



DIOXIN OG BIOLOGISK EFFEKTMONITERING I ÅLEKVABBE I KYSTNÆRE DANSKE FARVANDE

Faglig rapport fra DMU nr. 743 2009



DANMARKS MILJØUNDERSØGELSER
AARHUS UNIVERSITET



[Tom side]

DIOXIN OG BIOLOGISK EFFEKT- MONITERING I ÅLEKVABBE I KYSTNÆRE DANSKE FARVANDE

Faglig rapport fra DMU nr. 743 2009

Jakob Strand¹
Rossana Bossi¹
Ingela Dahllöf¹
Christian A. Jensen²
Vibeke Simonsen¹
Zhanna Tairova¹
Jonna Tomkiewicz³

¹) Danmarks Miljøundersøgelser, Aarhus Universitet

²) Miljøcenter Århus, By- og Landskabsstyrelsen

³) DTU Aqua, Institut for Akvatiske Ressourcer



Datablad

- Serietitel og nummer: Faglig rapport fra DMU nr. 743
- Titel: Dioxin og biologisk effektmonitoring i ålekvabbe i kystnære danske farvande
- Forfattere: Jakob Strand¹, Rossana Bossi², Ingela Dahllöf¹, Christian A. Jensen³, Vibeke Simonsen⁴, Zhanna Tairova¹ & Jonna Tomkiewicz⁵
- Institutioner, afdelinger: ¹ DMU, Afdeling for Marin Økologi, ² DMU, Afdeling for Atmosfærisk Miljø, ³ Miljøcenter Århus, By- og Landskabsstyrelsen, ⁴ DMU, Afdeling for Terrestrisk Økologi, ⁵ DTU Aqua, Institut for Akvatiske Ressourcer
- Udgiver: Danmarks Miljøundersøgelser©
Aarhus Universitet
- URL: <http://www.dmu.dk>
- Udgivelsesår: November 2009
- Redaktion afsluttet: Oktober 2009
- Faglig kommentering: Lars Förlin, Gøteborgs Universitet og Torkel Gissel Nielsen, DMU, Århus Universitet
- Finansiel støtte: NOVANA F & U puljen, By- og Landskabsstyrelsen
- Bedes citeret: Strand, J., Bossi, R., Dahllöf, I., Jensen, C.A., Simonsen, V., Tairova, Z. & Tomkiewicz, J. 2009: Dioxin og biologisk effektmonitoring i ålekvabbe i kystnære danske farvande. Danmarks Miljøundersøgelser, Aarhus Universitet. 66 s. - Faglig rapport fra DMU nr. 743. <http://www.dmu.dk/Pub/FR743.pdf>.
- Gengivelse tilladt med tydelig kildeangivelse
- Sammenfatning: Denne undersøgelse afprøver nogle nye potentielle miljøindikatorer for at kunne vurdere, dels belastningsniveauer med de miljøfarlige dioxinlignende stoffer og PAH, dels omfanget af forskellige typer af biologiske effekter i ålekvabbe. Biomarkører for bl.a. hormonforstyrrelser i form af intersex, CYP1A-enzymssystemer og forekomsten af misdannelser viser sammen med de kemiske målinger, at ålekvabbe er påvirket af miljøfarlige stoffer i de danske farvande.
- Emneord: Miljøfarlige stoffer, hormonforstyrrelser, fisk, overvågning, marine områder
- Layout: Anne van Acker
- Illustrationer: Forfatterne/Anne van Acker
- Forsidefoto: Jakob Strand
- ISBN: 978-87-7073-128-7
- ISSN (elektronisk): 1600-0048
- Sideantal: 66
- Internetversion: Rapporten er tilgængelig i elektronisk format (pdf) på DMU's hjemmeside <http://www.dmu.dk/Pub/FR743.pdf>

Indhold

Forord 5

Sammenfatning 6

Summary 8

Ordliste 10

1 Introduktion 11

2 Ålekvabbe som miljøindikator i NOVANA 13

3 Stationer og indsamling af prøver 16

4 Misdannelser hos ålekvabbens unger 18

4.1 Metoder 19

4.2 Resultater og diskussion 20

4.3 Konklusioner 23

5 Dioxiner, furaner og co-planare PCB'er i ålekvabbe og dens unger 24

5.1 Metode 24

5.2 Resultater og diskussion 24

5.3 Konklusioner 25

6 PAH-metabolitter i fiskegalde og urin 27

6.1 Metode 28

6.2 Resultater 28

6.3 Diskussion 30

6.4 Konklusioner 31

7 Aktivitet og ekspresion af CYP1A-enzymssystemer 32

7.1 Metoder 33

7.2 Resultater for CYP1A-aktivitet og ekspresion 34

7.3 Diskussion 35

7.4 Konklusioner 36

8 Intersex - et tegn på hormonforstyrrelser i ålekvabbe 37

8.1 Metoder 38

8.2 Resultater 39

8.3 Diskussion 42

8.4 Konklusioner 42

9 Populationsgenetik 44

9.1 Materiale og metode 44

9.2 Resultater og diskussion 45

9.3 Konklusioner 46

10 Generelle fysiologiske indikatorer 47

10.1 Metode 47

10.2 Resultater og diskussion 48

10.3 Konklusioner 51

11 Tværgående analyse 52

11.1 Resultater og diskussion 52

11.2 Konklusioner 54

12 Anbefalinger 55

13 Tak til 57

14 Referencer 58

Danmarks Miljøundersøgelser

Faglige rapporter fra DMU

Forord

Nærværende rapport omhandler undersøgelser af udvalgte kemiske og biologiske metoder til at vurdere forekomst og effekter af miljøfarlige stoffer i fisk. Projektet "Dioxin og biologisk effektmonitoring i ålekvabbe" (DEMÅL) er gennemført med henblik på at vurdere metodernes potentiale til brug i kommende marine monitoringssammenhænge. Projektet er finansieret af den tværgående pulje under NOVANA.

Sammenfatning

I de seneste år er der fundet tegn på påvirkning af den reproduktive succes hos ålekvabbe (*Zoarces viviparus*) indsamlet i de danske farvande. Fund af misdannelser blandt ålekvabbens unger har været mistænkt for at være forårsaget af for høje belastninger med miljøfarlige stoffer, og at forurening derved kan bidrage til uønskede effekter på reproduktion hos dyr i de danske farvande.

Formålet med denne undersøgelse har derfor været at afprøve nogle nye potentielle miljøindikatorer for at kunne vurdere dels belastningsniveauer med miljøfarlige stoffer, dels omfanget af forskellige typer af toksiske effekter i ålekvabbe.

Denne undersøgelse har fokus på to udvalgte prioriterede stofgrupper af miljøfarlige stoffer henholdsvis de dioxinlignende stoffer og PAH'er og nogle af deres potentielle effekter i ålekvabbe fra 6-7 forskellige områder i de kystnære danske havområder i hhv. november 2007 og maj-juni 2008.

Undersøgelsen har ud over reproduktiv succes og forekomst af fejludvikling af unger omfattet forskellige delundersøgelser med både kemiske målinger og biomarkører for at vurdere, om der også er andre tegn på effekter i ålekvabbe. Desuden indgår en populationsgenetisk undersøgelse baseret på isozymer, der viste, at lokale ålekvabbepopulationer er særdeles stationære over tid. Dette underbygger, at ålekvabbe er en velegnet indikatororganisme til brug for miljøundersøgelser, der skal vurdere belastning og biologiske effekter i afgrænsede vandområder.

Resultaterne fra de forskellige delundersøgelser viste, at ålekvabbepopulationerne i forskellig grad var påvirket af miljøfarlige stoffer. Billedet var dog ikke helt entydigt, når graden af belastning og effekter i de forskellige områder blev sammenlignet for de enkelte delundersøgelser, hvilket sandsynligvis skyldes, at de fundne tegn på påvirkninger ikke udelukkende kan tilskrives specifikke stofgrupper som de dioxinlignende stoffer og PAH. Derimod kan de undersøgte effekter i højere grad tilskrives påvirkninger af komplekse blandinger af miljøfarlige stoffer, som kan forekomme i havmiljøet. Ingen af de undersøgte stoffer eller effekter i ålekvabbe korrelerede direkte til niveauerne af misdannelser eller anden type for fejludvikling hos ungerne.

De kemiske analyser viste, at alle de undersøgte ålekvabbepopulationer var belastet med både dioxinlignende stoffer og PAH og at de område-mæssige forskelle i koncentrationsniveauer især synes at give sig direkte udslag i mRNA-ekspression og i mindre grad aktiviteten af enzymesystemet CYP1A. CYP1A er vigtig for organismens mulighed for at afgifte sig selv for netop denne type af kemiske stoffer.

Derudover blev der i denne undersøgelse også fundet tegn på, at ålekvabbepopulationerne er udsat for hormonforstyrrelser, idet en stor andel af hannerne (8-36%) har udviklet intersex i form af forstadier til æg (oocytter) i deres testikler. Dette indikerer, at ålekvabbe er særlig følsom over-

for påvirkninger fra miljøfarlige stoffer, der kan forårsage østrogenlignende effekter.

Århus Bugt var det område, der viste den højeste belastning og de mest udtalte effekter, efterfulgt af Randers Fjord, Karrebæk Fjord, Roskilde Fjord og Vejle Fjord. Til sammenligning fremstod Agersø som et område med kun lille påvirkningsgrad.

Det kan ikke udelukkes, at visse lokale ålekvabbebestande er særligt sårbare med tanke på, at alvorlige miljøpåvirkninger kan give sig udslag i effekter på reproduktion, herunder hormonforstyrrelser som følge, samtidig med at ålekvabbe må anses for at være forholdsvis stationær fisk. Dette kan bl.a. gælde populationer i kystnære områder som fx Århus Bugt, Vejle Fjord og Roskilde Fjord, der udviste de højeste niveauer af misdannede unger samt intersex i hanner.

Det anbefales, at overvågningsaktiviteter af reproduktiv succes i ålekvabbe også fremover understøttes af både kemiske målinger og komplementerende biomarkørundersøgelser som PAH-metabolitter og intersex for bedre at kunne vurdere årsager til fund af uønskede effekter.

Summary

Indications of disturbances on reproductive success in eelpout (*Zoarces viviparus*), also called *Viviparous blenny*, from Danish marine areas have been observed in recent years in connection with the yearly monitoring programme, called NOVANA. Prime suspects thought to have caused these disturbances have been contaminants, especially in relation to malformed larvae. If this is the case, then there can also be undesirable effects on reproduction for other marine organisms due to contaminants.

The aim of this study was to investigate whether additional new biomarkers could reveal more information on both pressures of contaminants as well as the effects in eelpout.

The project consisted of several parts focussing on dioxin-like compounds and PAHs and their potential effects in eelpout collected at 6-7 different sites in November 2007 and May to June 2008. Population genetics based on isozymes was also included in the study to verify that the eelpout had stationary populations and can be used in monitoring activities to assess the status of different marine areas.

The overall results showed that the populations differ with respect to the degree of contamination effects, but the picture is somewhat unclear as there are no direct link between the magnitude of dioxin and PAH contamination and the magnitude or type of effects seen. This suggests, however, that it is not only these compounds that are the causes for effects, but rather the complex mixtures of contaminants that occur in marine coastal areas. Furthermore, the magnitude or types of deformities cannot be directly correlated to the compounds in focus, or the other effects, but it has to be kept in mind that the effects occur at different time-scales, and that also other compounds or environmental factors can be involved.

The chemical analyses showed that all the eelpout populations were contaminated with dioxin-like compounds and PAHs. The differences in contamination levels between sites were most pronounced in the expression of CYP1A enzymes, and to a lesser degree by the activity of this enzyme system, as the enzymes also can be inhibited at higher contamination. CYP1A is important for the organism as it represents a pathway for biotransformation and excretion of contaminants like PAHs and dioxin-like compounds.

There are also indications that the Danish eelpout populations are affected by hormone disrupting compounds as a large fraction of the males (8-36%) developed intersex, seen as early stages of oocytes in their testicular tissue.

Overall for all studied parameters Aarhus Bight has in this study the most affected eelpout population, followed by Randers Fjord, Karrebæk Fjord, Roskilde Fjord and Vejle Fjord. The population from Agersø is in comparison only affected to a smaller extent.

Considering that the populations are stationary and that they are affected by contaminants that result in reduced reproductive success, including hormone disruptions, most likely some of the populations are more vulnerable, which can result in severe population declines.

It can finally be concluded that future monitoring activities of eelpout should be supported by both chemical analyses and complementary biomarkers like PAH-metabolites and intersex, in order to better understand what causes the undesirable effects seen today.

Ordliste

- Congener: Analoge varianter af enkeltstoffer som indgår i syntetiske blandinger af bl.a. PCB.
- CYP1A: Cytokrom P450 type 1A er et proteinkompleks, der er involveret i organismers afgiftning af planare aromatiske stoffer.
- HELCOM: Østersøkonventionen. The Helsinki Commission is the governing body of the "Convention on the Protection of the Marine Environment of the Baltic Sea Area".
- ICES: The International Council for the Exploration of the Sea.
- NOVANA: Det Nationale program for Overvågning af Vandmiljøet og Naturen.
- OSPAR: Nordsøkonventionen. The Oslo and Paris Commission is the governing body of the "Convention for the Protection of the Marine Environment of the North-East Atlantic".
- PAH: Polycykliske aromatiske hydrocarboner er en stofgruppe, der også kaldes for tjærestofferne.
- PCB: Polychlorerede biphenyler er en meget persistent stofgruppe af giftige industrikemikalier.
- PCDD/F: Polychlorerede dibenzo-p-dioxiner og furaner er en gruppe af persistente og meget giftige klorerede stoffer, der bl.a. kan dannes ved ukontrollerede forbrændingsprocesser.
- Teratogen: Fosterskadende ved at forårsage misdannelser i æg, embryoner og unger.
- TCDD: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) er prototypen for dioxin, og fx WHO-TEQ beregnes i forhold til aktiviteten af TCDD.
- TBT: Tributyltin er et giftigt stof, der har været anvendt som antibegroningsmiddel i bundmalinger til skibe.
- WHO-TEQ: Toksicitets ækvivalenter for dioxinaktivitet anbefalet af FN's verdenssundhedsorganisation WHO.

1 Introduktion

Forurening med forskellige typer af miljøfarlige stoffer er stadig i dag et miljøproblem i de kystnære danske havområder. Flere af disse stoffer kan forekomme i koncentrationsniveauer, hvor de påvirker dyrs og planter vækst, reproduktion, adfærd eller på anden måde deres evne til at overleve, og de udgør dermed en risiko for økosystemets struktur og funktion.

I de seneste år er der fundet misdannede ålekvabbeunger i danske farvande, blandt andet i forbindelse med den marine del af det Nationale Program for Overvågning af Vandmiljøet og Naturen (NOVANA). Her har fund af især misdannelser blandt ålekvabbens unger været mistænkt for at være forårsaget af for høje belastninger med miljøfarlige stoffer, og at forurening derved kan bidrage til uønskede effekter på reproduktion hos dyr i de danske farvande. Disse fund rejser derfor spørgsmål om kvaliteten af vandmiljøet. Der er dog endnu ikke blevet udpeget en primær stofgruppe, forureningskilde eller anden årsag, som kan ligge til grund for misdannelserne, der fortrinsvis forekommer i fjordområder med belastning fra en større by og/eller industri og med forholdsvis lille vandudveksling til de åbne farvande. Mistanken rettes derfor heller ikke mod enkeltstoffer, men derimod mod blandinger af mange forskellige typer af forureninger, som kan forekomme i varierende grad i forskellige vandområder. Af stofgrupper mistænkt for at kunne bidrage til de observerede misdannelser i ålekvabbe i de danske farvande kan bl.a. nævnes dioxinlignende stoffer, pesticider, tjærestoffer som PAH, antibegroingsmidler som tributyltin (TBT), cadmium og kviksølv og stoffer med mere østrogenlignende effekter som ethinylestradiol, alkylphenoler og phthalater (*Stuer-Lauridsen et al. 2008; Halling-Sørensen et al. 2008*). Mere viden er derfor nødvendigt for at få styrket forklaringsmodellerne af de nuværende NOVANA-undersøgelser af ålekvabbe og dens reproduktion, da det vil øge deres egnethed som miljøindikatorer til at vurdere, i hvilket omfang uønskede effekter af miljøfarlige stoffer forekommer i vandmiljøet.

Formålet med denne undersøgelse var derfor at afprøve nogle nye potentielle miljøindikatorer for at kunne vurdere dels belastningsniveauer med miljøfarlige stoffer, dels omfanget af forskellige typer af toksiske effekter i ålekvabbe, så der kan tilvejebringes et bedre vidensgrundlag i forhold til de eksisterende NOVANA effektundersøgelser af ålekvabber i de danske farvande. Det er intentionen, at integreringen mellem kemiske målinger og kompletterende biomarkører desuden kan bidrage til en vurdering af, om fiskene er påvirket af særlige grupper af miljøfarlige stoffer.

Forskellige kemiske og biologiske parametre kan anvendes til at vurdere, om miljøfarlige stoffer udgør en risiko for dyrelivet i vore farvande. Heriblandt kan kemiske analyser af koncentrationsniveauer sammen med molekylære og cellulære biomarkører anvendes til at identificere tidlige tegn på skadelige effekter i individer af de undersøgte organismer. De tidlige tegn på effekter har dog ikke nødvendigvis betydning på populationsniveau. Biomarkørerne anvendes som mål til at afspejle de rumlige

og tidlige variationer i påvirkninger. Ofte kan disse påvirkninger ikke tilskrives udelukkende enkelte specifikke stoffer men derimod fortrinsvis blandinger af miljøfarlige stoffer, som nu kan forekomme i miljøet. Afhængig af typen af biomarkør ses effekterne med forskellig stofspecifitet samt tidsforsinkelse i forhold til det reelle tidspunkt for påvirkning. Det er derfor ikke forventeligt, at alle effekttyper viser de samme grader af påvirkning for alle områder, der indgår i en større geografisk undersøgelse.

Denne undersøgelse har fokus på to udvalgte prioriterede stofgrupper af miljøfarlige stoffer: de dioxinlignende stoffer (dioxiner, furaner og coplanare PCB'er) og de polycykliske aromatiske hydrocarboner (PAH'er). Disse stofgrupper kan ud over at skade fisks reproduktion, herunder forårsage hormonforstyrrelser og misdannelser, også medføre oxidativt stress og inducering af afgiftningenszymer, der i de værste tilfælde kan medføre DNA-skader og cancer. De dioxinlignende stoffer er meget fedtopløselige og svært nedbrydelige og vil derfor let akkumuleres både i voksne fisk samt overføres til deres æg og unger. Derimod er PAH-forbindelser stoffer, som fisk betydeligt lettere kan metabolisere og efterfølgende udskille igen. Dette betyder dog ikke, at PAH ikke kan forårsage skader i organismen, både i de voksne fisk og deres æg og unger. Derfor kan det metodemæssigt være bedre at vurdere eksponeringen til PAH-forbindelser ved at måle på forekomsten PAH-metabolitter i galde og urin, som er de primære ekskretionsveje i fisk.

Undersøgelsen har ud over de kemiske målinger for dioxinlignende stoffer og PAH'er også omfattet biomarkører for mRNA-ekspression og aktivitet af afgiftningenszymsystemet CYP1A. I projektet blev der desuden undersøgt for forekomst af intersex hos hanfisk. Forekomsten af intersex i fisk anses hovedsageligt for at være et respons på hormonforstyrrelser forårsaget af stoffer med østrogenlignende aktivitet, hvorimod effekter på CYP1A systemet anses for at være mere specifikke effekter i forhold til eksponering til dioxinlignende stoffer og/eller PAH'er (OSPAR 1997). Disse biomarkørmetoder er alle anbefalet af de internationale organisationer OSPAR, HELCOM og ICES til marin overvågning af biologiske effekter i fisk. Endvidere omfattede denne undersøgelse en vurdering af forskelle i den genetiske diversitet mellem de undersøgte populationer af ålekvabbe. Dette kan være en vigtig biologisk støtteparameter, bl.a. til at vurdere hvor stationære ålekvabbe er over tid, og derved hvor godt eventuelle forhøjede niveauer af stoffer og effekter på lokale populationer kan tilskrives miljøforureninger i de undersøgte vandområder.

De anvendte metoder indgår i forskellige delundersøgelser og resultaterne derfra vil efter en beskrivelse af ålekvabben som miljøindikator (*kapitel 2*) og stationer og indsamling (*kapitel 3*), hver især blive gennemgået i de efterfølgende kapitler og afsluttende med en samlet tværgående analyse.

2 Ålekvabbe som miljøindikator i NOVANA

Ålekvabbe (*Zoarces viviparus*) er siden 2004 blevet anvendt i NOVANA som indikator for eventuelle effekter af miljøfarlige stoffer på kystnære fisk. Ålekvabbe er af flere årsager velegnet som monitoringsorganisme i undersøgelser af effekter fra miljøfarlige stoffer i det marine miljø. Udover at være følsom for en række naturlige og menneskeskabte stressforhold, som fx miljøfarlige stoffer, iltsvind og klimaforandringer (Vetemaa et al. 1997; Strand et al. 2004a; Schiedek et al. 2006; Pörtner & Knust 2007; Strand in press), er den også en udpræget stationær fisk (mere herom i kapitel 9). Sidstnævnte er en fordel, når observerede effekter i fiskene skal forbindes med den lokale forureningsituation. Desuden er ålekvabbe forholdsvis almindeligt forekommende i kystnære salt- og brakvandsområder i det nordlige Europa inklusiv mange kystnære områder i Danmark, selvom bestandene er gået markant tilbage i de seneste årtier (Pörtner & Knust 2007; Strand in press). Ålekvabbe er den eneste benfisk i danske farvande, som er levendefødende (vivipar livscyklus), hvor drægtige hunner kan bære op til 300 levende unger i et kuld (figur 2.1). Hermed kan eventuelle effekter af miljøfarlige stoffer på ålekvabbens reproduktion let undersøges (Neuman et al. 1999; Strand & Dahllöf 2005). Den nærmere sammenhæng mellem forekomsten af de undersøgte effekter og tilstedeværelsen af miljøfarlige stoffer er ikke endelig afklaret (Strand et al. 2004a); Stuer-Lauridsen et al. 2008). Det antages, at ikke alle effekter er stof-specifikke, men kan skyldes påvirkninger fra en række forskellige miljøfarlige stoffer, alene eller i kombination.

Figur 2.1. Ålekvabbe (*Zoarces viviparus*) er en levendefødende (vivipar) fisk, og den drægtige hun bærer op til 300 levende unger i ovariesækken. Ålekvabbe bliver sjældent mere end 34 cm lang.

FOTO: JAKOB STRAND.



Undersøgelser af ålekvabben og dens reproduktion anbefales derfor til brug i marin overvågning af de internationale organisationer HELCOM, OSPAR og ICES (OSPAR 1997; ICES 2004; HELCOM 2006). Ålekvabbe er også blevet anvendt som indikatororganisme i en række af vore nabolande som Sverige, Tyskland, Finland, Estland, Letland, Litauen og England. Især Sverige har mange års erfaring med brug af ålekvabbe til forskellige typer af undersøgelser, og der foreligger tidsserier på forekomst af misdannelser blandt unger, der går tilbage til midten af 1990'erne (Ådjers et al. 2001). Ålekvabbe indgår også i overvågningssammenhænge, hvor fokus er at vurdere udvikling i belastningsniveauer med miljøfarlige stoffer, herunder også i retrospektive undersøgelser, som baseres på prøver

fra ålekvabbe, der opbevares i nationale miljøprøvebanker i både Sverige og Tyskland (NHR 2009; UPB 2009).

I internationale fora som ICES arbejdes der på at fastsætte kvalitetskriterier inklusiv baggrundsresponsniveauer for anbefalede miljøindikatorer. Der foreligger allerede forslag til kvalitetskriterier, der omfatter reproduktiv succes i ålekvabbe og bl.a. PAH-metabolitter og CYP1A aktivitet i forskellige fiskearter (ICES 2007 og 2008), men de konkrete værdier er pt. til revision. Desuden arbejdes der på udvikling af værktøjer til at integrere forskellige effekt- og belastningsmarkører i forbindelse med miljøvurderinger af det samlede pres og ikke kun ud fra de enkelte parametre. Sådanne kvalitetskriterier kan anvendes i en operationel vurdering af et områdes miljøtilstand. Data fra både udenlandske overvågningsprogrammer og det danske NOVANA-program og andre relaterede undersøgelser som denne undersøgelse indgår som et grundlag for dette arbejde. Desuden gøres der også en indsats for at udarbejde internationale ICES guidelines og kvalitetssikring fx som interkalibreringer af udvalgte effektmarkører inden for BEQUALM, der anbefales for at kunne opfylde krav til at indgå i marin overvågning inden for havkonventioner som HELCOM og OSPAR.

I kystnære områder i Danmark har Danmarks Miljøundersøgelser (DMU) i 2001-2002 (Strand *et al.* 2004a) og i perioden 2004-2008 sammen med fire amter og senere hen de statslige Miljøcentre (Strand 2005; Strand 2007; Strand *et al.* 2009) undersøgt den reproduktive succes hos ålekvabber, herunder forekomsten af misdannelser hos ålekvabbeunger. Foruden reproduktiv succes og forekomsten af misdannelser indgår desuden en anden type af effektundersøgelse i tilknytning til NOVANA-programmet, idet NOVANA hidtidigt også har omfattet biomarkøranalyser for aktivitet af CYP1A afgiftningenszymer (Strand 2005; Strand 2007; Strand *et al.* 2009). Samtidigt er der også målt generelle fysiologiske indikatorer så som konditionsindeks, lever-somatisk indeks og reproduktiv kapacitet (Strand & Dahllöf 2005).

I NOVANA foretages udover effektundersøgelser i ålekvabbe desuden også overvågning af miljøfarlige stoffer i sediment og muslinger samt andre typer af effektundersøgelser i hhv. havsnegle og muslinger (Strand 2005; Strand 2007; Strand *et al.* 2009). Disse undersøgelser indgår som en del af vurderingen af miljøtilstanden i de kystnære danske områder under NOVANA-programmet. Da forekomsten af miljøfarlige stoffer og deraf følgende effekter kan udvikle sig med en stigende eller faldende tendens både mellem og inden for de enkelte år, er det som med andre typer af miljøundersøgelser nødvendigt med tilstrækkeligt lange tidsserier for at kunne vurdere eventuelle tendenser og årsager til de observerede effekter (Strand *et al.* 2004b; Ronisz *et al.* 2005; Sandström *et al.* 2005). Desuden skal det også tages med i betragtning, at nogle typer af effektmarkører i fisk er generelle indikatorer, der integrerer effekter af det samlede pres af forskellige ydre stressfaktorer. Yderligere kan man ikke altid forvente, at der er tydelige korrelationer mellem miljøfarlige stoffer og alle typer af effekter. Fx kan kønsdifferentiering og udvikling af visse sygdomme påvirkes af en kortvarig eksponering i fiskens tidlige livsstadier, og som ikke nødvendigvis vil afspejle sig i belastningsniveauet ved indsamlingstidspunktet af flere år gamle voksne fisk.

For at styrke forklaringsmodellerne vil en række supplerende undersøgelser være nødvendige. Ved både at undersøge reproduktive og økotoxikologiske effektparametre samtidigt med målinger af miljøfarlige stoffer, styrkes grundlaget for at beskrive effekter af lang- og korttidspåvirkninger af det samlede pres af miljøfarlige stoffer.

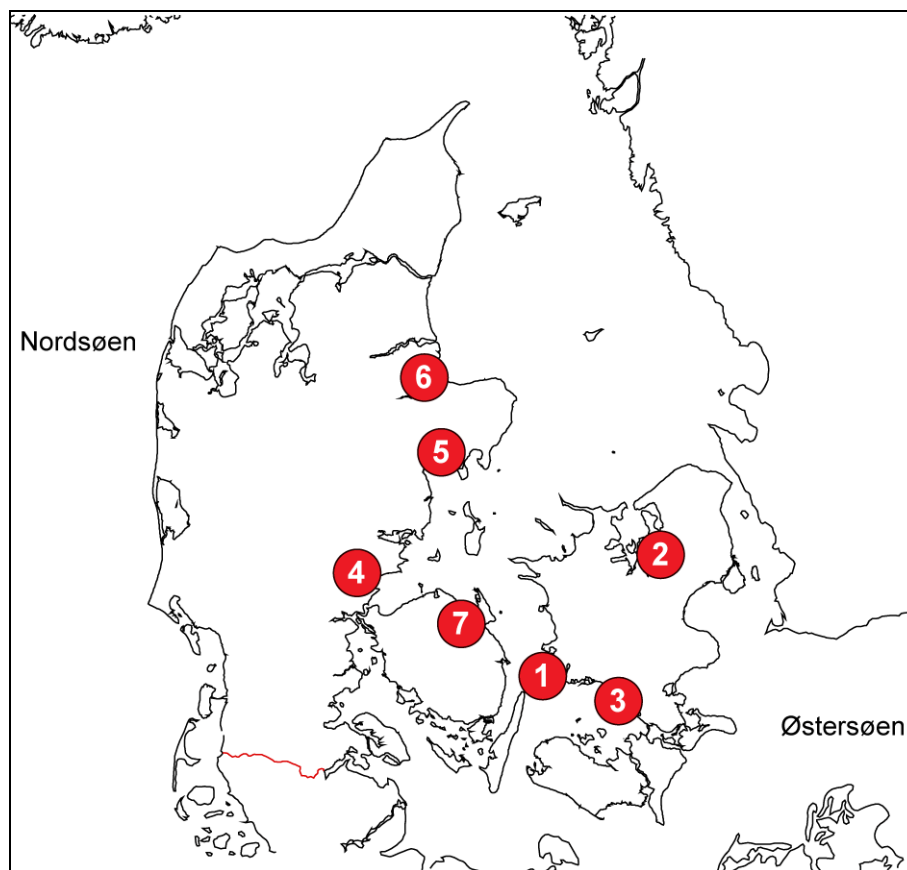
3 Stationer og indsamling af prøver

Prøvetagningen af ålekvabber er forløbet over to perioder, hhv. november 2007 og maj-juni 2008.

I november 2007 blev der fra 6 eksisterende NOVANA-stationer med biologisk effektmonitoring i ålekvabber udtaget en række ekstra prøver til supplerende kemiske og biologiske undersøgelser af hunnerne og deres kuld, hhv. fra Randers Fjord, Århus Bugt, Vejle Fjord, Roskilde Fjord, Karrebæk Fjord og Agersø i Storebælt. Prøver, men kun fra den eksisterende NOVANA-indsamling i november 2007 i et syvende område, Odense Fjord, blev også senere inddraget i denne undersøgelse (figur 3.1).

Desuden blev der også i maj-juni 2008 indsamlet 30-40 hanner af ålekvabber. Denne indsamling foregik i de samme områder som i november 2007 på nær Odense Fjord, der har erstattet Randers Fjord, idet der ikke foregik ålefiskeri her på det pågældende tidspunkt. Denne forårsindsamling havde fokus på hanner af ålekvabbe til brug for gonadehistologiske intersex-analyser, se kapitel 8.

Figur 3.1. Undersøgelingslokaliteter i enten november 2007 eller maj 2008. 1) Agersø i Storebælt, 2) Roskilde Fjord, 3) Karrebæk Fjord, 4) Vejle Fjord, 5) Århus Bugt, 6) Randers Fjord og 7) Odense Fjord.



Tabel 3.1. Stationsoplysninger for efterårsindsamlingen 2007 og forårsindsamlingen 2008.

Område	Stationsnavn	Dato	Position (bredde- og længdegrad)		Antal fisk
1) Agersø (referencestation)	Agersø Sund	15-11-2007	5512.5	1111.5	51♀ + 43♂
		20-05-2008			13♀ + 32♂
2) Roskilde Fjord	Risø	21-11-2007	5541.3	1204.5	58♀ + 39♂
		25-05-2008			12♀ + 35♂
3) Karrebæk Fjord	Karrebæksminde	13-11-2007	5511.4	1140.0	63♀ + 3♂
		26-05-2008			18♀ + 31♂
4) Vejle Fjord	Brønshoved	30-10-2007	5542.2	0936.2	50♀ + 10♂
		27-05-2008			12♀ + 35♂
5) Århus Bugt	170009	30-10-2007	5610.1	1013.6	55♀ + 0♂
		28-05-2008			12♀ + 33♂
6) Randers Fjord	230066	30-10-2007	5634.5	1015.9	37♀ + 10♂
7) Odense Fjord	Seden Strand	12-06-2008	5517.3	1018.4	10♀ + 38♂

Indsamlingen blev i alle områder udført med åluser og med hjælp fra lokale fritidsfiskere. I alt blev der indsamlet 419 ålekvabber i efteråret 2007 og 281 ålekvabber i foråret 2008 (tabel 3.1). Fiskene blev opbevaret i aflukkede åluser eller trådbure i maksimalt to uger fra fangsttidspunktet og frem til dissektion og udtagning af prøver til de forskellige delundersøgelser (tabel 3.2). Prøver til CYP1A aktivitet og ekspresion samt PAH-metabolitter blev taget fra de 10 mest friskfangede fisk, der havde været opbevaret i det færreste antal dage, der optimalt set er maksimalt 2 dage.

Stationen ved Agersø anses som referencestation, da den betragtes som den generelt mindst belastede station, hvor der også er størst vandudveksling sammenlignet med de andre områder. De andre områder er alle placeret tæt på større byer, og i de fleste tilfælde i mere aflukkede fjordområder med lavere vandudveksling.

Følgende biometriske mål er taget på alle fisk: længde, totalvægt, somatisk vægt, vægt af lever, vægt af gonade (dvs. kuld hos hunner eller testikler hos hanner), antal unger i kuld, antal og type af misdannede unger og anden fejludvikling af unger i henhold til NOVANA teknisk anvisning (Strand & Dahllöf 2005).

Tabel 3.2. Oversigt over delundersøgelser (parametre), antal prøver pr. station og opbevaring.

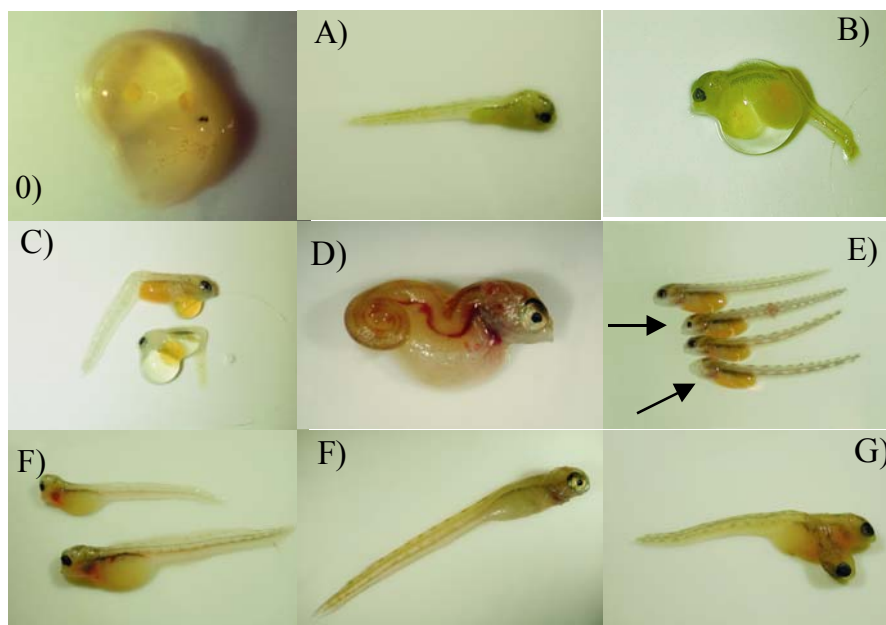
Delundersøgelser	Antal prøver	Prøvetype/organ	Opbevaring
Reproduktiv succes ^N	40-50 hunner/kuld	A) Unger	Undersøges friske
Dioxinlignende stoffer	10 hunner/kuld, pooles*	B) Unger	-20° C i ritsanposer
PAH-metabolitter	10 hunner*	C) Muskel	-20° C i eppendorfrør
		D) Galde	
CYP1A aktivitet (EROD) ^N	10 hunner*	E) Urin	-80° C i cryorør
		F) Lever	
CYP1A-ekspresion (mRNA)	10 hunner*	G) Lever	RNA later i cryorør
Populationsgenetik	50-100 hunner og hanner	H) Hoved (inkl. hjerne)	-80° C i knapnose
Intersex (først i maj 2008)	30-40 hanner	I) Testikler	Histo-formalin i glas

^N tilbagevendende NOVANA-aktivitet. * Udtaget fra de samme 10 individer.

4 Misdannelser hos ålekvabbens unger

De tidlige livsstadier hos fisk og også andre dyr er typisk de mest modtagelige og følsomme stadier overfor miljøfarlige stoffer, som kan medføre misdannelser (teratogene effekter) (Weis & Weis 1989; Bodammer 1993, Neuman et al. 1999). Undersøgelser viser, at teratogene effekter kan induceres under hele den tidlige udviklingsperiode fra modnende kønsceller til unger før klækning (Bodammer 1993). Udviklingen af skelettet er særligt følsomt. Påvirkning af skelettet kan bl.a. føre til misdannelser af rygsøjlen, men også misdannelser i indre organer og hoved samt øjendeformiteter er hyppige teratogene effekter i fisk (Weis & Weis 1989). Undersøgelser af teratogene effekter hos fisk er hovedsageligt udført på fiskearter med fritsvømmende larvestadier, og i disse undersøgelser er det vist, at en række stoffer såsom PAH'er, klorerede kulbrinter som dioxin og PCB, pesticider, metaller eller stoffer med hormonlignende effekter kan medføre forskellige typer af misdannelser hos fiskelarver (Weis & Weis 1989; Bodammer 1993; Davis 1997). Derudover tyder det også på, at andre stresspåvirkninger, som fx iltsvind, temperatur, fødemangel herunder vitaminmangel, kan påvirke fritsvømmende fiskelarvers udvikling (Bodammer 1993). Der er indikationer på, at lave vandtemperaturer måske også kan øge følsomheden hos visse fiskearter overfor miljøfarlige stoffer (Dethlefsen et al. 1997).

Figur 4.1. Forskellige typer af misdannelser hos ålekvabbeunger observeret i danske undersøgelser. 0) tidligt døde, A) sent døde, >10 mm, B) misdannet blommesæk- eller indre organer, C) bøjet ryggrad, D) spiralførm ryggrad, E) manglende eller defekte øjne, F) hoveddeformiteter og G) sammenvoksede eller siamesiske tvillinger (fra Strand et al. 2004a).



Flere udenlandske undersøgelser har vist, at der kan forekomme et øget antal misdannelser hos unger i kuldene fra drægtige ålekvabber fra forureningsbelastede områder, bl.a. i Sverige og Tyskland (Vetemaa et al. 1997; Gercken et al. 2006; 2007). Danmarks Miljøundersøgelser (DMU) har i 2001-2002 (Strand et al. 2004a) og i perioden 2004-2008 sammen med fire amter og senere hen de statslige Miljøcentre (Strand 2005; 2007; Strand et al. 2009) undersøgt den reproduktive succes hos ålekvabber, herunder undersøgt forekomsten af misdannelser hos ålekvabbeyngel i forskellige

danske fjorde som en del i vurderingen af miljøtilstanden under NOVANA-programmet (Strand & Dahllöf 2005).

De fleste områder med øgede forekomster af misdannede unger er generelt kendetegnet ved at være kystnære områder med en øget menneskelig påvirkning fra byer og industri. Det kan derfor ikke udelukkes, at disse effekter skyldes påvirkning af miljøfarlige stoffer, herunder dioxin, PAH eller tungmetaller (Stuer-Lauridsen et al. 2008; Halling-Sørensen et al. 2008).

Til sammenligning har svenske undersøgelser vist generelt, at kun mindre end 5% af hunnerne indsamlet i mindre belastede referenceområder har mere end 5% abnormt yngel (Vetemaa et al. 1997; Svödäng & Förllin 1997; Ådjers et al. 2001), hvilket er i overensstemmelse med, hvad der forekommer i danske kystområder med større vandudveksling som fx ved Agersø i Storebælt eller i Lillebælt (Strand et al. 2009). På baggrund af det har ICES foreslået, at et anslået baggrundsniveau er på mindre end 5% af kuldene, der har mere end 5% misdannede unger (ICES 2007).

4.1 Metoder

Typer af misdannelser, der synligt kan identificeres, omfatter misdannelser af blommesæk- og tarmdeformiteter, bøjet eller spiralformet rygsøjle, øjendeformiteter, kraniale deformiteter og siamesiske tvillinger, som ifølge NOVANA teknisk anvisning karakteriseres som typerne B til G (Strand & Dahllöf 2005). Derudover kan der også forekomme anden form for fejludviklede unger, herunder tidligt og sent døde unger uden synlige misdannelser samt "dværge" (hhv. type 0, A og I) (figur 4.1; tabel 4.1).

Tabel 4.1. Karakterisering af forskellige typer af fejludviklede unger, jf. figur 4.1. (Strand & Dahllöf 2005).

Type	Beskrivelse af synlige tegn på fejludvikling af unger
0.	Befrugtede æg eller embryoner, der lige er klækket (< 10 mm). Ofte døde.
A.	Døde unger uden misdannelser (> 10 mm).
B.	Unger med misdannelser i blommesæk eller indvolde.
C.	Unger med vinklet knæk på rygrad eller hale.
D.	Unger med spiralformet rygrad.
E.	Unger med defekt på øjne eller helt manglende øjne.
F.	Unger med misdannelser i hovedet.
G.	Sammenvoksede unger, evt. som siamesiske tvillinger.
H.	Andre abnormiteter, evt. kalcificerede unger eller sammenfildrede klynger.
I.	Unger med reduceret vækst, "dværgvækst".

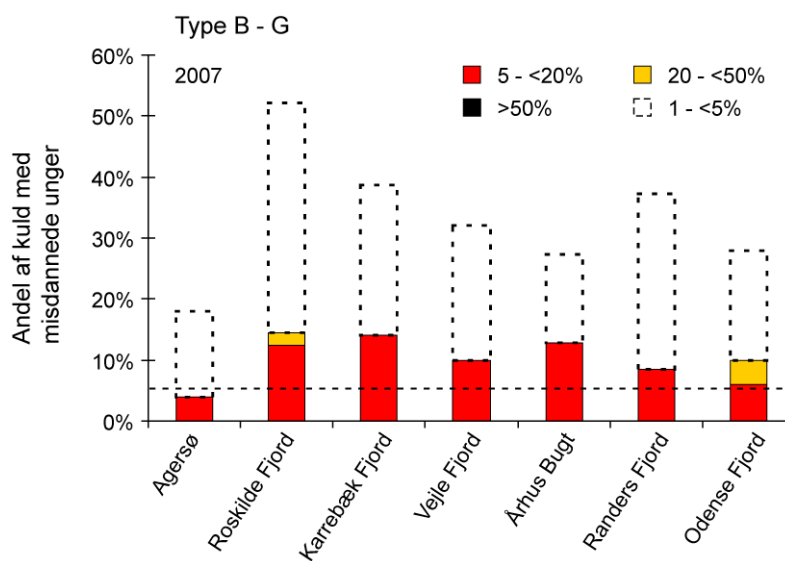
Data for fejludviklede unger, herunder både for misdannelser (type B-G) og andre typer (hhv. type 0, A og I), opgøres som den procentvise andel af kuld med øget forekomst (> 5%) af misdannede unger i det enkelte kuld (kuldniveau).

I NOVANA-programmet er der for at vurdere omfanget af forekomsten af misdannelser som udgangspunkt undersøgt minimum 40 kuld pr. område.

4.2 Resultater og diskussion

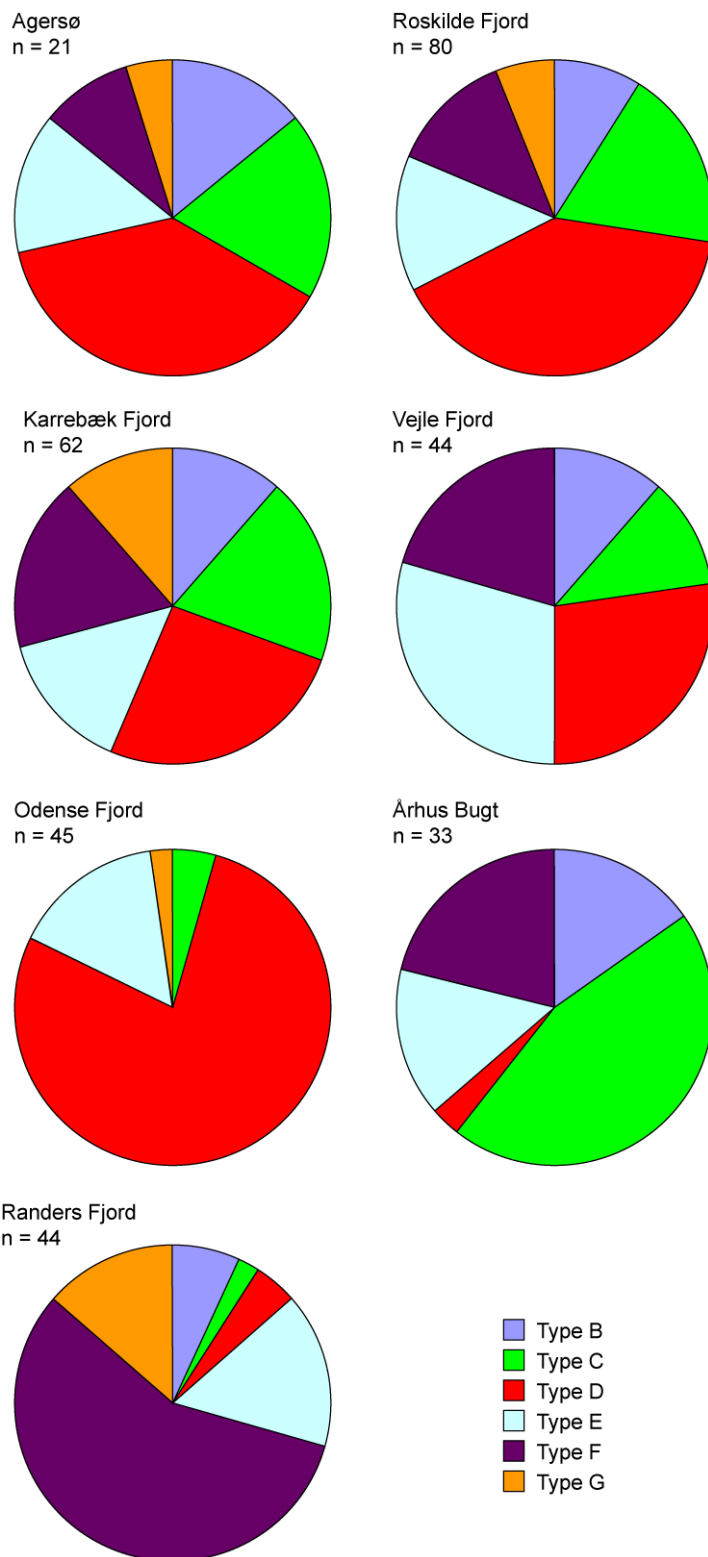
I figur 4.2 vises andelen af kuld hos ålekvabbe med en øget forekomst af misdannelser, der kan karakteriseres som typerne B-G i de samme 7 områder, hvor der i denne undersøgelse er undersøgt for en række supplerende kemiske stoffer i fiskene, biomarkører og populationsgenetik i november 2007. Andelen af kuld med en øget forekomst af misdannede unger (med op til 15% af kuldene i Roskilde Fjord) var i efteråret 2007 forholdsvis lavt sammenlignet med tidligere år, hvor helt op til 53% af kuldene har haft en øget forekomst af misdannelser i deres kuld (Strand et al. 2004a; Strand 2007). I alle områder end ved Agersø vurderes forekomsten af misdannelser dog til at være over det anslåede baggrundsniveau på mindre end 5% af kuldene, der har mere end 5% misdannede unger (ICES 2007). Ved Agersø havde kun 4% af kuldene mere end 5% misdannede unger i 2007.

Figur 4.2. Andel af kuld med en øget forekomst af misdannede unger (type B-G) i de samme 7 NOVANA-områder, hvor der i denne undersøgelse er undersøgt for en række supplerende effektparametre i november 2007. Desuden indgår en opdeling af kuld i grupper med hhv. 0- < 5%, 5- < 20%, 20- < 50% og > 50% misdannede unger i det enkelte kuld. Niveaue for en øget forekomst af misdannelser i et enkelt kuld (dvs. > 5%) er sammenholdt med anslået baggrundsniveau (---), som er vurderet til at være på mindre end 5% af kuld, der har > 5% misdannede unger.



Alle typerne af misdannelser B-G blev stort set fundet i de fleste undersøgte områder, men der er relativt store områdemæssige forskelle i den relative fordeling af typerne. Kun i Odense Fjord, Vejle Fjord og Århus Bugt 5 blev der kun fundet hhv. 4, 5 og 5 typer af misdannelser, hvorimod i de andre 4 områder blev der fundet alle 6 forskellige typer af misdannelser (figur 4.3). Med hensyn til den relative fordeling mellem typerne, så udgør misdannelser af rygraden (typerne C og D) ca. halvdelen af de fundne misdannelser i områderne Agersø, Roskilde Fjord, Karrebæk Fjord, Vejle Fjord og Århus Bugt. Derimod udgør typerne C og D mere end 80% i Odense Fjord og kun 6% i Randers Fjord. I Randers Fjord udgør øjen-skader (type E) størstedelen af de fundne misdannelser.

Figur 4.3. Den relative fordeling af forskellige typer af misdannede unger (type B-G) i kuld fra ålekvabbe fra de forskellige områder i november 2007. n angiver det totale antal misdannede unger fundet i hvert område.



Forskellen i fordelingen af typerne af misdannelser mellem områderne er statistisk forskellig (tabel 4.2). Dog skal det bemærkes, at styrken i testet varierer, eftersom der er en stor spredning i antal kuld med misdannelser pr. område.

Forskellen i fordelingen mellem typerne af misdannelser kan også være en indikation på, at årsagen kan være lokale miljøforhold, herunder specifikke grupper af miljøfarlige stoffer, da visse grupper af miljøfarlige stoffer tidligere er sat i forbindelse med specifikke typer af misdannelser i fisk (Weis & Weis 1989; Bodammer 1993).

Tabel 4.2. Multivariat similaritetsanalyse af forskelle i fordelingen af misdannede unger (typerne B-G) mellem områderne. * markerer, at fordelingen mellem de enkelte områder er statistisk forskellige ($p < 0,05$).

	Storebælt <i>n</i> = 10	Roskilde <i>n</i> = 26	Karrebæk <i>n</i> = 11	Vejle <i>n</i> = 17	Århus <i>n</i> = 15	Randers <i>n</i> = 14	Odense <i>n</i> = 14
Storebælt						*	
Roskilde					*	*	
Karrebæk					*	*	
Vejle							*
Århus							*
Randers							*
Odense							

n angiver antallet af kuld med misdannelser af typerne B-G i hvert område.

Udover synligt misdannede unger forekom der også andre typer af fejludvikling af æg, embryoner og unger, der er karakteriseret som hhv. tidligt døde (type 0) og sent døde unger uden misdannelser (type A) samt dværgvækst (type I). Ligeledes for disse typer var der forholdsvis store områdemæssige forskelle i omfanget, hvormed de forekom (tabel 4.3). For eksempel var de højeste og laveste forekomster af type 0 i Karrebæk Fjord og Randers Fjord med hhv. 25% og 5,7% af kuldene, der havde mere end 5% af type 0. Derimod forekom type A især i Randers Fjord med op til 14% af kuldene, der havde mere end 5%. Med hensyn til type I forekom de hyppigst i Vejle og Karrebæk Fjord (tabel 4.3.).

Yderligere var der en række voksne hunner (> 15 cm), der ikke bar nogle æg eller unger ved undersøgelsestidspunktet i november 2007, hvilket kan være et tegn på, at de var sterile. Hyppigst i Roskilde Fjord hvor 10,4% af de undersøgte voksne hunner ikke bar unger, hvorimod sådanne hunner ikke blev registreret ved Odense Fjord, Vejle Fjord og Århus Bugt. Det kan dog ikke udelukkes, at disse forskelle skyldes en konsekvens af, at indsamlingen havde fokus på drægtige hunner og at indsamlingen blev foretaget af forskellige personer i de forskellige områder. En mere populationsdækkende indsamling, der ikke fortrinsvis fokuserer på drægtige hunner, vil bedre kunne beskrive forskelle i forekomsten af ikke kuldbærende hunner.

Tabel 4.3. Andel af kuld med en forhøjet andel af fejludviklede unger (dvs. > 5% pr. kuld) af hhv. tidligt døde (type 0), sent døde uden misdannelser (type A) og "dværge" (type I) samt hunner uden unger.

	Agersø	Roskilde Fjord	Karrebæk Fjord	Vejle Fjord	Århus Bugt	Randers Fjord	Odense Fjord
Type 0	12%	10%	25%	12%	22%	5,7%	12%
Type A	0,0%	4,2%	0,0%	0,0%	3,6%	14%	0,0%
Type I	2,0%	0,0%	5,3%	6,0%	1,8%	0,0%	2,0%
Hunner uden unger (sterile?)	2,0%	10,4%	1,8%	0,0%	0,0%	5,7%	0,0%

Det er også signifikante forskelle mellem områder, når det kommer til fordelingen af de andre typer af effekter på ungeudviklingen, hhv. type 0, A og I (tabel 4.4).

Tabel 4.4. Multivariat similaritetsanalyse af forskelle i fordelingen af andre typer af fejludviklede unger end misdannelser (dvs. typerne 0, A og I) mellem områderne. * markerer, at fordelingen mellem de enkelte områder er statistisk forskellige ($p < 0,05$).

	Storebælt <i>n</i> = 30	Roskilde <i>n</i> = 39	Karrebæk <i>n</i> = 34	Vejle <i>n</i> = 29	Århus <i>n</i> = 41	Randers <i>n</i> = 27	Odense <i>n</i> = 31
Storebælt			*				*
Roskilde							*
Karrebæk				*		*	
Vejle							*
Århus						*	
Randers							*
Odense							

n angiver antallet af kuld med andre typer af fejludviklede unger af typerne 0, A og I i hvert område.

Især Odense Fjord skiller sig ud fra flere af de andre områder, men også Karrebæk Fjord, Vejle Fjord og Randers Fjord har en fordeling mellem typerne, der afviger fra nogle af de andre områder (tabel 4.4).

Disse typer af fejludvikling kan sandsynligvis også skyldes andre lokale miljøfaktorer end miljøfarlige stoffer, som f.eks. iltsvind og for høje vandtemperaturer, eller kombinationer deraf (Strand et al. 2004a).

4.3 Konklusioner

- Misdannede unger forekom i alle de 7 undersøgte områder i 2007, med de mest hyppige forekomster i Roskilde Fjord, Århus Bugt og Randers Fjord. Det laveste niveau forekom ved den forventede referencestation Agersø i Storebælt, hvor kun 4% af kuldene havde forhøjede niveauer af misdannede unger, hvilket er under det anslåede baggrundsniveau på 5%.
- Der var tydelige områdemæssige forskelle i den relative fordeling, hvormed de forskellige typer af misdannelser forekom.
- Ud over misdannelser forekom der også andre typer af fejludvikling hos ålekvabbens unger, hvor der også var områdemæssige forskelle.
- De områdemæssige forskelle i hyppighed og fordeling mellem typerne af misdannelser er en indikation på, at lokale miljøforhold, herunder belastning med miljøfarlige stoffer, har betydning.

5 Dioxiner, furaner og co-planare PCB'er i ålekvabbe og dens unger

De dioxinlignende stoffer er en af de mest potente teratogene stofgrupper, og det kan derfor ikke udelukkes, at de kan bidrage til forekomsten af misdannelser i ålekvabbe i de kystnære danske havområder. De har et højt bioakkumuleringspotentialt og vil desuden kunne overføres fra moderfisk til æg og unger. Desuden er de dioxinlignende stoffer (sammen med PAH) blandt de stofgrupper, som i høj grad kan inducere CYP1A-enzymet, som i dette projekt blev målt dels ved EROD-aktivitet, dels ved mRNA-ekspression. Derudover er dioxinlignende stoffer sat i forbindelse med en række andre effekter, herunder cancer, hormonforstyrrelser og svækkelse af immunforsvar (Srogi 2008).

De dioxinlignende forbindelser består af adskillige varianter (congenerer), som dannes bl.a. ved menneskeskabte aktiviteter som forbrænding af affald og visse industrielle aktiviteter. Dyr og mennesker eksponeres løbende til disse stoffer i miljøet, og bl.a. indtaget af fedtholdige fødeemner anses som den vigtigste optagelsesvej (Srogi 2008).

Formålet med denne delundersøgelse var at vurdere koncentrationsniveauer og sammensætningen af de forskellige dioxinlignende forbindelser i de voksne ålekvabber og deres unger.

5.1 Metode

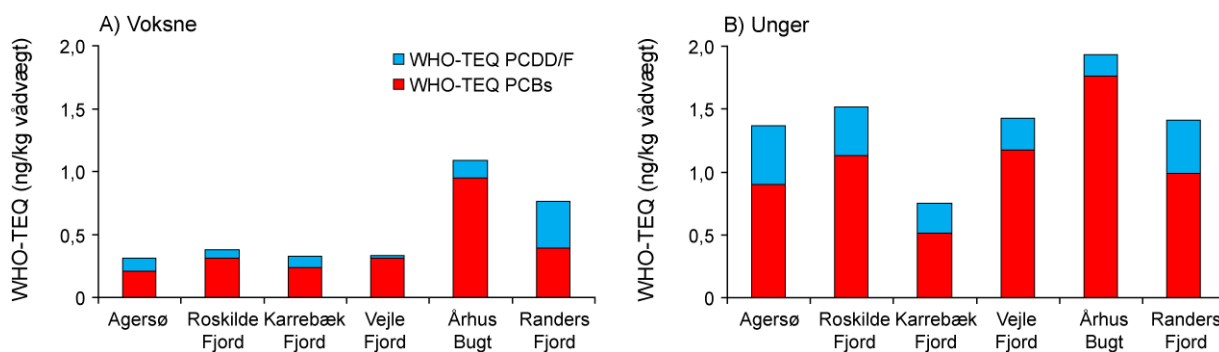
Analyserne blev udført på puljede prøver af hhv. muskel fra voksne hunner og deres kuld fra de 6 stationer, i alt 12 prøver. Prøverne blev homogeniseret, uddelt og ekstraheret med toluen på Soxhlet. Ekstrakter blev oprenset med Supelco Dioxin Preparation System, Florisil version. Denne metode er afprøvet og valideret for oprensning af dioxiner og WHO-PCB i certificeret materiale, inklusiv fiskemuskel (Aries et al. 2006). Ekstrakterne er analyseret på højtopløselig GC-MS.

Dioxinanalyserne omfattede 7 dibenzo-p-dioxiner (PCDD), 10 polychlorerede dibenzofuraner (PCDF) samt 4 non-orto PCB'er (CB77, 81, 126, 169) og 8 mono-ortho PCB'er (CB105, 114, 118, 123, 156, 157, 167, 189). Non-ortho og mono-ortho PCB er også kendt som WHO-PCB. Disse PCB forbindelser har også en dioxinlignende aktivitet og de kan ved omregning med congener-specifikke TEF-værdier også indgå i den samlede beregning af dioxin-toksicitet for hele gruppen af dioxinlignende stoffer (WHO-TEQ) (EF 2006).

5.2 Resultater og diskussion

Dioxinlignende forbindelser var akkumuleret i ålekvabbe fra alle 6 områder - både i muskel fra de voksne fisk og deres unger med de højeste WHO-TEQ-niveauer i Århus Bugt med hhv. 1,09 og 1,93 ng/kg vådvægt. Niveauerne af dioxinlignende forbindelser var generelt højere i ålekvabbers unger end i muskel fra de voksne fisk (figur 5.1), men der var også

forskel mellem områder, når man sammenligner det relative forhold mellem niveauet i de voksne fisk og deres unger. Fx var der betydeligt mindre i unger fra Karrebæk Fjord sammenlignet med de andre områder, hvilket ikke afspejles i muskel fra de voksne fisk (figur 5.1). Dette kan måske skyldes forskelle i tidspunktet for hhv. den egentlige deponering af stofferne i æggene, der foregår om foråret, og den senere indsamling af muskel fra drægtige hunner i november.



Figur 5.1. Koncentrationen af dioxinlignende forbindelser i A) muskel fra de voksne og gravide hunner og B) deres unger.

I samtlige 6 undersøgte områder udgjorde non-ortho og mono-ortho PCB generelt en dominerende andel (mellem 51%-93%) af den samlede dioxin-toksicitet både i muskel fra de voksne ålekvabber samt deres unger.

Til sammenligning har nogle laboratorieundersøgelser af effekter af dioxin på fisks reproduktion vist, at de laveste effektive niveauer, hvor dioxin (i form af forbindelsen TCDD) kan påvirke ægs og ungers udvikling og overlevelse er mellem 0,1-2 ng TCDD/kg vådvægt i både de voksne fisks muskel samt i æg (Elonen *et al.* 1998; Giesy *et al.* 2002; Yamauchi *et al.* 2006). Dette omfatter også udvikling af forskellige typer af misdannelser som også ses hos ålekvabbers unger. Nogle undersøgelser antyder også, at dioxinniveauerne i Østersøområdet kan spille en rolle for fisks reproduktion og udvikling, fx i form af det såkaldte M74-syndrom i laks, som også omfatter udvikling af visse former for misdannelser. Det menes, at M74 skyldes, at Østersølakserne udviser mangel på vitamin B1 - også kaldet thiamin - hvilket også er forbundet med bl.a. CYP1A og dermed også til effekter af de dioxinlignende stoffer (Börjeson & Norrgren 1997; Pesonen *et al.* 1999; Amcoff *et al.* 2002).

Det kan derved ikke udelukkes, at de fundne niveauer af dioxin i ålekvabbe også kan forårsage tilsvarende effekter på æg og unger.

Niveauerne i muskel fra ålekvabbe var i alle de undersøgte 6 kystnære områder til gengæld væsentligt under fødevarer kriteriet for magre fisk (som fx ålekvabbe) til humant konsum på 8,0 ng/kg vådvægt (EF 2006).

5.3 Konklusioner

- Dioxinlignende forbindelser forekom i både muskel fra de voksne fisk og deres unger fra samtlige seks undersøgte områder.

- Niveaueet af dioxinlignende forbindelser var generelt højere i ålekvabens unger end i muskel fra de voksne fisk, men der var ikke nogen umiddelbar sammenhæng mellem niveaueet i unger og de voksne.
- De højeste dioxinniveauer blev fundet i Århus Bugt, men ellers var de områdemæssige forskelle i niveauer væsentligt afhængigt af, om sammenligningerne baseres på niveauer i voksne eller i deres unger.
- Det kan ikke udelukkes, at de fundne niveauer af dioxin kan være med til at forårsage forhøjede forekomster af misdannelser i ålekvabbe.

6 PAH-metabolitter i fiskegalde og urin

Polyaromatiske hydrocarboner (PAH) repræsenterer en gruppe af persistente organiske stoffer, som findes både i marine og terrestriske miljøer. Ukomplet forbrænding af organiske materialer, herunder fossile brændstoffer, anses som den primære kilde til PAH i miljøet, men som naturlige komponenter af råolie og raffineret olie samt kul bliver PAH'er også tilført miljøet på grund af produktion, transport, brug og eventuelle spild af fossile brændstoffer (Oros & Ross 2004).

PAH-forbindelser bliver forholdsvis hurtigt optaget især over gællerne og via føden, men fisk er også hurtige til at omsætte og udskille dem igen. En del af disse PAH-forbindelser kan alligevel være skadelige for organismen, da de efter optagelse i fisken kan blive omdannet til særligt reaktive mellemstoffer (metabolitter), som kan reagere med og dermed skade cellernes DNA (Varanasi *et al.* 1986), se også kapitel 7. Da udgangsstofferne af PAH omsættes hurtigt, vil disse forbindelser ikke bioakkumuleres i særlig grad i fisk, og der forekommer derfor oftest kun spor af PAH, når der analyseres fx i muskel- eller levervæv fra fisk (Ariese *et al.* 1993). Derimod, eftersom PAH'er hurtigt bliver omsat og udskilt igen i fisk, kan PAH-belastning og deraf følgende risiko for PAH-effekter i fisk lettere måles som PAH-metabolitter i galde og urin, da disse er de primære ekskretionsveje. Galde fra fisk har været anvendt i mange undersøgelser til at vurdere effekter af PAH i fisk – både i kystnære farvande og åbne farvande (Ariese *et al.* 1993; Aas *et al.* 1998; Vourinen *et al.* 2006; Kammann 2007). Andre undersøgelser har også fundet høje niveauer af PAH-metabolitter i andre kropsvæsker inklusiv urin, fx fra krabber (Fillmann *et al.* 2004, Watson *et al.* 2004). Der er dog kun lidt viden omkring forekomsten af PAH-metabolitter i urin fra fisk.

En anden metodemæssig fordel er, at prøvetagning, opbevaring, ekstraktion og analyser af fiskens galde og urin er forholdsvis simpel, sammenlignet med andre slags væv som fx muskel og lever. Dette skyldes, at fiskens kropsvæsker som galde og urin indeholder et forholdsmæssigt lavt niveau af proteiner og lipider, og derfor behøver prøverne ikke at ekstraheres eller renses i samme grad forud for analysen. Derudover kan matricer som galde og urin forholdsvis let analyseres for PAH-metabolitter, bl.a. vha. simple fluorescens-teknikker eller HPLC/F-teknikker. På hvilken måde PAH-niveauerne i galde bedst kan normaliseres til fx niveauet af proteiner og pigmenter som det grønne galdestof biliverdin, er dog stadigvæk til diskussion (Ariese *et al.* 2005; Kammann 2007). Det er kendt, at der sker en opkoncentrering af bl.a. proteiner og pigmenter i galden i perioderne mellem fødeoptag og det diskuteres, om niveauet af disse stoffer også vil co-variere med niveauet af PAH-metabolitter i fiskens galde, da tendenserne ikke er entydige (Kammann 2007).

Formålet med denne delundersøgelse var at vurdere koncentrationsniveauer af PAH-metabolitter i hhv. galde og urin som tegn på belastning med PAH.

6.1 Metode

PAH-metabolitten af stoffet pyren, 1-hydroxypyren, har vist sig at være den primære PAH-metabolit i galde fra fisk, når de er eksponeret til PAH i miljøet fra forurenede sedimenter (*Ariese et al. 1993*). For eksempel bidrager 1-hydroxypyren med 76% i gennemsnit af alle PAH-metabolitter i galde fra skrubber indsamlet i Østersøen (*Kammann 2007*). Derfor kan netop denne metabolit med fordel anvendes som biomarkør for miljøbelastningen med PAH.

Da alle PAH-forbindelser er meget fluorophore, kan de fase-II konjugerede metabolitter som 1-hydroxypyren detekteres i fortyndede kropsvæsker af galde og urin, fx ved brug af teknikken "Synchronous Fluorescens Scan" (SFS) i bølglængdeintervallet 250-450 nm og med en konstant deltaværdi på 42 nm. Herved kan de pyren-lignende metabolitter, dvs. 3-4 ringe PAH-forbindelser, måles ved excitation-/emissionsbølglængderne omkring 341/383 nm og angives som 1-hydroxypyrene ækvivalenter ifølge ICES guideline (*Ariese et al. 2005*). Detektionsgrænsen er ved 2000 gange fortynding af galde i 50%:50% methanol:vand på 0,2 µg/ml. Reproducerbarhed er inden for 10%. Urinprøver fortyndes derimod kun 100 gange.

Niveauet af galdepigmenter kan kvantificeres ved måling af absorbans med UV spektrofotometer ved 380 nm (*Kammann 2007*).

Der blev analyseret prøver af galde og urin fra ca. 10 hunner indsamlet ved de 6 stationer i november 2007.

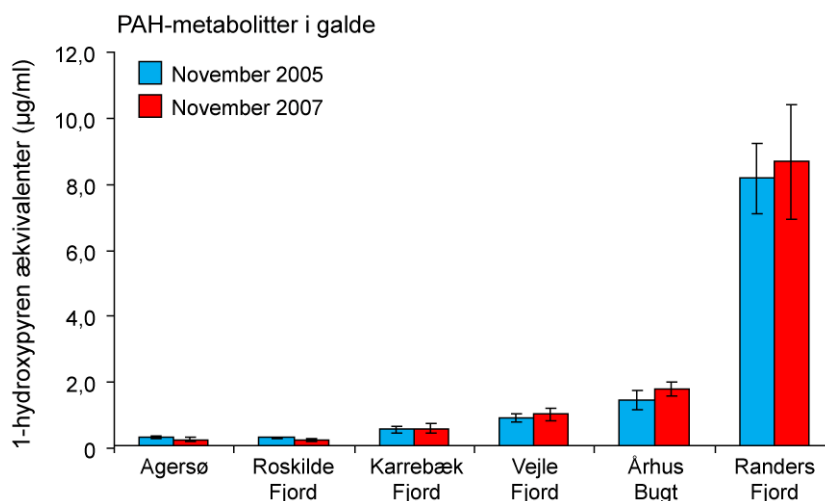
6.2 Resultater

PAH-metabolitter i form af 3-4 ringe PAH'er (målt som 1-hydroxypyren ækvivalenter) forekom i galde og urin fra ålekvabbe fra samtlige undersøgte områder.

6.2.1 PAH metabolitter i galde

De gennemsnitlige koncentrationer af PAH-metabolitter i galde var mellem 0,25 og 8,7 µg/ml med de højeste koncentrationer i Randers Fjord efterfulgt af Århus Bugt, Vejle Fjord og Karrebæk Fjord og med de generelt laveste niveauer i Roskilde Fjord og ved Agersø (*figur 6.1*). Koncentrationsniveauerne i de enkelte områder er i høj grad i overensstemmelse med de tidligere fundne niveauer i 2005 (*Strand unpubl.*).

Figur 6.1. Koncentration af PAH-metabolitter (målt som 1-hydroxypyren ækvivalenter) i galde fra ålekvabber fra de 6 indsamlingsområder i november 2007 og sammenlignet med tilsvarende indsamling i november 2005.

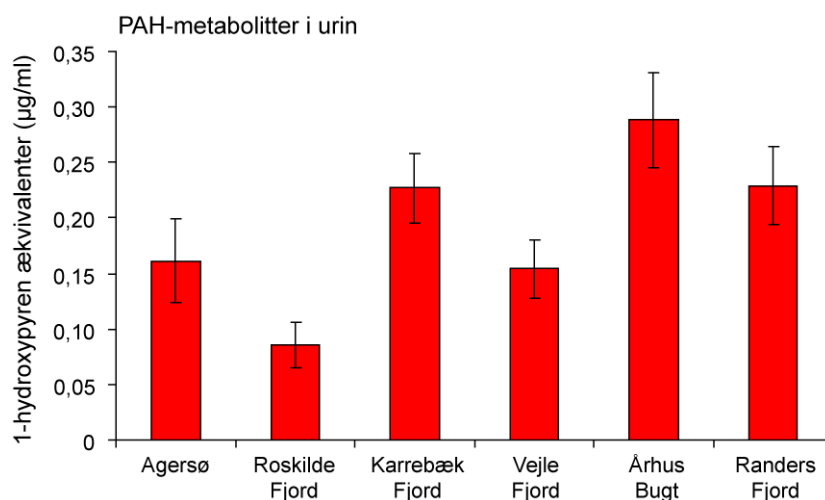


6.2.2 PAH-metabolitter i urin

PAH-metabolitter kan på tilsvarende måde som i galdeprøver identificeres og kvantificeres i urinprøver. De højeste koncentrationer i urin forekom i Århus Bugt, efterfulgt af prøver fra Randers Fjord og Karrebæk Fjord. De gennemsnitlige koncentrationer af PAH-metabolitter i urin var mellem 0,09 og 0,30 µg/ml i urin (figur 6.2), og de var derved generelt lavere end i galde.

De områdemæssige forskelle fundet for PAH-metabolitter i galdeprøver afspejles til gengæld ikke tilsvarende i urin. De laveste koncentrationer i urin blev påvist ligesom for galde i prøverne fra Roskilde Fjord, men der forekom ikke tilsvarende markante niveauer i urin som i galdeprøver fra Randers Fjord. Ligeledes var niveauet i urin fra Karrebæk Fjord forholdsvis højt, hvilket var modsat niveauet i galdeprøverne.

Figur 6.2. Koncentration af PAH-metabolitter (målt som 1-hydroxypyren ækvivalenter) i urin fra ålekvabber fra de 6 indsamlingsområder i november 2007.

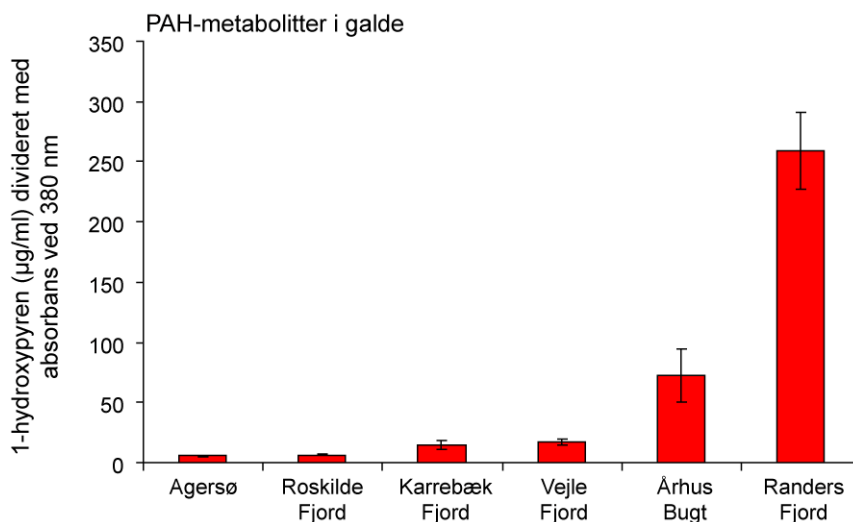


6.2.3 Normalisering af niveauer af PAH-metabolitter i galde

Normalisering af data for PAH-metabolitter i galde, fx til galdepigmenter som biliverdin (målt som absorbansen ved 380 nm) kan være en mulighed for at reducere og udjævne eventuelle forskelle i koncentrationeniveauer. I denne undersøgelse fandt vi dog ikke en sådan sammenhæng, idet data efter normalisering viste en større variation mellem de

individuelle data fra de forskellige stationer (figur 6.3). De områdemæssige forskelle er dog nærmest identiske uanset om denne normalisering er anvendt eller ej.

Figur 6.3. Koncentration af PAH-metabolitter (målt som 1-hydroxypyren ækvivalenter, $\mu\text{g/ml}$) i galde fra november 2007 efter normalisering til indholdet af biliverdin (målt som absorbans ved 380 nm).



6.3 Diskussion

Der var tydelige forskelle i de målte koncentrationer af PAH-metabolitter i urin og galde mellem de seks stationer. De relativt høje niveauer af PAH-metabolitter i galde af fisk fra Århus Bugt og Vejle Fjord tyder på en markant belastning med PAH'er i disse områder. Det kan være nærliggende at tilskrive dette som værende et resultat af større havne- og industrielle aktiviteter og deraf følgende mere kommerciel skibstrafik i disse områder. Derimod er sådanne aktiviteter på et lavere niveau i Roskilde Fjord og Karrebæk Fjord, hvor skibstrafikken domineres af fritidssejls. På den anden side er der en større vandudveksling med de åbne farvande i Århus Bugt og Vejle Fjord end i de to sidstnævnte fjordområder, som ved hurtigere fortynding vil kunne nedsætte miljøbelastning med PAH'er. Overraskende nok viser resultaterne også, at galde fra fisk fra Randers Fjord indeholdt de højeste koncentrationer af PAH-metabolitter, selvom der ikke er nogle umiddelbare større kendte kilder omkring indsamlingsområdet. Det kan ikke afvises, at dette eventuelt også kan skyldes en uhensigtsmæssig opbevaring af fiskene efter endt prøvetagning. Der er dog en klar overensstemmelse mellem data fra en tidligere undersøgelse i 2005 og de markante områdemæssige forskelle understøtter, at lokale miljøforhold har stor betydning for de fundne koncentrationer.

De områdemæssige forskelle i niveauet af PAH-metabolitter i urin var væsentligt anderledes end for galde, hvilket tyder på, at de to ekskretionsveje i forskellig grad afspejler den lokale PAH-belastning. Forskellen kan muligvis ligge i, at andre faktorer kan påvirke dynamikken for metabolisering og den senere udskillelse af fase-II-konjugater i urin og galde via de to vigtige organer hhv. nyre og lever i fiskene. For eksempel vil fisk akkumulere konjugerede PAH-metabolitter i galde under sultperioder, da galden i galdeblæren ikke bliver tømt ind i tarmen, før fisken tager føde til sig igen (Kammann 2007). Normalisering til biliverdin i galdeprøverne viste dog ingen væsentlig effekt af dette. Det er også vigtigt at understrege, at koncentrationer af PAH-metabolitter målt i urin ikke

er normaliseret, og der kan være en tilsvarende sammenhæng for udskillelsen af PAH-metabolitter via urin.

6.4 Konklusioner

- PAH-metabolitter af fortrinsvis 3-4 ringe PAH'er som 1-hydroxypyren kan måles i både galde- og urinprøver ved brug af den samme fluorescens (SFS)-metode.
- Koncentrationen af PAH-metabolitter varierede betydeligt mellem de forskellige undersøgte populationer af ålekvabbe, hvilket må reflektere lokale forskelle i PAH-belastningen.
- Der var betydelige forskelle mellem resultaterne for galde og urin, hvilket tyder på, at de to ekskretionsveje i forskellig grad afspejler den lokale PAH-belastning.

7 Aktivitet og ekspresion af CYP1A-enzymssystemer

I alle fisk findes afgiftningsenzymssystemet CYP1A (cytochrom P450, type 1A), som indgår i den oxidative metabolisme og nedbrydning af visse typer af organiske stoffer, kaldet fase-I-enzymmer. Disse processer foregår med den højeste aktivitet i leveren, men CYP1A kan også forekomme i mindre grad i andre organer som fx gælle, nyre og milt. Ud over at omdanne en del af organismens egne stoffer, kan disse enzymer også omdanne organiske miljøfarlige stoffer såsom PAH og dioxinlignende stoffer, så de bliver mere vandopløselige og nemmere at udskille fra organismen igen, fx som Fase-II-konjugater via galde og urin. Derved betragtes CYP1A-systemet som afgiftningsenzymmer, som er ansvarlige for organismers detoksifikation og ekskretion af sådanne forbindelser. En ulempe er dog, at en forhøjet aktivitet kan medføre en øget produktion af reaktive metabolitter som fx epoxider af PAH. Disse reaktive mellemprodukter har en særlig høj toksicitet, der kan have mutagen og kræftfremkaldende virkning ved, at de skader DNA, hvilket på sigt kan medføre en risiko for svære cellulære og fysiologiske skader, som fx leverskader, immunotoksiske effekter og reproduktionsskader. En anden vigtig egenskab ved disse enzymer er, at de er inducérbare, dvs. at aktiviteten øges som respons på en stigende påvirkning. Disse egenskaber gør CYP1A-systemet både målt som mRNA-ekspresion og enzymaktivitet anvendelige som biomarkører for at vurdere eksponering og effekter af PAH, dioxinlignende forbindelser og andre planare polyaromatiske forbindelser.

CYP1A er et enzym, som dannes, når P450-systemet for afgiftning bliver aktiveret. Syntesen af enzymet starter ved at genet for CYP1A bliver aktiveret og der dannes mRNA, som bliver oversat til selve proteinet. mRNA-niveauet giver et mål for CYP1A i den første tid efter aktivering af genet. Eftersom proteinet har længere levetid end mRNA, vil der på et tidspunkt være mere protein end mRNA til stede. Desuden er proteinet også til stede, efter produktionen af mRNA er slået fra. Dog skal det bemærkes, at der altid vil være en vis grad af CYP1A-ekspresion og -aktivitet til stede, eftersom det samme protein også bliver anvendt til at nedbryde en række af organismens naturligt forekommende stoffer som fx visse hormoner og vitaminer. CYP1A-ekspresion kan derfor være en bedre indikator for momentan eksponering til PAH og dioxinlignende stoffer end CYP1-aktivitet (som anvendes i NOVANA-programmet målt som EROD (Ethoxy-1-Resorufin-O-Deethylase)), idet aktiviteten i højere grad afspejler ophobning af protein, men også kan blive hæmmet ved høj eksponering. Ekspresionen af mRNA CYP1A-ekspresionen er derimod lineært over flere størrelsesordener af eksponering og er derfor et velegnet supplement til CYP1A-aktivitet. På den anden side siger aktiviteten mere om den reelle funktion af enzymssystemet i organismen sammenlignet med ekspresionen.

Formålet med denne delundersøgelse var at vurdere i hvilken grad, der er forskelle i, hvordan CYP1A-enzymssystemet kommer til udtryk som enzymaktivitet eller mRNA-ekspresion i relation til målte niveauer af dioxinlignende stoffer og PAH-metabolitter i fiskene.

7.1 Metoder

7.1.1 Analyse af CYP1-aktivitet (EROD)

Enzymaktiviteten kan fx måles vha. EROD-assay (EthoxyResorufin-O-Deethylase), der er et enzymatisk bioassay, hvor enzymaktiviteten, dvs. hastigheden hvormed prøven kan omdanne et tilsat substrat, ethoxyresorufin, måles (Stagg & McIntosh 1998). Metoden anbefales til marin overvågning af effekter på fisk af bl.a. OSPAR, HELCOM og ICES og er bl.a. inddraget i marine overvågningsprogrammer i en række af vore nabolande, herunder Sverige, Tyskland, Norge og England.

EROD-assayet bygger på princippet, at hvis der er CYP1A-enzymet til stede, kan disse enzymer deetoxilere reagenset 7-ethoxyresorufin. Dannelsen af produktet resorufin måles spektrofotometrisk. Aktiviteten af enzymet angives ved hastigheden, hvormed resorufin produceres normaliseret til proteinniveauet. Mængden af protein bestemmes separat spektrofotometrisk efter en Bradford-reaktion, hvor bovin serum albumin (BSA) bruges som proteinstandard.

Analyseresultaterne angives som pmol (dannet resorufin) pr. minut og pr. g protein (pmol/(min * mg protein)) i S9 fraktion af fiskeleveren. EROD-analyserne er udført i henhold til den af ICES's anbefalede metode (Stagg & McIntosh 1998).

Som kvalitetssikring har DMU's analyselaboratorium i 2008 desuden deltaget i en international præstationsprøvning (interkalibrering) af både bestemmelse af CYP1A/EROD-aktivitet og proteinniveau i fiskelever (BEQUALM 2008). Hovedparten af laboratoriets resultater havde såkaldte z-scores på mindre end 1 og viste derved god overensstemmelse med de senere angivne referenceværdier (tabel 7.1).

Tabel 7.1. DMU's laboratoriums resultater fra deltagelse i international præstationsprøvning for analyser af CYP1A målt som EROD-aktivitet samt proteinkoncentrationer i S9 og microsomal fraktion af fiskelever (BEQUALM 2008).

BEQUALM 2008	Antal analyser	Z-scores: < ±1 (godt)	Z's: ±1 - < ±2 (tilfredsstillende)	Z's: ±2 - < ±3 (tvivlsomme)
CYP1A/EROD	9	9	0	0
Protein	17	12	3	2

7.1.2 Analyse af CYP1-ekspression

For at kunne sammenligne niveauer af CYP1A-ekspression er det nødvendigt at kunne normalisere mellem prøver. I almindelige ekstraktionsforløb for kemiske analyser bruges interne standarder til dette formål. For mRNA-ekstraktion findes ikke tilsvarende, bl.a. på grund af mRNA's ustabilitet. For DNA findes en sådan metode udarbejdet ved DMU (Petersen & Dahllöf 2005). Normalisering mellem prøver i forbindelse med mRNA-analyser udføres derfor ved at måle ratioen mellem mængden af mRNA for CYP1A og mængden af mRNA fra et såkaldt husholdningsgen. En husholdningsgen antages at blive udtrykt i den samme mængde kontinuerligt, hvorimod udtrykket for CYP1A varierer i tid afhængigt af behov for afgiftning. En anden måde at kvantificere på er at normalisere mRNA-ekspressionen mod mængde af DNA, som blev ekstraheret fra den samme prøve. Mængden af DNA er proportionalt med det antal

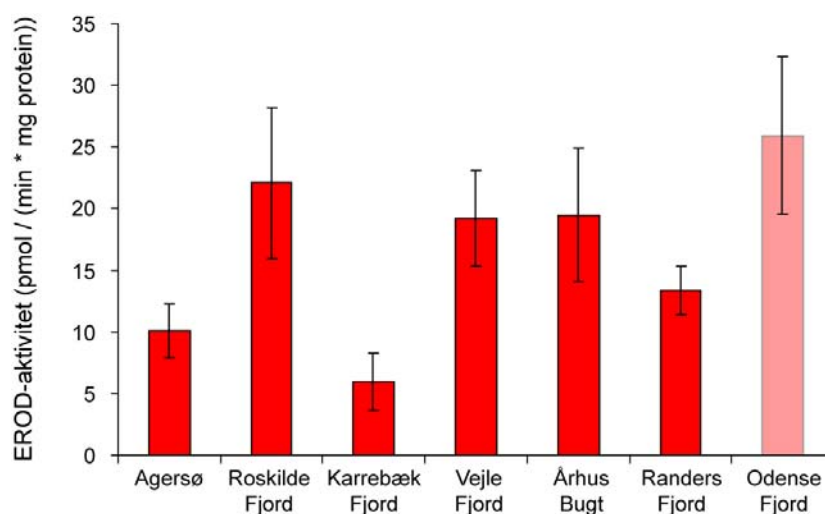
genkopier af CYP1A, der findes og er også konstant. Dog er DNA mere holdbart end mRNA, hvilket gør at brug af husholdningsgenet er at foretrække.

Analyserne blev udført efter en protokol udarbejdet i samarbejde med professor Malin Celander ved Göteborg Universitet, hvilket inkluderer samtidig ekstraktion af DNA og RNA, og PCR-forhold for CYP1A samt for husholdningsgenet β -actin.

7.2 Resultater for CYP1A-aktivitet og ekspresion

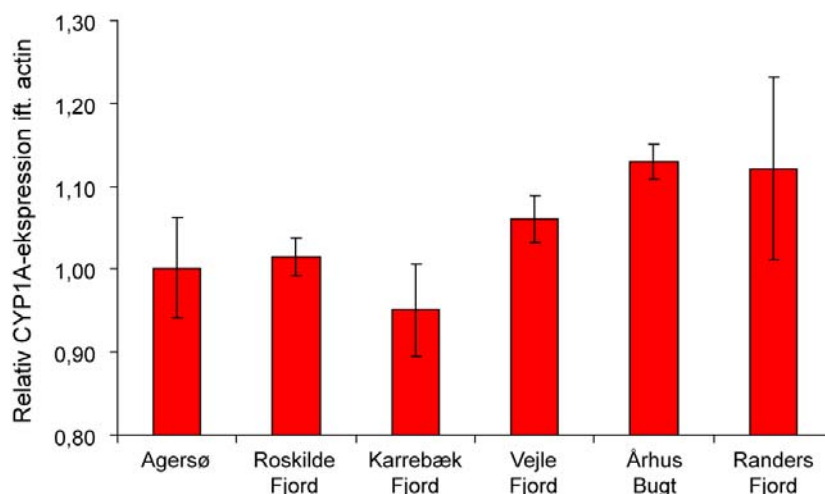
De højeste aktiviteter af CYP1A-enzymet blev målt i ålekvarter fra Odense Fjord og Roskilde Fjord, hvorimod de laveste enzymaktiviteter forekom i Karrebæk Fjord og ved Agersø i Storebælt (figur 7.1).

Figur 7.1. Aktiviteten af CYP1A-medieret afgiftsenzym (målt som EROD) i lever fra hunner af ålekvarter fra de forskellige kystnære danske områder, inklusiv den supplerende NOVANA-station i Odense Fjord, november 2007.



Det relative udtryk af CYP1A, målt som mRNA, varierede med ca. 18% mellem områder og var højest i Århus Bugt og lavest i Karrebæk Fjord. Der var signifikant forskel mellem Århus Bugt og Roskilde Fjord samt mellem Århus Bugt og Karrebæk Fjord (figur 7.2).

Figur 7.2. mRNA CYP1A-ekspresion i lever fra hunner af ålekvarter angivet i forhold til actin (middel \pm S.E.).



7.3 Diskussion

I denne delundersøgelse blev der ikke fundet nogen direkte sammenhæng mellem CYP1A-ekspression og CYP1A-aktivitet (EROD) på områdeniveau. Dette er heller ikke umiddelbart forventeligt, eftersom aktiviteten er et mål for den totale mængde af aktive CYP1A-enzymmer, der er dannet i cellerne som følge af længere tids påvirkninger. Derimod reflekterer ekspressionen i højere grad den øjeblikkelige påvirkning, idet enzymer er mere holdbare end mRNA, der hurtigt nedbrydes igen i organismen. Endvidere kan enzymaktiviteten også blive hæmmet ved høje koncentrationer af miljøfarlige stoffer, hvilket giver en lavere aktivitet, end det man kan forvente af ekspressionen. For eksempel var enzymaktiviteten i Vejle Fjord, Århus Bugt og Randers Fjord lavere end det, der kan forventes i forhold til CYP1A-ekspressionen. Dette kan være en indikation på, at den højere belastning af dioxinlignende stoffer og PAH i disse områder også hæmmer aktiviteten af enzymet, da sammenhæng mellem påvirkning og effekt på CYP1A-enzymaktivitet generelt følger en klokkeformet kurve (Bosveld *et al.* 2002). Til gengæld er enzymaktiviteten i Roskilde Fjord høj i forhold til ekspressionen, hvilket kan være en følge af, at der stadigt er enzym tilbage, men at den nuværende belastning ikke er så høj, at ekspressionen bliver tilsvarende forhøjet.

Derimod kan der i højere grad forventes korrelationer mellem påvirkningsfaktorer og deraf følgende effekter. I denne undersøgelse synes der især at være en sammenhæng mellem CYP1A-ekspressionen og både de målte koncentrationsniveauer af dioxinlignende stoffer og PAH-metabolitter, hvilket understøtter, at især ekspressionen kan ses som et udtryk for den nuværende belastning. Den bedste korrelation fremkommer ($R = 0,89$; $p < 0,02$), når både niveauet af dioxinlignende stoffer i de voksne fisk og PAH-metabolitter i galde begge inddrages i korrelationsanalysen (tabel 7.2).

Koblingen mellem ekspression og aktivitet kan dog ikke helt klarlægges, eftersom der ikke er fuldstændig overlap mellem individuelle data for ekspression, aktivitet og PAH-metabolitter, og eftersom dioxin kun blev målt som en enkelt puljet prøve fra hver station.

Tabel 7.2. Korrelationstabel med R-værdier for sammenhæng mellem hhv. CYP1A-ekspression (Cyp/Act ratio) og CYP1A-aktivitet (EROD) i forhold til de målte niveauer af PAH og dioxinlignende stoffer på stationsniveau. Alle parametre er normaliseret til deres standardafvigelse før eventuel addition (signifikans for sammenhæng: ** $p < 0,05$ og * $p < 0,1$).

R-værdier	CYP1A-ekspression (Cyp/Act ratio)	CYP1A-aktivitet (EROD)
Dioxin i voksne	0,81*	0,31
Dioxin i unger	0,41	0,79*
sum dioxin (voksne + unger)	0,87**	0,00
PAH i galde	0,66	-0,07
PAH i urin	0,82**	-0,32
sum PAH (urin + galde)	0,53	0,68*
sum PAH (galde) + dioxin (voksne)	0,89**	-0,23
sum PAH (galde + urin) + dioxin (voksne + unger)	0,88**	0,35

På grund af usikkerheder anbefales det, at EROD-aktiviteten måles i forhold til en kendt/referenceprøve. Direkte sammenligning af områder, fx et belastet og et referenceområde, bør kun gøres, hvis analyserne er udført af det samme laboratorium og sammenlignes i forhold til den samme referenceprøve. Faktorer som art, køn, kønsmodenhed, sæson mht. reproduktive forhold og vandtemperatur, har væsentlig indflydelse på aktiviteten af EROD (Ronisz *et al.* 1999). Det tyder dog ikke på, at salinitetsforskelle har væsentlig indflydelse på aktiviteten af EROD (Jonsson *et al.* 2003). Der er nødvendigvis ikke lineære sammenhænge mellem eksponeringsniveauer og enzym, idet klokkeformede dosis-responskurver ofte vil forekomme. For eksempel ved høje eksponeringsniveauer af PAH kan der forekomme en direkte hæmning af EROD-aktiviteten (Bosveld *et al.* 2002). Tungmetaller som Cu, Cd, Hg og TBT i nanomolar-området, kan også have en hæmmende effekt på aktiviteten af EROD (Brüschweiler *et al.* 1996a,b).

7.4 Konklusioner

- CYP1A-ekspression og -aktivitet er en god kombination af biomarkører, som bidrager til fortolkning af belastningsniveauet med polyaromatiske stoffer og deraf følgende effekter.
- CYP1A-ekspression og -aktivitet kan kompletteres med målinger af CYP1A-protein for at verificere, at hæmning af proteinet sker, men dette kræver metodeudvikling for CYP1A i ålekvabbe.

8 Intersex - et tegn på hormonforstyrrelser i ålekvabbe

Intersex i hanfisk er en form for en reproduktiv forstyrrelse, hvor der dannes forstadier til æg (oogonier og oocytter) i hannens testikler (testes). Denne feminisering af hanfisk kan skyldes hormonforstyrrelser, og intersex anses derfor som en biomarkør for østrogenlignende effekter forårsaget af miljøfarlige stoffer, der kan forstyrre hormonbalancen i fisk.

Feminiseringen af hanfisk kan også komme til udtryk på andre måder end som intersex, bl.a. ved forhøjede koncentrationer af blommeproteiner (vitellogenin) i blodet hos hanfisk, ved ændringer i sekundære køns karakterer, ændret kønsadfærd eller eventuelt ved forskydninger af kønsratioen i populationer (Christiansen *et al.* 2002; Jobling & Tyler 2003; Mathiessen 2003). Feminisering i hanfisk menes især at skyldes hormonforstyrrelser i fiskenes tidlige livsstadier, hvorimod voksne fisk anses som værende meget mindre følsomme. Undersøgelser har også vist, at feminiserede hanfisks fertilitet kan være negativt påvirket, idet de kan have nedsat sædkvalitet (Jobling *et al.* 2002; Henderson 2007; Kidd 2007) eller manglende kønskarakteristisk parrings- eller redebygningsadfærd (Schoenfuss *et al.* 2008), hvilket dermed også kan få betydning på populationsniveau. Andre undersøgelser har vist, at også hunfisks kønsudvikling kan være påvirket af hormonforstyrrende stoffer (Bjerregaard *et al.* 2006b; Larsson & Förlin 2002).

Intersex og andre tegn på feminisering af hanfisk er tidligere set især i spildevandsbelastede ferskvandsområder i en række lande (Jobling & Tyler 2003), men i de senere år er dette også beskrevet for flere marine fiskearter som fx skrubbe (*Platichthys flesus*) fra Nordsøen (Allen *et al.* 1999a,b; Minier *et al.* 2000; Kirby *et al.* 2004), sværdfisk (*Xiphias gladius*) fra Middelhavet (De Metrio *et al.* 2003), sandkutling (*Pomatoschistus minutus*) fra Nordsøen (Kirby *et al.* 2003) samt ålekvabbe fra Østersøen og Nordsøen (Gercken & Sordyl 2002, Allen *et al.* 2002; Gercken *et al.* 2007).

Mistanken er især rettet mod en række miljøfremmede stoffer som fx østrogene stoffer ethynylestradiol (EE2) fra p-piller, blødgørere som alkylphenoler og chlorerede dioxinlignede stoffer, men derudover kan måske også naturligt forekommende østrogener i miljøet være en medvirkende årsag (Mathiessen 2003; Madsen *et al.* 2003).

Tilsvarende tegn på feminisering af hanfisk er tidligere også konstateret enkelte gange i det danske vandmiljø, idet undersøgelser fandt op til 26,5% intersex i hanfisk af hhv. skalle (*Rutilus rutilus*) og forhøjede niveauer af blommeprotein (> 1000 ng/ml) i bækørred (*Salmo trutta*) i nogle spildevandsbelastede østjyske vandløb (Bjerregaard *et al.* 2006a,b) samt i ca. 25% af skrubbe indsamlet i Vejle Fjord (Stuer-Lauridsen *et al.* 2008; Bjerregaard, pers. komm.).

Andre undersøgelser har også fundet intersex i vævsanalyse af testis fra 2 ud af ca. 150 hanner af sild (*Clupea harengus*) fra den danske del af Østersøen (Tomkiewicz, pers. komm.). Desuden er der rapporteret enkelte meget fremskredne eksempler på makroskopisk identificerbar feminise-

ring af testikler fra torsk (*Gadus morhua*), der er blevet fanget på videnskabelige togter eller indleveret af fiskere pga. de synlige forandringer (Tomkiewicz *et al.* 2002).

Formålet med denne delundersøgelse var at vurdere, hvorvidt hormonforstyrrelser i form af intersex i hanfisk testikler forekommer i ålekvabber i det danske havmiljø.

8.1 Metoder

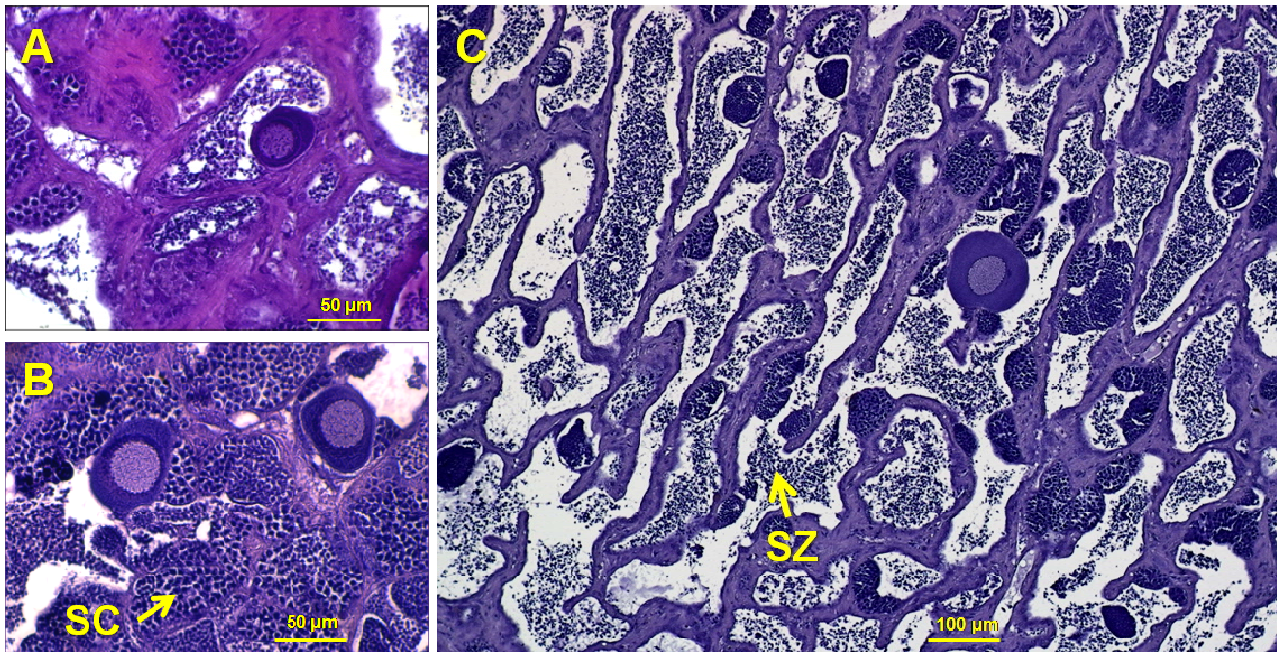
Indsamling af ålekvabbe foregik med åluser med hjælp fra lokale fritidsfiskere i 6 danske fjorde i maj-juni 2008, hhv. Roskilde Fjord, Karrebæk Fjord, Odense Fjord, Århus Bugt, Agersø og Vejle Fjord. Da det ikke lykkedes at skaffe ålekvabber fra Randers Fjord, blev der i stedet indsamlet fisk fra Odense Fjord med hjælp fra Miljøcenter Odense. Der blev desuden indsamlet i individer af begge køn hen over året i Roskilde Fjord og ved Agersø. I alt blev der udtaget og præpareret prøver fra 205 hanner. I 5 tilfælde var snittet af testes ikke vellykket og måtte kasseres. I den histologiske analyse af intersex indgik således 200 hanner.

Fiskene blev aflivet, hvorpå de blev målt og vejede. Testiklerne blev dissekeret ud med en saks, vejede og derpå konserveret enkeltvis i Lillys væske (4% formalinopløsning i en fosfatbuffer) og opbevarede frem til de histologiske undersøgelser af vævet i laboratoriet. I laboratoriet blev der anvendt standardprocedurer til dehydrering og paraffinindstøbning af prøverne. Til standardisering af snitvinkel blev testikler positioneret i kassetter, sådan at der kunne opnås et tværsnit af begge lobes i hvert snit. For hver prøve blev to 4 µm tykke snit skåret på mikrotom med en afstand på ca. 100 µm. Snittene blev monteret på objektglas og efterfølgende farvet med hæmatoxylineosin.

I analysen af intersex blev hver af de 4 lobes pr. prøve systematisk undersøgt i mikroskop ved 40 gange forstørrelse og forekomst af oocytter blev registeret for hver lobe som antal og oocytstadium. Graden af intersex blev klassificeret i 4 stadier med udgangspunkt i Gercken *et al.* (2007):

- I Enkelte spredte oocytter (maks. 2 i prøven)
- II Flere spredte (maks. 10 i prøven)
- III Adskillige spredte oocytter (mellem 10 og 100 i prøven)
- IV Mange oocytter (> 100) spredte (IVa) eller i grupper (IVb)

I analysen blev en nedre størrelse på 10 µm anvendt til identifikation af oogonier, idet spermatogonier og oogonier vanskeligt kan separeres. Der blev anvendt en skala til klassificering af hunlige gameter omfattende oogonier (OG), primære oocytter vækstfase 1 (PN1) og 2 (PN2) afhængig af størrelse og forhold mellem kerne og cytoplasma (*figur 8.1*) samt vitellogene oocytter (VT) (ikke illustreret). Alle oocytter, der kunne identificeres, blev talt og stadiet vurderet, uanset om kernen var synlig eller ikke. *Figur 8.1C* illustrerer testes med klasse I intensitet. Ofte observeredes kun 1 enkelt oocyt i 1 ud af de 4 lobes.



Figur 8.1. Oocytter observeret i testesvæv hos hanner af ålekvabber i denne undersøgelse. A: Oogonium (OG), B: Oocytter i første vækstfases tidlige del (PN1), C: Oocyt i første vækstfases sene del (PN2). I testesvævet ses tubuli med spermatocytter (SC) og spermatozoa (SZ).

8.2 Resultater

Alle indsamlede individer var kønsmodne. Referenceprøverne omfattede modnende, gydende og udgydte (regeneration) individer for begge køn, og det var muligt at identificere gameter i forskellige udviklingsstadier til bedømmelse af oocytstadier og hannerne modenhed. I prøverne til bestemmelserne af intersex var omkring 85% af hanner gydende, 5% i modning og 10% udgydte.

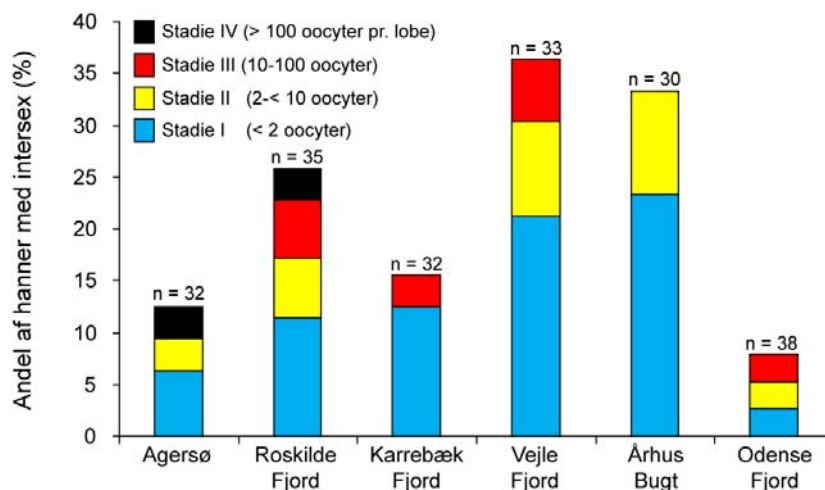
8.2.1 Forekomst af intersex

Den histologiske analyse viste, at der på alle lokaliteter var indsamlet hanner med forekomst af oocytter i testes (*figur 8.2*). Intersex forekom hyppigst i Vejle Fjord (36%), Århus Bugt (33%) og Roskilde Fjord (29%), hvor der blev fundet oocytter i omkring en tredjedel af hannerne. Lavest lå Odense Fjord (8%), mens Karrebæk Fjord (16%) og Agersø (13%) var intermediære. Der forekom således intersex på samtlige lokaliteter i undersøgelsen.

Der var stor variation i graden af intersex, vurderet ud fra antallet af oocytter pr. prøve (tværsnit af 4 lober). Antallet for de 4 lober samlet strakte sig fra én enkelt oocyt og til 285 og 296 oocytter i de to respektive prøver med den mest fremskredne udvikling af intersex i klasse IV. Langt den hyppigste kategori var intersex klasse I, hvor der optrådte 1-2 oocytter i de undersøgte prøver.

Der var ingen umiddelbar sammenhæng mellem hyppighed af intersex og sværhedsgrad. Hyppighed og inddeling i klasser giver tilsammen et skøn over, hvor påvirket populationen i et område er. Der kan dog være forskelle på arealet af det undersøgte testesvæv, da størrelsen af de individuelle testes varierer.

Figur 8.2. Forekomst af intersex i hanner af ålekvabbe i de 6 undersøgte områder i foråret 2008. Forekomsten er angivet som procentdel af prøver med intersex samt intersex-klasse (I - IV) fordelt på lokaliteter med prøvetagning i gydeperioden. n angiver antallet af histologisk undersøgte hanner.

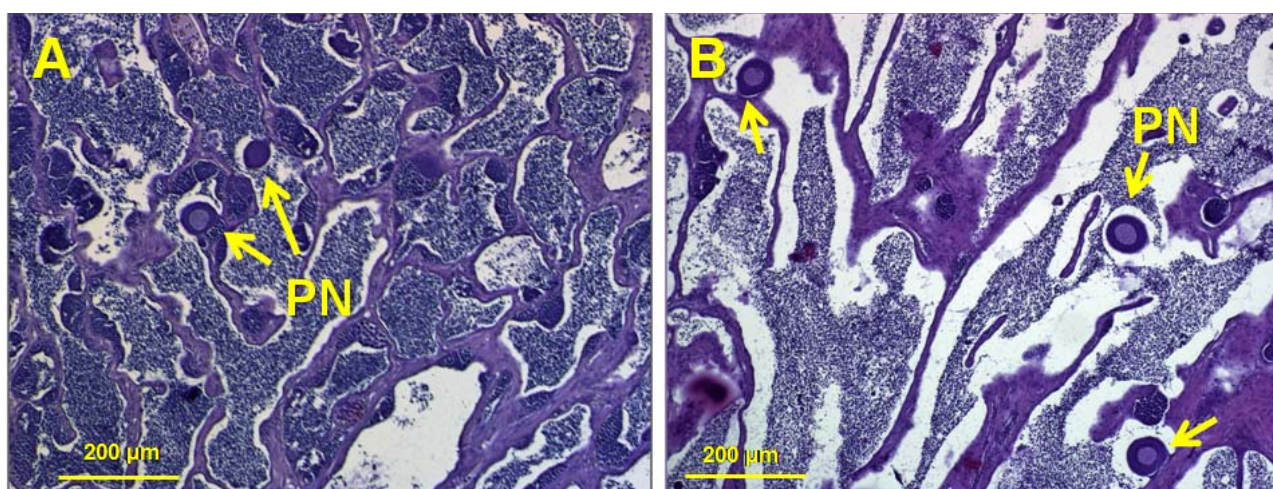


En anden måde kan derfor være at opdele klasserne efter arealenhed, som et mere standardiseret mål. Der er sandsynligvis også en underestimering af antallet af individer i klasse I, da de 4 lobe-tværsnit, udgør en ringe del af testes samlede volumen og jo sjældnere oocyterne er, desto mere upræcist bliver identifikationen af oocytter.

8.2.2 Udvikling og fordeling af oocytter i testes

Udviklingsgraden af oocytter varierede fra oogonier til tidlige og sene stadier af primær vækstfase oocytter men kun i den primære vækstfase. Der blev ikke identificeret oocytter i de senere vækstfaser, som ville have omfattet dannelse af corticale alveoli eller påbegyndt blommedannelse (vitellogenese).

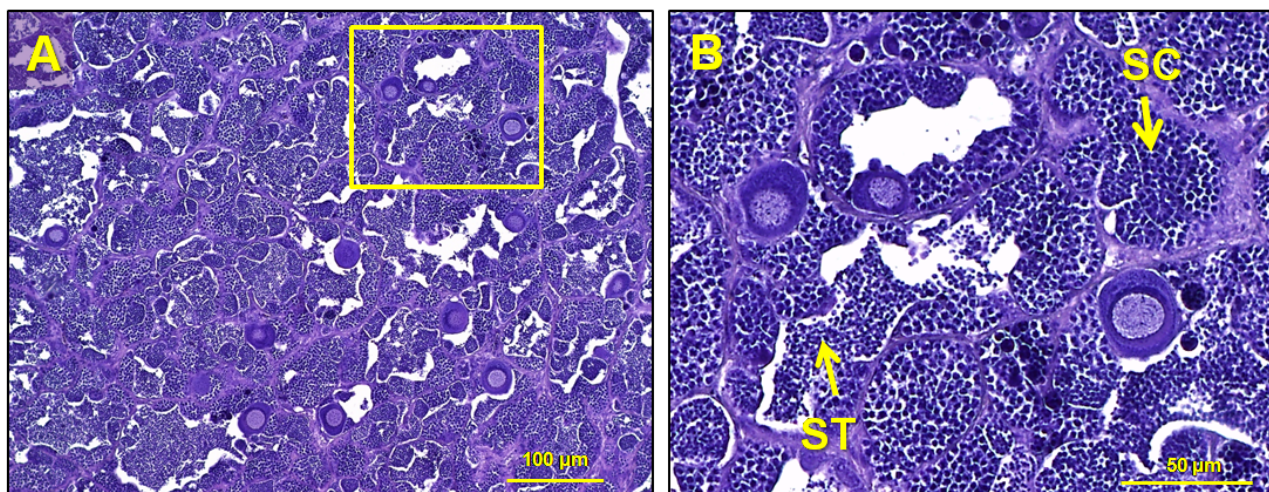
Figur 8.1 viser oocytter i testes med klasse I intensitet. Ofte observeredes kun en enkelt oocyt i en ud af de fire løber for en prøve. I denne prøvetagning blev der således i 18 ud af de 44 fisk med intersex kun registeret en enkelt oocyt pr. prøve.



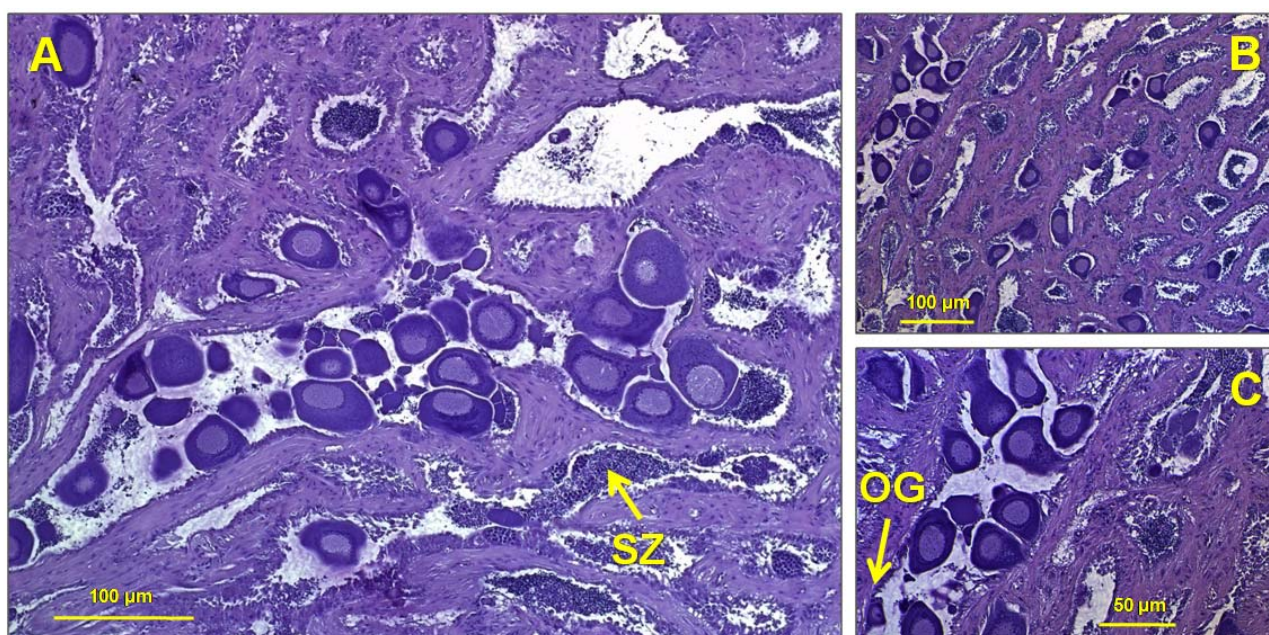
Figur 8.3. Eksempel på oocytter observeret i testesvæv hos hanner af ålekvabber i intersex klasse II. De ensartede oocytter i første vækstfase (PN) ligger spredt i testesvæv med spermatozoa i tubuli. A: Testesvæv med høj tæthed af spermatozoa (tidligt i gydning). B: Lavere densitet af spermatozoa i tubuli.

Oocysterne kan have forskellige udviklingsgrad i alle klasserne. I figur 8.3, 8.4 og 8.5 ses prøver af intersex i klasse II, III og IV, hvor oocysterne henholdsvis dels er ensartede og dels i meget forskellige udviklingstrin.

Oocyterne forekom hyppigst i den proksimale del af testes, dvs. forholdsvis tæt på sædkanalen, mens det var forholdsvis sjældent at finde oocyter distalt. I klasse IV forekom såvel et tilfælde spredte oocyter med høj tæthed (IVa) som tætliggende oocyter i grupper (IVb). *Figur 8.4* og *8.5* viser udsnit af væv hos hanner med intersex klasse IVa og IVb respektivt. Klasse III og IVa adskiller sig primært ved stigende intensitet af oocyter. Det er ikke muligt at vurdere på grundlag af de histologiske analyser, om sædkvaliteten også er forringet hos hanner med intersex. Oocyternes skæbne i testes er uvis. Der blev hverken fundet oocyter med blommedannelse eller nedbrudte (atretiske) oocyter. Om oocyterne i primær vækstfase kan løsrives og flyde ud med sæden er uklart, men der blev observeret enkelte tilfælde af oocyter i sædkanalen.



Figur 8.4. Eksempel på adskillige til mange oocyter af forskellig størrelse spredt i testesvævet hos hanner af ålekvabber med intersex klasse III eller IVa afhængigt af antal. A: Oocyter af forskellig størrelse spredt i testesvævet hos han i modning med spermatocytter (SC) og spermatider (ST). Figur B er en forstørrelse af udsnittet i figur A, som viser oogonia (OG) og oocyter i første vækstfase, PN1 og PN2.



Figur 8.5. Eksempel på oocyter observeret i testesvæv hos klasse IVb hanner af ålekvabbe, som er tæt ved at være udgydt. Oogonier (OG) og oocyter i første vækstfase (PN1 og PN2) ligger tæt sammen. I testesvævet ses tubuli med resterende spermatozoa (SZ).

8.3 Diskussion

Udenlandske undersøgelser har tidligere fundet at 0-28% af hanner har udviklet intersex i den tyske del af Østersøen og Nordsøen samt i 0-9% i nogle engelske fjorde, hvor de højeste niveauer blev fundet i de kystnære områder, som vurderes som værende mest forurenede. Desuden foreligger der en enkelt ældre beskrivelse fra 1975 af intersex i ålekvabber fra den Finske Bugt i Østersøen (se *tabel 8.1*).

Niveauerne fundet i de 6 danske fjorde i denne undersøgelse på 8-36% intersex i ålekvabbe er derfor sammenlignelige med data fra de tyske og finske områder. Derimod er de danske data generelt højere end i de engelske fjordområder med undtagelse af Tyne, der anses som den mest forurenede af de engelske fjorde.

Det vides dog ikke i hvilket omfang, at intersex også kan have et naturligt forekommende baggrunds niveau i ålekvabbepopulationer. I andre fiskearter som hundestejle, skrubbe og skalle vurderes baggrunds niveauet at være på under 4% af hanner, der har udviklet intersex i form af oocytter i testes (*Hahlbeck 2004*), hvilket er betydeligt lavere end niveauet fundet i ålekvabbe i denne undersøgelse. Det er derfor sandsynligt, at de høje niveauer af intersex i de kystnære danske områder kan tilskrives menneskeskabte miljøfaktorer, så som forurening fra hormonforstyrrende stoffer i havmiljøet.

Tabel 8.1. Oversigt over tidligere udenlandske observationer af intersex i hanner af ålekvabbe.

Område	Antal hanner undersøgt	% hanner med intersex	Reference
Tvärminne, Finske Bugt, 1973-74	?	~20%	Kristoffersson & Pekkarinen 1975
Wismar, tyske Østersø, 1999/2000	24	25,0%	Gercken & Sordyl 2002
Salzhaff, tyske Østersø, 1999/2000	18	27,8%	Gercken & Sordyl 2002
Rostock, tyske Østersø, 1999/2000	17	23,5%	Gercken & Sordyl 2002
Darss, tyske Østersø, 1999/2000	16	0,0%	Gercken & Sordyl 2002
Darss, tyske Østersø, 2006	7	(42,9%)*	Gercken et al. 2007
Varel, tyske Nordsø, 2006	47	14,9%	Gercken et al. 2007
Büsum, tyske Nordsø, 2006	33	24,2%	Gercken et al. 2007
Alde, engelsk Nordsø, 1999-2001	10	0,0%	Allen et al. 2002
Forth, engelsk Nordsø, 1999-2001	63	1,6%	Allen et al. 2002
Clyde, engelsk Nordsø, 1999-2001	79	3,8%	Allen et al. 2002
Tyne, engelsk Nordsø, 1999-2001	66	9,1%	Allen et al. 2002

* begrænset prøveantal

En tysk undersøgelse har desuden fundet tegn på degenerering af æg (atresia) i ålekvabbe indsamlet om foråret (*Gercken et al. 2007*), men i hvilket omfang dette er naturligt forekommende eller også kan være en effekt af forurening vides ikke.

8.4 Konklusioner

- Intersex i form af forstadier i æg (oocytter) i hannernes testikler forekom i alle de undersøgte områder med mellem 8% og 36% af de voksne hanner og mest i Vejle Fjord og Århus Bugt.
- Intersex forekom i forskellige grader både med hensyn til antal og tæthed af oocysterne i de enkelte testikler. Der sås, som i tidligere undersøgelser af ålekvabbe, ingen oocytter med blommedannelse.

- Den udbredte forekomst af intersex i ålekvabbe indikerer, at ålekvabbe er en følsom og dermed velegnet indikator for marine fisk i forbindelse med undersøgelser af østrogenlignende effekter forårsaget af hormonforstyrrende miljøfarlige stoffer i det danske havmiljø.

9 Populationsgenetik

Ålekvabben er blevet benyttet som studieobjekt af danske forskere siden begyndelsen af det tyvende århundrede. Da ålekvabben er levendeføden, har den været genstand for genetiske undersøgelser, idet mødrene kan sammenlignes med afkommet. Allerede i 1917 publicerede Schmidt et omfangsrigt arbejde af mange populationer. Han benyttede antallet af finnestråler i den højre brystfinne, antallet af ryghvirvler, antallet af pigstråler i rygfinnen og antallet af pigmentpletter langs rygfinnen til genetisk karakterisering af ålekvabberne. *Schmidt (1917)* fandt, at ålekvabbebestanden kunne opdeles i fire grupper: en gruppe omfattende ålekvabber fra den vestlige Nordsø, en fra den østlige Nordsø, en fra den vestlige del af Østersøen samt de indre danske farvande samt en fra den østlige del af Østersøen. I 1970'erne blev grupperingerne eftervist ved hjælp af analyse af isozymer og Schmidts resultater blev yderligere verificeret og uddybet (*Christiansen et al. 1976; Simonsen & Christiansen 1985*), idet flere af grupperingerne kunne opsplittes yderligere. Bestanden i Mariager Fjord har været genstand for undersøgelser flere gange (*Schmidt 1917; Christiansen et al. 1981, 1988*), hvor de morfologiske karakterer er blevet analyseret hver gang samt i de senere undersøgelser også isozymer. Bestanden i Mariager Fjord var klart opdelt i to - en i den indre del af fjorden og en i den ydre del. Det var bemærkelsesværdigt, hvor velbevaret strukturen af de morfologiske karakterer var gennem 60-70 år, hvilket må tilskrives, at ålekvabben er en stationær fisk (*Muus & Dahlstrøm 1983*). Disse populationsgenetiske undersøgelser med isozymer kan dog ikke umiddelbart anvendes til at vurdere, hvorvidt populationerne er udsat for langtidseffekter af specifikke miljøfarlige stoffer. For at undersøge om enkelte grupper af miljøfarlige stoffer også kan have direkte effekter på den populationsgenetiske diversitet, skal der anvendes andre teknikker, der kan fokusere på specifikke gener for fx CYP eller metallothionein (*Snyder 2000; Amiard et al. 2006*).

Formålet med denne delundersøgelse var at vurdere, om den tidligere fundne genetiske variation bestemt ved hjælp af isozymer tilbage i 1980'erne kan genfindes i dag.

9.1 Materiale og metode

Ålekvabber fra seks lokaliteter blev fanget i ruser og bragt til et laboratorium for videre håndtering. Hovedet fra hver ålekvabbe og evt. en unge blev frosset ned i flydende kvælstof og senere fragtet til Silkeborg, hvor materialet blev opbevaret ved -80° C indtil brug. I alt indgik 103 hanner, 296 hunner med unger og 18 hunner uden unger i undersøgelsen. Desværre blev der i håndteringen mistet 50 unger, så kun en unge fra hver af de 246 hunner blev analyseret.

Der blev anvendt horisontal stivelsesgelelektroforese til analysen. Følgende enzymer blev analyseret: adenosin deaminase (*Simonsen & Christiansen 1981*), aspartat aminotransferase (*Simonsen & Christiansen 1984*), esterase (*Simonsen & Frydenberg 1972*), lactat dehydrogenase (*Simonsen & Christiansen 1985*) og phosphoglucomutase (*Hjorth 1971*). De fem enzy-

mer var betinget af mindst 10 loci, som alle udviste variation, mere eller mindre. Desværre var det ikke muligt at bestemme lactat dehydrogenase hos ungerne og det ene locus for aspartat aminotransferase, hvorfor kun 6 loci blev analyseret hos ungerne. Disse isozymer er udvalgt for at kunne sammenligne direkte med de tidligere populationsgenetiske undersøgelser af ålekvabbe i danske farvande, som er udført i perioden 1969-1971.

Dendrogrammet er konstrueret efter følgende metode: Først beregnes de genetiske afstande parvis mellem populationerne (Nei 1978), dernæst udføres en UPGMA-analyse (unweighted pair group method with arithmetic means) (Sneath & Sokal 1973) og resultatet afbildes ved hjælp af TreeView (Page 1996).

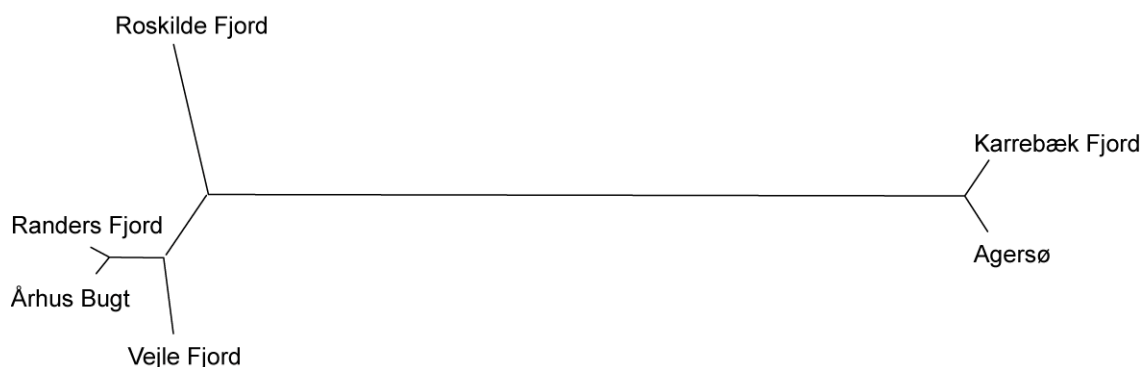
Programmet GenAlex version 6 (Peakall & Smouse 2006) blev benyttet til dataanalyse. Homogenitetstest blev udført som beskrevet af Fowler *et al.* (1998), og signifikansniveauet blev korrigeret ved hjælp af sekventiel Bonferroni test (Rice 1989). Programmet POPGENE 1.32 blev anvendt til bestemmelse af et dendrogram (Yeh *et al.* 2001), og relationen mellem de seks stikprøver blev udformet med programmet TreeView 1.6.6 (Page 1996).

9.2 Resultater og diskussion

De seks stikprøver af unger var i overensstemmelse med Hardy-Weinberg forventningerne, og ligeledes var der homogenitet mellem mødre og ungerne som forventet. I et tilfælde da den voksne stikprøve blev testet for homogenitet med unger, viste prøven fra Vejle Fjord en signifikant afvigelse for et af phosphoglucomutase loci'ene (der er tre i det hele). Alle andre homogenitetstests udviste ingen signifikans, hvilket er en indikation af, at lokalbestanden er ophav til den næste generation.

Ligeledes var alle stikprøver af voksne i overensstemmelse med Hardy-Weinberg forventningerne. Der var også homogenitet mellem mødre og den øvrige del af den voksne population – igen en indikation af at bestanden er lokal.

Slægtskab baseret på den genetiske afstand mellem stikprøverne er vist i figur 9.1, og der er en klar opdeling i en nordlig og sydlig bestand i lighed med tidligere observationer (Christiansen *et al.* 1976; Simonsen & Christiansen 1985).



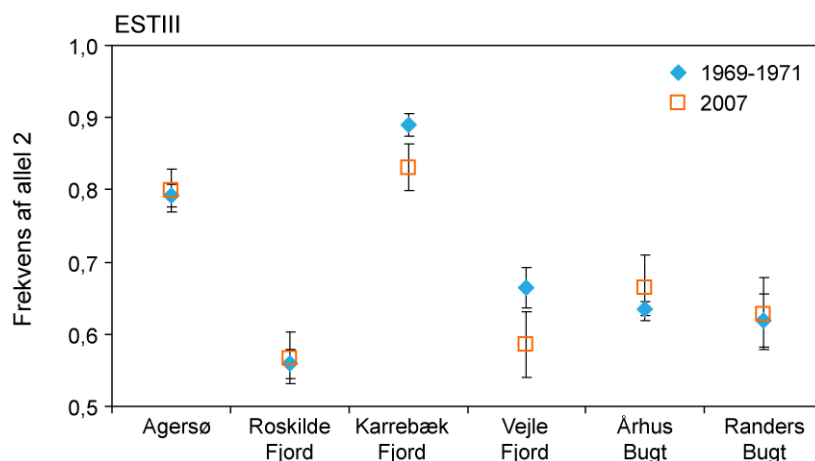
Figur 9.1. Slægtskab mellem de seks undersøgte bestande af ålekvabber, november 2007. Dendrogrammet er baseret på 9 loci.

Der var homogenitet mellem de to prøver fra Karrebæk Fjord og Agersø, og også mellem Randers Fjord, Århus Bugt, Roskilde Fjord og Vejle Fjord.

Sammenligning af allel-frekvenser fundet for ca. 35 år siden og i dag viste, at de var stabile (figur 9.2), altså en klar opdeling i lokalbestande. De lokale ålekvabbepopulationer kan derfor anses som værende stationære med kun begrænset udveksling mellem de forskellige populationer.

Dette underbygger, at ålekvabbe er en velegnet indikatororganisme til brug for undersøgelser, der skal vurdere belastning og effekter i afgrænsede vandområder.

Figur 9.2. Frekvens af allel 2 for locus ESTIII vist med ± 1 standardafvigelse.



9.3 Konklusioner

Resultatet af den populationsgenetiske undersøgelse kan samles i hovedkonklusionerne:

- Den genetiske sammensætning i de forskellige undersøgte områder er stort set uændret gennem 30-40 år for de undersøgte isozymer.
- Opdelingen mellem områder er også sammenfaldende med observationerne for 30-40 år siden.
- De lokale ålekvabbepopulationer kan derfor anses som værende stationære med kun begrænset udveksling mellem de forskellige populationer.
- Dette underbygger, at ålekvabbe er en velegnet indikatororganisme til brug for undersøgelser, der skal vurdere belastning og effekter i afgrænsede vandområder.

10 Generelle fysiologiske indikatorer

Generelle fysiologiske parametre som længde, vægt, levervægt og kuld størrelse er vigtige støtteparametre til at beskrive de undersøgte ålekvabepopulationers struktur, og forskelle kan eventuelt indikere, at lokale miljøforhold har betydning for populationernes overordnede vækst og reproduktion. De fysiologiske indikatorer udregnes fra disse som indeksbaserede værdier for konditionsindeks (KI), lever-somatisk indeks (LSI) og reproduktiv kapacitet (RK). Før forskellige områder kan sammenlignes, skal der korrigeres for, at parametre som levervægt, somatisk vægt og kuld størrelse er afhængige af de enkelte individers størrelse.

Ændringer i disse indikatorer for fisks generelle fysiologiske og reproduktive status kan i visse situationer tilskrives et generelt respons på en stress-situation – herunder en begrænset fødetilgang, der medfører en dårlig ernæringstilstand og hermed en lavere konditionsindeks. Effekter af toksiske stoffer vil dog også kunne påvirke fiskens generelle fysiologiske tilstand, men i en lang række ikke-specifikke stress-situationer vil denne type af indikatorer fortrinsvis anvendes som støtteparametre til andre biologiske effektparametre. Det vil variere fra situation til situation, om data for længde-/aldersfordeling, konditionsindeks, lever-somatisk indeks, gonade-somatisk indeks og reproduktion hos ålekvabbe i specifikke områder direkte integreres i tolkninger af andre typer af effektdata.

Andre miljøfaktorer, som eventuelt kan være årsag til forskelle i de fysiologiske indikatorer mellem lokale fiskepopulationer, kan omfatte fx habitatets struktur, fødegrundlagets sammensætning og forekomst, abiotiske forhold som temperatur, salinitet, iltsvind, populationsgenetiske forskelle samt eventuelt predation og omfanget af fiskeri. Fiskeri kan alene medføre en stor effekt på fiskebestandens størrelse og struktur. Desuden kan det ikke udelukkes, at indfangningsmetoden, som i de undersøgte områder alle er foretaget med åleruser, kan have betydning for længdefordelingen af de undersøgte fisk.

Formålet med denne delundersøgelse var, om der er nogen sammenhæng mellem de enkelte generelle fysiologiske indikatorer i forhold til niveauerne af fejludviklede unger i ålekvabbekuld i de forskellige områder.

10.1 Metode

Generelle fysiologiske parametre som længde, vægt, levervægt, kuld størrelse og gonade/kuld vægt blev målt under dissektionen af hvert individ i henhold til NOVANA teknisk anvisning (*Strand & Dahllöf 2005*). Der indgår dog ikke aldersbestemmelse ud fra otoliter i de nuværende undersøgelser af ålekvabbe under NOVANA-programmet.

Ud fra fysiologiske parametre for hver population blev følgende indeksbaserede indikatorer udregnet:

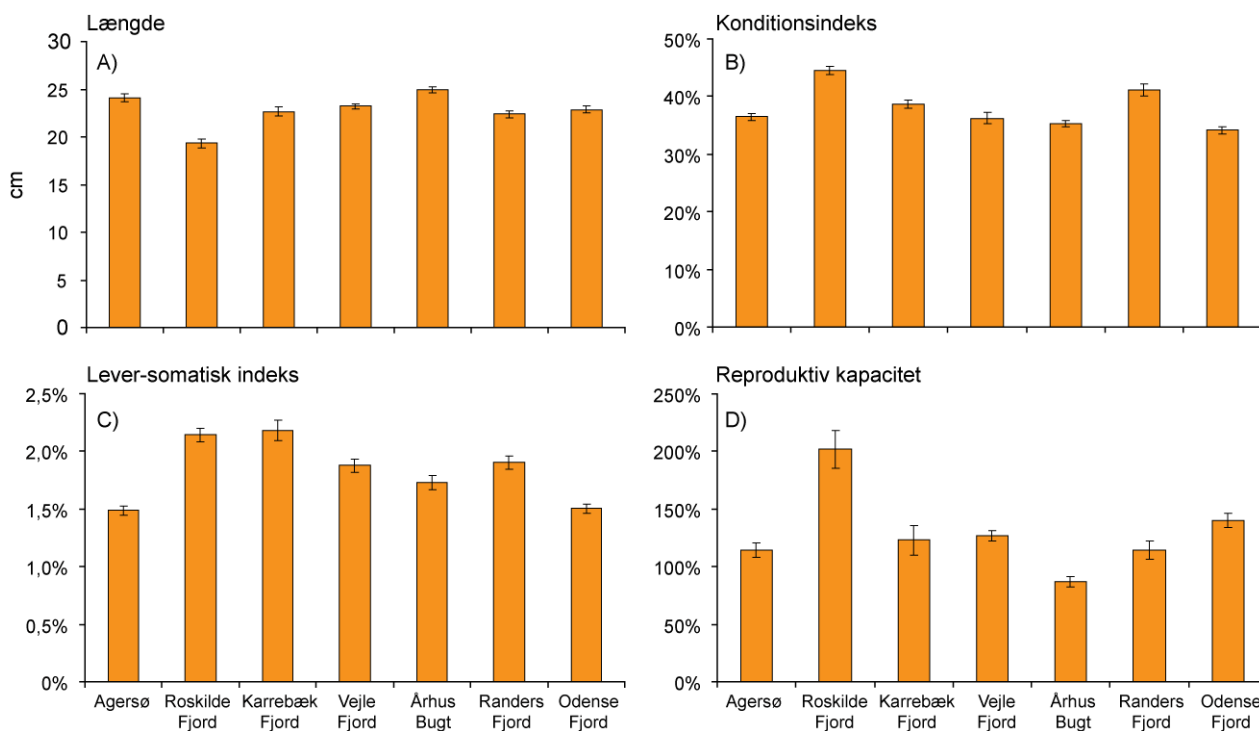
- Populationens længdefordeling angivet som middellængde og standardfejl (S.E.).
- Konditionsindeks (KI) = $100\% * (\text{somatisk vægt (g)}/\text{længde (cm)})^3$
- Lever-somatisk indeks (LSI) = $100\% * \text{levervægt}/\text{hunnens somatiske vægt}$
- Gonade-somatisk indeks (GSI) = $100\% * \text{gonadevægt}/\text{somatiske vægt}$
- Reproduktiv kapacitet (RK): $100\% * \text{antal normalt yngel hunnens totalvægt}$.

10.2 Resultater og diskussion

For alle de fysiologiske parametre var der tydelige områdemæssige forskelle. Tendenserne var dog ikke sammenfaldende for de enkelte parametre.

Ålekvabberne fra de syv områder viste en vis variation i middellængden, hvor de længste fisk hovedsageligt var fanget i Århus Bugt og ved Agersø og de generelt mindste fisk var fanget i Roskilde Fjord (figur 10.1A).

Med hensyn til konditionsindekset (KI) var det de forholdsvis mindre fisk fra Roskilde Fjord, der havde den bedste kondition sammenlignet med populationerne fra Århus Bugt og Agersø (figur 10.1B), hvor der var forholdsvis længere fisk. Dette beror muligvis på, at beregningsforudsætningerne for KI, baseret på længden i tredje potens, ikke er optimal for en langstrakt fisk som ålekvabbe. Denne sammenhæng er dog ikke helt entydig, idet KI også var forholdsvis stor i fisk fra Randers Fjord, og at dette ikke afspejledes i samme grad i deres middellængde.

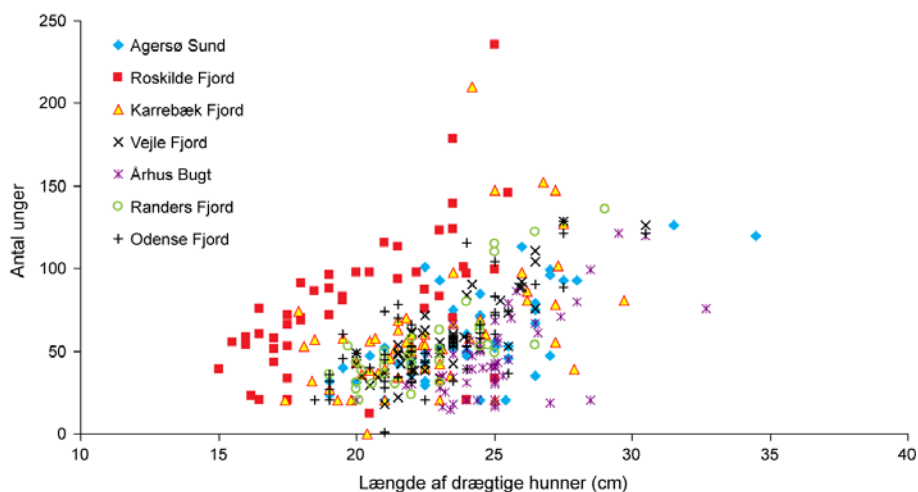


Figur 10.1. Fysiologiske indikatorer for hunnerne i de undersøgte ålekvabbepopulationer fra de 7 områder i november 2007, hhv. A) Længde, B) Konditionsindeks, C) Lever-somatisk indeks og D) Reproduktiv kapacitet (angivet som middelværdier \pm S.E.).

LSI-værdier viste tilsvarende en markant variation mellem områderne (figur 10.1C). Det ser ud til, at leveren i ålekvabber fra Roskilde Fjord og Karrebæk Fjord er uforholdsmæssig stor i relation til fiskenes størrelse sammenlignet fx med fiskene fra Agersø, som formentlig det mindst belastede af de undersøgte områder. Nogle udenlandske undersøgelser har tidligere fundet forhøjede LSI-værdier og/eller andre histopatologiske forandringer i leveren hos ålekvabbe indsamlet i forskellige industripåvirkede områder bl.a. i England (Stentiford *et al.* 2003) og i Sverige (Vetema *et al.* 1997; Sturve *et al.* 2005) og i laboratorieforsøg med ålekvabber har man bl.a. fundet signifikante øgninger i LSI-værdier ved eksponering til PAH (Celand *et al.* 1994). En række andre miljøfaktorer kan dog også have indflydelse på LSI-værdierne.

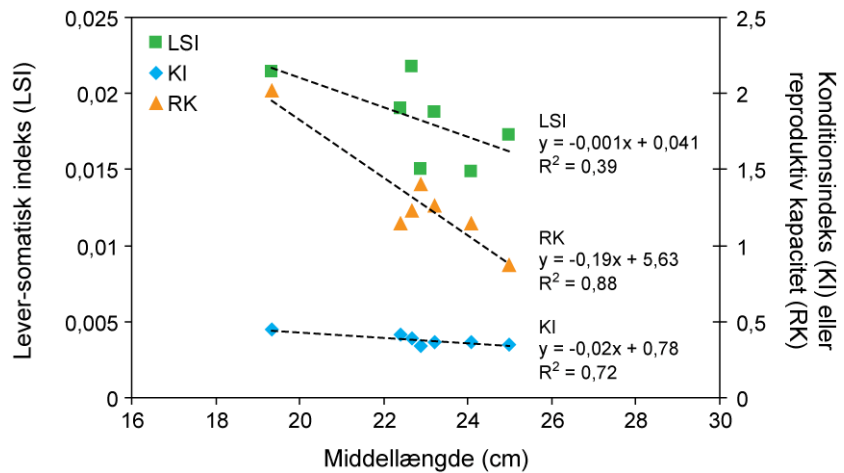
Den reproduktive kapacitet udviste en område-afhængig sammenhæng, da individer med samme størrelse producerede væsentligt forskellige antal unger. Ungeproduktionen i Roskilde Fjord var 2-3 gange større end for tilsvarende individer med samme størrelse fra Århus Bugt (figur 10.1D). Den højere produktion af unger i forhold til fiskenes størrelse i Roskilde Fjord kan måske tilsvarende forklares med en bedre fødetilgængelighed for disse fisk end for fiskene som lever fx i Århus Bugt. Figur 10.2 viser, at der er en generel tendens til, at de største fisk producerer flest unger inden for de enkelte områder.

Figur 10.2. Sammenhæng mellem længden af drægtige hunner og kuldstørrelsen i de 7 områder i november 2007.

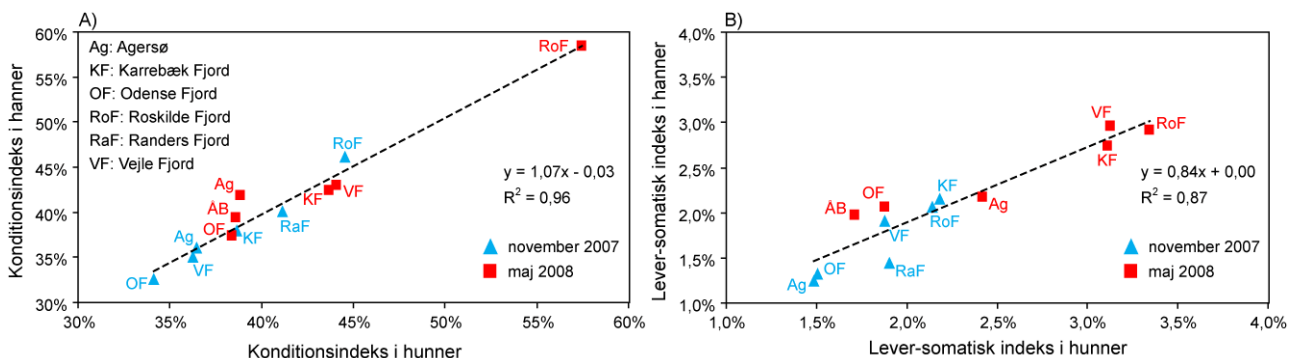


Denne tendens afspejles dog ikke, når man sammenligner de forskellige områder. Der er derimod en tendens til, at de områder, hvor populationerne har den største middellængde, har de laveste RK-værdier, ligesom lave KI- og LSI-værdier (figur 10.3).

Figur 10.3. Sammenhæng mellem middellængden og middelværdierne af de generelle fysiologiske indikatorer for hunnerne i de 7 undersøgte ålekvabbepopulationer i november 2007.



Yderligere skal også betydelige sæsonmæssige variationer i KI- og LSI-værdier tages med i betragtning, idet begge indikatorer var betydeligt større i maj 2008 sammenlignet med november 2007 (figur 10.4A,B). De sæsonmæssige variationer gælder i samme grad for både hunner og hanner, idet der er en nærmest lineær sammenhæng mellem de to køn, uanset om det er forår eller efterår. Tendensen er igen, at Roskilde Fjord havde de største KI- og LSI-værdier for både hanner og hunner uanset indsamlingstidspunktet. Umiddelbart er det lidt overraskende, at sammenlignet med hannerne var hunnernes KI- og LSI-værdierne ikke forholdsmæssigt mere påvirket på trods af hunnernes ungeproduktion i efteråret.



Figur 10.4. Indsamlingstidspunktets betydning for den kønsspecifikke sammenhæng mellem middelværdi af A) konditionsindeks og B) lever-somatisk indeks i hunner og hanner for både indsamlingen i november 2007 og maj 2008 i de 7 undersøgte områder.

I hvilket omfang de generelle fysiologiske indikatorer kan have betydning for de forskellige typer af fundne effekter på biomarkører og unged udvikling vides dog ikke. I denne undersøgelse blev der kun fundet statistisk sikre sammenhænge mellem den reproduktive kapacitet (RK), forekomst af misdannede unger (type B-G) og tidligt døde unger (type 0), der indikerer, at forekomsten af disse typer af fejludvikling har betydning for reproduktiv succes i ålekvabbe, se tabel 10.1. Der ses ikke tilsvarende sammenhænge for de andre generelle fysiologiske indikatorer såsom KI og LSI, hvilket kan være en indikation på, at de naturlige miljøforhold som habitater og fødetilgængelighed ikke har nogen direkte betydning for forekomsten af misdannelser i de enkelte områder.

Tabel 10.1. Oversigt over R-værdier fra korrelationsanalyse mellem de fysiologiske indikatorer og de forskellige typer af fejludviklede unger udført på det samlede datamateriale (n = 343 fisk) (* sammenhæng er statistisk signifikant, p < 0,05).

	Længde	Antal yngel	KI	LSI	RK	Type 0	Type A	Type B-G	Type I
Type 0	0,03	-0,17	-0,08	-0,05	-0,24*	1			
Type A	0,04	0,11	0,12	0,07	0,01	0,07	1		
Type B-G	-0,04	-0,12	0,13	0,04	-0,19*	0,46*	0,09	1	
Type I	-0,03	-0,07	0,14	0,10	-0,11	0,08	0,01	0,11	1

10.3 Konklusioner

Analysen af de generelle fysiologiske faktorer mellem områderne viser følgende:

- Der blev observeret forholdsvis store områdemæssige forskelle for både lever-somatisk indeks (LSI), konditionsindeks (KI) og reproduktiv kapacitet (RK).
- Den reproduktive kapacitet i Århus Bugt lå væsentlig lavere end for de øvrige områder.
- Det kan ikke udelukkes, at leverens størrelse er påvirket af eksponering med miljøfarlige stoffer i visse områder, fx Roskilde Fjord og Karrebæk Fjord.
- På områdeniveau var der en negativ korrelation mellem middellængden og de tre indikatorerne KI, LSI og RK.
- Der var sammenhæng mellem den reproduktive kapacitet (RK), forekomst af misdannede unger (type B-G) og tidligt døde unger (type 0), der indikerer, at forekomsten af disse typer af fejludvikling har betydning for reproduktiv succes i ålekvalbe.
- Der blev ikke fundet sammenhæng mellem nogen af andre fysiologiske indikatorer så som LSI og KI og forekomsten af fejludviklede unger i de enkelte områder.

11 Tværgående analyse

Et af formålene med denne undersøgelse omkring dioxin og biologisk effektmonitoring i ålekvabbe i kystnære danske havområder har været at opnå en integrering af forskellige delundersøgelser med kemiske målinger og kompletterende biomarkører. Intentionen har været, at en integrering bedre kan bidrage til en vurdering af, om fiskene er påvirket af særlige grupper af miljøfarlige stoffer, herunder være årsag til fund af øgede forekomster af misdannede unger i ålekvabbe.

11.1 Resultater og diskussion

De forskellige delundersøgelser har hver især givet det billede, at ålekvabbepopulationerne - i forskellig grad - synes at være påvirket af miljøfarlige stoffer. Akkumuleringen af dioxin i de voksne fisk og deres unger og udskillelsen af PAH-metabolitter i deres galde og urin er direkte bevis på dette. Derudover er de områdemæssige forskelle i forekomsten af intersex i hannernes testikler, CYP1A-ekspression og -aktivitet samt den øgede forekomst af fejludviklede herunder misdannede unger stærke indikationer på, at sådanne påvirkninger finder sted. Billedet er dog ikke helt entydigt, når graden af belastning og effekter i de forskellige områder sammenlignes.

I *tabel 11.1* er vist en sammenstilling af resultaterne fra de forskellige delundersøgelser af kemiske og biologiske effektparametre i ålekvabbe i de 7 undersøgte områder. For syns skyld er de laveste værdier angivet som grønne, middeldata som gule og de højeste værdier som røde inden for hver undersøgt parameter. Overordnet set fremstår Århus Bugt som det område med de mest udtalte effekter (8 røde, 5 gule og 0 grønne felter), efterfulgt af Randers Fjord, Karrebæk Fjord, Roskilde Fjord og Vejle Fjord. Til sammenligning fremstår især Agersø som et område med kun en lille påvirkningsgrad (1 rød, 3 gule og 9 grønne felter).

Der er dog ikke umiddelbart en tydelig sammenhæng mellem alle parametrene. Som beskrevet i kapitel 7 er det tidligere vist, at belastning med dioxinlignende stoffer og PAH kan afspejles direkte i form af forskelle i biomarkørrespons for især CYP1A-ekspression. Derved indikeres det, at disse stoffer påvirker essentielle biokemiske processer i fiskene. Tilsvarende sammenhæng fremstår ikke tydeligt, når belastningen med dioxinlignende stoffer og/eller PAH sammenstilles med de andre undersøgte effektparametre, herunder forekomsten af misdannede unger.

De områdemæssige forskelle for de andre biomarkører skyldes sandsynligvis, at de fundne tegn på påvirkninger ikke udelukkende kan tilskrives enkelte specifikke stoffer som de dioxinlignende stoffer og PAH, men derimod fortrinsvis de komplekse blandinger af miljøfarlige stoffer, som nu kan forekomme i miljøet. I havmiljøet kan der også forekomme mange andre forskellige typer af skadelige stoffer, som kan tilføres miljøet fra forskellige kilder som (skibs)trafik, spildevandsudledninger fra byer og industri samt diffuse tilførsler fra atmosfærisk deposition og afstrømning fra vandløb. Dette kan omfatte miljøfarlige stoffer som fx tung-

metaller og organometaller, pesticider og antibegroningsmidler, klorerede, bromerede og fluorerede persistente stoffer og andre hormonforstyrrende stoffer af forskellig slags.

Tabel 11.1. Oversigtstabel for resultaterne fra de forskellige delundersøgelser af kemiske og biologiske effektparametre i ålekvarbe. De laveste værdier er angivet som grønne, middeldata som gule og de højeste værdier som røde.

Enhed		Agersø	Roskilde Fjord	Karrebæk Fjord	Vejle Fjord	Århus Bugt	Randers Fjord	Odense Fjord
<i>Effekter på yngel</i>								
Type B-G	%-kuld med > 5%	4,0%	15%	14%	10%	13%	8,6%	10%
Type 0	%-kuld med > 5%	12%	10%	25%	12%	22%	5,7%	12%
Type A	%-kuld med > 5%	0,0%	4,2%	0,0%	0,0%	3,6%	14%	0,0%
Type I	%-kuld med > 5%	2,0%	0,0%	5,3%	6,0%	1,8%	0,0%	2,0%
<i>Eksponeringsparametre</i>								
Dioxin i voksne	ng/kg vådvægt	0,30	0,38	0,32	0,33	1,09	0,76	-
Dioxin i unger	ng/kg vådvægt	1,37	1,52	0,75	1,43	1,93	1,41	-
PAH i galde	µg OHP/ml	0,27	0,25	0,59	1,03	1,79	8,69	-
PAH i urin	µg OHP/ml	0,16	0,09	0,23	0,15	0,29	0,23	-
<i>Effektparametre</i>								
Konditionsindeks	%	36,5%	44,5%	38,6%	36,2%	38,6%	41,1%	34,1%
LSI, hunner	%	1,49%	2,14%	2,18%	1,88%	1,71%	1,90%	1,50%
EROD-aktivitet	pmol/(min * mg protein)	10,1	22,1	6,0	19,2	19,5	13,3	25,9
CYP1A-ekspres.	Cyp/Act ratio	1,00	1,01	0,95	1,06	1,13	1,12	-
Intersex	% af hanner	12,5%	25,7%	15,6%	36,4%	33,3%	-	7,9%

Desuden kan eventuelle årsag-respons sammenhænge forstyrres af, at afhængig af typen af biomarkør kan effekterne afspejle påvirkninger med forskellig tidsforsinkelse i forhold til det reelle tidspunkt for, hvornår påvirkningen fandt sted. Det kan derfor ikke forventes, at alle effekttyper viser de samme grader af påvirkning for alle områder, der indgår i en større geografisk undersøgelse. Dette betyder dog ikke, at effekterne ikke alligevel kan være kobledede, men det vil vanskeliggøre denne form for sammenstilling.

Ålekvarbe har i de seneste årtier udvist en generel nedgang i bestande både i danske og tyske farvande (*Stuer-Lauridsen et al. 2008, Pörtner & Knust 2007*). En årsag til dette kan være – som den populationsgenetiske undersøgelse påviser – de stationære bestande og den derved begrænsede udveksling mellem lokale populationer (*kapitel 9*). Derved kan visse lokale populationer være særligt sårbare, hvis de er udsat for alvorlige miljøpåvirkninger på fx vækst og reproduktion, herunder forekomster af skadede unger. Som følge af dette kan bestandene have sværere ved at opretholde sig selv, og det kan derved ikke udelukkes, at de i sidste ende kan stå over for et kollaps. Det kan stadigvæk ikke afvises, at sådanne miljøpåvirkninger kan omfatte de lokalt forhøjede belastninger med miljøfarlige stoffer i de kystnære danske havområder og de deraf forskellige typer af tegn på effekter, der forekommer i ålekvarbe. Det skal i denne sammenhæng også bemærkes, at ålekvarbe også kan være følsom over for andre miljøfaktorer så som predation fra fiskespisende fugle og pattedyr, parasitinfektioner og temperaturstigninger og øget udbredelse af iltvind bl.a. i forbindelse med klimaændringer.

11.2 Konklusioner

- De forskellige delundersøgelser har hver især givet det billede, at ålevabbepopulationerne, i forskellig grad, synes at være påvirket af miljøfarlige stoffer. Billedet er dog ikke helt entydigt, når graden af belastning og effekter i de forskellige områder sammenlignes for de enkelte delundersøgelser, hvilket sandsynligvis skyldes, at de fundne tegn på påvirkninger ikke udelukkende kan tilskrives specifikke stofgrupper som de dioxinlignende stoffer og PAH, men derimod mere sandsynligt påvirkninger af komplekse blandinger af miljøfarlige stoffer, som kan forekomme i havmiljøet.
- Overordnet set fremstår Århus Bugt som det område med den højeste belastning og de mest udtalte effekter, efterfulgt af Randers Fjord, Karrebæk Fjord, Roskilde Fjord og Vejle Fjord. Til sammenligning fremstår Agersø især som et område med kun en lille påvirkningsgrad.
- Det kan ikke udelukkes, at visse lokale ålevabbestande kan være særligt sårbare for populationsnedgange, hvis de er udsat for alvorlige miljøpåvirkninger.

12 anbefalinger

Det anbefales ud fra denne rapport, at overvågning af effekter på reproduktiv succes i ålekvabbe i højere grad bør understøttes af både kemiske målinger og komplementerende biomarkørundersøgelser for bedre at kunne vurdere årsager til fund af uønskede effekter.

I denne sammenhæng skal der også henvises til, at Det Marine Fagdatacenter foreslår, at i et kommende overvågningsprogram kan biologisk effektmonitoring i ålekvabbe udføres i 12 mod de nuværende 16 områder. Det Marine Fagdatacenter anbefaler desuden, at følgende stoffer bør måles i ålekvabber for at opfylde kravene til overvågning i havkonventionerne HELCOM og OSPAR og i den prioriterede liste for miljøfarlige stoffer; non-planare PCB'er, klorerede pesticider som DDT, HCH og HCB, dioxinlignende stoffer og bromerede flammehæmmer. Ved brug af ålekvabbe som miljøindikator kan der derved opnås dels gode muligheder for analytisk-kemisk detektion af stofferne til at vurdere områdespecifikke belastningsniveauer ved brug af en stationær fiskeart, dels at etablere bedre årsagssammenhænge mellem fundne effekt-niveauer af den samlede belastning, målt ved hhv. biologiske effektmarkører og kemisk belastning.

Resultaterne fra denne undersøgelse peger på nogle potentielle nye indikatorer for effekter i fisk. Især målinger af PAH-metabolitter i galde synes at vise tydelige områdemæssige forskelle i PAH-belastning i fiskene, som kan supplere undersøgelserne af bl.a. CYP1A-aktivitet. Disse fluorescenceteknikker kan udføres forholdsvis let og billigt. En sådan teknik kan derfor med fordel integreres som en del af de eksisterende former for NOVANA-aktiviteter omkring biologiske effektovervågning i fisk.

Derudover synes også biomarkørerne for intersex og CYP1A-ekspression at være velegnede teknikker til at vurdere påvirkning fra hhv. østrogen- og dioxinlignende stoffer – fx i forbindelse med fokuseret overvågning i udvalgte områder, som er udpeget som værende særligt følsomme inden for et fremtidigt overvågningsprogram.

En række andre kemiske og biologiske undersøgelser vil dog også være nødvendige at inddrage for bedre at underbygge årsagerne til fund af øgede forekomster af misdannede unger i ålekvabbe i de kystnære danske havområder. Sådanne undersøgelser kan inddrage supplerende kemiske målinger af belastning med potentielle teratogene stoffer i de voksne fisk og deres unger samt biomarkørmålinger af bl.a. steroid og thyroid hormoner, vitaminer som A, D og B1, oxidativt stress, DNA-skader samt andre tegn på effekter af hormonforstyrrende stoffer. En yderligere kortlægning af populationsgenetik samt stressfaktorer som parasitinfektioner og temperaturstigninger og øget udbredelse af iltvind i forbindelse med klimaændringer bør også forsøges integreret i fremtidige undersøgelser.

Yderligere er NOVANA-undersøgelserne nu ved at nå tilstrækkelige lange tidsserier, der fremover kan muliggøre analyser af tidslige udviklinger og eventuelle årsagssammenhænge for observerede effekter på reproduktiv succes i ålekvabbe i danske havområder. Desuden arbejdes

der også på udvikling af værktøjer og kvalitetskriterier til at integrere forskellige effekt- og belastningsmarkører i forbindelse med miljøvurderinger af det samlede pres og ikke kun af enkeltparametre. Flere af disse emner vil blive belyst inden for igangværende udrednings- og forskningsprojekter som FORMÅL (et undersøgelsesforløb til at FORklare fund af Misdannet ÅLeqvabbeunger i danske fjorde) og Østersøprojektet BALCOFISH (Integration of molecular responses to pollutants and ecology of Baltic coastal fish), der begge løber i perioden 2009-2011.

13 Tak til

En tak rettes til Arne Erik Nielsen (Karrebæksminde), Hans Christian Bomberg (Agersø), Leif Stuve Christensen (Vejle), Leif Thomsen (Århus), Jan Damborg (Randers), Erik Krebs (Roskilde) og Birgit Gotthardsen Jacobsen (Miljøcenter Odense) for god assistance ved indsamling af ålekvabber i de forskellige områder.

Derudover skal der rettes en tak til Britt Wassmur og Malin Celander (Gøteborg Universitet) samt DMU's laboranter Birgit Søborg, Peter Kofoed, Inga Jensen, Nina Wiese Thomsen, Anna Marie Plejdrup og Anni Christiansen samt Inger Hornum fra DTU AQAU i forbindelse med de udførte analyser.

Professorerne Lars Förlin (Gøteborg Universitet) og Torkel Gissel Nielsen (Aarhus Universitet) sammen med flere kollegaer i de statslige miljøcentre takkes for at komme med deres faglige kommentering på den endelige rapport.

14 Referencer

Aas, E., Beyer, J. & Goksoyr, A. 1998: PAH in fish bile detected by fixed wavelength fluorescence. - *Marine Environmental Research* 46(1-5): 225-228.

Allen, Y., Matthiessen, P., Scott, A.P., Haworth, S., Feist, S. & Thain J.E. 1999a: The extent of oestrogenic contamination in the UK estuarine and marine environments - further surveys of flounder. - *Science of the Total Environment* 233: 5-20.

Allen, Y., Scott, A.P., Matthiessen, P., Haworth, S., Thain, J.E. & Feist, S. 1999b: Survey of estrogenic activity in United Kingdom estuarine and coastal waters and its effects on gonadal development of the flounder *Platichthys flesus*. - *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 1791-1800.

Allen, Y., Balaam, J., Bamber, S., Bates, H., Best, G., Bignell, J., Brown, E., Craft, J., Davies, I.M., Depledge, M., Dyer, R., Feist, S., Hurst, M., Hutchinson, T., Jones, G., Jones, M., Katsiadaki, I., Kirby, M., Leah, R., Matthiessen, P., Megginson, C., Moffat, C.F., Moore, A., Pirie, D., Robertson, F., Robinson, C.D., Scott, A.P., Simpson, M., Smith, A., Stagg, R.M., Struthers, S., Thain, J., Thomas, K., Tolhurst, L., Waldock, M. & Walker, P. 2002: Endocrine disruption in the marine environment (EDMAR). CEAFS, UK, 70 pp.

[http://www.salmon-trout.org/pdf/Cefas.%20\(2002\).pdf](http://www.salmon-trout.org/pdf/Cefas.%20(2002).pdf)

Amcoff, P., Akerman, G., Tjarnlund, U., Borjeson, H., Norrgren, L., Balk, L., 2002: Physiological, biochemical and morphological studies of Baltic salmon yolk-sac fry with an experimental thiamine deficiency: relations to the M74 syndrome. - *Aquatic Toxicology* 61: 15-33.

Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J. & Rainbow, P.S. 2006: Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. - *Aquatic Toxicology* 76: 160-202.

Ariese, F., Kok, S.J., Verkaik, M., Gooijer, C., Velthorst, N.H. & Hofstraat J.W. 1993: Synchronous fluorescence spectrometry of fish bile - a rapid screening method for the biomonitoring of PAH exposure. - *Aquatic Toxicology* 26(3-4): 273-286.

Ariese, F., Beyer, J., Jonsson, G., Visa, C.P. & Krahn, M.M. 2005: Review of analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic compounds (PACs) in fish bile. - *ICES TIMES* No. 39, 41 pp.

Aries, E., Anderson, D.R., Ordsmith, N. & Fitzpatrick, L. 2006: The Supelco dioxin prep system - Florisil version: a new sample preparation method for fast analysis of PCDD/F and WHO-12 PCBs in environmental samples. - *Organohalogen Compounds* 68: 911-915.

BEQUALM 2008. EROD intercalibration 2008, Final report 31/10/08, BEQUALM Biomarker Programme Office, NIVA, Oslo, Norway.

Bjerregaard, L.B., Korsgaard, B. & Bjerregaard P. 2006a: Intersex in wild roach (*Rutilus rutilus*) from Danish sewage effluent-receiving streams. - *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64: 321-328.

Bjerregaard, L.B., Madsen, A.H., Korsgaard, B. & Bjerregaard P. 2006b: Gonad histology and vitellogenin concentrations in brown trout (*Salmo trutta*) from Danish streams impacted by sewage effluent. - *Ecotoxicology* 15: 315-327.

Bodammer, J.E. 1993: The teratological and pathological effects of contaminants on embryonic and larvae fishes exposed as embryos: a brief review. - *Am. Fish Soc. Symp.* 14: 77-84.

Bosveld, A.B.T., de Bie, P.A.F., van den Brink, N.W., Jongepier, H. & Klomp, A. 2002: In vitro EROD induction equivalency factors for the 10 PAHs generally monitored in risk assessment studies in the Netherlands. - *Chemosphere* 49: 75-83.

Börjeson, H. & Norrgren, L. 1997: M74 syndrome: a review of potential etiological factors. - In: Rolland, R.M., Gilbertson, M. & Peterson, R.E. (Eds.): *Chemically induced alterations in functional development and reproduction of fishes*. Book Series: SETAC Technical Publication Series, p. 153-166.

Bruschweiler, B.J., Wurgler, F.E. & Fent, K. 1996a: Inhibition of cytochrome P4501A by organotins in fish hepatoma cells PLHC-1. - *Environmental Toxicology and Chemistry* 15: 728-735.

Bruschweiler, B.J., Wurgler, F.E. & Fent, K. 1996b: Inhibitory effects of heavy metals on cytochrome P4501A induction in permanent fish hepatoma cells. - *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 31: 475-482.

Celander, M., Näf, C., Bromand, D. & Förlin L. 1994: Temporal aspects of induction of hepatic cytochrome P450 1A and conjugating enzymes in the viviparus blenny (*Zoarces viviparus*) treated with petroleum hydrocarbons. - *Aquatic Toxicology* 29(3-4): 183-196.

Christiansen, F.B., Frydenberg, O., Hjorth, J.P. & Simonsen, V. 1976: Genetics of *Zoarces* populations. IX. Geographic variation at the three phosphoglucomutase loci. - *Hereditas* 83: 245-256.

Christiansen, F.B., Nielsen, B.V. & Simonsen V. 1981: Genetical and morphological variation in the eelpout, *Zoarces viviparus*. - *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 23: 163-172.

Christiansen, F.B., Nielsen, V.H. & Simonsen, V. 1988: Genetics of *Zoarces* populations. XV. Genetic and morphological variation in Mariager Fjord. - *Hereditas* 109: 99-112

Christiansen, L. B., Winther-Nielsen, M. & Helweg, C. 2002: Feminisation of fish. The effect of estrogenic compounds and their fate in sewage treatment plants and nature. - Environmental Project No. 729, 184 pp. Danish Environmental Protection Agency.

<http://www.mst.dk/udgiv/Publications/2002/87-7972-305-5/pdf/87-7972-306-3.pdf>

Davis, W.P. 1997: Evidence for developmental and skeletal responses as potential signals of endocrine disrupting compounds in fishes. - In: Rolland, R.M. Gilbertson, M. & Peterson, R.E. (Eds.); Chemically induced alterations in functional development and reproduction of fishes. SETAC Press, Pensacola, FL, pp. 61-72.

De Metrio, G., Corriero, A., Desantis, S., Zubani D., Cirillo, F., Deflorio, M., Bridges, C.R., Eicker, J., de la Serna, J.M., Megalofonou, P. & Kime, D.E. 2003: Evidence of a high percentage of intersex in the Mediterranean swordfish (*Xiphias gladius* L.). - Marine Pollution Bulletin 46: 358-361.

Detlefsen, V., von Westernhagen, H., Cameron, P., 1996: Malformations in North Sea pelagic fish embryos during the period 1984-1995. ICES Journal of Marine Science 53: 1024-1035.

EF 2006: Kommissionens forordning (EF) Nr. 1881/2006 af 19. december 2006 om fastsættelse af grænseværdier for bestemte forurenende stoffer i fødevarer. Den Europæiske Unions Tidende L 364/5-24.

Elonen, G.E., Spehar, R.L., Holcombe, G.W., Johnson, R.D., Fernandez, J.D., Erickson, R.J., Tietge, J.E. & Cook, P.M. 1998: Comparative toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin to seven freshwater fish during early life-stage development. - Environmental Toxicology and Chemistry 17: 472-483.

Fillmann, G., Watson, G.M., Howsam, M., Francioni, E., Depledge, M.H. & Readman, J.W. 2004: Urinary PAH metabolites as biomarkers of exposure in aquatic environments - applicability of immunochemical techniques. - Environmental Science and Technology 38: 2649-2656.

Fowler, J., Cohen, L. & Jarvis, P. 1998: Practical statistics for field biology. 2nd edition, John Wiley and Sons, Chichester, UK, 259 pp.

Gercken, J. & Sordyl, H. 2002: Intersex in feral marine and freshwater fish from northeastern Germany. - Marine Environmental Research 54: 651-655.

Gercken, J., Förlin, L. & Anderson J. 2006: Developmental disorders in larvae of eelpout (*Zoarces viviparus*) from German and Swedish Baltic coastal waters. - Marine Pollution Bulletin 53: 497-507.

Gercken, J., Sund, M. & Sordyl, H., 2007: Biologisches Effektmonitoring mit Aalmuttern aus Nord- und Ostsee. Histologische Gonadenuntersuchung. - Rapport fra Institut für Angewandte Ökologie Forschungsgesellschaft mbH (IFAÖ), Broderstorf bei Rostock, Deutschland, Im Auftrag des Umweltbundesamtes, 39 s.

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.

Hahlbeck, E. 2004: The juvenile three-spined stickleback – model organism for the study of estrogenic and androgenic endocrine disruption in laboratory and field. - Doctoral thesis 2004 from Stockholm University, Institute of Applied Environmental Research (ITM), Sweden.

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, Miljøministeriet, 112 s. <http://www.blst.dk/Publikationer/2008/978-87-92256-41-6.htm>

HELCOM 2006: Manual for Marine Monitoring in the COMBINE Programme of HELCOM. Part D. Programme for monitoring of contaminants and their effects.

http://www.helcom.fi/groups/monas/CombineManual/en_GB/main

Henderson, H. 2007: The effects of contaminants on sperm quality and intersex condition of smallmouth bass (*Micropterus dolomieu*) in the Potomac River. - A thesis submitted to the Davis College of Agriculture, Forestry and Consumer Sciences at West Virginia University, Morgantown, West Virginia, 35 pp.

<http://wvuscholar.wvu.edu:8881/R/Y5JV36TA7E648G6R13DH68AGIGTXM4JBJB6PR9SUG85QQ5Y91C-01778>

Hjorth, J.P. 1971: Genetics of *Zoarcetes* populations. I. Three loci determining the phosphoglucosmutase isoenzymes in brain tissue. - *Hereditas* 69: 233-242.

ICES 2004: Recommended techniques for biological monitoring programmes at the national or international level – methods for fish. - Report of the Working Group on Biological Effects of Contaminants. WGBEC meeting 22-26 March 2004, Ostend, Belgium.

ICES 2007: Annex 16: Assessment criteria for fish diseases, vitellogenin, and reproductive success in eelpout etc. - In: Report of the ICES/OSPAR Workshop on Integrated Monitoring of Contaminants and their Effects in Coastal and Open Sea Areas (WKIMON III), 16-18 January 2007, ICES Headquarters, Denmark.

ICES 2008: Report of the Fourth ICES/OSPAR Workshop on Integrated Monitoring of Contaminants and their Effects in Coastal and Open Sea Areas (WKIMON IV), 5-7 February 2008, ICES, Copenhagen, Denmark, ICES WKIMON IV report 2008, ICES Advisory Committee, ICES CM 2008/ACOM:49, 68 pp.

Jobling, S., Coey, S., Whitmore, J.G., Kime, D.E., Van Look, K.J., McAllister, B.G., Beresford, N., Henshaw, A.C., Brighty, G., Tyler, C.R. & Sumpter, J.P. 2002: Wild intersex roach (*Rutilus rutilus*) have reduced fertility. - *Biology of Reproduction* 67(2): 515-24.

Jobling, S. & Tyler, C.R. 2003: Endocrine disruption in wild freshwater fish. - *Pure and Applied Chemistry* 75: 2219-2234.

Jonsson, M., Abrahamson, A., Brunstrom, B., Brandt, I., Ingebrigtsen, K. & Jorgensen, E.H. 2003: EROD activity in gill filaments of anadromous and marine fish as a biomarker of dioxin-like pollutants. - *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 136: 235-243.

Kammann, U. 2007: PAH metabolites in bile fluids of dab (*Limanda limanda*) and flounder (*Platichthys flesus*): Spatial distribution and seasonal changes. - *Environmental Science and Pollution Research* 14 (2): 102-108.

Kidd, K.A., Blanchfield, P.J., Mills, K.H., Palace, V.P., Evans, R.E., Lazorchak, J.M. & Flick, R.W. 2007: Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. - *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 8897-8901.

Kirby, M.F., Allen, Y.T., Dyer, R.A., Feist, S.W., Katsiadaki, I., Matthiessen, P., Scott, A.P., Smith, A., Stentiford, G.D., Thain, J.E., Thomas, K.V., Tolhurst, L. & Waldock, M.J. 2004: Surveys of plasma vitellogenin and intersex in male flounder (*Platichthys flesus*) as measures of endocrine disruption by estrogenic contamination in United Kingdom estuaries: Temporal trends, 1996 to 2001. - *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 748-758.

Kirby, M.F., Bignell, J., Brown, E., Craft, J.A., Davies, I., Dyer, R.A., Feist, S.W., Jones, G., Matthiessen, P., Megginson, C., Robertson, F.E. & Robinson, C. 2003: The presence of morphologically intermediate papilla syndrome in United Kingdom populations of sand goby (*Pomatoschistus spp*): Endocrine disruption? - *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 239-251.

Kristofferson, R. & Pekkarinen, M. 1975: Histological changes in the testes of brackish-water *Zoarces viviparus* (L.) in relation to the reproductive cycle. - *Annales Zoologici Fennici* 12: 205-210.

Larsson, D.G.J. & Förlin, L., 2002: Male-biased sex ratios of fish embryos near a pulp mill: Temporary recovery after a short-term shutdown. - *Environmental Health Perspectives* 110(8): 739-742.

Madsen, L.L., Korsgaard, B. & Bjerregaard, P. 2003: Estrogenic effects in flounder *Platichthys flesus* orally exposed to 4-tert-octylphenol. - *Aquatic Toxicology* 64: 393-405.

Matthiessen, P. 2003: Endocrine disruption in marine fish. - *Pure and Applied Chemistry* 75: 2249-2261.

Minier, C., Levy, F., Rabel, D., Bocquené, G., Godefroy, D., Burgeot, T. & Leboulenger, F., 2000: Flounder health status in the Seine Bay. A multi-biomarker study. - *Marine Environmental Research* 50: 373-377.

Muus, B.J. & Dahlstrøm, P. 1983: Havfisk og fiskeri. Gads nature forum.

Nei, M. 1978: Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. - *Genetics* 89: 583-590.

Neuman, E., Sandström, O. & Thoresson, G. 1999: Guidelines for coastal fish monitoring. National Board of Fisheries, Institute of Coastal Research, Öregrund, Sweden, 44 pp.

NHR 2009: The Environmental Specimen Bank. The Swedish Museum of Natural History, Stockholm, Sweden.

<http://www.nrm.se/en/menu/researchandcollections/departments/contaminantresearch>

Oros, D.R & Ross, J.R.M. 2004: Polycyclic aromatic hydrocarbons in San Francisco Estuary sediments. - *Marine Chemistry* 86: 169-184.

OSPAR 1997: JAMP guidelines for general biological effects monitoring. Technical Annex 10 - Reproductive success in fish.

<http://www.ospar.org/documents/dbase/decrecs/agreements/97-07e.doc>

Page, R.D.M. 1996: TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. - *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.

Peakall, R. & Smouse, P.E. 2006: GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. - *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.

Pesonen, M., Andersson, T.B., Sorri, V. & Korkalainen, M. 1999: Biochemical and ultrastructural changes in the liver of Baltic salmon sac fry suffering from high mortality (M74). - *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 1007-1013.

Petersen, D.G. & Dahllöf, I. 2005: Improvements for comparative analysis of changes in diversity of microbial communities using internal standards in PCR-DGGE. - *FEMS Microbiology Ecology* 53: 339-348.

Pörtner, H.O. & Knust, R. 2007: Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. - *Science* 315: 95-97.

Rice, W.R. 1989: Analysing tables of statistical tests. - *Evolution* 43: 223-225.

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* 124C: 271-279.

Ronisz, D., Lindesjö, E., Larsson, Å., Bignert, A. & Förlin, L. 2005: Thirteen years of monitoring selected biomarkers in eelpout (*Zoarces viviparus*) at reference site in the Fjällbacka Archipelago on the Swedish West Coast. - *Aquatic Ecosystem Health & Management* 8(2): 1-10.

Sandström, O., Larsson, A., Andersson, J., Appelberg, M., Bignert, A., Ek, H., Förlin, L. & Olsson, M. 2005: Three decades of Swedish experience demonstrates the need for integrated long-term monitoring of fish in marine coastal areas. - *Water Quality Research Journal of Canada* 40(3): 233-250.

Schiedek, D., Broeg, K., Barsiene, J., Lehtonen, K.K., Gercken, J., Pfeifer, S., Vuontisjärvi, H., Vuorinen, P.J., Dedonyte, V., Köhler, A., Balk, L. & Schneider, R. 2006: Biomarker responses as indication of contaminant effects in blue mussel (*Mytilus edulis*) and female eelpout (*Zoarces viviparus*) from the southwestern Baltic Sea. -Marine Pollution Bulletin 53: 387-405.

Schoenfuss, H.L., Bartell, S.E., Bistodeau, T.B., Cediell, R.A., Grove, K.J., Zintek, L., Lee, K.E. & Barber L.B. 2008: Impairment of the reproductive potential of male fathead minnows by environmentally relevant exposures to 4-nonylphenol. - Aquatic Toxicology 86(1): 91-98.

Schmidt, J., 1917: *Zoarces viviparus* L. and its local races, in Danish. Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet 13(3): 271-386.

Simonsen, V. & Frydenberg, O. 1972: Genetics of *Zoarces* populations. II. Three loci determining esterase isozymes in eye and brain tissue. - Hereditas 70: 235-242.

Simonsen, V. & Christiansen, F.B. 1981: Genetics of *Zoarces* populations. XI. Inheritance of electrophoretic variants of the enzyme adenosine deaminase. - Hereditas 95: 289-294.

Simonsen, V. & Christiansen, F.B. 1984: Genetics of *Zoarces* populations. XIII. Three loci determining isoenzymes of glutamic-oxaloacetic transaminase. - Hereditas 101: 129-136.

Simonsen, V. & Christiansen F.B. 1985: Genetics of *Zoarces* populations. XIV. Variation of the lactate dehydrogenase isoenzymes. - Hereditas 103: 177-185.

Sneath, P.H.A. & Sokal, R.R. 1973: Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. Freeman, San Francisco, USA, 573 pp.

Snyder, M.J. 2000: Cytochrome P450 enzymes in aquatic invertebrates: recent advances and future directions. - Aquatic Toxicology 48: 529-547.

Srogi, K. 2008: Levels and congener distributions of PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs in environmental and human samples: a review. - Environmental Chemistry Letters 6: 1-28.

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.

Stentiford, G.D., Longshaw, M., Lyons, B.P., Jones, G., Green, M. & Feist, S.W. 2003: Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. - Marine Environmental Research 55:137-159.

Strand, J., Andersen, L., Dahllöf I. & Korsgaard, B., 2004a: Impaired larval development in broods of eelpout (*Zoarces viviparus*) in Danish coastal waters. - Fish Physiology and Biochemistry 30: 37-46.

Strand, J., Larsen, M.M. & Stedmon C. 2004b: Analyse af udviklingen i koncentrationen af miljøfarlige stoffer i det danske havmiljø, kapitel 17, s 58-65. - I: Ærtebjerg, G. & Andersen, J.H. (red.)2004; Marine områder 2003 – Miljøtilstand og udvikling. 97 s. – Faglig rapport fra DMU nr. 513.
http://www2.dmu.dk/1_Viden/2_Publikationer/3_Fagrappporter/rappporter/FR513.pdf

Strand J. & Dahllöf I. 2005: Biologisk effektmonitoring i fisk. NOVANA teknisk anvisning for marin overvågning, kapitel 6.3. Danmarks Miljøundersøgelser.
http://www2.dmu.dk/1_Om_DMU/2_Tvaer-funk/3_fdc_mar/programgrundlag/TekAnv2004_2009/Del6/TA04_6_3_BEM_fisk_12_12_05.pdf (in Danish).

Strand, J. 2005: Biologiske effekter i ålekvalbe og muslinger, kapitel 16, s. 52-53. - I: Ærtebjerg, G. (red.); Marine områder 2004 – Tilstand og udvikling i miljø- og naturkvaliteten. NOVANA. Danmarks Miljøundersøgelser. 94 s. – Faglig rapport fra DMU nr. 551.
http://www2.dmu.dk/1_viden/2_Publikationer/3_fagrappporter/rappporter/FR551.PDF

Strand, J., 2007: Biologisk effektmonitoring, kapitel 14, s 53-57. - I: Ærtebjerg, G. (red.); Marine områder 2005-2006 – Tilstand og udvikling i miljø- og naturkvaliteten. NOVANA. Danmarks Miljøundersøgelser, Aarhus Universitet. 95 s. – Faglig rapport fra DMU nr. 639.
<http://www.dmu.dk/Pub/FR639.pdf>

Strand, J., Dahllöf, I. & Larsen, M.M., 2009: Biologisk effektmonitoring, kapitel 13, s. 62-63. - I: Dahl, K. & Josefson, A.B. (red.); Marine områder 2007. NOVANA. Tilstand og udvikling i miljø- og naturkvaliteten. Danmarks Miljøundersøgelser, Aarhus Universitet. 113 s. - Faglig rapport fra DMU nr. 707.
<http://www.dmu.dk/Pub/FR707.pdf>

Strand, J., in press: Biologisk effektmonitoring, kapitel 13. - I: Hjorth, M. & Josefson, A.B. (red.); Marine områder 2008. NOVANA. Tilstand og udvikling i miljø- og naturkvaliteten. Danmarks Miljøundersøgelser, Aarhus Universitet. - Faglig rapport fra DMU.

Stuer-Lauridsen, F., Gustavson, K., Møhlenberg, F., Dahllöf, I., Strand, J., Bjerregaard, P., Korsgaard, B., Rasmussen, T.H. & Halling-Sørensen, B. 2008: Misdannet ålekvalbe og andre biologiske effekter i danske vandområder: Litteraturudredning. - Miljøprojekt 1151, Rapport fra By- og Landskabsstyrelsen, Miljøministeriet. 208 s.
<http://www.blst.dk/Publikationer/2008/978-87-7052-384-4.htm>

Sturve, J., Berglund, A., Balk, L., Broeg, K., Bohmert, B., Massey, S., Savva, D., Parkkonen, J., Stephensen, E., Koehler, A. & Forlin, L. 2005: Effects of dredging in Goteborg Harbor, Sweden, assessed by biomarkers in eelpout (*Zoarces viviparus*). - Environmental Toxicology and Chemistry 24: 1951-1961.

Tomkiewicz, J., Tybjerg, L., Holm, N., Hansen, A., Broberg, C. & Hansen, E. 2002: Manual to determine gonadal maturity of Baltic cod. - DFU-rapport 116-02, Danmarks Fiskeriundersøgelser, 49 pp.
http://www.aqua.dtu.dk/Om_DTU_Aqua/Medarbejdere.aspx?lg=showcommon&id=227693

Svedäng, H. & Förlin, L. 1997: Fiskekologi och fiskfysiologi. - Bottniska viken 1997: 16-17.

UPB 2009: Umweltprobenbank des Bundes - the Environmental Specimen Bank of the Federal Government, Berlin, Germany.

<http://anubis.uba.de/wwwupb/servlet/upb>

Varanasi, U., Nishimoto, M., Reichert, W.L. & Leeberhart, B.T. 1986: Comparative metabolism of benzo(alpha)pyrene and covalent binding to hepatic DNA in English sole, starry flounder and rat. - Cancer Research 46(8): 3817-3824.

Vetemaa, M., Förlin, L. & Sandström, O. 1997: Chemical industry effluent impact on reproduction and biochemistry in a North Sea population of the viviparous blenny (*Zoarces viviparus*). - Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery 6: 33-41.

Vetemaa, M. 1999: Reproduction biology of the viviparous blenny (*Zoarces viviparus* L.). - Fiskeriverket rapport 2: 81-96, Göteborg, Sweden.

Vuorinen, P.J., Keinänen, M., Vuontisjärvi, H., Barsiene, J., Broeg, K., Förlin, L., Gercken, J., Kopecka, J., Köhler, A., Parkkonen, J., Pempkowiak, J. & Schiedek, D. 2006: Use of biliary PAH metabolites as a biomarker of pollution in fish from the Baltic Sea. - Marine Pollution Bulletin 53: 479-487.

Watson, G.M., Andersen, O.-K., Galloway, T.S. & Depledge, M.H. 2004: Rapid assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure in decapod crustaceans by fluorimetric analysis of urine and haemolymph. - Aquatic Toxicology 67: 127-142.

Weis, J.S. & Weis, P. 1989: Effects of environmental pollutants on early fish development. - Reviews in Aquatic Sciences 1(1): 45-73.

Yamauchi, M., Kimb, 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 and CYP1A expressions. - Aquatic Toxicology 80: 166-179.

Yeh, F., Boyle, T., Yeh, R. & Ye Z. 2001: Popgene 1.32.

<http://www.ualberta.ca/~fyeh>

Ådjers, K., Appelberg, M., Eschbaum, R., Lappalainen, A. & Lozys, L. 2001: Coastal fish monitoring in Baltic reference areas 2000. - Kala - ja riistaraportteja 229: 1-14, Helsinki, Finland.

DMU Danmarks Miljøundersøgelser

Danmarks Miljøundersøgelser er en del af Aarhus Universitet. På DMU's hjemmeside www.dmu.dk finder du beskrivelser af DMU's aktuelle forsknings- og udviklingsprojekter.

DMU's opgaver omfatter forskning, overvågning og faglig rådgivning inden for natur og miljø. Her kan du også finde en database over alle publikationer som DMU's medarbejdere har publiceret, dvs. videnskabelige artikler, rapporter, konferencebidrag og populærfaglige artikler.

Yderligere information: www.dmu.dk

Danmarks Miljøundersøgelser
Frederiksborgvej 399
Postboks 358
4000 Roskilde
Tlf.: 4630 1200
Fax: 4630 1114

Administration
Afdeling for Arktisk Miljø
Afdeling for Atmosfærisk Miljø
Afdeling for Marin Økologi
Afdeling for Miljøkemi og Mikrobiologi
Afdeling for Systemanalyse

Danmarks Miljøundersøgelser
Vejlsovej 25
Postboks 314
8600 Silkeborg
Tlf.: 8920 1400
Fax: 8920 1414

Afdeling for Ferskvandsøkologi
Afdeling for Marin Økologi
Afdeling for Terrestrisk Økologi

Danmarks Miljøundersøgelser
Grenåvej 14, Kalø
8410 Rønne
Tlf.: 8920 1700
Fax: 8920 1514

Afdeling for Systemanalyse
Afdeling for Vildtbiologi og Biodiversitet

Faglige rapporter fra DMU

På DMU's hjemmeside, www.dmu.dk/Udgivelser/, finder du alle faglige rapporter fra DMU sammen med andre DMU-publikationer. Alle nyere rapporter kan gratis downloades i elektronisk format (pdf).

- Nr./No. 2009**
- 720 The eastern Baffin Bay. A preliminary strategic environmental impact assessment of hydrocarbon activities in the KANUMAS West area.
By Boertmann, D., Mosbech, A., Schiedek, D. & Johansen, K. (eds). 238 pp.
- 719 The western Greenland Sea. A preliminary strategic environmental impact assessment of hydrocarbon activities in the KANUMAS East area.
By Boertmann, D., Mosbech, A., Schiedek, D. & Johansen, K. (eds). 246 pp.
- 718 DEVANO. Decentral Vand- og Naturovervågning. Programbeskrivelse 2009.
Af Bijl, L. van der, Boutrup, S. & Nordemann Jensen, P. (red.). 34 s.
- 717 Oplandsmodellering af vand og kvælstof i umættet zone for oplandet til Horndrup Bæk.
Af Ladekar, U.L., Jensen, R., Grant, R., Blicher-Mathiesen, G., Mejlhede, P., Olsen, B.Ø. 76 s.
- 716 Annual Danish informative inventory report to UNECE. Emission inventories from the base year of the protocols to year 2007.
By Nielsen, O-K., Winther, M., Mikkelsen, M.H., Hoffmann, L., Nielsen, M., Gyldenkærne, S., Fauser, P., Plejdrup, M.S., Albrektsen, R. & Hjelgaard, K. 498 pp.
- 715 Baseline and monitoring studies at Seqi olivine mine 2004 to 2007.
By Asmund, G., Boertmann, D. & Johansen, P. 90 pp.
- 714 Vandmiljø og Natur 2007. NOVANA. Tilstand og udvikling – faglig sammenfatning.
Af Nordemann Jensen, P., Boutrup, S., Bijl, L. van der, Svendsen, L.M., Grant, R., Bøgestrand, J., Jørgensen, T.B., Ellermann, T., Dahl, K., Josefson, A.B., Ejrnæs, R., Søgaard, B., Thorling, L. & Dahlgren, K. 118 s.
- 713 Arter 2007. NOVANA.
Af Søgaard, B. & Asferg T. (red.). 140 s.
- 712 Terrestriske Naturtyper 2007. NOVANA.
Af Ejrnæs, R., Nygaard, B., Fredshavn, J.R., Nielsen, K.E. & Damgaard, C. 150 s.
- 711 Vandløb 2007. NOVANA.
Af Bøgestrand, J. (red.). 108 s.
- 710 Søer 2007. NOVANA.
Af Jørgensen, T.B., Clausen, J., Bjerring Hansen, R., Søndergaard, M., Sortkjær, L. & Jeppesen, E. 68 s.
- 709 Landovervågningsoplande 2007. NOVANA.
Af Grant, R., Pedersen, L.E., Blicher-Mathiesen, G., Jensen, P.G., Hansen, B. & Thorling, L. 128 s.
- 708 Atmosfærisk deposition 2007. NOVANA.
Af Ellermann, T., Andersen, H.V., Bossi, R., Christensen, J., Geels, C., Kemp, K., Løfstrøm, P., Mogensen, B.B. & Monies, C. 97 s.
- 707 Marine områder 2007 – Tilstand og udvikling i miljø- og naturkvaliteten. NOVANA.
Af Dahl, K. & Josefson, A.B. (red.) 113 s.
- 706 Beregning af naturtilstand for vandhuller og mindre søer. Tilstandsvurdering af Habitatdirektivets søtyper.
Af Fredshavn, J.F., Jørgensen, T.B. & Moeslund, B. 38 s.
- 705 Hazardous substances and heavy metals in the aquatic environment. State and trend, 1998-2003.
By Boutrup, S. (ed.), Fauser, P., Thomsen, M., Dahllöf, I., Larsen M.M., Strand, J., Sortkjær, O., Ellermann, T., Rasmussen, P., Jørgensen, L.F., Pedersen, M.W. & Munk, L.M. 44 pp.
- 704 Contaminants in the traditional Greenland diet – Supplementary data.
By Johansen, P., Muir, D., Asmund, G. & Riget, F. 22 pp.
- 703 Projection of Greenhouse Gas Emissions 2007 to 2025.
By Nielsen, O-K., Winther, M., Mikkelsen, M.H., Gyldenkærne, S., Lyck, E., Plejdrup, M., Hoffmann, L., Thomsen, M., Fauser, P. 211 pp.
- 702 Rastende vandfugle i Margrethe Kog og på forlandet vest for Tøndermarsken, 1984-2007.
Af Laursen, K., Hounisen, J.P., Rasmussen, L.M., Frikke, J., Pihl, S., Kahlert, J., Bak, M. & Amstrup, O. 78 s.
- 700 Drivhusgasopgørelse på kommuneniveau. Beskrivelse af beregningsmetoder.
Af Nielsen, O-K., Winther, M., Gyldenkærne, S., Lyck, E., Thomsen, M., Hoffmann, L. & Fauser, P. 104 s.

[Tom side]

DIOXIN OG BIOLOGISK EFFEKT- MONITERING I ÅLEKVABBE I KYSTNÆRE DANSKE FARVANDE

Denne undersøgelse afprøver nogle nye potentielle miljøindikatorer for at kunne vurdere, dels belastningsniveauer med de miljøfarlige dioxinlignende stoffer og PAH, dels omfanget af forskellige typer af biologiske effekter i ålekvabbe. Biomarkører for bl.a. hormonforstyrrelser i form af intersex, CYP1A-enzymssystemer og forekomsten af misdannelser viser sammen med de kemiske målinger, at ålekvabbe er påvirket af miljøfarlige stoffer i de danske farvande.