabolites, CYP1A-activity and calcium levels in the ovarian fluid and plasma.

The main conclusions from the experiment are:

- Hazardous compounds tend to increase the incidence of abnormal fry in eelpout when administered as either mixtures or single substances at environmentally realistic concentrations.
- The levels of deformities as well as exposure of eggs and fry were similar to those found in the environment.
- A simple dose-response relationship could not be determined, and there were indications of antagonistic effects of mixtures at higher concentrations.

Introduktion

Det overordnede formål med undersøgelsesforløbet var at belyse årsagen til misdannelser i ålekvabbeunger (Stuer-Lauridsen et al. 2008). Hypotesen er, at den øgede forekomst af misdannelser i fiskeunger er forårsaget af miljøfarlige stoffer, der inducerer toksiske effekter og processer, som kan lede til misdannelser.

Bekræftelse af hypotesen forudsætter, at man kan etablere en årsagssammenhæng mellem udsættelse for kandidatstoffer og de observerede misdannelser. Derfor er der blevet gennemført et kontrolleret laboratorieforsøg, hvor drægtige ålekvabbeunger er blevet udsat for stærke kandidatstoffer i blandinger og som enkeltstoffer i miljørelevante koncentrationer.

I denne delrapport sammenfattes resultaterne af de biologiske og kemiske målinger i eksponerede ålekvabbeunger og -unger, som er blevet udført i laboratorieforsøget.

Kandidatstoffer og doser

Stofferne og deres doser i eksponeringen i laboratorieforsøgene er valgt ud fra målinger dels i ålekvabber (delrapport I) og dels i muslinger og sediment (delrapport III) fra undersøgelsesforløbet trin 1. Kandidatstofferne er udpeget på grundlag af forekomst af forhøjede koncentrationer i ålekvabber i belastede områder med høj hyppighed af misdannelser (Roskilde og Frederiksværk) i forhold til en "ren" referencelokalitet med lav hyppighed af misdannelser (Agersø).

Det samlede billede af forekomst og koncentrationer af miljøfarlige stoffer pegede på kobber, organotin, PAH'er, chlorerede dioxiner og dioxinlignende polychlorerede biphenyl (PCB'er) som stærke kandidater til at være årsag til de observerede misdannelser, samt bromerede flammehæmmere, perfluorerede forbindelser og nonylphenol som kandidatstoffer.

I laboratorieforsøgene udvalgte 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) som repræsentant for de chlorerede dioxiner og de dioxinlignende PCB'er, pyren som repræsentant for PAH'erne, tributyltin som repræsentant for organotinforbindelserne, PFOS (perfluorooctansulfonsyre) som repræsentant for de perfluorerede forbindelser, og 2,2',4,4'-tetrabromodiphenylether (BDE-47) som repræsentant for de bromerede flammehæmmere.

TCDD og pyren (PAH) tilhører stofgrupper, der påvirker *Ah*-receptoren og herved CYP-systemet, som kan forårsage bl.a. oxidativ stress, interferens med proteiner og DNA og effekter på vitamin- og hormonbalancen (Sturve et al. 2005, Alsop et al. 2007, Billiard et al. 2008). TCDD og PAH'er er blevet påvist at forårsage ødem pga. osmoregulatoriske effekter, leverskader, kardiovaskulær

dysfunktion, tidlig død, blommesækødem og skeletmisdannelser – især kæbe- og øjendeformiteter – i fiskeunger (Hose et al. 1982, Hannah et al. 1982, Giesy et al. 2002, Incardona et al. 2004, Antkiewicz et al. 2005, Carney et al. 2006, Farwell et al. 2006, Incardona et al. 2006, Yamauchi et al. 2006).

TBT kan – ud over at påvirke CYP- og hormonsystemet (Fent 1996, Morcillo et al. 2004, Mortensen & Arukwe 2007, 2009) – også påvirke ion- og næringsstoftransport over cellemembraner (Selwyn 1976). Dette påvirker bl.a. pH-gradienter over cellemembraner og calciumtransport. Skader på cellemembranens transportzymer og andre virkninger på ATPasen påvirker energibalancen negativt og interfererer med osmoreguleringen (Fent 1996, Hartl et al. 2000). Det er påvist, at TBT er genotoksisk i fisk i miljørelevante koncentrationer (Micael et al. 2007), og det kan føre til reduceret klækning og deformiteter i fisk – bl.a. abnorm øjen- og muskeludvikling (Fent 1992, Nakayama et al. 2005, Hano et al. 2007).

Akkumulering af metaller – inklusive kobber – kan forårsage en øgning af 'Reactive Oxygen Species' (ROS), som forårsager oxidativ stress. Trods forhøjet antioxidantforsvar kan oxidativ skade ske, når organismer bliver eksponeret for kemiske stoffer, hvis systemet ikke kan følge med. Oxidativ stress medfører typisk skader på cellemembranens lipider og på proteiner. Kobber er blevet påvist at medføre DNA-skader (Chairi et al. 2010, Santos et al. 2010) og at forstyrre mitokondriel respiration (Craig et al. 2007, Garceau et al. 2010) og metalbindende enzymer (Craig et al. 2009, Atli & Canli 2010, Chairi et al. 2010). Udsættelse for subletale kobberkoncentrationer medfører typisk blommesækødem og rygsøjlekrumning (Adema-Hannes & Shenker 2008). Kobber reducerer vitamin A-koncentrationer (Alsop et al. 2007) og forstyrrer ionbalancen (Stouthart et al. 1996, McGeer et al. 2000). Desuden reducerer det optagelsen af æggeblomme i fiskeunger og har derfor effekter på metabolisme og vækst (Stouthart et al. 1996, Johnson et al. 2007, Witeska et al. 2010). Effekter på nervesystemet og hjerterytmen er også rapporteret efter eksponering for kobbersalte (Johnson et al. 2007).

Bromerede flammehæmmere forårsager adskillige udviklingsmæssige defekter i fiskeunger, bl.a. på rygsøjle og hjerte (Lema et al. 2007), blommesækødem (Kammann et al. 2006), effekter på P-450 aktivitet og oxidativ stress (Tjärnlund et al. 1998, Kling et al. 2008). Stofferne påvirker ligeledes både kønshormon- og thyroindhormonsystemet (de Wit 2002, Hamers et al. 2006).

PFOS forårsager oxidativ stress og hepatocytapoptose (Oakes et al. 2005, Liu et al. 2007, Han et al. 2010). Det sidstnævnte kan skyldes, at PFOS skader cel-

lemembranerne og interfererer med DNA-metabolismens homeostase (Hoff et al. 2003). Ud over også at interferere med thyroidhormonerne, som spiller en vigtig rolle for normal udvikling og fysiologisk funktion i fisk (Shi et al. 2008, 2009), påvirker PFOS også steroidhormonbalancen (Oakes et al. 2005). Generelt forårsager PFOS mange forskellige typer misdannelser på fiskeunger pga. bl.a. apoptose i de embryonale celler (Shi et al. 2008).

Nonylphenol har en række effekter på fisk. Blandt andet virker det hormonforstyrrende og inducerer bl.a. vitellogeninsyntese i hanner og reduceret ægproduktion og fertilitet (Christiansen et al. 1998, Ishibashi et al. 2006). Endvidere er der observeret deformiteter hos afkom af eksponerede hunner samt hæmning af CYP1-aktivitet og oxidativ skade på bl.a. æg (Kelly & di Giulio 2000, Maradonna et al. 2004, Zhang et al. 2006, Meucci & Arukwe 2006, Zhang et al. 2008).

For yderligere oplysninger om effekter af de udvalgte stoffer henvises til rapporten "Kemiske stoffer der kan føre til misdannelser i fisk" fra trin 1 af FORMÅL (Halling-Sørensen et al. 2008).

De fleste af de udvalgte stoffer kan overføres fra moderfisk til æg eller afkom og ofte bioakkumulere dér til højere koncentrationer end i moderen pga. disse tidlige livsstadiers manglende evne til at metabolisere og udskille stofferne (Fent 1991, Giesy et al. 2002, Nakayama et al. 2005, Ohji et al. 2006, Rattfelt Nyholm et al. 2008, Sharpe et al. 2010). De fleste stoffer kan også reducere klæknings succes (fx Hose et al. 1982, Fent & Meier 1994, Johnson et al. 2007, Adema-Hannes & Shenker 2008).

Doserne af eksponeringsstofferne blev udvalgt ud fra to forskellige kriterier: 1) ud fra de målte koncentrationer i ålekvabber fra de to belastede områder (Delrapport I) og 2) ud fra koncentrationen i blåmuslinger fra områderne (delrapport III). Doserne i forsøget blev valgt, så eksponeringen af ålekvabberne var henholdsvis 10 og 50 gange højere, end den belastning ålekvabberne er udsat for i de to områder med forhøjet hyppighed af misdannelser. Der er i Appendiks A gjort mere detaljeret rede for beregningerne af doserne.

Det blev ved en række små pilotforsøg sikret, at de valgte doser ikke medførte akut dødelighed for ålekvabberne.

Der blev eksponeret for såvel enkeltstoffer som blandinger. Dette giver mulighed for at få et billede af blandingseffekter, som er den mest miljørelevante si-

tuation for fiskene, samt udpege de enkeltstoffer, der eventuelt forårsager misdannelser.

Biomarkører og optagelse/metabolisme af organismefremmede stoffer

Biomarkører er biologiske indikatorer, der kan anvendes til at vurdere, om miljøfarlige stoffer påvirker og derved udgør en risiko for dyrelivet i vore farvande. Forekomsten af misdannelser i fisk som ålekvabben er et eksempel på en generel biomarkør, hvor det vil være nødvendigt med yderligere undersøgelser af både de kemiske og biologiske forhold for at sandsynliggøre årsagerne.

Følgende biomarkører anvendtes i denne undersøgelse:

- Biometriske data
- Misdannelser/unormal udvikling af unger
- CYP1A-aktivitet
- Calciumindhold i ovarievæske og plasma

Desuden er det vigtigt at verificere, at de stoffer, fisken er blevet eksponeret for, er blevet optaget i vævet og eventuelt metaboliseret. Derfor blev følgende målinger foretaget:

- Kemiske målinger i æg og unger (puljede prøver)
- Måling af PAH-metabolitter i galde (på individniveau)

Misdannelser i unger og biometri

Misdannelser i unger er den primære effekt, som blev målt i dette projekt for at vurdere, om miljøfarlige stoffer forårsager de misdannelser, som er observeret i naturen.

Biometri, dvs. forskellige typer af fysiske mål, fx længde, vægt, levervægt m.m., er brugt til at beregne fiskens kondition som et supplement til misdannelser.

CYP-1A aktivitet

I alle fisk findes cytochrom-P450-medierede enzymer, som indgår i den oxidative metabolisme. Udover at omdanne en del af organismens egne stoffer som vitaminer og hormoner, omdanner disse enzymer, og især enzymerne af typen CYP1A, organiske miljøfarlige stoffer såsom PAH og dioxinlignende stoffer, så de bliver mere vandopløselige og nemmere at udskille. En vigtig egenskab ved disse enzymer er, at de er inducérbare, dvs. at aktiviteten øges som respons på en stigende påvirkning. En forhøjet CYP1A-enzymaktivitet medfører bl.a. oxidativ stress i form af en øget produktion af reaktive metabolitter med særlig høj toksicitet, fx epoxider af PAH, der kan have en mutagen og kræftfremkaldende virkning ved at forvolde skader på DNA. Disse egenskaber gør CYP1A-

aktiviteten anvendelig som biomarkør. Man skal dog være opmærksom på, at sæsonmæssige variationer i enzymaktiviteten er velkendte, og forskelle også kan skyldes bl.a. kønsforskelle og reproduktiv status. Det er derfor vigtigt at sammenligne grupper af fisk indsamlet under ensartede forhold, hvilket også er tilfælde i dette forsøg.

Calcium i ovarievæske og plasma

Da ålekvabben er levendefødende, er det en god modelart til at studere effekterne af toksisk påvirkning af afkommet gennem moderen og direkte påvirkninger af ynglen. Ved reproduktionen frigives æggene fra ovariet ind i ovariesækken, og befrugtningen sker umiddelbart efter. Cirka 3 uger efter befrugtningen klækker larverne. Herefter ligger larverne frit i ovariesækken. Deres vækst er gennem den første måneds tid afhængig af blommesækken. I denne periode sker bl.a. differentiering af gonader. Herefter, indtil fødsel ca. 5 måneder efter klækning, er ynglen afhængig af de næringsstoffer i ovarievæsken, som dannes gennem denne periode. Miljøet inde i ovariet og ovarievæskens indhold kan derfor tænkes at have stor betydning for udviklingen af ynglen.

Calcium indgår som en vigtig komponent i opbygningen skelettet og andre vitale dele, og det optages aktivt af ynglen. Igennem hele perioden bliver afkommet udsat for de forureningsstoffer moderen udsættes for gennem udveksling over ovariesækkens væg (Rasmussen et al. 2002). Forskning har vist, at østrogene stoffer – både naturlige og forureningsstoffer – kan påvirke mængden af ovarievæske og indholdet af calcium (Rasmussen et al. 2002).

Optagelse og omsætning af kandidatstoffer

Ved eksperimenteringsforsøg er det vigtigt at vide, hvor meget af de anvendte stoffer fisken reelt optager i vævet og i dette tilfælde videregiver til ungerne. Stoffers optagelsesgrad afhænger af mange faktorer såsom eksperimenteringsmetode og stoffets biokemiske egenskaber som fx fedtopløselighed.

Koncentrationen af et stof på et givent tidspunkt siger ikke nødvendigvis alt om den eksponering, ålekvabberne er udsat for. Mange stoffer bliver omsat (metaboliseret) i organismer, herunder organotin, nonylphenol, phthalater, PFAS og PAH'er. Metabolisering bevirker, at stofferne bliver mere vandopløselige og derved lettere at udskille. Andre stoffer såsom visse dioxiner, dioxinlignende PCB'er og bromerede flammehæmmere har en meget lavere omsætning i organismen eller bliver slet ikke nedbrudt. Disse oplagres typisk i cellemembraner og lipiddepoter. Stoffer, der ophobes i lipiddepoter, bliver ofte frigivet igen i perioder, hvor fiskene har brug for ekstra energi – fx i den reproduktive periode. For at få et mere reelt billede af den belastning fra stoffer fiskene er udsat for, er det

derfor nødvendigt at foretage målinger af stoffer og metabolitter i væv og kropsvæsker.

PAH-metabolitter

Skadelige PAH'er (dvs. tjærestoffer) bliver forholdsvis hurtigt omsat af CYP1A-enzymet til mere vandopløselige metabolitter (se ovenfor), som derved nemmere udskilles fra fisk, primært via galde og urin. Niveaue af PAH-metabolitter i galde kan derfor anvendes som et mål for belastning med PAH, men det skal ses i forhold til, i hvilken grad CYP1A-enzymet er induceret og derved i højere grad har potentiale til at danne disse metabolitter. Den primære PAH-metabolit i fiskegalde er 1-hydroxypyren.

Selv om PAH-forbindelser bliver hurtigt omsat, kan en del af dem alligevel være skadelige for organismen, bl.a. eftersom de bliver omdannet til særligt reaktive mellemstoffer (metabolitter), som kan reagere med og dermed skade cellernes DNA og proteiner.

Metoder og prøvetagning

Forsøget blev planlagt til at påbegyndes umiddelbart efter ovulation og befrugtning af ålekvabbehunnernes æg, da de første dage i embryonets udvikling regnes for at være den mest følsomme over for kemiske forstyrrelser. Da den præcise dato for dette ikke var kendt, og da der ikke er nogen kendt fremgangsmåde, der sikrer, at parring kan ske i fangenskab, blev der indsamlet ålekvabber 1-2 gange om ugen i en periode fra midten af august.

Indsamling

Ålekvabber til forsøget blev fanget i ruser i farvandet rundt om den lille ø Birkholm, der ligger ca. fire km sydvest for Tåsinge i Det sydfynske Øhav. Området er uden indlysende forureningskilder. Fiskene blev leveret i Skovballe på Tåsinge og transporteret i en gennemluftet tank på en trailer til feltstation Kerteminde, hvor de blev overflyttet til et opbevaringskar.

På feltstationen i Kerteminde blev tre til fem hunner aflivet med henblik på bestemmelse af deres reproduktive status. Den 7. september 2010 kunne vi konstatere, at fire ud af fire undersøgte hunner havde ovuleret, og at befrugtningen var sket. Følgelig blev forsøget sat i gang den 10. september 2010. Ålekvabberne, der indgik i forsøget, var indfanget henholdsvis den 7. og den 9. september.

Kemikalier og blandinger

De drægtige ålekvabbehunner blev eksponeret for en blanding (Dk-blanding) af de kemikalier, der i projektfase 1 fremstod som de stærkeste kandidatstoffer (TBT, PAH, dioxin), og som ifølge litteraturen har forskellige virkemekanismer.

Der anvendtes to dosisniveauer af denne blanding, Dk10 og Dk50 (*tabel 1*). Derudover eksponeredes en gruppe for en blanding (Dk+-blanding) af nonylphenol, en bromeret flammehæmmer BDE 47 (2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether) og PFOS ved en koncentration. Disse stoffer forventes at have lignende virkemekanismer som dem i Dk-blandingerne. De to blandinger kombineredes også i en eksponering (Dk50+). De resterende grupper af fisk blev eksponeret for enkeltstoffer fra Dk50-blandingen (*tabel 1*).

Der blev taget højde for eventuelle ukendte virkninger af karrenes størrelse ved at duplikere eksponeringen for Dk10, Dk50 og Dk50+ samt kontrol, således at der eksponeredes i både store og mindre kar (*tabel 1*).

Stofferne blev administreret ved opblanding i jordnøddeolie, og eksponeringen skete ved en enkelt intraperitoneal injektion ved forsøgsstart (se længere nede). Kobber blev administreret særskilt, og ikke i blandingerne, da det ikke er oplø-

seligt i jordnøddedeolie. Kobber blev derfor administreret opløst i destilleret H₂O. Eksponeringen er angivet i *tabel 1*.

Tabel 1. Forsøgsgrupper og eksponeringsniveau af stoffer.

Gruppe	Antal fisk (start)	Eksponering (per g vådvægt hun)
Kontrol	20	
Dk10	20	5 ng Sn-TBT + 200 ng pyren + 10 pgTCDD
Dk50	20	25 ng Sn-TBT + 1 µg pyren + 50 pg TCDD
Dk50+	23	25 ng Sn-TBT + 1 µg pyren + 50 pg TCDD + 500 ng NP + 2,5 ng BFR + 500 ng PFOS
Kontrol	10	
Dk10	10	5 ng Sn-TBT + 200 ng pyren + 10 pgTCDD
Dk50	10	25 ng Sn-TBT + 1 µg pyren + 50 pg TCDD
Dk50+	10	25 ng Sn-TBT + 1 µg pyren + 50 pg TCDD + 500 ng NP + 2,5 ng BFR + 500 ng PFOS
Dk+	10	500 ng NP + 2,5 ng BFR + 500 ng PFOS
TBT	10	25 ng Sn-TBT
Pyren	10	1 µg pyren
TCDD	10	50 pg TCDD
Cu	2 x 5	1 µg Cu

Der var 20 fisk i hver af de fire store kar, og 10 fisk i hver af de mindre. De sidste to små kar for kobbereksponering indeholdt fra start fem fisk hver.

Forsøgsopstilling

Forsøget blev foretaget på Syddansk Universitet, Marinbiologisk Forskningscenter i Kerteminde, som har tilladelse til at udføre dyreforsøg. Her var opstillet fire store, otte mindre (178 l) og to små kar, alle med gennemstrømmende havvand og gennemluftning.

Efter forsøgsstart blev karrene tilset dagligt og døde fisk noteret og fjernet. Vandgennemstrømning og lufttilførsel blev ligeledes kontrolleret, og vandtemperaturen blev målt. De første to uger blev fiskene ikke fodret, da de virkede lidt stressede og ikke havde interesse for føde. Herefter blev de fodret med hakkede muslinger, først én gang om ugen, siden to og til sidst i forsøget tre gange om ugen. Muslingerne var importeret fra Chile (Pesquere, San José) og var forkogte.

Forsøgsstart

På forsøgets dag 0 blev hunfisk tilfældigt udvalgt til de forskellige grupper. De blev bedøvet i ca. 0,002 % phenoxyethanol og vejnet. Ud fra vægten af hver en-

kelt fisk blev mængden af eksponeringsblanding udregnet og 4,16 µl jordnøddedeolie/g fisk blev injiceret i bughulen.

En række prøver blev udtaget fra 10 ueksponerede fisk til bestemmelse af T0-værdier for de forskellige biomarkører. Desuden blev yderligere seks fisk injiceret med Dk50+. Disse fisk blev aflivet efter 3 døgn, og vævsprøver blev udtaget til måling af optagelse af eksponeringsstofferne i æg.

Afslutning af forsøget

Forsøget blev afsluttet i uge 44, efter 7½ uge. Prøvetagningen tog i alt fire dage, så ikke alle forsøgsgrupper blev afsluttet samme dag. Ålekvabberne blev bedøvet i 0,002 % phenoxyethanol og derefter vejede og målte.

Først blev blod udtaget fra den caudale vene med en hepariniseret kanyle, og et blodsmear blev lavet på et objektglas. Ovarievæske blev udtaget ved at stikke en kanyle gennem bugvæggen ind i ovariesækken.

Vævsprøver og æg/unger blev udtaget ved dissektion umiddelbart efter, at de voksne fisk var blevet aflivet med et kraftigt slag i hovedet. Ynglen blev dissekeret ud af ovariesækken og vejede. Resten af ovarievæsken blev siet fra og vejede.

Ynglen blev bedøvet med mineralvand, talt og sorteret efter misdannelser, og billeder blev taget af hele kuldet. Herefter blev længden af alle embryonerne målt, og de blev efterfølgende nedfrosset til kemiske analyser.

De udtagne vævsprøver skulle, ud over at anvendes til de i dette projekt udvalgte analyser for biomarkører og miljøfarlige stoffer, også kunne anvendes til andre supplerende undersøgelser i forbindelse med BONUS+-projekterne BALCOFISH og BEAST. Dette indebærer, at nogle af vævsprøverne blev opdelt i flere delprøver: fx blev lever og muskel opdelt i henholdsvis syv og fire delprøver. Alle delprøver blev registeret og opbevaret separat i en biobank, så senere identifikation og analyser af individbaserede prøver kunne gennemføres. Ovariesækken blev til sidst udtaget, vejede og konserveret, og fiskens somatiske vægt (uden indre organer) blev noteret.

Undersøgelse af voksne fisk og unger

En række parametre blev undersøgt i september ved forsøgets start, tre dage efter forsøgets start, samt ved den primære prøvetagning ved forsøgets afslutning (*tabel 2*).

Tabel 2. Oversigt over de undersøgte parametre, udvalgt matrice og analysemetode.

Parameter	Matrice	Analysemetode
Biometri	Voksne drægtige hunner	Længde, vægt, vægt uden indvolde, levervægt, antal unger og kuldvægt, vægt af ovariesæk
Biometri	Yngel	Længde og vægt
Misdannelser		
Kemisk analyse	Æg og unger start og slut (Kontrol og DK50+)	LC-MS/GC-MS, GC-PFDP
Calcium	Ovarievæske, plasma	Atomabsorptionsspektrofotometri
CYP 1A-aktivitet	Lever fra voksne hunner Kontrol og Dk50+	Enzymassay
PAH-metabolitter	Galde fra voksne hunner Kontrol og Dk50+	Fluorescens og HPLC

Biometriske data

Følgende biometriske mål blev taget på alle fisk: længde (til nærmeste 0,5 cm), totalvægt, vægt uden indvolde og gonader, vægt af lever, vægt af kuld, vægt af ovariesæk og ovarievæske, antal unger i kuld og ungerens længde.

Ud fra disse data blev følgende udregnet:

- Konditionsindeks (KI) voksne hunner (vægt uden indvolde (g)/længde³ (cm))*100)
- Leversomatisk indeks (LSI) (levervægt (g)/ vægt uden indvolde (g)*100)
- Gonade-somatisk indeks (GSI) (ungers vægt (g) + vægt af ovariesæk (g) + vægt af ovarievæske (g)/ vægt uden indvolde (g) *100)
- Konditionsindeks unger (Klu) (gennemsnitsvægt af unger fra kuld (g)*100/gennemsnitslængde³ (cm) af unger fra kuld)
- Reproduktiv kapacitet (RK): Antal unger uden dværgvækst/hunnens vægt uden indvolde (g)

Misdannelser/unormal udvikling i ålekvabbeunger

Unormal udvikling hos ålekvabbeunger kan inddeles i 10 forskellige typer af fejludviklede unger, som beskrevet i den tekniske anvisning for NOVANA (Strand & Dahllöf 2005) (tabel 3).

Tabel 3. Karakterisering af forskellige typer af fejludviklede unger i kuld fra ålekvabbe (efter Strand & Dahllöf 2005).

0	Befrugtede æg eller embryoner, der lige er klækket (< 10 mm)
A	Døde unger uden misdannelser (> 10 mm)
B	Unger med misdannelser i blommesæk eller indvolde
C	Unger med 'vinkelknæk' på rygrad
D	Unger med spiralformet rygrad
E	Unger med defekt på øjne eller manglende øjne
F	Unger med misdannelser i hovedet
G	To sammenvoksede unger, eventuelt som siamesiske tvillinger
H	Andre abnormiteter, evt. som calcificerede unger eller sammenfiltrede klynger
I	Signifikant mindre unger, 'dværgvækst'

Misdannede unger blev karakteriseret visuelt som tilhørende type B-G. Der var ingen forekomster af type H.

En længdefordeling af ungerne blev fundet ved at måle længden af alle levende, normalt udviklede unger i længdegrupper á 2,5 mm. Normalt tilhører næsten alle unger i et kuld tre grupper. De unger, der faldt to kategorier under de tre hovedgrupper, blev kategoriseret som dværge (type I).

Denne karakterisering af markante, synlige misdannelser udelukker ikke, at andre ikke umiddelbart synlige skadelige effekter på ungeudviklingen, fx i form af skader på nervesystemet eller blodkredsløbet, er til stede.

Calciummålinger i blod og ovarievæske

Prøver af blod på 0,5-1 ml til calciumanalyser blev udtaget med hepariniseret 1 ml sprøjte med kanyle. Plasma blev udtaget og frosset ned på tøris efter centrifugering i Eppendorfrør ved 2.500 rpm i fem minutter. Herefter blev plasma frosset ved -80°C indtil analyse.

Ovarievæske til calciummålinger blev ved prøvetagningen i november udtaget med en kanyle gennem bugvæggen på den aflivede fisk og overført til Eppendorfrør. Herefter blev væsken frosset ved -80°C indtil analyse.

Før analyse blev prøverne fortyndet 100 gange i 0,1 % La₂O₃. Koncentrationen af totalt calcium (fri og bundet) i ovarievæske og -plasma blev målt med atomabsorptionsspektrofotometri (Perkin Elmer).

CYP1A-analyser

Leverprøver til måling af aktiviteten af CYP1A-afgiftningenszymer blev nedfrosset i flydende kvælstof direkte efter afvejning og opbevaret ved -80°C. Aktivite-

ten af CYP1A blev målt som EROD (Ethoxyresorufin-O-deethylase) i S9-fraktionen af en homogeniseret lever fra de drægtige ålekvabbe og normaliseret til proteinniveauet målt ved Bradford-metoden. Analyserne blev udført i henhold til ICES guideline (Stagg & McIntosh 1998).

Kemiske analyser

De 10 ekstra fisk, som blev eksponeret for Dk50+-blandingen i starten af forsøget, samt ikke eksponerede fisk fra T0 blev brugt til at vurdere kemikaliekoncentrationen i æg. Tre dage efter injektionen blev disse fisk aflivet. Æg fra samtlige individer blev puljet og efterfølgende delt op til analyser af de forskellige stoffer. På samme måde blev unger fra Dk50+-blandingen og kontrollen puljet til sidst i eksperimentet, og de tilsvarende analyser blev foretaget som et mål for eksponering i løbet af forsøget.

Samtlige analyser blev udført ved DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi (det tidligere DMU), Aarhus Universitet, ifølge de tekniske anvisninger for NOVA/NOVANA (Pedersen et al. 2004a-c; Strand & Dahllöf 2005). Analysemetoder, detektionsgrænser og usikkerhed for samtlige stoffer findes i Annex 1, tabel 2. Usikkerheder er angivet som de akkrediterede usikkerheder, idet der ikke var mulighed for dobbeltbestemmelser.

Analyser af PAH-metabolitter

I de grupper af ålekvabber, der i dette eksperiment også blev eksponeret for pyren (enten alene eller i en blanding), blev koncentrationerne af PAH-metabolitten 1-hydroxypyren bestemt ved brug af fluorescens-metoden Synkron Fluorescens Scan (delta 41nm) på prøver af galde og urin, der var fortyndet henholdsvis 2000 og 100 gange i methanol:vand (50 % v/v). Koncentrationen blev bestemt ved ekstern kalibrering til en standard af 1-hydroxypyren, og derpå justeret med faktor 1,7 for at korrigere for den højere fluorescens af konjugerede sammenlignet med dekonjugerede pyren-metabolitter (Tairova et al. *in press*). Som en del af kvalitetssikringen har denne metode i 2010 også opnået tilfredsstillende resultater i en international interkalibrering om PAH-metabolitter i fiskegalde i 2010 (Kammann 2010).

Databehandling og statistik

Fisk, hvor der kun blev fundet ubefrugtede æg, et overtal af ubefrugtede æg eller mindre end 10 unger, blev ikke inkluderet i dataanalysen.

I databehandlingen blev grupperne eksponeret for identiske kemikalier i henholdsvis store og mindre kar slået sammen.

I overvågningssammenhæng betragtes et kuld som påvirket, når der er 5 % eller flere deformerte unger (type B-G). Denne grænse er beregnet efter den forekomst af deformiteter, som findes i områder med lille og diffus belastning af miljøfarlige stoffer. Når man summerer alle grupper af misdannelser under betegnelsen abnorm udvikling, er grænsen for påvirkning på tilsvarende måde sat til mere end 10 % med abnorm udvikling i et kuld, da der også er naturlig forekomst af unormal tilvækst oven i deformiteter.

Hypighederne af de forskellige typer af misdannelser blev opgjort i de enkelte grupper dels som gennemsnit af antal unger, og dels som procent af kuld inden for hver behandling med mere end 5 % misdannelser af type B-G, og med mere end 10 % misdannelser af alle typer (abnorm udvikling). Signifikante forskelle i misdannelser mellem de eksponerede fisk og kontrol blev testet ved en ensidet Chi^2 med Fisher's exact test, som bruges, når antal individer i de forskellige grupper er lavere end fem i én af grupperne.

Til de biometriske målinger blev envejs variansanalyse (ANOVA) anvendt, efterfulgt af Bonferroni's Multiple Comparison Test, for at sammenligne de forskellige grupper baseret på middelværdier. Forskelle i konditionsindeks for unger og reproduktiv kapacitet mellem procent af kuld inden for hver behandling blev derudover vurderet ved Chi^2 med Fisher's exact test.

Analyserne blev foretaget ved hjælp af GraphPad Prism 5, og der blev anvendt et signifikansniveau på $\alpha = 0,05$.

Resultater

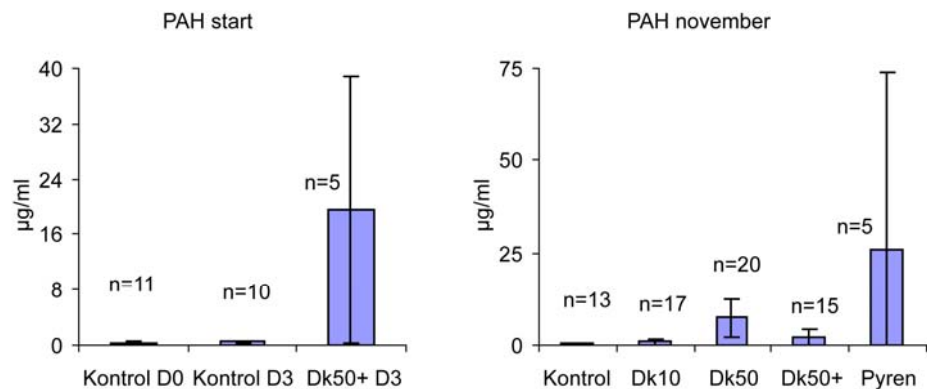
I dette kapitel gennemgås resultaterne af laboratorieforsøget med eksponering af drægtige ålekvabbeuner for kandidatstoffer, som mistænkes for at kunne forklare fund af misdannelser i ålekvabbeunger.

Eksponering af æg og unger

Alle stoffer, undtagen pyren, blev målt på puljede prøver af æg og unger, hvorimod PAH-metabolitter blev målt i individuelle hunner som et mål for pyreneksponering.

PAH-metabolitter

Der var lave niveauer af PAH-metabolitter i de indfangede fisk samt i kontrolfisk tre dage efter injektion (*figur 1*). Koncentrationerne var forhøjede i Dk50+-fisk efter tre dage, hvilket tyder på en igangsat metabolisering. Den store variation i koncentration for DK50+ fisk kan være et udslag af såvel individuelle forskelle i metabolisering, som variation i eksponeringssucces.



Figur 1. PAH-metabolitter i galde ved start og afslutning af forsøget. Standardafvigelser angiver 95 % konfidensinterval og n antal fisk i hver gruppe. D0 angiver forsøgsstart og D3 tre dage efter start.

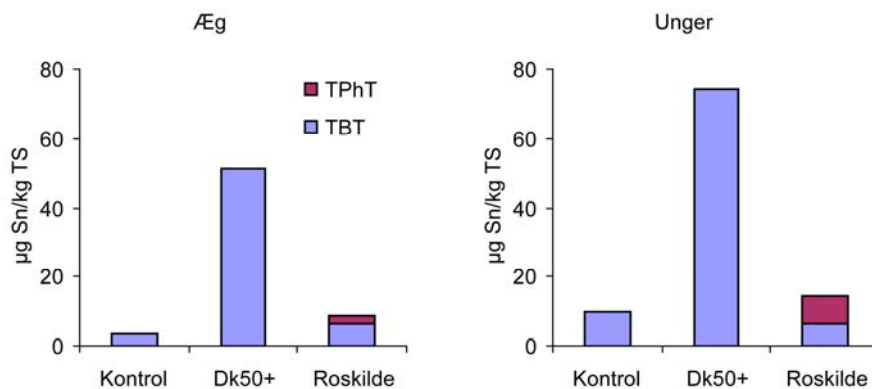
Koncentrationerne var stadig lave i kontrolfisk ved forsøgets afslutning, men der var forhøjede niveauer i de fisk, som var blevet eksponerede for pyren og mest i de fisk, som kun havde fået pyren, selv om den oprindelige eksponering med pyren var ens i Dk50, Dk50+ og kun pyren. Igen var der store individuelle forskelle i koncentration.

TBT, TCDD, PFOS, BFR og NP

Koncentrationerne i æg og unger fra forsøgets kontrolgruppe og Dk50+-gruppe er sammenlignet med koncentrationerne i æg og unger fra feltstudiet (Dahllöf &

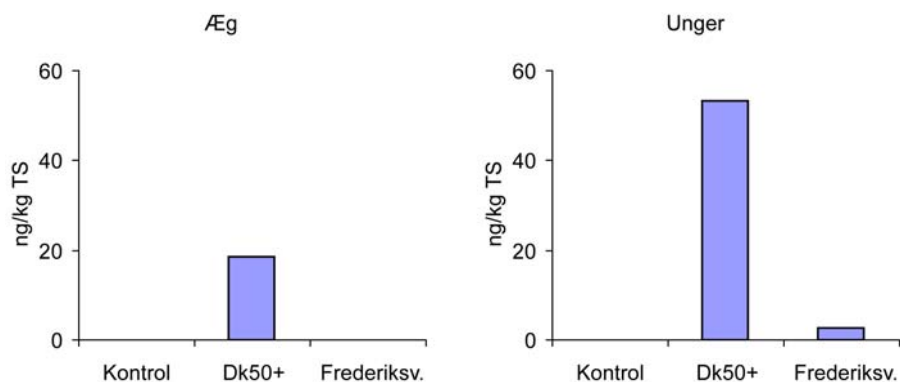
Strand 2010). Sammenligningen er enten med Roskilde eller Frederiksværk afhængigt af, hvor koncentrationerne i felten var de højeste.

Koncentrationerne af TBT i forsøget, som repræsentant for summen af TBT og phenyltin (TPhT) i miljøet, i æg og unger var ca. 10 gange højere i DK50+ end i kontrolgruppen og i felten ved Roskilde (*figur 2*). Der var kun lave koncentrationer af nedbrydningsprodukterne DBT og MBT i forsøget og ikke nogen forøgelse over tid (ikke vist).

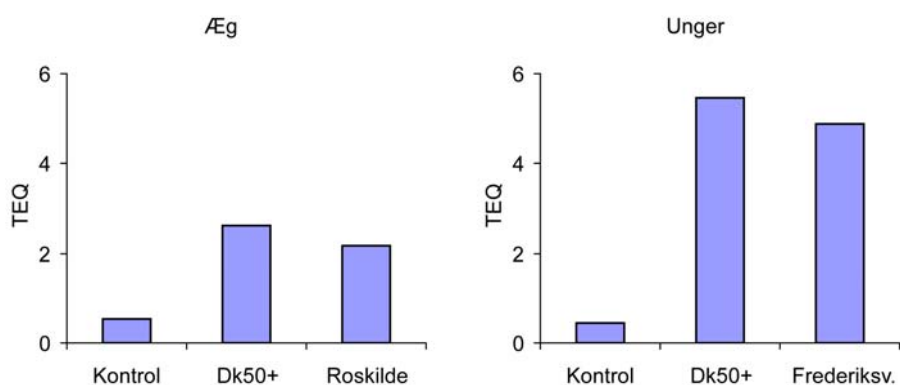


Figur 2. TBT- og TPhT-koncentrationer i æg og unger sammenlignet med Roskilde i august (æg) og november (unger).

TCDD-koncentrationen i æg og unger fra Dk50+-gruppen var mindst 20 gange højere end koncentrationerne fundet i felten (*figur 3*). Eftersom TCDD blev benyttet som substitut for den samlede belastning af dioxin, furan og dioxinlignende PCB'er, er det mere hensigtsmæssigt at sammenligne de toksiske ækvivalenter (TEQ). Ved omregning til toksiske ækvivalenter svarede den samlede eksponeringsbelastning i æg og unger til de niveauer, som blev målt i felten (*figur 4*).

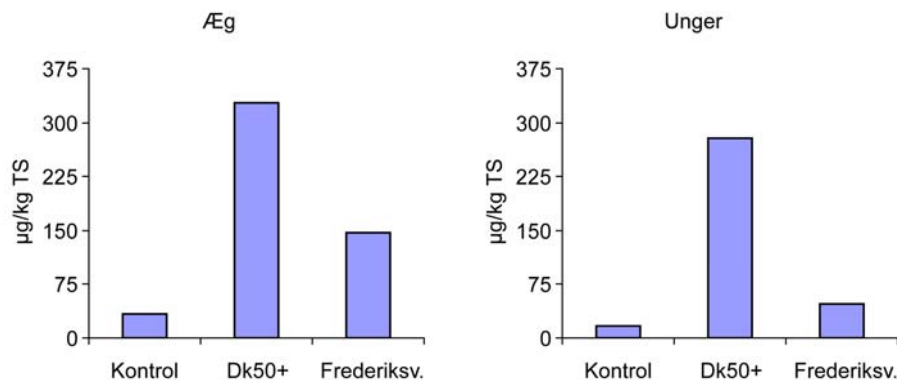


Figur 3. TCDD-koncentrationer i æg og unger sammenlignet med Frederiksværk i august (æg) og november (unger).



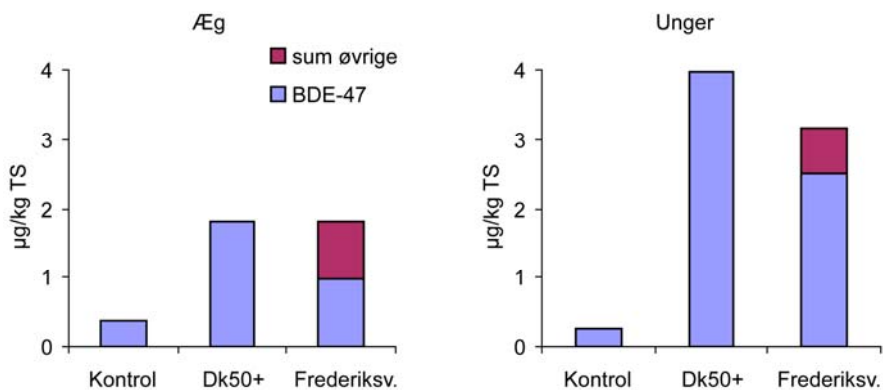
Figur 4. TEQ-WHO-ækvivalenter i æg og unger sammenlignet med Roskilde i august (æg), og med Frederiksværk november (unger).

Koncentrationerne af PFOS i de eksponerede æg og unger var to og fem gange højere end de koncentrationer, som blev målt i æg og unger fra Frederiksværk (figur 5).



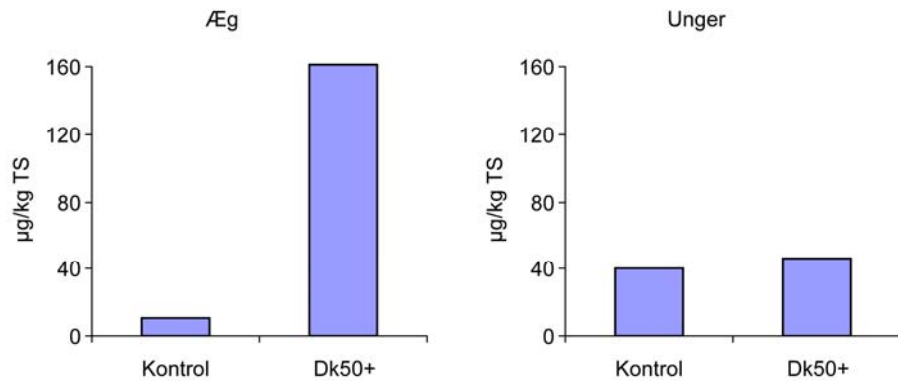
Figur 5. PFOS-koncentrationer i æg og unger sammenlignet med Frederiksværk i august (æg) og november (unger).

Ålekvabberne blev eksponeret med ren BDE-47 som repræsentant for bromerede flammehæmmere. Eksponeringen var i samme størrelsesorden som målt i felten i såvel æg som unger (figur 6).



Figur 6. BFR-koncentrationer i æg og unger sammenlignet med Frederiksværk.

Der foreligger ikke NP-data fra felten til at sammenligne med. Eksponeringen resulterede i forhøjede koncentrationer i æg, men der var ingen forskel mellem unger fra eksponerede fisk og kontrolfisk sidst i forsøget (figur 7).



Figur 7. NP-koncentrationer i æg og unger fra forsøget.

Overførsel fra moder til æg og unger

Den beregnede TBT-eksponering for hunner (125 µg Sn/kg tørstof (TS)) var ca. 10 gange højere end den samlede TBT- og TPhT-mængde, som blev målt i ålekvabbehunner i feltstudiet. Tilsvarende var den beregnede eksponering af hunner for dioxinen TCDD (250 ng/kg TS) 1000 gange højere end det, som blev målt for TCDD i felten. Regnet som TEQ, var eksponeringen 10 gange højere end i felten.

For PFOS og NP kendes niveauerne i voksne ålekvabber fra felten ikke, men den beregnede eksponering af hunner var 2.500 ng/kg TS for begge stoffer.

Da stofferne ikke blev målt direkte i hunnerne (undtaget pyren, som dog ikke blev målt i æg og unger), kan overførsel ikke beregnes på traditionel vis. Derimod kender vi mængden af injiceret stof i hunnernes bughule, koncentrationer i puljer af æg og unger, samt vægt af hunner, æg og unger. Derved kan den procentuelle overførsel af injicerede mængde i hunner til æg og unger beregnes, uden at optagelsen i moderfisken er kendt.

Stofferne var kun i mindre mængder overført til æggene tre dage efter eksponeringen af hunnerne (tabel 4).

Tabel 4. Overførsel af injiceret mængde stoffer i hunner til æg (september) og unger (november).

Overførsel fra moder til:	TBT (%)	PFOS (%)	NP (%)	TCDD (%)	ΣBFR (%)
Æg	2,7	0,8	0,4	3,7	0,8
Unger	13,9	2,8	0,1	52,5	7,96

Ved forsøgets afslutning var dog hele 52,5 % af TCDD overført til ungerne. TBT, PFOS og BFR blev også overført i løbet af forsøget, men ikke i den samme grad som TCDD. Den procentuelle overførsel af NP til æg og unger var lav.

Biometri og kondition

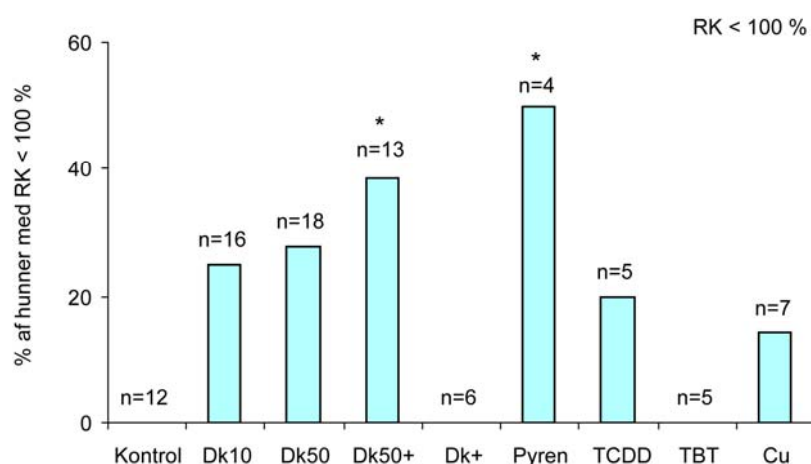
Der var ingen effekter på fiskernes grundlæggende biometri. Gennemsnitslængden for de drægtige ålekvabber var 28,0 cm (fra 19,8 cm til 33,0 cm), og deres vægt var i gennemsnit 108,2 g (fra 46,9 g til 193,0 g). Der var en stor individuel variation i størrelsen af kuldene, men uafhængigt af eksponeeringsstatus. Gennemsnittet lå på 110,6 unger/kuld. Vægten af hele kullet var i gennemsnit 15,3 g, og længden og vægten af de individuelle unger var i gennemsnit 34,4 mm og 0,139 g ved forsøgets afslutning. Vægten af ovariesæk og ovarievæske var heller ikke påvirket af eksponeeringen. Biometri for de forskellige behandlinger findes i Annex A.

Fiskenes kondition blev også vurderet ved en række indeks (tabel 5). Konditionsindekset (KI) faldt fra forsøgets start til dets afslutning (se Annex A), hvilket skyldes den metaboliske omkostning ålekvabberne har ved at forsyne de voksende unger. Det leversomatiske (LSI) og gonadesomatiske (GSI) indeks var i gennemsnit henholdsvis 2,1 og 34,8 %.

Tabel 5. Konditionsindekser for hunner ved forsøgets afslutning. LSI - lever somatisk indeks, KI - konditionsindeks, GSI - gonadesomatisk indeks, RK - reproduktiv kapacitet.

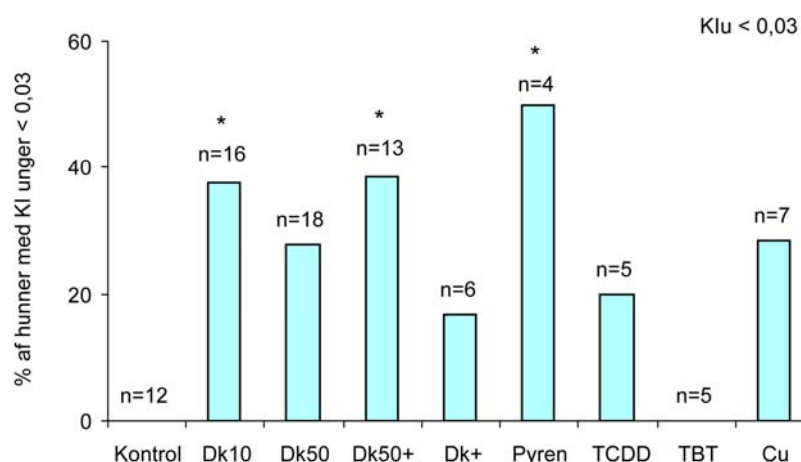
Gruppe	Antal fisk	LSI	KI	GSI	RK
Kontrol	13	2,1 ± 0,9	0,33 ± 0,04	34,7 ± 9,7	166 ± 46
Dk10	17	2,0 ± 0,8	0,33 ± 0,03	33,5 ± 12,4	146 ± 65
Dk50	20	1,9 ± 0,6	0,32 ± 0,03	28 ± 9,1	129 ± 63
Dk50+	16	2,2 ± 0,6	0,31 ± 0,02	32,8 ± 11	132 ± 68
Dk+	7	2,0 ± 0,7	0,32 ± 0,05	37,6 ± 8,2	161 ± 37
TBT	5	1,9 ± 1,1	0,31 ± 0,02	40,2 ± 11,9	137 ± 61
Pyren	5	2,2 ± 1,0	0,32 ± 0,05	28,3 ± 12,8	109 ± 61
TCDD	5	2,1 ± 0,7	0,30 ± 0,03	38,2 ± 5,8	136 ± 33
Cu	7	2,2 ± 0,5	0,32 ± 0,03	39,4 ± 4,9	145 ± 44

Der var ingen signifikant forskel mellem grupperne beregnet som middelværdier af indeks. Derimod var der signifikant flere hunner med en reproduktiv kapacitet (RK) på mindre end 100 % i Dk50+ og pyreneksponeringen, og fire af de andre eksponeringsgrupper havde også et større antal med reduceret RK sammenlignet med kontrollen, hvor alle hunner havde et RK > 100 % (figur 8).



Figur 8. Andel hunner med lavere end 100 % reproduktiv kapacitet. n angiver antal og * signifikant forskel fra kontrol ($p < 0,05$).

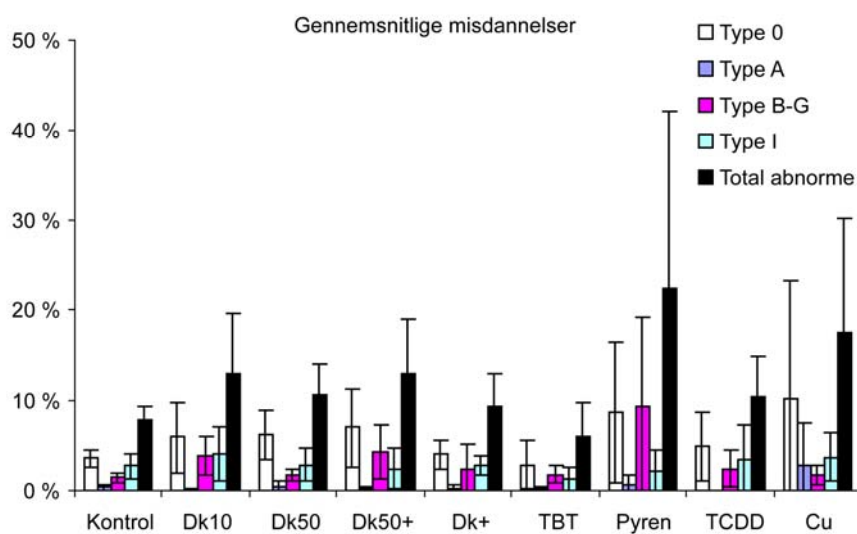
Konditionsindekset for ynglen var ikke signifikant forskelligt mellem forsøgsgrupperne, beregnet som middelværdier, men der var signifikant flere kuld med lavt konditionsindeks ($< 0,03$) i Dk10, Dk50+ samt pyrengruppen, samtidig med at der også var et forhøjet antal i de andre eksponeringer undtagen TBT (figur 9).



Figur 9. Andel hunner med kuld hvor kuldets konditionsindeks er lavere end 0,03. n angiver antal og * signifikant forskel fra kontrol ($p < 0,05$).

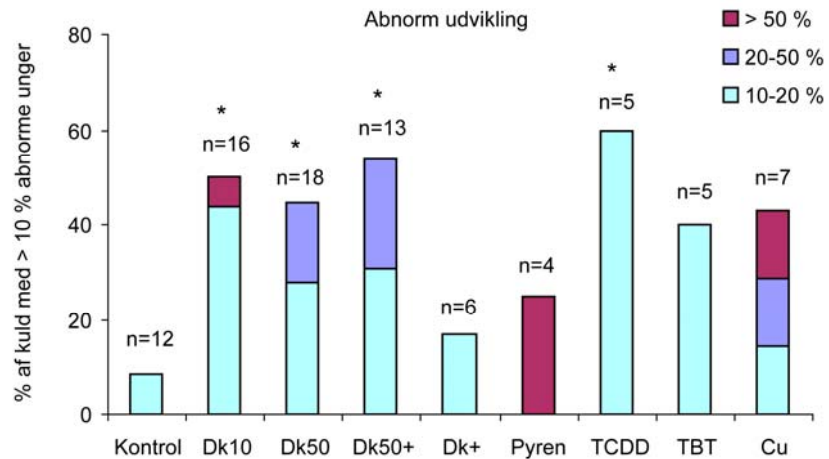
Misdannelser i unger

Der blev konstateret abnorm udvikling hos 8 % af ungerne i kontrolgruppen og selv om der var en overordnet tendens til, at eksponering af moderfisken for de udvalgte eksponeringsstoffer forårsagede en øget frekvens af misdannelser i ynglen, var denne tendens dog ikke statistisk signifikant, når resultaterne blev behandlet som gennemsnitligt antal misdannet yngel i kuld (*figur 10*).



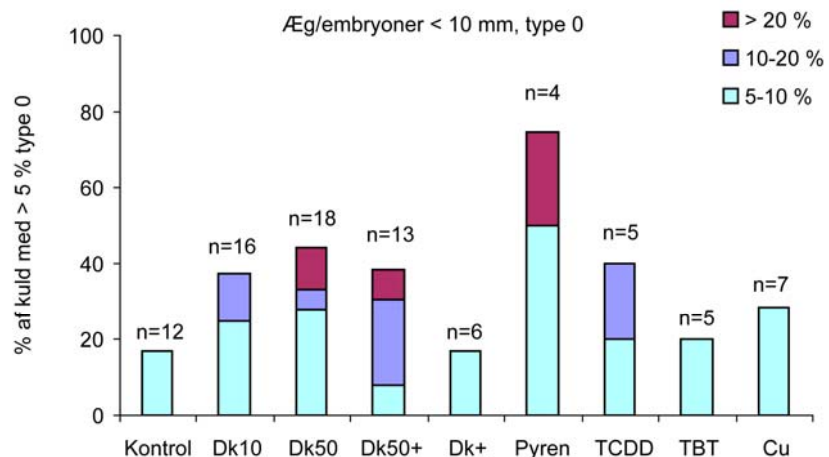
Figur 10. Gennemsnitlig andel af abnorm yngel (tidigt døde (type 0), sent døde (type A), misdannede (type B-G), dværge (type I) og sammenlagt (alle typer)) i de forskellige eksponeringsgrupper. Standardafvigelser angiver 95 % konfidensinterval.

Når resultaterne blev behandlet som andel af kuld med mere end 10 % abnormt udviklede unger, er resultatet signifikant for grupperne Dk10, Dk50, DK50+ og pyren (*figur 11*). Kuld med mere end 20 % misdannelser fandtes i Dk10, Dk50, DK50+, pyren og kobber.



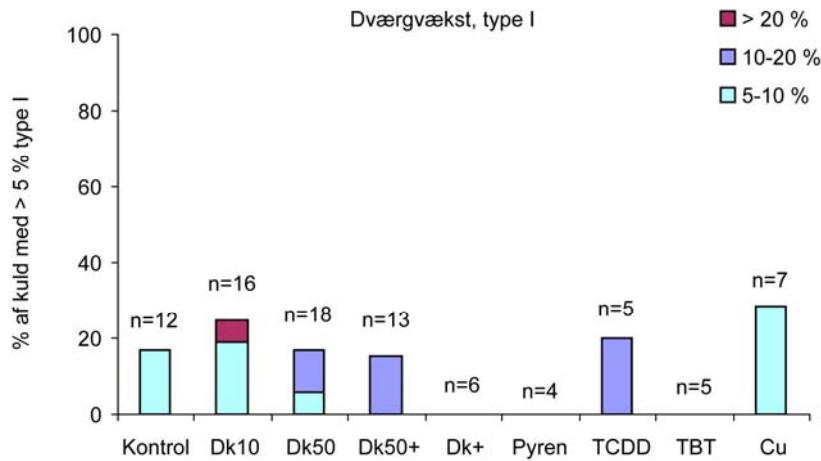
Figur 11. Andel af kuld med mere end 10 % abnormt udviklede unger (type 0, A-I). n angiver antal replikater og * angiver $p < 0,05$ (χ^2 , Fischer exact test).

Antallet af æg, som ikke var nået længere i udviklingen end at være befrugtede, eller hvis udvikling var standset lige efter klækning (type 0), var højere i de fleste eksponerede grupper (undtaget Dk+ og TBT) end i kontrolgruppen – dog uden at forskellene var statistisk signifikante (figur 12). I Dk10, Dk50, Dk50+, pyren samt TCDD fandtes derudover kuld med mere end 10 % misdannelser.



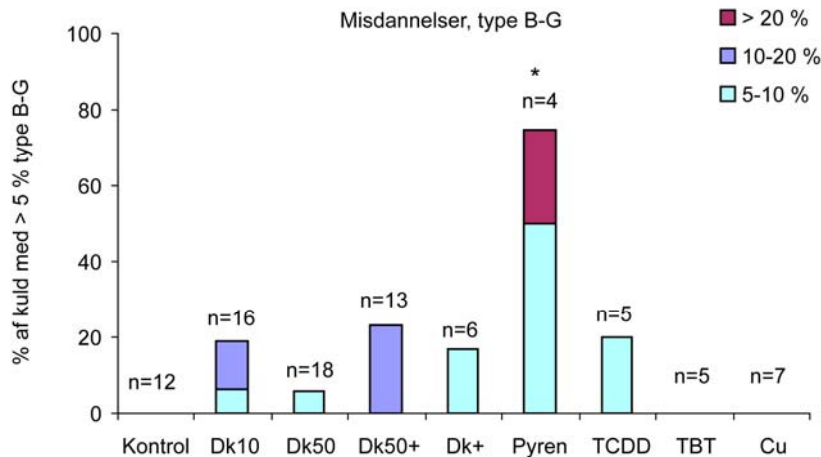
Figur 12. Andel af kuld med mere end 5 % type 0. n angiver antal replikater.

Der var heller ikke signifikante forskelle i dværgvækst (type I) i nogen af eksponeringerne sammenlignet med kontrolgruppen, og andelen af påvirkede kuld var også lavere end for type 0 (figur 13). Dog var der kuld med mere end 10 % misdannelser i visse af eksponeringerne.



Figur 13. Andel af kuld med mere end 5 % dværgvækst (type I). n angiver antal replikater.

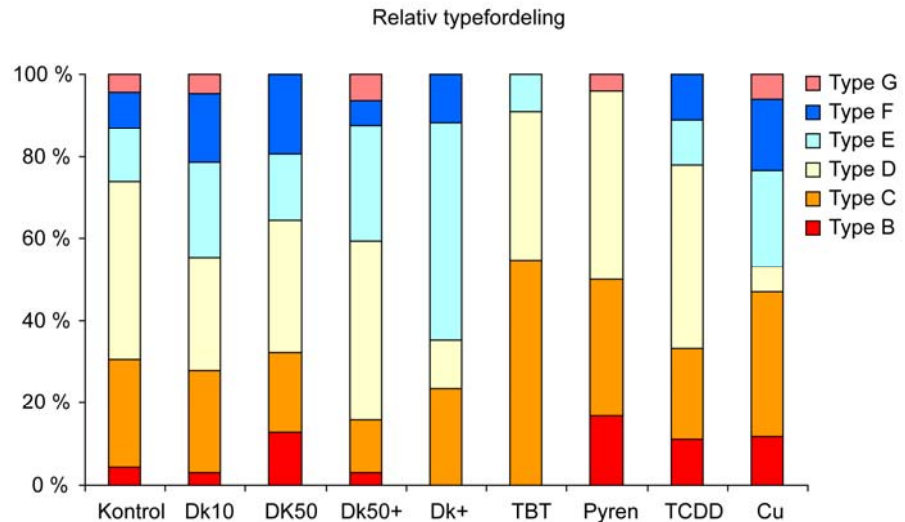
I kontrolgruppen og grupperne eksponeret for TBT og kobber havde ingen hunner mere end 5 % misdannelser af typen B-G i deres kuld, hvorimod der var forhøjet forekomst ved de andre eksponeringer; forskellen var dog kun statistisk signifikant i pyrengruppen (figur 14). Derudover fandtes kuld med mere end 10 % misdannelser i Dk10, DK50+ samt i pyren.



Figur 14. Andel af kuld med mere end 5 % misdannelser af type B-G. n angiver antal replikater.

Tidligt døde unger uden misdannelser (type A) i mere end 5 % af de enkelte kuld forekom kun i kobbereksponeringen. Forskellen var ikke statistisk signifikant i forhold til kontrolgruppen.

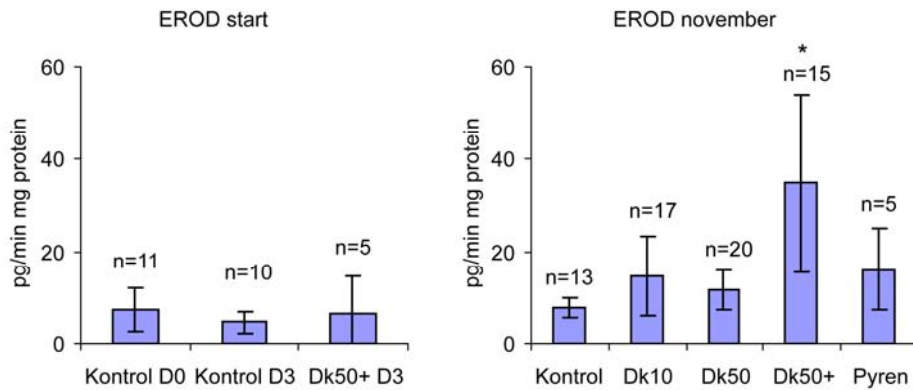
Den relative forekomst af deformiteter type B-G varierede mellem de forskellige eksponeringer (figur 15), men direkte sammenhæng til stoffer kunne ikke udledes.



Figur 15. Relativ fordeling af deformiteter type B (blommesæk eller indvolde), C (vinkelknæk på ryggrad), D (spiralformet ryggrad), E (defekt på øjne eller manglende øjne), F (misdannelser i hovedet), G (sammenvoksede unger, eventuelt som siamesiske tvillinger).

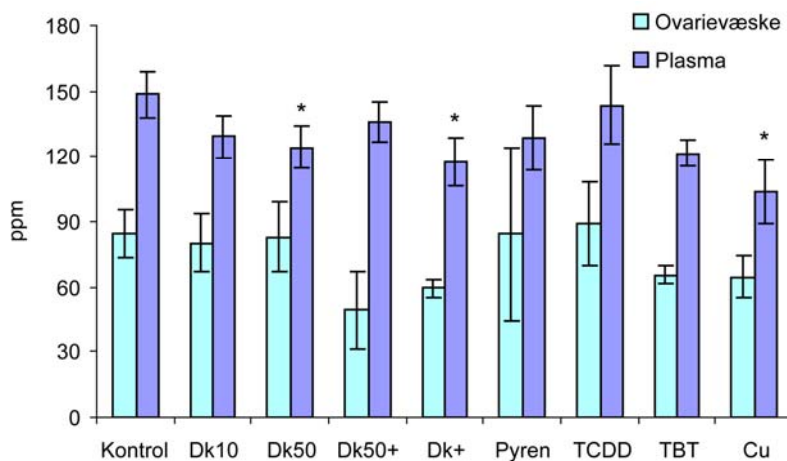
Øvrige biomarkører

CYP1A-aktiviteten tre dage efter eksponering var noget forhøjet i Dk50+ blandingen, men ikke signifikant forskellig fra kontrollen. Sidst i forsøget var aktiviteten også forhøjet i forhold til kontrollen, men kun signifikant for Dk50+ (figur 16).



Figur 16. CYP1A-aktivitet målt som EROD i hunner ved starten og afslutningen af forsøget. Standardafvigelser angiver 95 % konfidensinterval, n antal fisk i hver gruppe og * signifikant forskel fra kontrollen.

Calciumkoncentrationerne i plasma var reducerede i ålekvabbehunnerne eksponeret for Dk50, Dk+ og kobber i forhold til niveauerne hos kontrolhunnerne (figur 17). Samme tendens sås i ovarievæsken, men her var forskellen dog ikke statistisk signifikant.



Figur 17. Calciumkoncentrationer i ovarievæske og plasma i hunner fra forskellige eksponeringsgrupper. * indikerer en signifikant forskel fra kontrolgruppen.

Diskussion

Formålet med denne laboratorieundersøgelse var at forsøge at etablere en årsagssammenhæng mellem de observerede misdannelser i ålekvabbeynglen og udsættelse for stærke kandidatstoffer i miljøet ved eksperimentel eksponering af ålekvabbehunner med miljørelevante doser af stofferne.

Eksponering

Vurderet ud fra koncentrationerne af kandidatstofferne i æg og unger i Dk50+-gruppen syntes eksponeringen at være forholdsvis vellykket, idet koncentrationerne i æg og unger var på niveau med eller højere end koncentrationerne fundet ved Roskilde og/eller Frederiksværk. Da de enkelte stoffer er udvalgt som repræsentanter for stofgrupper, er det derfor ikke urealistisk at antage, at blandingerne dækker det miljørealistiske niveau hos ålekvabber i belastede områder.

Nonylphenol var det eneste stof, hvor koncentrationen var markant højere i æg end i unger tre dage efter injektionen. Da nonylphenol – i modsætning til de andre kandidatstoffer – er hurtigt omsætteligt ($T_{1/2} = 10$ timer hos hundestejle, Ekelund et. al. 1990) hos fisk, er dette resultat ganske som forventet.

I dette forsøg blev eksponeringen målt ved at pulje æg og unger i Dk50+-eksponeringen, hvor alle stoffer undtaget kobber indgik. Derved er der ikke mulighed for at vurdere individuelle forskelle i eksponering.

PAH-metabolitter i hunner kan dog bruges som en indikation på individuelle variationer i eksponering, som kan skyldes individuelle forskelle i optag og metabolismering. De store variationer mellem individer i såvel Dk50+- som pyren-eksponerede fisk tyder på, at der er stor forskel i eksponering mellem individer samt i metabolismering løbet af forsøget.

Misdannelser og abnorm udvikling af unger

Der var en overordnet tendens til, at eksponeringen for de udpegede kandidatstoffer forårsagede en forøget frekvens af misdannelser (type B-G) i ungerne. I kontrollen, TBT og kobber forekom ikke kuld med mere end 5 % deformiteter af type B-G, hvorimod de andre eksponeringer havde en effektstørrelse på mellem 5 og 40 %, dvs. over niveauet for naturligt forekommende misdannelser, og på størrelse med de niveauer man finder i forurenede områder. Dk10, Dk50, Dk50+, samt TCDD var de eksponeringer, som gav kuld med mere end 10 eller 20 % misdannelser af type 0, I og total abnorm udvikling.

En forholdsvis stor dødelighed blandt forsøgsdyrene betød, at kun effekter, som var mere end 35 % større end i kontrolgruppen, faldt signifikant ud, når antal fisk i de enkelte grupper var flere end 12. Tilsvarende krævedes en effektstør-

relse på 50 % for eksponeringsgrupper med mindre end 10 fisk i hver. Styrken i testene var derfor lille, eftersom der kræves mellem 35 og 50 % effektøgning i forhold til kontrol, hvis der skal opnås et signifikansniveau på 5 %. Til sammenligning kan det noteres, at den signifikante detektérbare forskel af effektstørrelse i overvågningssammenhæng er 10 %, eftersom der undersøges 50 kuld pr. station for at dække variationen i effekter mellem individer fra den samme lokalitet. Da fisk fra miljøet blev brugt i forsøget, indgår den naturlige variation i følsomhed og kondition mellem individer, selv om hunnerne havde de samme forhold efter eksponering.

Misdannelsesfrekvenser på 35-50 % er betegnende for stærkt forurenede områder. I de to forurenede lokaliteter Roskilde og Frederiksværk, hvilke eksponeringen i dette forsøg er baseret på, var effekterne i 2002 høje (20-55 %), men har i de efterfølgende år været omtrent 10-15 % for type B-G. Tilsvarende betragtes områder som referenceområder, hvis der er mindre end 5 % af antal kuld, som har > 5 % deformiteter af type B-G. For abnormt udviklede unger er baggrundsniveauet tilsvarende mindre end 10 % abnormt udviklede unger.

I dette tilfælde, når den statistiske styrke er lille, kan man ikke konkludere, at stofferne ikke har en effekt, selv om antallet af signifikante resultater er lavt. Som supplement kan man derfor bruge en weight-of-evidence (WOE) tilgang, hvor effektstørrelserne også inddrages. Som tærskelværdier i weight-of-evidence tilgangen bruges den signifikant detektérbare effektstørrelse i felten, når man undersøger kuld af 50 hunner, dvs. en forskel på 10 %.

TBT og Dk+ var de to eksponeringer, som resulterede i de mindste effektstørrelser i forhold til kontrollen, efterfulgt af Dk50 (tabel 6). Kobberekspone- ring havde flest indikatorer (fem af seks) med effektstørrelse > 10 % af kontrol, mens de øvrige havde fire af seks.

Tabel 6. Forskel i effektstørrelse i forhold til kontrolgruppen (%). Mørke felter viser effektstørrelser > 10 %. Negative værdier indikerer, at der var færre misdannelser end i kontrolgruppen.

	Dk10	Dk50	Dk50+	Dk+	Pyren	TCDD	TBT	Cu
Abnorm udvikling	42	36	46	8	17	52	32	35
Type 0	21	28	22	0	58	23	3	12
Type A	0	0	0	0	0	0	0	14
Type B-G	19	6	23	17	75	20	0	0
Type I	8	0	-1	-17	-17	3	-17	12
Klu <0.03	38	28	38	17	50	20	0	29

Tidligt døde unger og dværgvækst (type A og I) udviste de mindste forskelle i forhold til kontrolgruppen, og dværgvækst var desuden i visse tilfælde mindre end i kontrollen. Tidlig død kan skyldes direkte toksiske effekter af ekspone-

ringsstofferne, men det kan også have andre årsager. Generel stress eller hvis hunålekvabberne er udsatte for hypoxi, kan også føre til tidlig død af unger (Strand et al. 2004, Eriksen et al. 2006). Indfangning og overførsel til laboratorieforhold, næsten uden tid til akklimatisering, kan være den stress, som var årsag til såvel type A og I effekter som dødelighed af ålekvabbehunner.

Den hyppigst forekommende misdannelse i de fleste grupper, inklusive kontrolgruppen, var spiralformet ryggrad efterfulgt af vinkelknæk på ryggraden. Andre studier, hvor forekomst af misdannelser i vilde ålekvabber er blevet undersøgt, har også noteret fortrinsvis rygsøjlemisdannelser (Strand et al. 2004, Gercken et al. 2006).

En tilsvarende WOE-tilgang for de biomarkører, som blev målt i ålekvabbehunner (*tabel 7*), viser igen, at Dk+ og TBT, denne gang sammen med TCDD, var eksponeringerne med de færreste forskelle i forhold til kontrol, efterfulgt af kobber og pyren.

Tabel 7. Forskel i effektstørrelse i forhold til kontrolgruppen. Mørke felter viser effektstørrelser på mere end 10 %.

	Dk10	Dk50	Dk50+	Dk+	TBT	Pyrene	TCDD	Cu
Ovarievæske	0.95	0.98	0.58	0.702	0.993	1.052	0.774	0.76
Plasma	0.87	0.84	0.91	0.791	0.866	0.966	0.819	0.70
EROD	0.00	1.49	4.50	i.a.	i.a.	2.08	i.a.	i.a.
PAH	1.70	14.2	4.50	i.a.	i.a.	50.2	i.a.	i.a.
RK	0.25	0.28	0.38	0	0.5	0.2	0	0.14

Sammenhæng mellem eksponering og effekter

Misdannelser

Selv om effekterne i de eksponerede kuld var større end i kontrolkuldene, var der ikke en simpel sammenhæng mellem størrelsen af effekten og eksponeringsniveauet eller typen af stof. For deformiteter (type B-G) svarer Dk10 dog til en additiv effekt af enkeltstofferne TBT, pyren og TCDD, og DK50+ svarer til en additiv effekt af Dk50 og Dk+. Men effekten af såvel Dk50 som Dk50+ var meget mindre end, hvad der kunne forventes ved additive effekter af enkeltstofferne.

Dette kan skyldes to ting: 1) at eksponeringen ikke ramte det rigtige tidspunkt for alle individer, 2) at der er antagonistiske interaktioner, når en fisk samtidigt udsættes for mange stoffer i høje koncentrationer.

Det er veldokumenteret, at udviklingen af skelet, muskler og organsystemer er specielt følsom over for påvirkninger fra teratogene stoffer i en begrænset periode (Manson & Wise 1991, Bentivegna & Piatkowski 1998). Misdannelser, tera-

togene effekter, induceres i perioden fra ægget anlægges i hunner (vitellogenese) op til klækningstidspunktet (Bodammer 1993). Ved at injicere kandidatstofferne i bughulen inden for en periode på ca. 7 dage efter befrugtningen, var en del af den følsomme periode dækket i forsøget.

Mange af de stoffer, som blev brugt i forsøget, interagerer med de samme receptorer og proteiner i cellerne. Denne type af interaktioner kan være såvel forstærkende (agonistiske) som hæmmende (antagonistiske). I dette forsøg var det ikke muligt at inkludere alle de nødvendige kombinationer af stoffer og kemiske analyser for at kunne lave en kvantitativ vurdering af interaktionseffekter. Dog er der indikationer på antagonistiske effekter, når man betragter fx Dk50 og Dk10. Hvor der er en additiv effekt af enkeltstoffer i Dk10, er der et lavt effektniveau i Dk50 – endda lavere end i Dk10. Dette peger på, at der er antagonistiske effekter mellem TBT, pyren og TCDD, når niveauerne bliver høje nok, forudsat at optagelsen er ens ved de forskellige eksponeringer. Antagonistiske effekter må også forudsættes at være til stede i miljøet, hvor ålekvabber altid vil være eksponerede for en blanding af stoffer.

Liversomatisk indeks

Mange forureningsstoffer forårsager leverforstørrelse i fisk (fx Celander et al. 1994, Vetemaa et al. 1997, Gercken et al. 2006). Sturve et al. (2005) fandt bl.a. et forhøjet LSI i ålekvabber i Gøteborg Fjord efter uddybning af fjorden og knyttede det til eksponering for PAH. Ligeledes har Strand et al. (2004) fundet forstørret lever i ålekvabber i områder i danske farvande med forøget forekomst af misdannede unger. I nærværende forsøg fandt vi ingen signifikante forskelle mellem LSI i kontrolgruppen og de eksponerede grupper.

I en undersøgelse hvor ålekvabber blev fanget i et relativt rent område af Kattegat nær den svenske kyst, lå LSI i august måned i gennemsnit lidt under 2 % (Ronisz et al. 1999). Dette er en lille smule lavere end i vores forsøg. Det vides dog ikke, hvor mange af de indre organer, der var blevet fjernet i det svenske forsøg, ligesom størrelsesfordelingen for fiskene ikke var angivet. På den anden side kan den højere LSI indikere, at fiskene har været udsat for miljøfarlige stoffer på fangststedet eller i vandet fra havnen i Kerteminde. Forstørrelse af leveren i forbindelse med eksponering for forurenende stoffer er formodentlig relateret til en generel forstyrrelse af stofskiftet og/eller induktion af beskyttende mekanismer inklusiv *de novo* syntese af enzymer. Desuden kan eksponering for hormonforstyrrende stoffer forhøje vitellogeninproduktionen og herved også øge aktiviteten i leveren (Rasmussen et al. 2002).

Hunners reproduktive kapacitet og ungers konditionsindeks

Både blandinger af miljøfarlige stoffer og enkeltstoffer forårsagede en højere andel hunner med mindsket reproduktiv kapacitet og/eller unger med lavt konditionsindeks. Kun for TBT var dette ikke tilfældet. Der var ingen dosis-respons sammenhæng, men en korrelation mellem lav reproduktiv kapacitet og KI for unger inden for hver behandling.

CYP1A-aktivitet

Den forhøjede CYP1A-aktivitet, dvs. en forhøjet mængde af CYP1A-enzymet i eksponerede fisk, kan være et resultat af behov for forøget nedbrydning af de miljøfarlige stoffer. Et øget niveau af CYP1A kan også skyldes, at enzymerne bliver blokeret af stofferne, dvs. at mere enzym produceres, så CYP1A kan udføre dets normale funktioner, herunder nedbrydning af hormoner og vitaminer. Der kan også være tale om en kombination af de to muligheder. Der var ikke direkte sammenhæng mellem aktivitet og eksponering for pyren og TCDD, hvilket peger på, at aktiviteten er et resultat af mange forskellige interaktioner både additive som antagonistiske. Aktiviteten af CYP1A steg i løbet af forsøget, hvilket indikerer, at der er en forsinkelse mellem eksponering og effekt på CYP1A.

Calcium

Der var et signifikant fald i koncentrationen af plasmacalcium i hunner eksponeret for Dk50- og Dk+-blandingerne, men overraskende ikke i hunner eksponeret for Dk50+-blandingen. I sidstnævnte var der dog til gengæld en tendens til lavere koncentrationer i ovarievæsken. Det vides ikke, om dette meget moderate fald i calciumtilgængelighed til ynglen kan bidrage til de observerede misdannelser.

Også kobber reducerede mængden af calcium i blodet. Kobbers effekter på calciumoptagelsen er ikke grundigt undersøgt, mens andre metaller såsom cadmium og bly er veldokumenterede konkurrenter (Craig et al. 2007). Disse metaller bliver transporteret over gælle- eller tarmepithelet via calciumkanaler og hæmmer calciumoptagelsen, og det samme synes at gælde for kobber (Eyckmans et al. 2010). Fisk kan dog oftest kompensere efter en akut eksponering som den i dette forsøg (McGeer et al. 2000, Eyckmans et al. 2010).

Ud over direkte effekter på mekanismerne for iontransport kan kobber og andre forurenende stoffer påvirke de hormoner, som styrer ionbalancen (Kirk et al. 2003, Suzuki et al. 2003, 2009, Eyckmans et al. 2010). Dette kan påvirke både optagelse over epitheler og optagelse ind i celler og skelet samt påvirke mobiliseringen af skæl (Bjerregaard et al. 2001, Kirk et al. 2003, Suzuki et al. 2003, 2009).

Dødelighed i forsøget

Dødeligheden i de forskellige grupper lå mellem 30 og 54,5 %, og dødsfaldene blandt forsøgsdyrene skete primært inden for de første tre uger efter forsøgsstart. Dødeligheden var ikke relateret til eksponeringen. Der er i tidligere laboratorieforsøg med ålekvabber fundet en lignende dødelighed (Mattsson et al. 2001). I denne type forsøg, hvor der ikke er tid til egentlig akklimatisering til laboratorieforholdene mellem indfangning og igangsættelse af eksponeringen, vurderes fiskene at være udsat for en højere grad af stress under forsøget end normalt. Under mere normal akklimatisering vil det også være muligt at få sorteret de fisk fra, som måtte være skadede i ruserne under indfangningen.

Overvejelser

I forsøget blev fiskene kun udsat for en enkelt puls af kandidatstofferne via den intraperitoneale injektion. Langtidseksponering via vandfasen eller gennem føden ville være mere miljørealistisk, idet denne eksponeringsform bedre simulerer den kontinuerlige påvirkning fiskene, og hermed deres unger, udsættes for i miljøet.

Vandeksponering er dog svær – hvis ikke umulig at administrere for så mange stoffer samtidigt, da nogle af de anvendte stoffer har en overordentlig lav opløselighed i vand. Eventuel eksponering via føden kræver, at fiskene først er så akklimatiserede til laboratorieforholdene, at de vil tage føde til sig. I vores forsøg skete dette først 2 uger inde i forsøget. Hvis eksponering skulle ske gennem føden, og man samtidig ønskede at ramme det følsomme vindue i ynglens udvikling, ville det være nødvendigt, at fiskene skulle indfanges og holdes i laboratoriet, før ægløsning og befrugtning havde fundet sted. Der var ikke på forhånd erfaring med, om fiskene var villige til at parre sig i fangenskab, hvilket ville have gjort denne fremgangsmåde meget usikker.

Mange af de anvendte stoffer er lipofile og kan under vitellogenese videreføres fra en eksponeret moderfisk til blommesækkene i æggene og ophobes der. En miljørealistisk eksponering af fiskene under vitellogenese ville derfor være relevant. Desværre er der meget lidt erfaring med opdræt af ålekvabber i fangenskab. Et lille sideløbende forsøg på feltstationen i Kerteminde tyder dog på, at det er muligt at opbevare fiskene i længere tid og få dem til at få ægløsning og parre sig. Hvis dette kunne kombineres med kontinuerlig eksponering gennem vandet eller føden, ville det også kunne fange det vindue, hvor embryonerne er allermost følsomme over for kemiske forstyrrelser.

Konklusioner og anbefalinger

Konklusionerne fra eksponeringsforsøget er, at:

- Der er en tendens til øget forekomst af misdannelser i ålekvabbeunger, når de udsættes for såvel blandinger af miljøfarlige stoffer som enkelte miljøfarlige stoffer i miljørelevante koncentrationer.
- Eksposeringen i forsøgene resulterede i koncentrationer af miljøfarlige stoffer, som er på niveau med dem, som er fundet i miljøet.
- Frekvenser af misdannelser var også på niveau med dem, som er fundet i miljøet.
- Pyren og dioxinet TCDD var de enkeltstoffer, som forårsagede et forhøjet niveau af misdannelser af type B-G. Alle blandinger gav også forhøjede niveauer af type B-G, men i lavere grad end pyren alene. Samtlige enkeltstoffer og blandinger medførte forhøjede niveauer af abnormt udviklede unger.
- Effekten af blandingen med lav koncentration af pyren, TBT og TCDD kan beskrives som en additiv effekt af enkeltstofferne.
- For blandinger med højere koncentrationer er der ikke simple dosis-respons sammenhænge, hvilket formentligt skyldes antagonistiske effekter af stoffblandinger.
- Der er generel tendens til mindsket reproduktiv kapacitet og lavere kondition af unger i eksponerede fisk.
- Biomarkøren CYP1A-aktivitet var forhøjet i forhold til kontrollen med en tidsmæssig forsinkelse mellem eksponering og effekt. Også her var der tegn på antagonistiske effekter på CYP1A-systemet.

Det anbefales, at:

1. Der gennemføres flere kontrollerede eksponeringsforsøg for at undersøge sammenhængen mellem eksponering for miljøfarlige stoffer og misdannelser i unger.
2. I nye forsøg bør flere kombinationer af miljøfarlige stoffer inddrages, så interaktionseffekter bedre kan forstås. Derudover skal forsøgsgrupperne være større, der bør være mere tid til akklimatisering og eventuelt kan flere kandidatstoffer inddrages. Ved nye forsøg bør eksponeringen af hunner ske også inden befrugtning for at inddrage hele det teratogene vindue og helst gennem føde, så fiskene kan eksponeres for mange forskellige typer af stoffer samtidigt.
3. Prøver fra FORMÅLs biobank gøres tilgængelige for andre forskningsprojekter, hvor ålekvabben er i fokus, så komplementerende og opfølgende analyser kan foretages for at tilvejebringe et mere fyldigt billede af biomarkørrespons.

Referencer

- Adema-Hannes, R., Shenker, J. 2008: Acute lethal and teratogenic effects of tributyltin chloride and copper chloride on Mahi mahi (*Coryphaena hippurus*) eggs and larvae. - *Environmental Toxicology and Chemistry* 27: 2131-2135.
- Alsop, D., Brown, S. & Van der Kraak, G. 2007: The effects of copper and benzo[a]pyrene on retinoids and reproduction in zebrafish. - *Aquatic Toxicology* 82: 281-295.
- Antkiewicz, D.S., Burns, C.G., Carney, S.A., Peterson, R.E. & Heideman, W. 2005: Heart malformation is an early response to TCDD in embryonic Zebrafish. - *Toxicological Sciences* 84: 368-377.
- Atli, G. & Canli, M. 2010: Response of antioxidant system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, ZN, Fe) exposure. - *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73: 1884-1889.
- Bentivegna, C.S. & Piatkowski, T. 1998: Effects of tributyltin on medaka (*Oryzias latipes*) embryos at different stages of development. - *Aquatic Toxicology* 44: 117-128.
- Billiard, S.M., Meyer, J.N., Wassenberg, D.M., Hodson, P.V. & Di Giulio, R.T. 2008. Nonadditive effects of PAHs on early vertebrate development: Mechanisms and implications for risk assessment. - *Toxicological Sciences* 105: 5-23.
- Bjerregaard, H.F., Stærmose, S. & Vang, J. 2001: Effect of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) on ion transport and intracellular calcium in kidney distal epithelial cells (A6). - *Toxicology in Vitro* 15: 531-537.
- Bodammer, J.E. 1993: The teratological and pathological effects of contaminants on embryonic and larvae fishes exposed as embryos: a review. - *Am. Fish Soc. Symp.* 14: 77-84.
- Carney, S.A., Prasch, A.L., Heideman, W. & Peterson, R.E., 2006. Understanding dioxin developmental toxicity using the zebrafish model. - *Birth Defects Research A* 76: 7-18.
- Celander, M., Näf, C., Broman, D. & Förlin, L. 1994: Temporal aspects of induction of hepatic cytochrome P4501A and conjugating enzymes in the viviparous blenny (*Zoarces viviparus*) treated with petroleum hydrocarbons. - *Aquatic Toxicology* 29: 183-196.
- Chairi, H., Fernández-Dias, C., Navas, J.I., Machado, M., Rebordinos, L. & Blasco, J. 2010: *In vivo* genotoxicity and stress defences in three flatfish species exposed to CuSO₄. - *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73: 1279-1285.

- Christiansen, T., Korsgaard, B. & Jespersen, Å. 1998: Effect of nonylphenol and 17 β -oestradiol on vitellogenin synthesis, testicular structure and cytology in male eelpout *Zoarces viviparus*. - The Journal of Experimental Biology 201: 179-192.
- Craig, P.M., Wood, C.M. & McClelland, G.B. 2007: Oxidative stress response and gene expression with acute copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*).- American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 293: R1882-R1892.
- Craig, P.M., Hogstrand, C., Wood, C.M. & McClelland, G.B. 2009: Gene expression endpoints following chronic waterborne copper exposure in a genomic model organism, the zebrafish, *Danio rerio*. - Physiological Genomics 40: 23-33.
- Dahllöf, I. & Strand J., 2010. Miljøfarlige stoffer i ålekvabbe – Delrapport I. By- og Landskabsstyrelsen (Naturstyrelsen). 38 pp. ISBN: 978-87-92708-21-2 (PDF).
- Ekelund, R., Bergman, A., Granmo, A. & Berggren, M. 1990: Bioaccumulation of 4-nonylphenol in marine animals - a reevaluation. - Environmental Pollution 64:107-120.
- Eriksen, M.S., Bakken, M., Espmark, Å., Braastad, B.O. & Salte, R. 2006: Prespawning stress in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*: maternal cortisol exposure and hypothermia during embryonic development affect offspring survival, growth and incidence of malformations. - Journal of fish Biology 69: 114-129.
- Eyckmans, M., Tudorache, C., Darras, V. M., Blust, R. & de Boeck, G. 2010: Hormonal and ion regulatory response in three freshwater fish species following waterborne copper exposure. - Comparative Biochemistry and Physiology C 152: 270-278.
- Farwell, A., Nero, V., Croft, M., Bal, P. & Dixon, D.G. 2006: Modified Japanese Medaka embryo-larval bioassay for rapid determination of developmental abnormalities. - Archives of Environmental Contamination and Toxicology 51: 600-607.
- Fent, K. 1991: Bioconcentration and elimination of tributyltin chloride by embryos and larvae of Minnows *Phoxinus phoxinus*. - Aquatic Toxicology 20: 147-157.
- Fent, K. 1996. Ecotoxicology of organotin compounds. - Critical Reviews in Toxicology 26(1): 1-117.

- Fent, K. & Meier, W. 1992: Tributyltin-induced effects on early life stages of Minnows *Phoxinus phoxinus*. - Archives of Environmental Contamination and Toxicology 22: 428-438.
- Fent, K. & Meier, W. 1994: Effects of triphenyltin on fish early life stages. - Archives of Environmental Contamination and Toxicology 27: 224-231.
- Garceau, N., Pichaud, N. & Couture, P. 2010. Inhibition of goldfish mitochondrial metabolism by *in vitro* exposure to Cd, Cu and Ni. - Aquatic Toxicology 98: 107-112.
- Gercken, J., Förlin, L. & Andersson, J. 2006: Developmental disorders in larvae of eelpout (*Zoarces viviparus*) from German and Swedish Baltic coastal waters. - Marine Pollution Bulletin 53: 497-507.
- Giesy, J.P., Jones, P.D., Kannan, K., Newsted, J.L., Tillitt, D.E. & Williams, L.L. 2002: Effects of chronic dietary exposure to environmentally relevant concentrations of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on survival, growth, reproduction and biochemical responses of female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). - Aquatic Toxicology 59: 35-53.
- Halling-Sørensen, B., Petersen, G., Stuer-Lauridsen, F., Slothuus, T., Kinnberg, K. & Bjerregaard, P. 2008: Kemiske stoffer der kan føre til misdannelser i fisk. Indkredsning af stoffer ud fra deres biokemiske virkemekanisme. Rapport fra By- og Landskabsstyrelsen. 112 s.
<http://www2.blst.dk/udgiv/Publikationer/2008/978-87-92256-41-6/pdf/978-87-92256-42-3.pdf>
- Hamers, T., Kamstra J.H., Sonneveld, E., Murk, A.J., Kester, M.H.A., Anderson, P.L., Legler, J. & Brouwer, A., 2006: *In vitro* profiling of the endocrine-disrupting potency of brominated flame retardants. - Toxicological Sciences 92: 157-173.
- Han, J. & Fang, Z. 2010: Estrogenic effects, reproductive impairment and developmental toxicity in ovoviparous swordtail fish (*Xiphophorus helleri*) exposed to perfluorooctane sulfonate (PFOS). - Aquatic Toxicology 99: 218-290.
- Hannah, J.B., Hose, J.E., Landolt, M.L., Miller, B.S., Felton, S.P. & Iwaoka, W.T. 1982: Benzo(a)pyrene-induced morphologic and developmental abnormalities in Rainbow trout. - Archives of Environmental Contamination and Toxicology 11: 727-734.
- Hano, T., Oshima Y., Kim, S.G., Satone, H., Oba, Y., Kitano, T. Inoue, S., Shimasaki, Y. & Honjo, T. 2007: Tributyltin causes abnormal development in embryos of medaka, *Oryzias latipes*. - Chemosphere 69: 927-933.

- Hartl, M.G.J., Hutchinson, S. & Hawkins L.E. 2000: Reduced blood osmolarity in freshwater-adapted European O-group flounder, *Platichthys flesus* (L.), exposed to environmental levels of sediment-associated tributyl- and triphenyltin.- *Marine Pollution Bulletin* 40: 792-794.
- Hoff, P.T., Van Dongen, W., Esmans, E.L., Blust, R. & De Coen, W.M. 2003: Evaluation of the toxicological effects of perfluooctane sulfonic acid in the common carp (*Cyprinus carpio*). - *Aquatic Toxicology* 62: 349-359.
- Hose, J.E., Hannah, J.B., Di Julio, D., Landolt, M.L., Miller, B.S., Iwaoka, W.T. & Felton, S.P. 1982: Effects of Benzo(a)pyrene on early development of flatfish. - *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 11: 167-171.
- Incardona, J.P., Collier, T.K. & Scholz, N.L. 2004: Defects in cardia function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. - *Toxicology and Applied Pharmacology* 196: 191-205.
- Incardona, J.P., Day, H.L., Collier, T.K. & Scholz, N.L. 2006: Developmental toxicity of 4-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish is differentially dependent on AH receptor isoforms and hepatic cytochrome P4501A metabolism. - *Toxicology and Applied Pharmacology* 217: 308-321.
- Ishibashi, H., Hirano, M., Matsumura, N., Watanabe, N., Takao, Y. & Arizono, K. 2006: Reproductive effects and bioconcentration of 4-nonylphenol in medaka fish (*Oryzias latipes*). - *Chemosphere* 65: 1019-1026.
- Johnson, A, Carew, E. & Sloman, K.A. 2007: The effects of copper on the morphological and functional development of zebrafish embryos. - *Aquatic Toxicology* 84: 431-438.
- Kammann, U., Vobach, M. & Wosniok, W. 2006: Toxic effects of brominated indoles and phenols on Zebrafish embryos. - *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51: 97-102.
- Kammann U. 2010. PAH-Metabolite Intercalibration 2010, Bonus+-Project BEAST, 11pp
- Kelly, S.A. & di Giulio R.T. 2000: Developmental toxicity of estrogenic alkylphenols in Killifish (*Fundulus heteroclitus*). - *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 2564-2570.
- Kirk, C.J., Bottomley, L., Minican, N., Carpenter, H., Shaw, S., Kohli, N., Winter, M., Taylor E.W., Waring, R.H., Michelangeli, F. & Harris, R.M. 2003: Environmental endocrine disrupters dysregulate estrogen metabolism and Ca²⁺ homeostasis in fish and mammals via receptor-independent mechanisms. - *Comparative Biochemistry and Physiology A* 135: 1-8.

- Kling, P., Norman, A., Andersson, P.L., Norrgren, L. & Förlin, L. 2008: Gender-specific proteomic responses in zebrafish liver following exposure to a selected mixture of bromated flame retardants. - *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71: 319-327.
- Lema, S.C., Schultz, I.R., Scholz, N.L., Incardona, J.P. & Swanson, P. 2007: Neural defects and cardiac arrhythmia in fish larvae following embryonic exposure to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE 47). - *Aquatic Toxicology* 82: 296-307.
- Liu, C., Yu, K., Shi, X., Wang, J., Lam, P.K.S., Wu, R.S.S. & Zhou, B. 2007. Induction of oxidative stress and apoptosis by PFOS and PFOA in primary cultured hepatocytes of freshwater tilapia (*Oreochromis niloticus*). - *Aquatic Toxicology* 82: 135-143.
- Manson, J.M. & Wise, L.D. 1991: Tetragens. - In: Amdur, M.O., Doull, J.D. & Klaassen, C.D. (eds.): *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic science of poisons*. Mc-Graw-Hill, New York, pp. 226-254.
- Maradonna, F., Polzonetti, V., Bandiera, S.M., Migliarini, B. & Carnevali O. 2004: Modulation of the hepatic CYP1A1 system in the marine fish *Gobius niger*, exposed to xenobiotic compounds. - *Environmental Science and Technology* 38: 6277-6282.
- Mattsson, K., Tana, J., Engstrom, C., Hemming, J. & Lehtinen, K.J. 2001: Effects of wood-related sterols on the offspring of the viviparous blenny, *Zoarces viviparus* L. - *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49:122-130.
- McGeer, J.C., Szebedinszky, C., McDonald, D.G. & Wood, C.M. 2000: Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs. - *Aquatic Toxicology* 50: 231-243.
- Meucci, V. & Arukwe, A. 2006: The xenoestrogen 4-nonylphenol modulates hepatic gene expression of pregnane X receptor, aryl hydrocarbon receptor, CYP3A and CYP1A1 in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). - *Comparative Biochemistry and Physiology C* 142: 142-150.
- Micael, J., Reis-Henriques, M.A., Carvalho, A.P. & Santos M.M. 2007: Genotoxic effects of binary mixtures of xenoandrogens (tributyltin, triphenyltin) and a xenoestrogen (ethinylestradiol) in a partial life-cycle test with Zebra fish (*Danio rerio*).- *Environment International* 33: 1035-1039.

- Morcillo, Y., Janer, G., O'Hara, S.C.M., Livingstone, D.R. & Porte, C. 2004: Interaction of tributyltin with hepatic cytochrome P450 and Uridine diphosphate-glucuronosyl transferase systems of fish: *in vitro* studies. - *Environmental Toxicology and Chemistry* 23 (4): 990-996.
- Mortensen, A.S. & Arukwe, A. 2007: Modulation of xenobiotic biotransformation system and hormonal responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) after exposure to tributyltin (TBT). - *Comparative Biochemistry and Physiology C* 145: 431-441.
- Mortensen, A.S. & Arukwe, A. 2009: Effects of Tributyltin (TBT) on *in vitro* hormonal and biotransformation responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*). - *Journal of Toxicology and Environmental Health A* 72: 209-218.
- Nakayama, K., Oshima, Y., Nagafuchi, K., Hano, T., Shimasaki, Y. & Honjo, T. 2005: Early-life-stage toxicity in offspring from exposed parent Medaka, *Oryzias latipes*, to mixtures of tributyltin and polychlorinated biphenyls. - *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 591-596.
- Oakes, K.D., Sibley, P.K., Martin, J.W., MacLean, D.D., Solomon, K.R., Mabury, S.A. & Van der Kraak, G.J. 2005: Short-term exposures of fish to perfluorooctane sulfonate: Acute effects on fatty acyl-CoA oxidase activity, oxidative stress, and circulating sex steroids. - *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 1172-1181.
- Ohji, M., Arai, T. & Miyazaki, N. 2006: Transfer of tributyltin from parental female to offspring in the viviparous surfperch *Ditrema temmincki*. - *Marine Ecology Progress Series* 307: 307-310.
- Pedersen, B., Larsen, M.M. & Dahllöf, I. 2004a: Teknisk anvisning for marin overvågning. 4.4 Miljøfarlige stoffer i muslinger. Danmarks Miljøundersøgelser. - Teknisk anvisning fra DMU's Marine Fagdatacenter. 19 s.
<http://www.dmu.dk/myndighedsbetjening/overvaagning/fagdatacentre/fdcmarint/tekniskeanvisningernovana20042009/>
- Pedersen, B., Larsen, M.M. & Dahllöf, I. 2004b: Teknisk anvisning for marin overvågning. 6.2 Miljøfarlige stoffer i fisk. Danmarks Miljøundersøgelser. - Teknisk anvisning fra DMU's Marine Fagdatacenter. 19 s.
<http://www.dmu.dk/myndighedsbetjening/overvaagning/fagdatacentre/fdcmarint/tekniskeanvisningernovana20042009/>
- Pedersen, B., Larsen, M.M. & Dahllöf, I. 2004c: Teknisk anvisning for marin overvågning. 5.4 Miljøfarlige stoffer i sediment. Danmarks Miljøundersøgelser. - Teknisk anvisning fra DMU's Marine Fagdatacenter. 22 s.
<http://www.dmu.dk/myndighedsbetjening/overvaagning/fagdatacentre/fdcmarint/tekniskeanvisningernovana20042009/>

- Rasmussen, T.H., Andreassen, T.K., Pedersen, S.N., Van der Ven, L.T.M., Bjerregaard, P. & Korsgaard, B. 2002: Effects of waterborne exposure of octylphenol and oestrogen on pregnant viviparous eelpout (*Zoarces viviparus*) and her embryos *in ovario*. - The Journal of Experimental Biology 205: 3857-3876.
- Rattfelt Nyholm, J., Norman, A., Norrgren, L., Haglund, P. & Andersson, P.L. 2008: Maternal transfer of brominated flame retardants in zebrafish (*Danio rerio*). - Chemosphere 73: 203-208.
- Ronisz, D., Larsson, D.G.J. & Förlin, L. 1999: Seasonal variations in the activities of selected hepatic biotransformation and antioxidant enzymes in eelpout (*Zoarces viviparus*). - Comparative biochemistry and physiology C 124: 271-279.
- Santos, E.M., Ball, J.S., Williams, T.D., Wu, H., Ortega, F., van Aerle, R., Katsiadaki, I., Falciani, F., Viant, M.R., Chipman, J.K. & Tyler, C.R. 2010: Identifying health impacts of exposure to copper using transcriptomics and metabolomics in a fish model. - Environmental Science and Technology 44: 820-826.
- Selwyn, M.J. 1976: Triorganotin compounds as ionophores and inhibitors of ion translocating ATPase. - In: Organotin compounds: New chemistry and applications, Zuckerman, J.J., American Chemical Society, Washington D.C.
- Sharpe, R.L., Benskin, J.P., Laarman, A.H., MacLeod, S.L., Martin, J.W., Wong, C.S. & Goss, G.G. 2010: Perfluorooctane sulfonate toxicity, isomer-specific accumulation, and maternal transfer in Zebrafish (*Danio rerio*) and Rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). - Environmental Toxicology and Chemistry 29: 1957-1966.
- Shi, X., Du, Y., Lam, P.K.S, Wu, R.S.S. & Zhou, B. 2008: Developmental toxicity and alteration of gene expression in zebrafish embryos exposed to PFOS. - Toxicology and Applied Pharmacology 230: 23-32.
- Shi, X., Liu, C., Wu, G. & Zhou, B. 2009: Waterborne exposure to PFOS causes disruption of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in zebrafish larvae. - Chemosphere 77: 1010-1018.
- Stagg, R. & McIntosh, A. 1998: Biological effects of contaminants: Determination of CYP1A-dependent mono-oxygenase activity in dab by fluorimetric measurement of EROD activity. - ICES Techniques in Marine Environmental Sciences No. 23, 16 pp.

- Stouthart, X.J.H.X., Haans, L.M., Lock, R.A.C. & Wendelaar Bonga, S.E. 1996: Effects of water pH on copper toxicity to early life stages of the common carp (*Cyprinus carpio*). – Environmental toxicology and Chemistry 15: 376-383.
- Strand, J., Andersen, L., Dahllöf, I. & Korsgaard, B. 2004. Impaired larval development in broods of eelpout (*Zoarces viviparus*) in Danish coastal waters. - Fish Physiology and Biochemistry 30: 37-46.
- Strand, J. & Dahllöf, I. 2005: Teknisk anvisning for marin overvågning. 4.5 Biologisk effektmonitoring - muslinger. NOVANA. Danmarks Miljøundersøgelser. - Teknisk anvisning fra DMU's Marine Fagdatacenter. 15 s.
- Stuer-Lauridsen, F., Gustavson, K., Møhlenberg, F., Dahllöf, I., Strand, J., Bjerregaard, P., Korsgaard, B., Rasmussen, T.H. & Halling-Sørensen, B. 2008: Misdannet ålekvabbeunger og andre biologiske effekter i danske vandområder. Litteraturudredning. Miljøministeriet, By- og Landskabsstyrelsen. - Miljøprojekt 1151, 208 s.
<http://www2.blst.dk/udgiv/Publikationer/2008/978-87-7052-384-4/html/default.htm>
- Sturve, J., Berglund, Å., Balk, L., Broeg, K., Böhmert, B. & Massey, S. 2005: Effects of dredging in Göteborg Harbor, Sweden, assessed by biomarkers in eelpout (*Zoarces viviparus*). - Environmental Toxicology and Chemistry 24: 1951-1961.
- Suzuki, N., Kambegawa, A. & Hattori, A. 2003: Bisphenol A influences the plasma calcium level and inhibits calcitonin secretion in Goldfish. - Zoological science 20: 745-748.
- Suzuki, N., Hayakawa, K., Kameda, T., Triba, A., Tang, N., Tabata, M.J., Takada, K., Wada, S., Omori, K., Srivastav, A.K., Mishima, H. & Hattori, A. 2009: Monohydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit both osteoclastic and osteoblastic activities in teleost scales. - Life sciences 84: 482-488.
- Tjärnlund, U., Ericson, G., Örn, U., de Wit, C. & Balk, L. 1998: Effects of two polybrominated diphenyl ethers on Rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) exposed via food. - Marine Environmental Research 46: 107-112.
- Vetemaa, M., Förlin, L. & Sandström, O. 1997: Chemical industry effluent impacts on reproduction and biochemistry in a North Sea population of viviparous blenny (*Zoarces viviparus*). - Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery 6: 33-41.
- de Wit, C.A. 2002. An overview of brominated flame retardants in the environment. - Chemosphere 46: 583-624.

- Witeska, M., Bilska, K. & Sarnowski, P. 2010: Effects of copper and cadmium on growth and yolk utilization in Barbel (*Barbus barbus* L.) larvae. - Polish Journal of Environmental Studies 19: 227-230.
- Yamauchi, M., Kim, E.-Y., Iwata, H., Shima, Y. & Tanabe, S. 2006: Toxic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in developing red seabream (*Pagrus major*) embryo: An association of morphological deformities with AHR1, AHR2 og CYP1A expressions. - Aquatic Toxicology 80: 166-179.
- Zhang, F.-X., Xu, Y. & Hui, Y. 2006 : Reproductive effects of prenatal exposure to nonylphenol on zebrafish (*Danio rerio*). - Comparative Biochemistry and Physiology C 143: 77-84.
- Zhang, X., Yang, F. Cai, Y.Q. & Xu, Y. 2008: Oxidativ damage in unfertilized eggs of Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) exposed to nonylphenol. - Environmental Toxicology and Chemistry 27 (1): 213-219.



Naturstyrelsen
Haraldsgade 53
2100 København
www.nst.dk