

NOTAT

Dato: 7. september 2001

Forfattere:

Sonnich Meier, Jarle Klungsøyr og Asbjørn Svardal

Havforskningsinstituttet

Nordnesgaten 50,

Pb 1870,

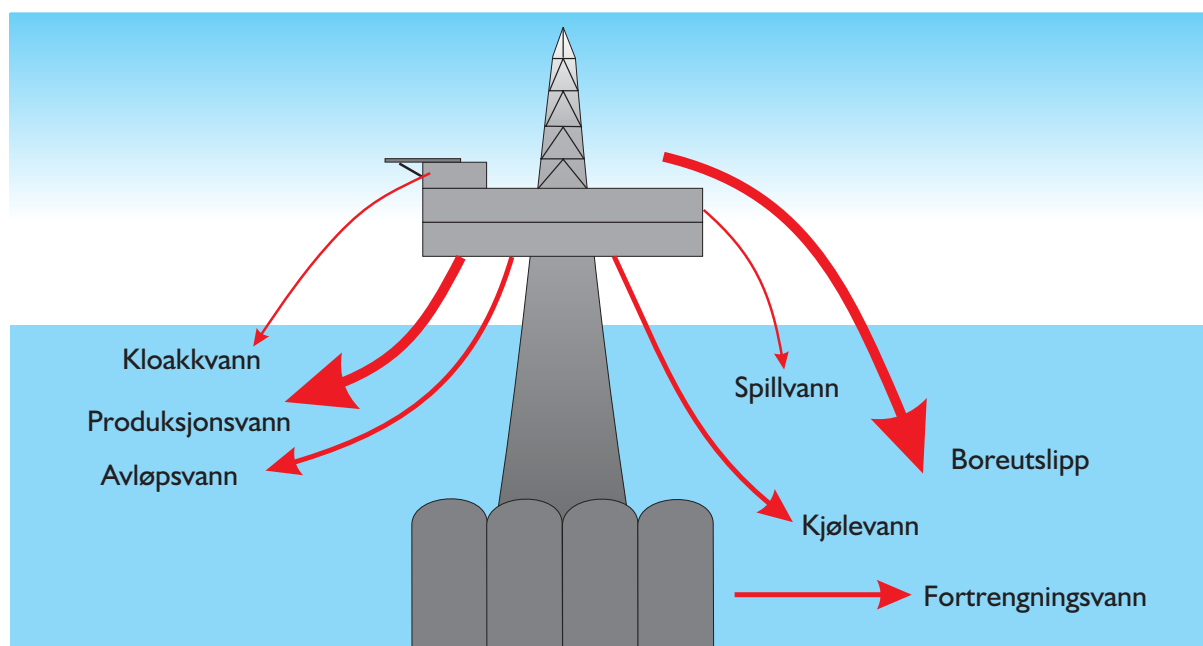
5817 Bergen

ALKYLERTE FENOLERS HORMONELLE INNVIRKNING PÅ TORSK

1. INTRODUKSJON TIL PROBLEMET OMKRING UTSLIPP TIL SJØ FRA OFFSHORESEKTOREN

1.1. Produsert vann – sammensetning og effekter på det marine miljø

Fra oljevirkosomheten på norsk sokkel slippes det ut store mengder såkalt produsert vann. Jo eldre et felt blir, jo mer produsert vann slippes ut, og det er ikke uvanlig at på slutten av feltets levetid er opptil 98% av det som pumpes opp fra brønnen produsert vann. I løpet av et oljefelts økonomiske liv kan volumet produsert vann være ti ganger så stort som volumet av oljen som er tatt opp. Hvilke konsekvenser de store utslippene har på det marine miljø bekymrer både oljeselskaper, myndigheter, den vanlige mann og ikke minst en rekke vitenskapelige miljøer.

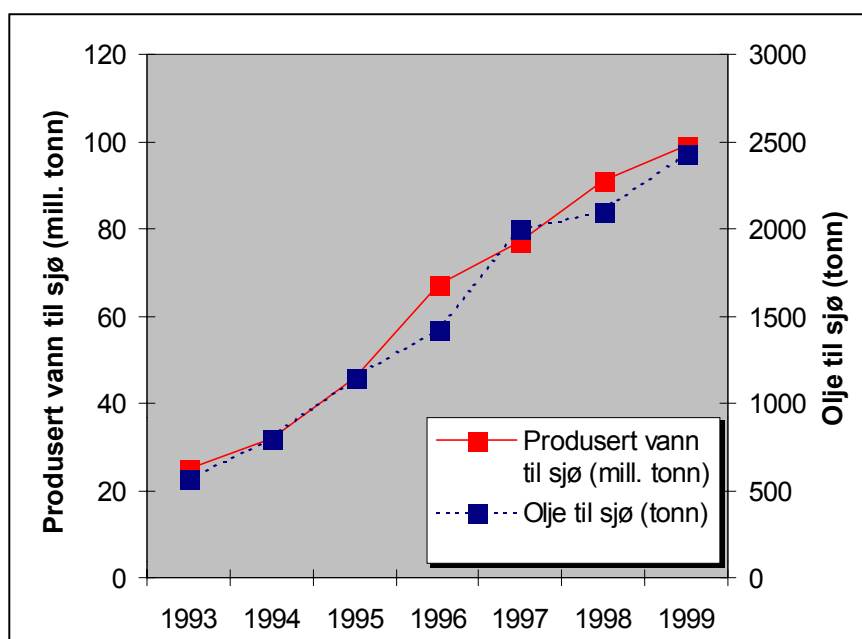


Figur 1. Utslipp til vann fra en oljeproduksjonsplattform

1.2. Produsert vann – hva er det og hvor mye slippes ut?

Produsert vann er vann som følger med olje og gass fra reservoarene og separeres fra hydrokarbonene på plattformen eller produksjonsskipet. Produsert vann består av såkalt formasjonsvann, dvs vann som naturlig befinner seg i den geologiske strukturen, og vann injisert i reservoaret for å opprettholde trykket. Det produserte vannet renses for olje ned til maksimum 40 mg/l og slippes deretter for det meste ut til sjø. Bare en mindre del reinjiseres i reservoaret. Utslippsgrensen på 40 mg/l gjelder dispergert olje. Det finnes ikke en tilsvarende grense for oppløste komponenter. I tillegg til rester av olje inneholder vannet kjemikalier og stoffer som finnes naturlig i reservoarene, som metaller, alkylfenoler og aromatiske hydrokarboner (inklusive PAH). I 1999 ble det sluppet ut i overkant av 15 tonn alkylfenoler på norsk sokkel i forbindelse med produksjonsvannutslipp.

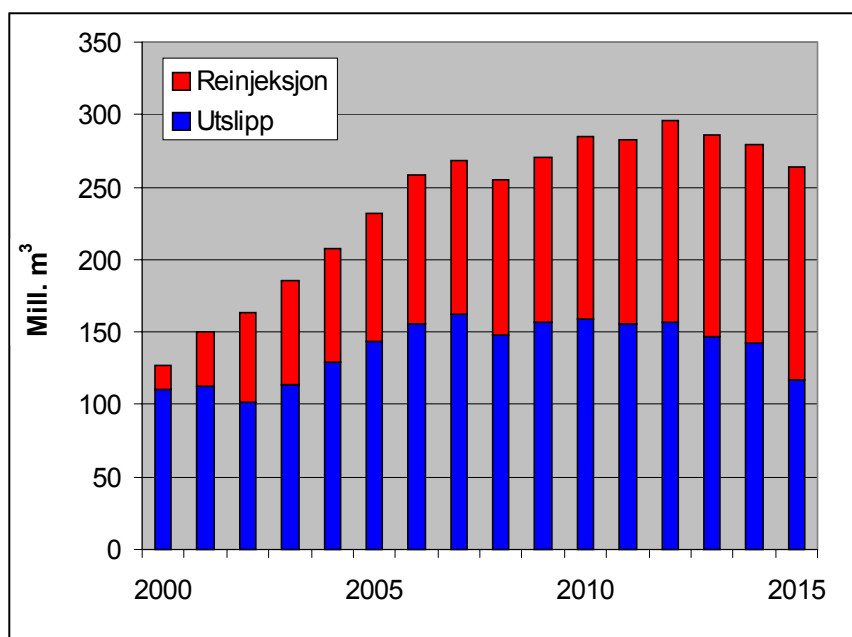
Plattformen som har lagerceller for olje slipper også ut såkalt *fortrengningsvann* sammen med det produserte vannet. I tillegg kommer *drenasjevann* fra dekket på plattformene som også kan inneholde olje. I 1999 kom 2.467 tonn av oljeutslippene fra produsert vann, mens 296 tonn skrev seg fra fortrennings- og drenasjevann. Resten av de totale utslippene på 2.900 tonn på norsk sokkel skyltes akuttutslipp på installasjonene. Fig. 2 viser utviklingen i mengde produsert vann og utslipp av olje til sjø på norsk sokkel (SFT 2000).



Figur 2. Mengde produsert vann og utslippet olje i perioden 1993-99 (Kilde: SFT)

1.3. Periode med sterk økning i utslipp

Norge er inne i en periode der størrelsen på utslippene av produsert vann fra olje- og gassvirksomheten øker sterkt (Fig. 3). Fra et utslipp på 26 millioner m³ i 1993 ventes utslippet i 2001 å være på 120 millioner m³. Dette skyldes at en rekke olje- og gassfelt begynner å tømmes.



Figur 3. Prognose for produsert vann, utslipp og reinjeksjon (Kilde: Miljøsok 1998)

1.4. Hva består det produserte vannet av?

For å kunne ha kvalifiserte meninger om effektene av utslippene av produsert vann, er det nødvendig å vite hva dette kjemisk sett er sammensatt av. Grovt sett kan komponentene grupperes i følgende kategorier:

- olje
- tungmetaller
 - Barium (Ba)
 - Kadmium (Cd)
 - Kopper (Cu)
 - Jern (Fe)
 - Kvikksølv (Hg)
 - Bly (Pb)
 - Sink (Zn)
- radionuklider
 - Radium (^{226}Ra)
- tilsetningskemikalier
 - Avleiringshemmere
 - Korrosjonshemmere
 - Biocider
 - Emulsjonsbrytere
 - Forskjellige vannbehandlingsmidler
 - Skumdempende midler
 - Parafin- asfaltenbehandlingsmidler
- salt
 - Hovedsakelig koksalt
- løst oksygen (lave mengder)

Deler av det produserte vannet har vært i kontakt med de geologiske formasjonene i millioner av år. Sammensetningen er derfor feltavhengig og vil også kunne forandre seg ettersom produksjonstiden øker, da stadig mer vann må injiseres i strukturen for å opprettholde trykket.

Tabell 1 gir en oversikt over den kjemiske sammensetningen av produsert vann på norsk sektor i Nordsjøen, samt resultatene fra feltstudier av bakgrunnsnivåer av noen komponenter i produsert vann.

Tabell 1. Kjemisk sammensetning av produsert vann fra oljeproduksjonsfelter på norsk sektor i Nordsjøen sammenlignet med observerte bakgrunnsnivåer (Røe, 1998).

Chemical composition of produced water from oil production fields in the Norwegian sector in the North Sea compared to observed background levels.

		Norsk sektor		Sjøvann
Kjemisk forbindelse	Enhet	Variasjonsbredde	Snitt	Variasjonsbredde
THC (IR)	mg/l	15-60	44	it
BTEX	mg/l	1-67	6	it
NPD	mg/l	0,06-2,3	1,2	9-185 ng/l
PAH	µg/l	130-575	468	1-45 ng/l
Organiske syrer (< C6)	mg/l	55-761	368	it
Fenoler (C0-C4)	mg/l	0,1-43	8	it
Ba	mg/l	0,2-228	87	22-80 µg/l
Cd	µg/l	0,4-5	2	4-23 ng/l
Cu	µg/l	22-82	10	20-500 ng/l
Fe	mg/l	0,1-15	4,3	1,8 µg/l
Hg	ng/l	< 0,1-26	1,9	1-3 ng/l
Pb	ng/l	0,4-8,3	0,7	20-81 ng/l
Zn	mg/l	0,5-13	7	0,3-1,4 µg/l
²²⁶ Ra	Bq/l	it	it	it

it: ikke tilgjengelig

THC Total HydroCarbon

BTEX Benzene, Toluene, Ethylbenzene, Xylene fraction

NPD Naphthalene, Phenanthrene, Dibenzothiophene og deres C1-C3 alkylhomologer

PAH Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

1.5. Innvirkning på det marine miljø

Fra ovenstående er det klart at produsert vann består av et veldig stort antall forskjellige kjemiske komponenter der noen er definerte mens andre er det ikke. Utslipp over et visst nivå av noen av disse forbindelsene kan medføre endringer i et økologisk system. Graden av endring vil avhenge av mange faktorer som f.eks. utslippsmengden og miljøets kapasitet til å absorbere, nytte eller uskadeliggjøre forurensningene. Noen forurensningskomponenter er lettere å uskadeliggjøre enn andre, noen tas lett opp i næringskjeden mens andre ikke blir tatt opp.

Enkelte komponenter i det produserte vannet kan tjene som direkte næringsemner for marine mikroorganismer og slike finnes først og fremst i fraksjonen av organiske syrer. Utslipet av kortkjedede fettsyrer er høyt (Tabell 1) og når en vet at disse er næring for mange forskjellige mikroorganismer er det lett å forestille seg at dette kan forrykke sammensetning og mengde av den naturlige fauna i området. Visse mikroorganismer får ekstra gode vekstvilkår, noe som kan lede til at andre fortrenses. Resultatet kan være en forskyvning i den naturlige artssammensetningen i området.

Det er skrevet tykke bøker om potensielle negative effekter av ulike kjemikalier i produsert vann på det marine miljø. Forskjellige testorganismer fra ulike ledd i næringskjeden er blitt brukt og oppfinnsomme såkalte "screeningprotokoller" er utviklet for å bestemme miljøeffektene. Oftest medfører dette grove forenklinger av de ulike biologiske system næringskjedene er sammensatt av, og resultatene av testene har i mange tilfeller begrenset verdi. Livet i havet er også ekstremt forskjelligartet og det kan til og med være vanskelig å overføre resultatene funnet på et fiskeslag til et annet. For å være helt sikker på hvilke spesifikke effekter bestemte kjemikalier har på en fiskeart, bør derfor akkurat den arten undersøkes.

I det nedenstående fokuseres det på de toksiske effektene av de komponentene som finnes i **oljefraksjonen** i det produserte vannet og disse deles opp i akutt og kronisk toksisitet.

1.6. Akutt toksisitet

Generelt sett er den akutte toksisiteten av produsert vann på marine organismer liten, men feltvariasjoner finnes. Akutt toksisitetsdata fra produsert vann fra Nordsjøen viser at effektnivået er over 0,3 ml/l for alle organismene som ble testet (alger, skjell, kopepoder, amfipoder, reker og fisk) (Røe, 1998). Akutte effekter er ikke forventet å bli funnet i områder som ligger mer enn 50 meter fra utslippspunktet. Undersøkelser er blitt gjort på hvilke fraksjoner i det produserte vannet det er som forårsaker den akutte toksisiteten. Testene som ble brukt var Microtox® (*Photobacterium phosphoreum*), og bionedbrytningstester (OECD 301E), og de viste at de største bidragsyterne til den akutte toksisitet til produsert vann var aromat- og fenolfraksjonen (Røe, 1998).

1.7. Kronisk toksisitet

Kronisk toksisitet eller såkalte langtidseffekter defineres som en påvirkning som er langvarig eller kontinuerlig over lang tid (uker til år avhengig av organismens livssyklus). Uttrykket “kronisk” kan brukes til enten å definere eksponeringen eller responsen på eksponeringen (effekten). Typisk for kronisk eksponering er at den biologiske effekten av denne utvikles langsomt og har lang varighet. Langtidseffekter kan oppsummeres som i Tabell 2.

Tabell 2. Oversikt over responser og effekter på forskjellige nivåer i økosystemet

Overview of responses and effects at different levels of the ecosystem

Nivå	Type respons	Effekt på neste nivå
Biokjemisk nivå	Forstyrrelser i stoffskifte Påvirkning av avgiftningssystemer	Senke energiproduksjonen Reduksjon i energilagring Organismetilpassing
Organisme	Metabolske forandringer Forandringer i oppførsel Økt sykdomsforekomst Nedsatt vekst og reproduksjon Nedsatt bevegelse Nedsatt motstandskraft mot sykdommer	Nedsettelse av populasjonens yteevne
Populasjon	Forandringer i populasjonsdynamikk Populasjonstilpassning til stress	Effekter på forekomsten av andre organismer og samfunn
Samfunn	Forandringer i artssammensetningen Nedsatt energioverføring Økosystemtilpassning	Svekkelse av samfunnet Nedsatt sekundærproduksjon

PAH-fraksjonen i oljen har vært gransket meget nøye gjennom mange år med hensyn til langtidseffekter. Det finnes nå betydelig dokumentasjon på at eksponering til ulike PAH forbindelser både kan føre til kreft, nedsettelse av immunforsvaret og påvirke reproduksjon og utvikling hos fisk. Alkylerte fenoler er mistenkt for å kunne ha samme virkning som det kvinnelige kjønnshormonet østrogen (hormonhermer). PAH-forbindelser og alkylerte fenoler er således fremtredende bidragsyttere til både akutt og kronisk toksisitet.

Potensiale til å forårsake kronisk toksisitet er nøye knyttet til potensiale til bioakkumulering og biomagnifikasjon. Det er blitt vist at PAH-forbindelser kan akkumuleres i organismer tilhørende lavere trinn i næringskjeden, men i mye

mindre utstrekning i organismer høyere oppe (eks. fisk). Dette henger sammen med at f.eks. fisk har mye større kapasitet til kjemisk omdannelse (=biotransformasjon \Rightarrow avgiftning) av fremmedstoff enn laverestående organismer. Et konkret eksempel på dette illustrerer situasjonen. PAH-forbindelsen fenantren akkumuleres meget lett i raudåte (*Calanus finmarchicus*) og en vesentlig del av den absorberte mengden blir værende i de eksponerte individene over lang tid (måneder) (Røe, 1998). Eksponeres fisk for samme forbindelse, vil stoffet relativt raskt skilles ut etter eksponeringstidens slutt og ikke bli værende igjen i individet. Raudåte kan således være mer utsatt for skadelige effekter av fenantren enn fisk fordi fundamentale biologiske forsvarsmekanismer er mye mindre utviklet i raudåte.

1.8. Bakgrunn for det aktuelle prosjekt

Det vil fremgå av ovennevnte introduksjon at det eksisterer et meget stort behov for økt kunnskap om effektene av utslipp til sjø fra offshoresektoren. Spesielt langtidseffektene er omfattet med sterk interesse da en her vet spesielt lite og en frykter konsekvensene av dette. Økt kunnskap er således nødvendig for at myndighetene skal kunne styre utviklingen i virksomheten og samordne utnyttelsen av olje- og gassressursene med annen bruk av havmiljøet. Det er sentralt at den samlede påvirkningen av havmiljøet ikke skal føre til endringer i det biologiske mangfoldet eller av marine økosystem.

Problemet er tidligere belyst av en arbeidsgruppe under ledelse av OED etter stortingsbehandlingen av St.meld.nr.26 (1993-94). Rapporten fra arbeidsgruppen ble utgitt i desember 1996. Seinere er det kommet en ny utredning i regi av NFR og som ble overlevert OED våren 2001. Så langt har disse utredningen ikke resultert i vesentlige tiltak fra det offentlige sin side verken når det gjelder konkrete prosjekter eller finansiering.

Havforskningsinstituttet forsøkte vinteren 1997 å gripe fatt i disse problemene og fremla et prosjekt: *Alkylerte fenolers hormonelle innvirkning på torsk* for Oljeindustriens landsforening (OLF) og Olje og Energidepartementet (OED) med forespørsel om finansiering. OLF stilte seg positive til prosjektforslaget mens OED var avvisende med argumentasjon at de ikke innehadde ekspertise til å bedømme dette. Med ekstra støtte fra OLF ble det likevel mulig å starte opp prosjektet høsten 1997. Fra 1998 til 2000 har også OED støttet prosjektet med Kr. 500.000 per år kanalisert gjennom NFR.

Prosjektet var basert på det faktum at betydelige mengder alkylfenoler blir sluppet ut i havet fra oljeinstallasjonene som følge av utslipp av produksjonsvann. Disse forbindelsene har vist seg å kunne ha østrogene (femininiserende) effekter på for eksempel regnbueørret, mennesker og andre mammalske organismer med reproduksjonsforstyrrelser som den endelige

konsekvens (Jobling & Sumpter, 1994; Colborn & Clement, 1992). Spørsmålet var om Norges viktigste kommersielle art innenfor fiskeri, torsk, kunne påvirkes.

Undersøkelsen ble gjort ved å sammenligne hormonell utvikling, gonadeutvikling og eggkvalitet hos en kontrollgruppe med to grupper som ble eksponert for alkylerte fenoler. Hormonell utvikling ble fulgt ved at det ble tatt regelmessige blodprøver av fisken for å se om alkylerte fenoler påvirker de sesongmessige variasjonene av kjønnshormonene østradiol-17 β og testosteron samt 11-ketotestosteron. Histologiske og morfologiske målinger inngikk for å studere gonadeutviklingen. Mengde alkylerte fenoler som akkumuleres i lever og gonader bestemmes sammen med en rekke biokjemiske parametre som cytokrom P450 og glutation med tilknyttede enzymer.

2. Vitenskapelig bakgrunn

2.1. Innledning

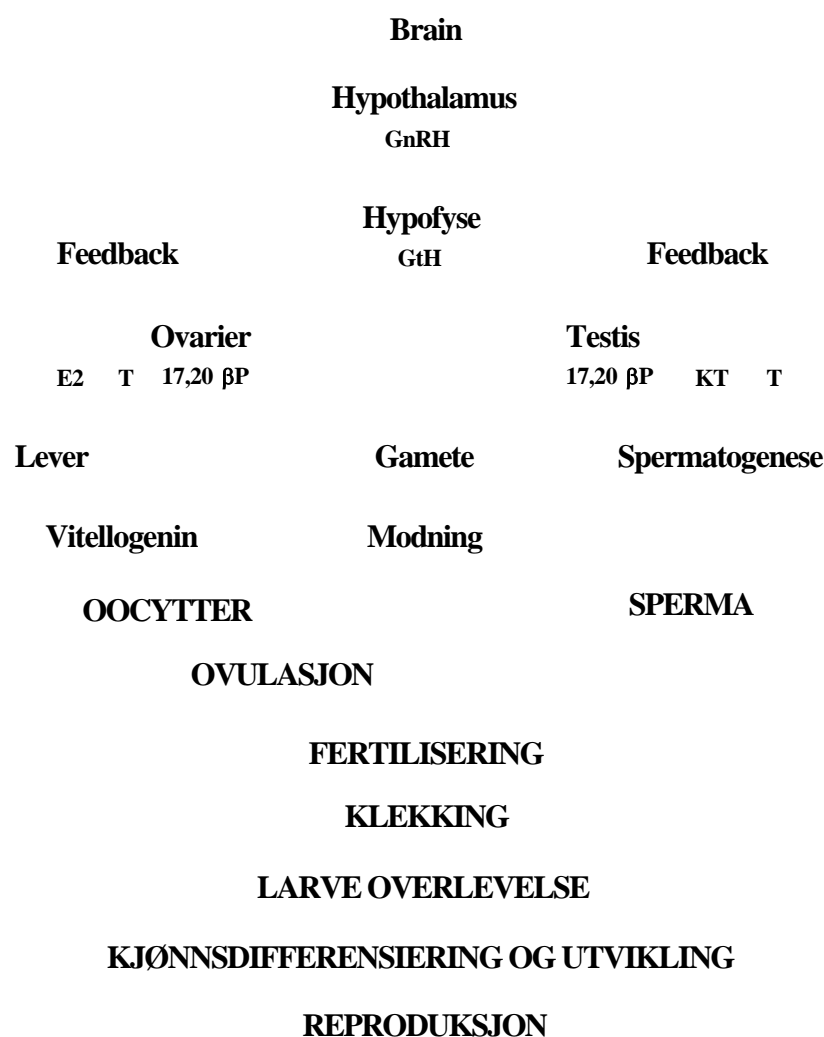
Det endokrine system er nøkkelen til suksérik reproduksjon og enhver forstyrrelse av dette vil kunne medføre senket fertilitet eller ufullstendig/unormal kjønnsutvikling. Slike effekter på fisk vil kunne omfatte hemming av gonadeutviklingen, endret vitellogenin produksjon (viktig komponent i plommemassen), senket produksjon av gonade- og hypofysehormon, senket spermotilitet og fertiliseringshastighet, nedsatt klekkehastighet og larveoverlevelse samt larvedeformitet. Lite er kjent om mekanismene som ligger til grunn for at disse stoffene fremkaller reproduktiv dysfunksjon.

I tillegg til å kontrollere den sesongmessige reproduksjonssyklus, spiller hormoner en hovedrolle i kjønnsdifferensiering. Kjønn er mindre klart differensiert i fisk enn i mammalia og kan sogar reverseres ved behandling med androgener eller østrogener på et tidlig stadium i livssyklus. Fravær av hormon på et kritisk stadium kan ha like alvorlige konsekvenser som feil hormon. Inkorporering av forurensningsstoffer i egg og larver ved direkte eksponering kan påvirke sekresjonen i gonadene og følgelig kjønnsdifferensiering og fertilitet til disse individene senere i livssyklus.

2.2. Generell bakgrunn om reproduksjon

Reproduktiv utvikling og funksjon i fisk har nære likhetstrekk med dem i mammalia, inkludert mennesker. Eksterne stimuli virker via hjerne-hypothalamus-hypofyse aksen og stimulerer til sekresjon av hypofysens gonadotropiner som i sin tur stimulerer modning av gonadene og får sistnevnte til å framstille steroidhormoner (østradiol og testosteron i hunnfisk; testosteron og 11-ketotestosteron i hannfisk). Østradiol har leveren som målorgan og stimulerer denne til å framstille vitellogenin som i sin tur blir inkorporert i plommemassen i den utviklende oocytten. 11-Ketotestosteron er sannsynligvis

innblandet i spermatogenesisen. Steroider fra gonadene regulerer også sekresjonen fra hypofysen via såkalte feedback (tilbakekopling) mekanismer, og blir til slutt metabolisert i leveren. Når egg og spermier når fram til sitt endelige utviklingstrinn, vil ytre påvirkning som: gytesubstrat, temperatur, tilstedeværelse av make og kurtise fra denne, sende signaler til hypofysen slik at denne frigjør store mengder gonadotropin som så stimulerer gonadene til å produsere et modningsinduserende steroid (17α , 20β ,-dihydroksy-4-pregnen-3-on; $17,20\beta$ P) som forårsaker nedbrytning av germinative vesikler, spermiemodning og ovulasjon. Ovulerte oocytter fertiliseres med moden sperma i vannet, egg klekkes, larvene utvikler seg og modnes for å produsere neste generasjon. En slik prosess, som finner sted hos de fleste marine- og ferskvannsfisk med relativt små variasjoner mellom de ulike arter, er oppsummert på Fig. 4.



Figur 4. Det reproduktive systemet hos fisk og mulige virkningspunkt for forurensning (GnRH = gonadotrophin-releasing hormone; GtH = gonadotropin; E2 = 17β -østradiol; T = testosteron; KT = 11-ketotestosteron; $17,20\beta$ P = 17α , 20β -dihydroksy-4-pregnen-3-on).

2.3. Effekter av forurensning på reproduksjon

Akvatisk forurensning kan ha en dyptgripende effekt på denne syklus. Egg og sperma under fertilisering og fertiliserte egg før klekking blir alle eksponert for forurensning i vannet. Larver, juvenil og moden fisk inntar mat som er kontaminert med forurensning og i denne finnes mange organiske molekyler som kan biokonsentreres i fettrikt vev som lever og gonader. De forurensende stoffene er derfor tilstede inne i cellene hvor de fleste reproduktive funksjoner er regulert og i konsentrasjoner som kan være flere ganger høyere enn de man finner i det akvatiske medium eller i dietten. For toppredatorer som torsk, marine mammalia som sel og hval samt vertebrater på land, mennesket inkludert, som har forurenset fisk som en viktig ernæringskilde, vil slik biokonsentrering kunne ha alvorlige implikasjoner. De fleste reproduktive nøkkelprosesser som er skissert på Fig. 4 er allerede i noen arter vist å kunne påvirkes av forurensning; andre arter kan med rimelighet også forventes å bli påvirket.

Kjønnsdifferensiering hos mammalia skjer som et resultat av påvirkning fra testikulære hormoner hos en hanngenotype i løpet av spesifikke faser i den føtale eller perinatale utvikling. Dersom testis ved en feil ikke er i stand til å sørge for slik sekresjon til riktig tidspunkt, vil dette føre til utvikling av en hunnfenotype. Nedsatt sekresjon vil kunne medføre ufullstendig differensiering og nedsatt fertilitet. Differensiering av hjerne og endokrine funksjoner krever at hjernen aromatiserer testosteron. Paradoksalt nok kan dette lede til at et hannmønster blir induert utfra hunnhormonet østradiol. Kontroll av kjønnsdifferensiering hos fisk er mer komplisert, og det mammalske mønster med XY kjønnskromosomer eksisterer ofte ikke. I tillegg eksisterer det også en viss grad av "formbarhet" i kjønnsutviklingen hos fisk slik at ved behandling med androgener eller østrogener på tidlige livsstadier kan en induere kjønnsdifferensiering i en bestemt retning. Monosex fiskekulturer blir vanligvis fremstilt på den måten. En kjenner lite til de naturlige prosessene som bestemmer kjønnsdifferensieringen hos fisk, men en må forvente at inkorporering i egget av forbindelser som enten i seg selv er hormonelt aktive eller interfererer med normal androgen- eller østrogenproduksjon vil kunne påvirke kjønnsutvikling og påfølgende fertilitet på en uheldig måte. Det er kjent at ål, *Anguilla anguilla*, er spesielt ømfintlig for tidlige eksponering for miljøhormoner og det er blitt foreslått at den høye andel hanner av denne arten som fanges i europeiske elver skyldes miljøfaktorer (Beullens *et al.*, 1996). Relativt nylig er det blitt vist at både klorerte hydrokarboner og alkylerte fenoler (som i tillegg til å stamme fra olje og produksjonsvann også er velkjente degraderingsprodukt fra de meget brukte alkoksyfenol-detergentene) har østrogenaktivitet (Colborn & Clement, 1992; Jobling & Sumpter, 1994). Videre er det vist at DDT metabolitten p,p'-DDE har antiandrogen effekt (Kelce *et al.*, 1995) og at dioksiner har antiøstrogen effekt (Romkes & Safe, 1988). Til sammen antyder dette at hormonforstyrrende miljøgifter har betydelig innvirkning på kjønnsdifferensiering og fertilitet hos fisk.

2.4. Alkylfenoler og deres potensielle effekter på reproduksjonen til fisk

Alkylfenolene finnes i typiske konsentrasjoner på 0,6 - 10 ppm (mg/l) i produksjonsvannet. Omtrent 80 % av dette utgjøres av de mest vannløselige alkylfenolene, fenol og cresol (C₁). Blant de resterende komponentene finnes høyere alkylerte fenoler fra C₄ til C₇ i lave konsentrasjoner på 2 - 237 ppb ((µg/l), Brendehaug *et al.* 1992).

En computermodell som simulerer utslippet av produksjonsvann fra Haltenbanken og opptaket i pelagisk fisk, estimerer at "body burden" vil ligge i konsentrasjonsområdet 0-10 ppb (Rye *et al.*, 1996). Vi har brukt Rye-artikkelen som utgangspunkt for valg av doseregime i våre eksponeringsforsøk. Vi har også prøvd å ta hensyn til at produksjonsvann inneholder en mangeartet blanding av forskjellige fenoler ved å bruke en blanding av 4 alkylfenoler med ulik kjedelengde, fra butyl- til heptylfenol. Forsøkets intensjon ble å dosere fisken til en "body burden" tilsvarende Rye's estimater. Vi fant derfor at 5 ppb av hver av de 4 alkylfenolene skulle tilsvare en realistisk dose.

Alkylfenolers østrogene effekter er velkjent fra et stort antall undersøkelser både *in vitro* og *in vivo* (Nimrod & Benson, 1996). Alkylfenolene binder seg til og påvirker østrogenreseptorene på samme måte som 17 β-østradiol, men responsen er mye svakere. En nylig gjennomført *in vitro* undersøkelse viste at østrogenisiteten til alkylfenoler er avhengig av både posisjon (para>meta>orto) og forgrening (tertiære>sekundære=primære) av alkylgruppen. Maksimum aktivitet (1000 - 6000 ganger mindre potent enn østradiol) er funnet for C₆-C₈ parasubstituerte terciære alkylfenoler, men også C₅, C₄ og C₃ fenoler er østrogene (10⁵ - 2x10⁷ mindre potente enn østradiol) (Routledge & Sumpter, 1997). Det er viktig å merke seg at *in vitro* effekter ikke direkte kan overføres til en *in vivo* situasjon. Mesteparten av østrogenet i plasma er bundet til plasmaproteiner (globuliner og albumin) og affiniteten av disse proteinene til alkylfenoler er mye lavere. Derfor kan biotilgjengeligheten og effektene av fenoler være atskillig større enn studier basert på reseptoraffinitet indikerer.

3. Materialer og metoder

Eksperimentelt design

Eksperiment 1. Eksperimentet ble utført ved bruk av 300 toårgammel førstegangsgytende torsk. Fisken kom fra en stamme norsk-artisk torsk produsert ved Havforskningsinstituttets (HI) stasjon i Øygarden (Parisvannet) utenfor Bergen. Fisken ble transportert fra Tveit (Tysnes) til HI i Bergen i september 1997 og ble delt i en kontrollgruppe og to eksponerte grupper i separate 15 m³ utendørskar (100 fisk i hver). Forsøket ble startet 10. oktober 1997 og varte til gytingen var avsluttet 7. april 1998. Fiskekarene fikk vann fra stort dyp (100m) og vanntemperaturen holdt seg stabil på 8-10 °C gjennom hele forsøket.

Fisken ble fôret 3 ganger i uken med en mengde fôr som tilsvarte en daglig rasjon på 0,5% av kroppsvekten. Fôrmengden ble justert etter hver prøvetaking.

De eksponerte gruppene ble gitt en blanding av 4-tert-butylfenol (C₄), 4n-pentylfenol (C₅), 4n-hexylfenol (C₆) og 4n-heptylfenol (C₇).

Alkylfenolene ble løst i soyaolje og blandet inn i fôret (våtpellets, sild:fiskemel 60:40) til en konsentrasjon på hhv. 1 og 100 ppm av hver forbindelse. Dette tilsvarer en teoretisk dose på hhv. 5 ppb og 500 ppb (av hver alkylfenol) per fisk per dag i lav- og høydosegruppen. Den lave dosen representerte en forventet realistisk verdi og den høye dosen en positiv kontroll. Det ble tatt månedlige prøveuttak på ca 20 fisk fra hver gruppe.

Fôringen ble stoppet 22. januar og den resterende fisk ble ikke fôret gjennom gytesesongen. Fisken gjøt naturlig i de tre 15 m³ karene og eggene ble innsamlet daglig fra siler montert på karenes utløp. I gyteperioden var det 7 hunnfisk og 5-7 hannfisk tilstede i hvert kar (de øvrige fiskene var blitt slaktet i forbindelse med tidligere prøveuttak).

Eksperiment 2. Dette ble utført høsten 1999 som et oppfølgingsforsøk på eksperiment 1. Eksponeringen ble gjentatt med den samme blandingen av de fire alkylfenolene, men ble nå utvidet til 5 forskjellige doseringer: 5 ppb, 0,5 ppm, 5 ppm, 10 ppm og 20 ppm av hver alkylfenol relativt til fiskevekten. I tillegg ble det tatt med en positiv østrogen kontrollgruppe (dosering: 5 ppm 17β-østradiol). Dette forsøket ble utført på toårgammel førstegangsgytende torsk fra samme stamme som i eksperiment 1 (norsk-artisk torsk produsert i 1997 ved HIs stasjon i Øygarden (Parisvannet)). Torsken ble hentet i august 1999 på Austevoll havbruksstasjon og brakt til HI i Bergen hvor den gikk i store utendørskar til forsøket startet i november.

Fisken ble fordelt på 7 grupper à 40 fisk og overført til 10 m³ innendørstanker. Lyset under forsøket ble regulert til å passe det naturlige lysregime. Fisken ble fra august til forsøksstart fôret med kommersielt fiskefôr (tørrpellet fra Felleskjøpet, 10% lipid).

For å få bedre kontroll med den reelle individuelle eksponering enn tilfellet var i eksperiment 1 (fisken ble her fôret som gruppe), ble fisken i dette forsøket gitt maten enkeltvis og med sonde direkte i magesekken. Alkylfenolene og østradiol ble løst i 1,2-propandiol og ble blandet i en pasta bestående av oppmalt tørrpellet, vann og fiskeolje (pastasammensetning: 50,5% tørrpellet, 40,5% vann, 5% fiskeolje og 4% 1,2-propandiol/alkylfenolløsning; lipidinnholdet og fettsyreprofilen i pastaen tilsvarte tørrpelletens opprinnelige sammensetning). Pastaen ble sugd opp i en plastslange ved hjelp av et stempel og deretter applisert direkte i magesekken på den bedøvde fisken. Både fisk og pasta ble veid umiddelbart før dosen ble gitt.

Fisken ble eksponert en gang i uken i fire uker. En uke etter førstegangs eksponering ble 20 fisk fra hver gruppe tatt ut til analyser. Resterende fisk fikk 3 doser til og ble slaktet en uke etter at siste dose ble gitt.

Fisken i forsøk 2 fikk altså nøyaktig den angitte dose hvoretter den ventet en uke før den fikk neste dose. Den reelle konsentrasjon i kroppen blir derfor sannsynligvis lavere enn i første forsøk som en følge av metabolisme og utskillelse av stoffene mellom doseringene. I forsøk 1 var intensjonen å oppnå en ”body burden” som tilsvarte de oppgitte doser. Fisken i forsøk 1 ble gitt den aktuelle dose 3 ganger i uken.

Prøvetaking

Torsken ble bedøvet med benzokain og blodprøver tatt fra det caudale sinus med heparinisert sprøyte. Blodprøven ble umiddelbart sentrifugert ved 3000g i 5 min. ved 4°C. Plasma ble tatt av, frosset i flytende nitrogen og oppbevart ved -80°C inntil analyse. Fisken ble avlivet ved slag i hodet og vekt og lengde målt. Prøver av de ulike vev (lever, gonade, hjerne og muskel ble hurtig tatt ut med skalpell, mens urin og galle (eget metabolismestudie) ble samlet opp med sprøyte. Alle prøver ble frosset i flytende nitrogen og lagret ved -80°C. Leverprøvene til enzymanalyser ble oppbevart i flytende nitrogen fram til analyse. Gonadeprøver til fekunditetsbestemmelse ble fiksert på buffret formalin.

Analyser

Steroidanalyser

Plasmasteroidene ble analysert med ”enzyme linked immunosorbant assay” (ELISA) etter en prosedyre av Nash *et al.*, 2000. Hunnfisken ble analysert for østradiol-17β (E2) og testosteron (T) og hannfisken for testosteron og 11-ketotestosteron (11KT) (samt E2 på hannfisk positiv kontroll).

Vitellogenin

Biomarkøren vitellogenin (VTG) ble analysert med ELISA teknikk utviklet ved HI, Austevoll havbruksstasjon (Meier *et al.*, under forberedelse). Det ble laget ett assay for hunnfisk (høyt VTG innhold, >10 mg/ml) og et mer følsomt assay for hannfisk (lavt VTG innhold, deteksjonsgrense 0,1 µg/ml).

Leverindeks er beregnet som:

$$(1) \quad \text{HIS} = \frac{(\text{LW} \cdot 100)}{(\text{W})}$$

der LW er levervekt (g) og W er fiskens våtvekt (g), mens gonadosomatisk indeks (GSI i %) er definert som:

$$(2) \quad \text{GSI} = \frac{(\text{GW} \cdot 100)}{(\text{W})}$$

(W-GW)

der GW er gonadevekt (g) og W er fiskens våtvekt (g).

Statistiske analyser

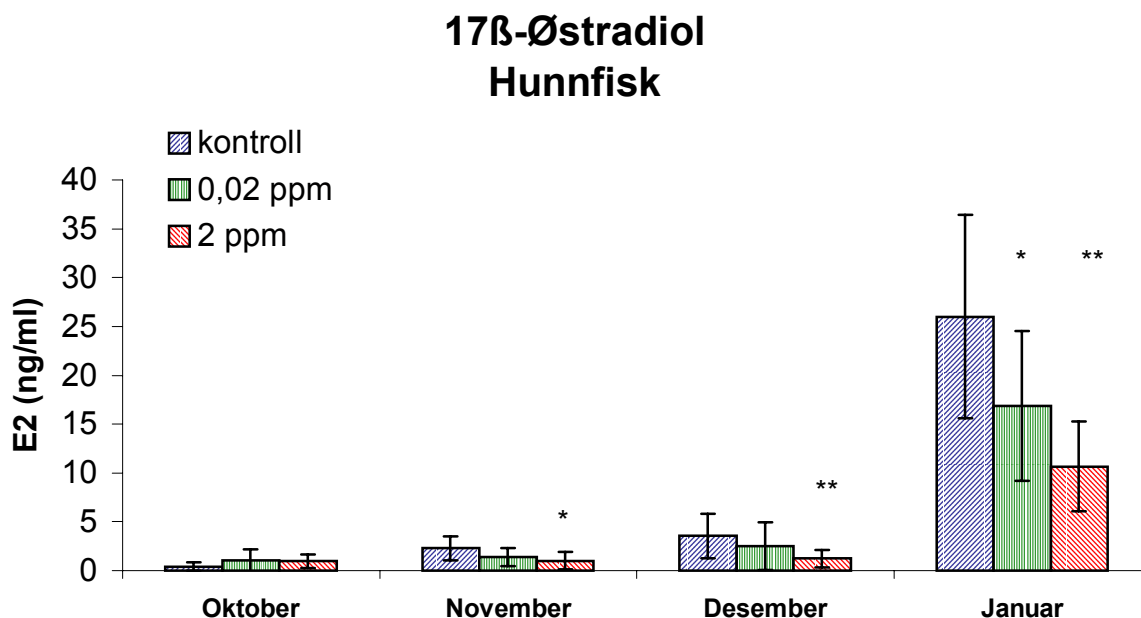
Alle data (unntatt hannfisk vitellogenin, inneholder nullverdier) ble log-transformerte før analyse for å oppnå homogenitet i varians. Statistisk forskjell mellom kontrollgruppen og de eksponerte grupper ble testet ved unpaired t-test. Signifikansnivå er angitt i figurteksten. De statistiske analyser er alle utført med Statview programvaren (SAS Institute, Cary, NC USA.)

4. Faglige resultater

Ekspirement 1. Hunnfisk

Østrogen

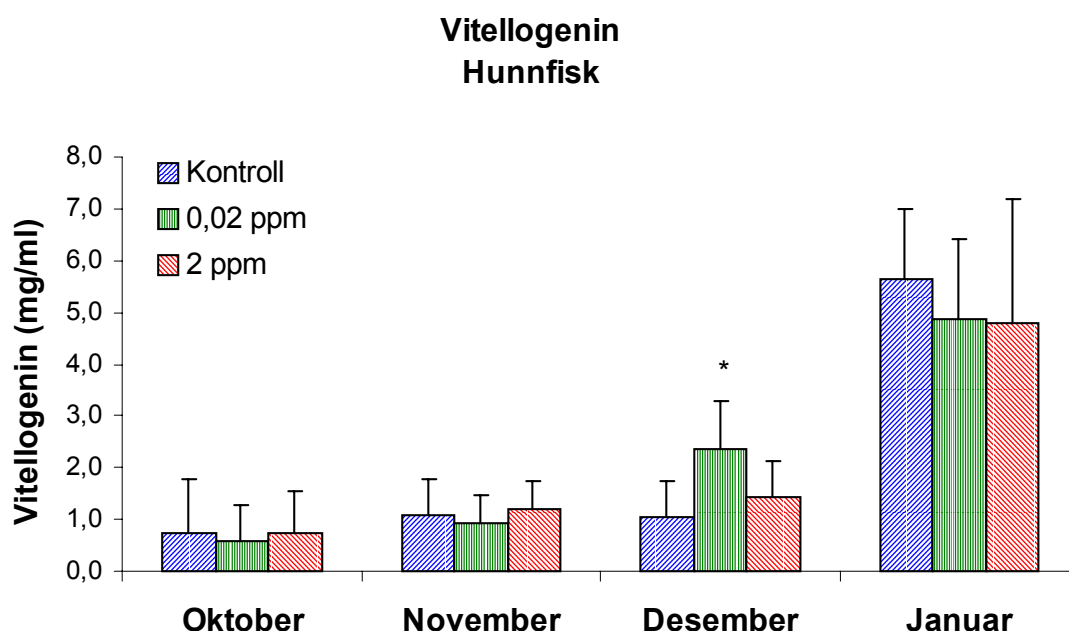
17 β -Østradiol ble målt i blodplasma i all hunnfisk fra alle prøveuttak underveis i forsøket. Fig. 5 viser 17 β -østradiol nivåene i de ulike gruppene. En ser at østradiolnivået går betydelig ned i de eksponerte gruppene og at nedgangen begynner allerede i november hvor gonadenes modningsprosess er begynt å komme skikkelig i gang.



Figur 5. 17 β -Østradiol i plasma (ng/ml) fra kontroll, laveksponert (0,02 ppm) og høyeksponert (2 ppm) hunnfisk. Gjennomsnittsverdi \pm 1 standardavvik. Stjernene markerer signifikant forskjell fra kontrollgruppen (unpaired t-test), *=P-verdi < 0,05, **=P-verdi < 0,01. På figuren er enkeltdosene av de fire alkylfenolene multiplisert med 4 for å vise totalkonsentrasjonen.

Vitellogenin

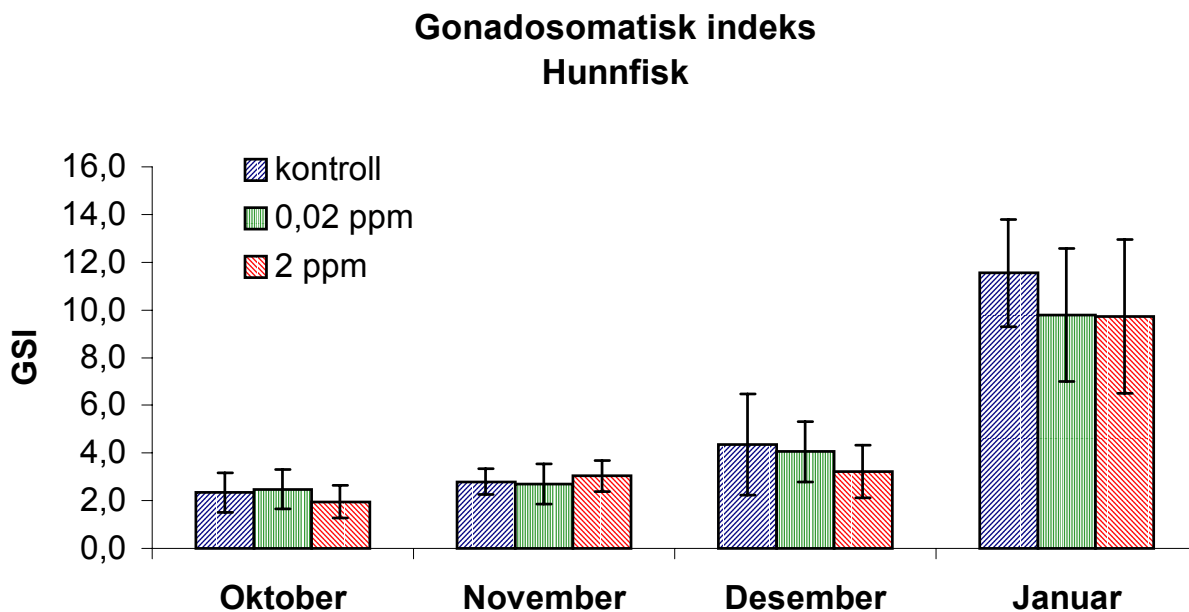
I leveren foregår syntesen av de proteinene som skal utgjøre hovedbestanddelen av plommemassen (vitellogenin) og eggeskallet (zona radiata-proteiner). Denne proteinsyntesen induseres ved at 17β -østradiol transporteres med blodet fra ovariene til leveren og binder seg til reseptorer i hepatocyttenes cytoplasma. I denne perioden syntetiserer leveren nesten utelukkende vitellogenin og eggeskallproteiner. Disse blir utskilt i blodet og transportert til ovariene der de henholdsvis blir tatt opp i, og avsatt rundt, det voksende egget. Vitellogenese kan induseres kunstig i hannfisk og ungfisk ved å injisere 17β -østradiol. Vitellogenese kan også påvirkes av visse typer forurensing, såkalte hormonhermere (Jones *et al.*, 2000). I hunnfisk kunne en ikke se noen klar relasjon mellom vitellogeninnivåene i de ulike gruppene og alkylfenoldose (Fig. 6). I januaruttaket tenderte vitellogeninnivået å gå noe ned i de eksponerte gruppene, men nedgangen var ikke statistisk signifikant.



Figur 6. Vitellogenin i plasma (mg/ml) fra kontroll, laveksponert (0,02 ppm) og høyeksponert (2 ppm) hunnfisk. Gjennomsnittsverdi \pm 1 standardavvik. Stjernene markerer signifikant forskjell fra kontrollgruppen (unpaired t-test), *=P-verdi < 0,05. På figuren er enkeltdosene av de fire alkylfenolene multiplisert med 4 for å vise totalkonsentrasjonen.

Gonadosomatisk indeks

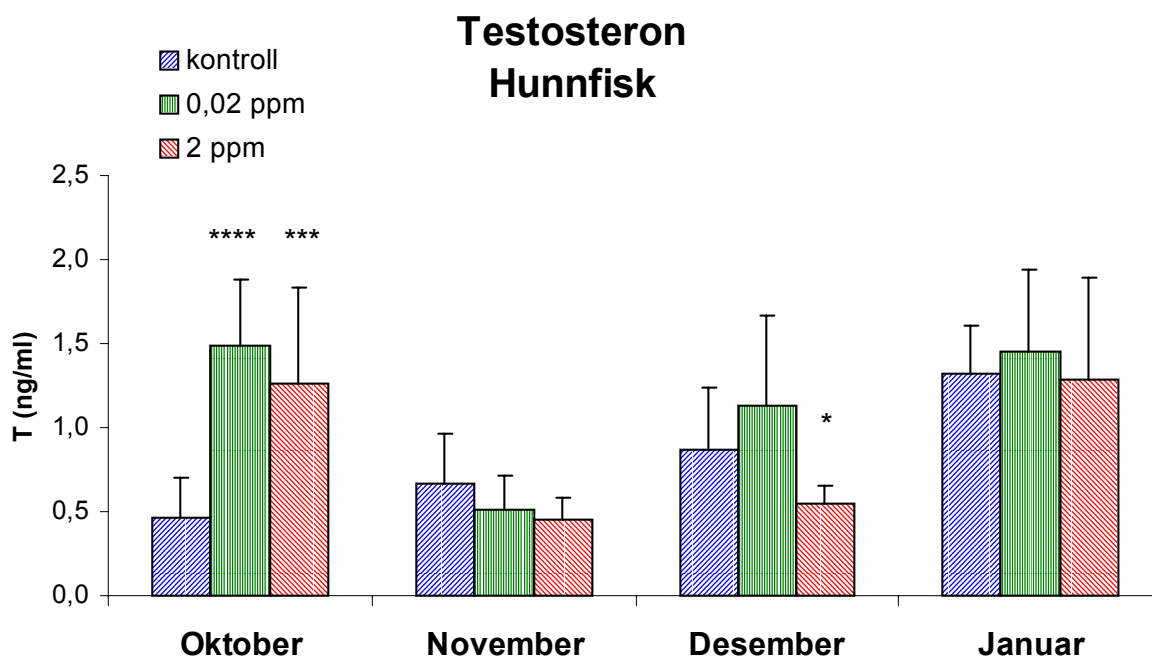
Gonadosomatisk ble beregnet for alle grupper fra all uttak (Fig. 7). I desember- og januaruttakene tenderte den gonadosomatiske indeks å gå noe ned, men nedgangen var ikke statistisk signifikant pga. stor individuell variasjon.



Figur 7. Gonadosomatisk indeks (GSI) for hunnfisk: kontroll, laveksponert (0,02 ppm) og høyeeksponert (2 ppm). Gjennomsnittsverdi \pm 1 standardavvik. På figuren er enkeltdosene av de fire alkylfenolene multiplisert med 4 for å vise totalkonsentrasjonen.

Testosteron

Testosteronnivået i hunnfiskens plasma økte betydelig initialt (oktoberuttaket) i de to eksponerte gruppene for så å bli mer likt kontroll senere i sesongen (Fig. 8).

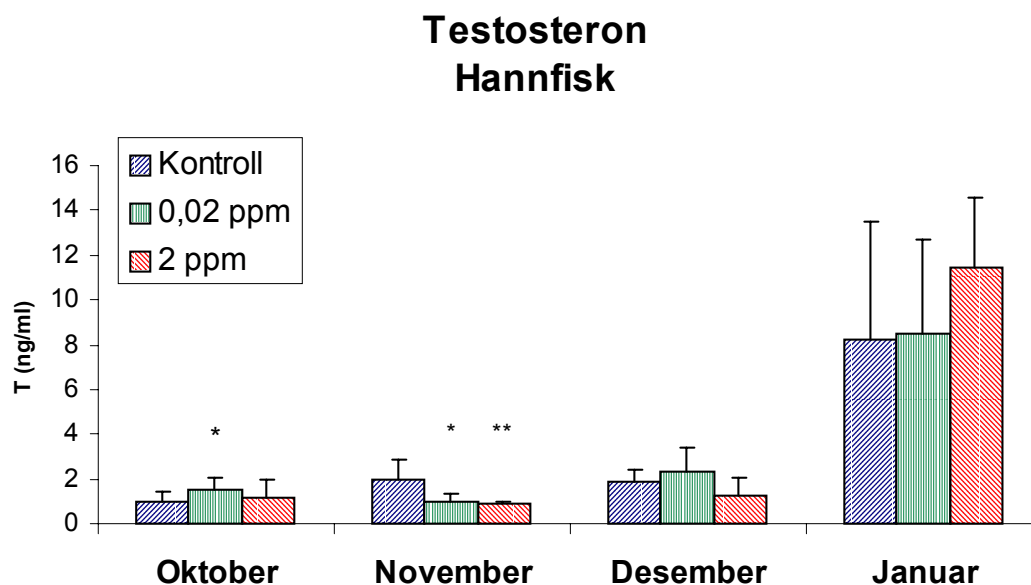


Figur 8. Testosteron i plasma (ng/ml) fra kontroll, laveksponert (0,02 ppm) og høyeeksponert (2 ppm) hunnfisk. Gjennomsnittsverdi \pm 1 standardavvik. Stjernene markerer signifikant forskjell fra kontrollgruppen (unpaired t-test), *=P-verdi < 0,05, **=P-verdi < 0,01, ***=P-verdi < 0,001, **** = P-verdi < 0,0001. På figuren er enkeltdosene av de fire alkylfenolene multiplisert med 4 for å vise totalkonsentrasjonen.

Ekspériment 1. Hannfisk

Testosteron

I likhet med hunnfisken tenderte også hannfisken til å ha et høyere testosteronnivå initialt under eksponeringen, dog var dette ikke statistisk signifikant (Fig. 9). Senere fikk en en markert nedgang i testosteronnivået (november). I desember og januar var det ikke statistisk påvisbare forskjeller mellom de eksponerte gruppene og kontroll.

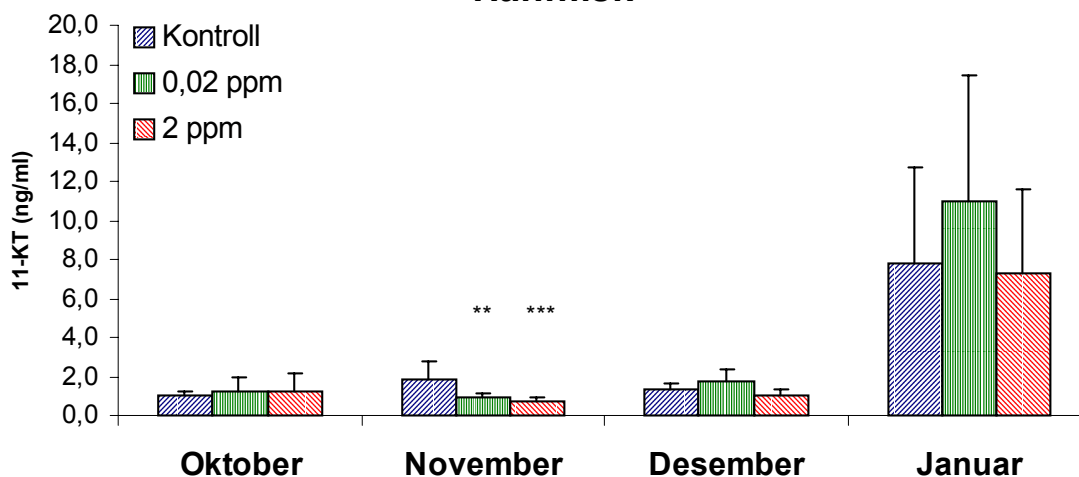


Figur 9. Testosteron i plasma (ng/ml) fra kontroll, laveksponert (0,02 ppm) og høyeksponert (2 ppm) hannfisk. Gjennomsnittsverdi \pm 1 standardavvik. Stjernene markerer signifikant forskjell fra kontrollgruppen (unpaired t-test), *=P-verdi < 0,05, **=P-verdi < 0,01. På figuren er enkeltdosene av de fire alkylfenolene multiplisert med 4 for å vise totalkonsentrasjonen.

11-Ketotestosteron

11-Ketotestosteron er involvert i spermatogenesisen. Initialt kunne en registrere et fall i dette hormonet (novemberuttaket) og mest ved den høyeste dosen (Fig. 10). Senere i forsøket kunne en ikke registrere signifikante forskjeller mellom de eksponerte gruppene og kontroll.

11-Ketotestosteron Hannfisk

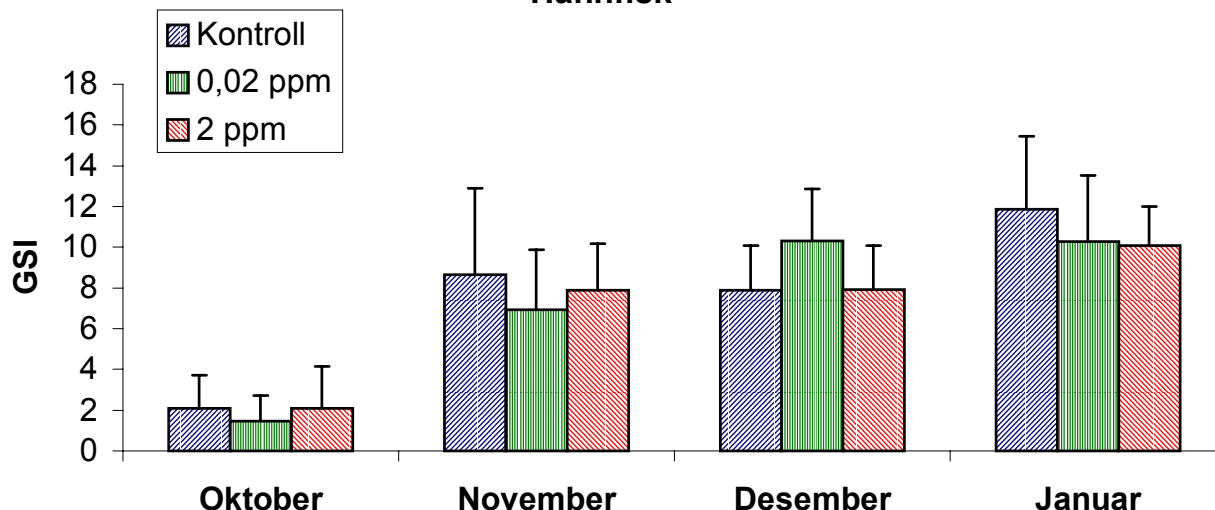


Figur 10. 11-Ketotestosteron i plasma (ng/ml) fra kontroll, laveksponert (0,02 ppm) og høyeeksponert (2 ppm) hannfisk. Gjennomsnittsverdi \pm 1 standardavvik. Stjernene markerer signifikant forskjell fra kontrollgruppen (unpaired t-test), *=P-verdi < 0,05, **=P-verdi < 0,01, ***=P-verdi < 0,001. På figuren er enkeltdosene av de fire alkylfenolene multiplisert med 4 for å vise totalkonsentrasjonen.

Gonadosomatisk indeks

GSI i de forskjellige eksponerte gruppene fra de ulike uttak er vist på Fig. 11. Signifikante forskjeller var ikke mulig å påvise.

Gonado somatisk indeks Hannfisk

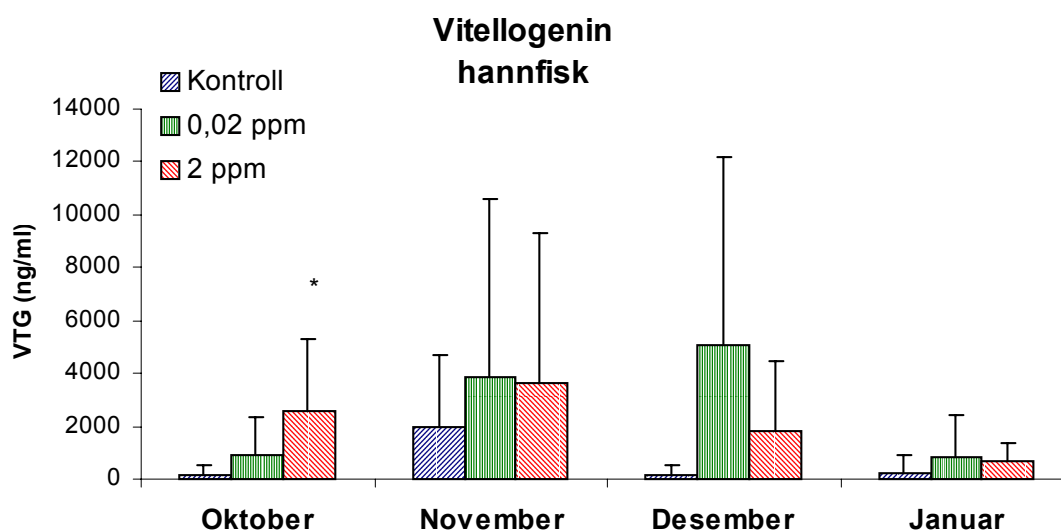


Figur 11. Gonadosomatisk index (GSI) for hannfisk: kontroll, laveksponert (0,02 ppm) og høyeeksponert (2 ppm). Gjennomsnittsverdi \pm 1 standardavvik. På figuren er enkeltdosene av de fire alkylfenolene multiplisert med 4 for å vise totalkonsentrasjonen.

Vitellogenin

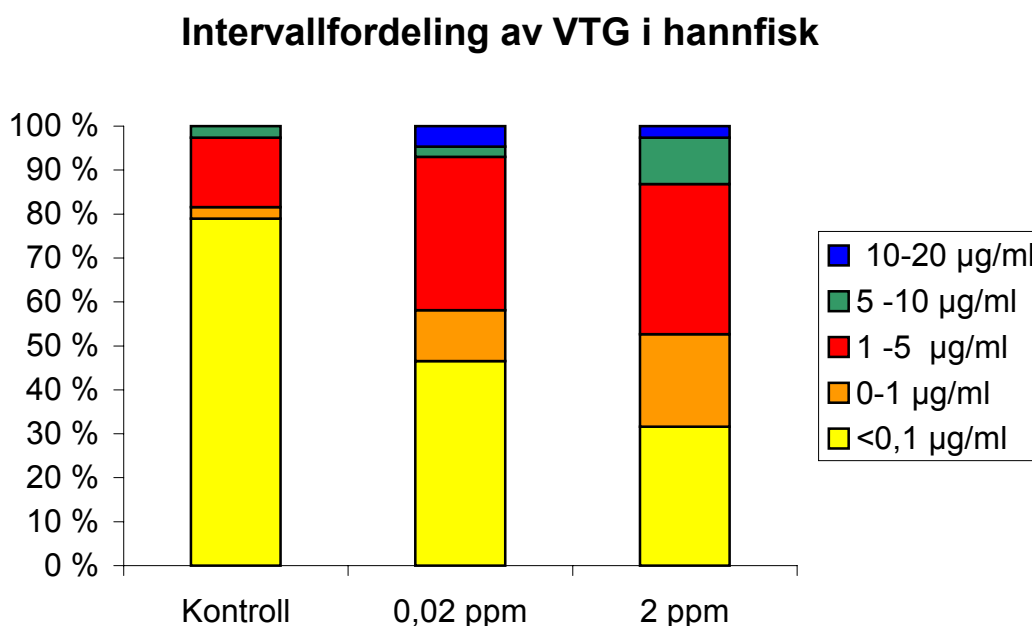
Vitellogeninnivået i plasma er under normale forhold meget lavt i hannfisk, men hannfisker har evnen til å syntetisere vitellogenin ved eksponering for

østrogener eller visse østrogene hormonhermere. Fig. 12 viser at vitellogeninmengden økte i de to eksponerte gruppene i alle uttakene, men på grunn av stor individuell variasjon i responsen var effekten statistisk signifikant kun i oktoberuttaket.



Figur 12. Vitellogenin i plasma (ng/ml) fra kontroll, laveksponert (0,02 ppm) og høyeksponert (2 ppm) hannfisk. Gjennomsnittverdi \pm 1 standardavvik. Stjernene markerer signifikant forskjell fra kontrollgruppen (unpaired t-test), *=P-verdi < 0,05. På figuren er enkeltdosene av de fire alkylfenolene multiplisert med 4 for å vise totalkonsentrasjonen.

Slår en sammen like grupper fra samtlige uttak og ser på intervallfordelingen av VTG i de ulike gruppene, går det fram at antall individer med høy vitellogenin øker i de eksponerte gruppene i forhold til kontroll og mest i den gruppen som har fått høyest dose alkylfenoler (Fig. 13).



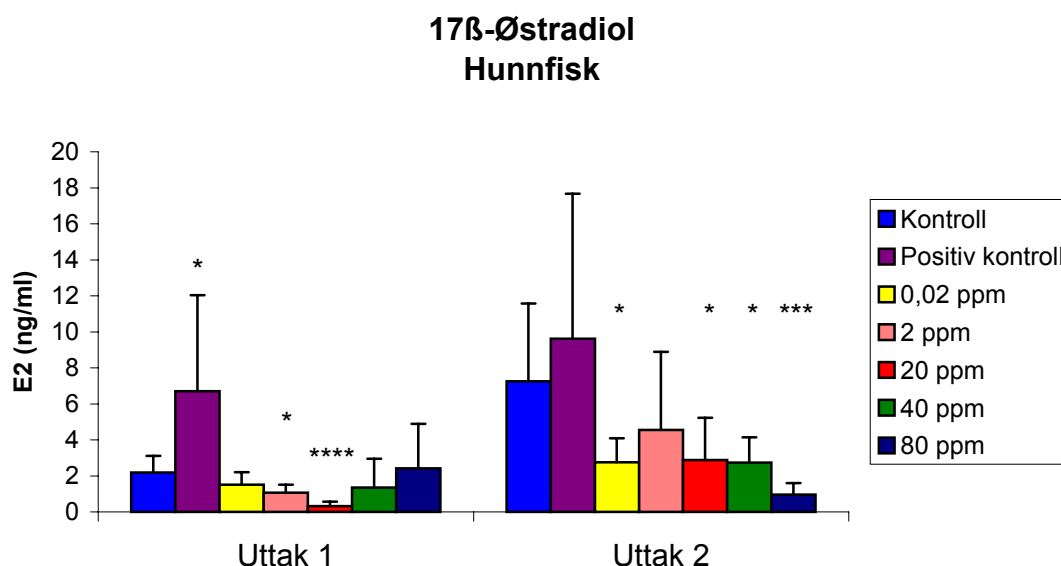
Figur 13. Intervallinndeling av VTG-nivåer i hannfisk fra samtlige uttak. (Kontroll, n=38. Lavdose, n=41. Høydose, n=38). På figuren er enkeltdosene av de fire alkylfenolene multiplisert med 4 for å vise totalkonsentrasjonen.

Ekspiriment 1 gav en rekke interessante resultater som en fant å måtte confirmere med et nytt eksperiment. Blant annet gjaldt dette østrogenpåvirkningen i hunnfisk selv ved lave doser alkylfenoler, og induksjonen av vitellogenin i hannfisk. For å få bedre kontroll med den reelle individuelle eksponering enn tilfellet var i eksperiment 1 (fisken ble her føret som gruppe), ble fisken i dette forsøket gitt maten enkeltvis og med sonde direkte i magesekken. En utvidet også forsøket med flere eksponerte grupper samt med en positiv østrogenkontroll som ville indikere hvordan en reell østrogenrespons skulle være.

Ekspiriment 2. Hunnfisk

Østrogen

I likhet til eksperiment 1 fant en at nivået av 17β -østradiol gikk ned i de eksponerte gruppene og mest i de gruppene som hadde fått høyest dose alkylfenoler og blitt eksponert lengst. Nedgangen var statistisk signifikant i de fleste gruppene i forhold til kontroll (Fig. 14).

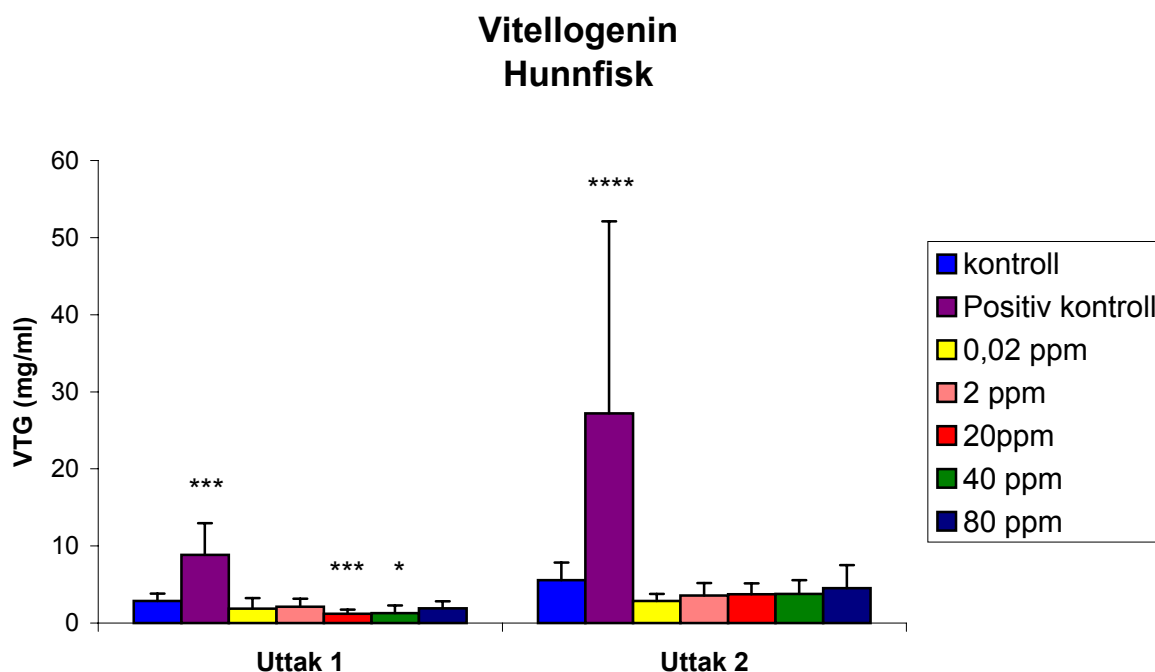


Figur 14. 17β -Østradiol i hunnfisk plasma (ng/ml) fra kontroll, positiv kontroll (5 ppm E2), 0,02 ppm, 2 ppm, 20 ppm, 40 ppm og 80 ppm alkylfenol eksponerte grupper. Gjennomsnittsverdi \pm 1 standardavvik. Stjernene markerer signifikant forskjell fra kontrollgruppen (unpaired t-test), * = P-verdi < 0,05, ** = P-verdi < 0,01, *** = P-verdi < 0,001, **** = P-verdi < 0,0001. På figuren er enkeltdosene av de fire alkylfenolene multiplisert med 4 for å vise totalkonsentrasjonen.

Vitellogenin

Vitellogeninnivået tenderte til å være noe lavere i den eksponerte hunnfisken enn i kontroll, selv om dette bare var statistisk signifikant i noen av gruppene (Fig. 15). I uttak 2, det vil si etter lengre tids eksponering, skjedde en jevn

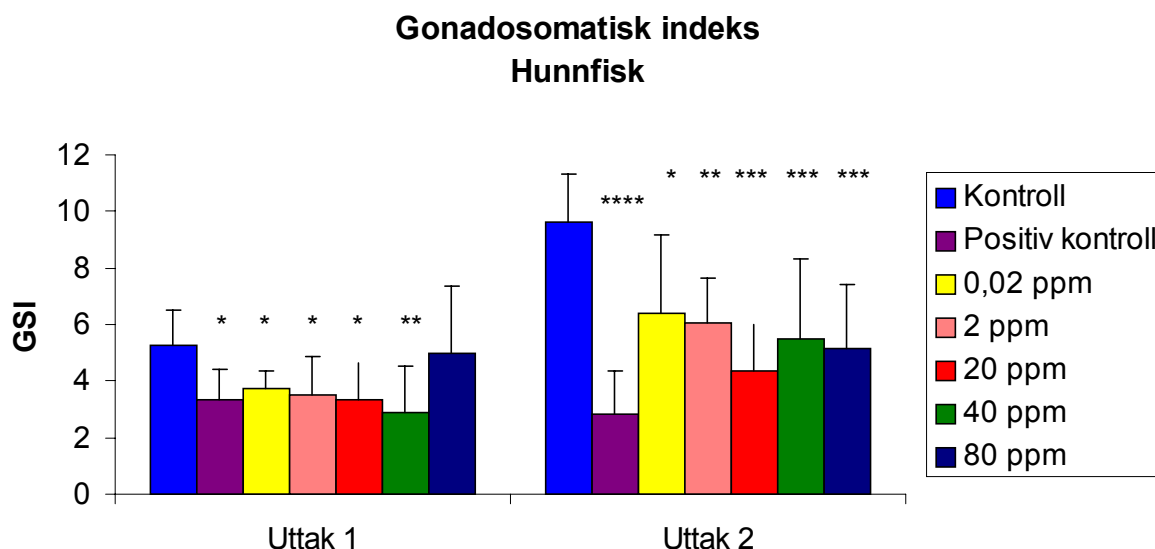
mindre økning i vitellogeninnivået ettersom dosen alkylfenoler økte i forhold til gruppen som hadde blitt eksponert for den laveste dosen.



Figur 15. Vitellogenin i hunnfisk plasma (mg/ml) fra kontroll, positiv kontroll (5 ppm E2), 0,02 ppm, 2 ppm, 20 ppm, 40 ppm og 80 ppm alkylfenol eksponerte grupper. Gjennomsnittsverdi \pm 1 standardavvik. Stjernene markerer signifikant forskjell fra kontrollgruppen (unpaired t-test), * = P-verdi < 0,05, ** = P-verdi < 0,01, *** = P-verdi < 0,001, **** = P-verdi < 0,0001. På figuren er enkeltdosene av de fire alkylfenolene multiplisert med 4 for å vise totalkonsentrasjonen.

Gonadosomatisk indeks

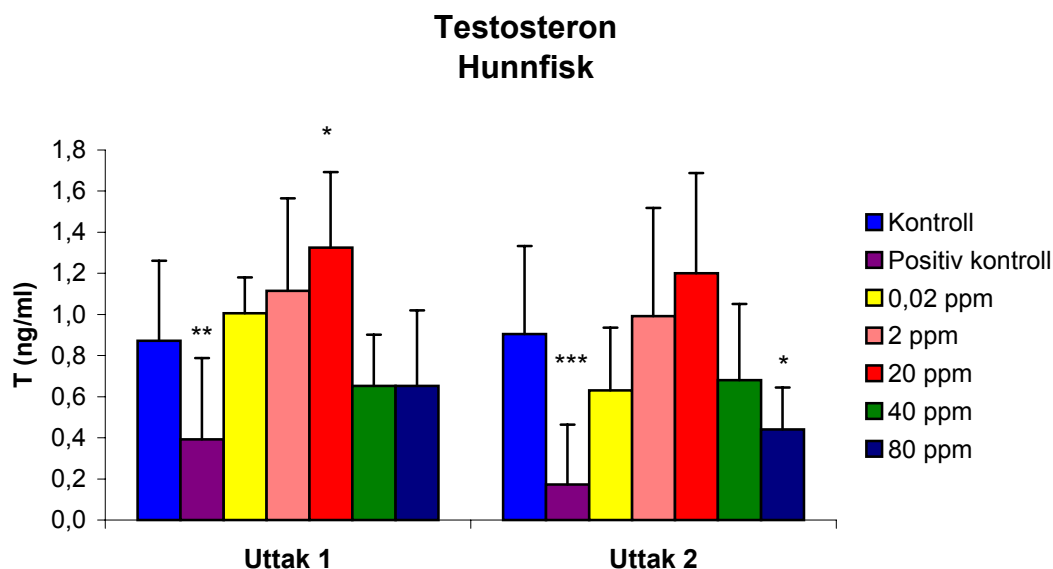
Eksponering for alkylfenoler hadde en betydelig påvirkning på GSI i dette forsøket (Fig. 16). I uttak 2 var nedgangen stor i alle eksponerte grupper.



Figur 16. Gonadosomatisk index (GSI) for hunnfisk: kontroll, positiv kontroll (5 ppm E2), 0,02 ppm, 2 ppm, 20 ppm, 40 ppm og 80 ppm alkylfenol eksponerte grupper. Gjennomsnittsverdi \pm 1 standardavvik. Stjernene markerer signifikant forskjell fra kontrollgruppen (unpaired t-test), * = P-verdi < 0,05, ** = P-verdi < 0,01, *** = P-verdi < 0,001, **** = P-verdi < 0,0001. På figuren er enkeltdosene av de fire alkylfenolene multiplisert med 4 for å vise totalkonsentrasjonen.

Testosteron

Responseren på alkylfenoleksponering synes å være doseavhengig når det gjelder testosteron. Lave doser tenderer å øke nivået av testosteron i hunnfisken, mens høyere doser senker det i likhet med 17 β -østradiol (Fig. 17).

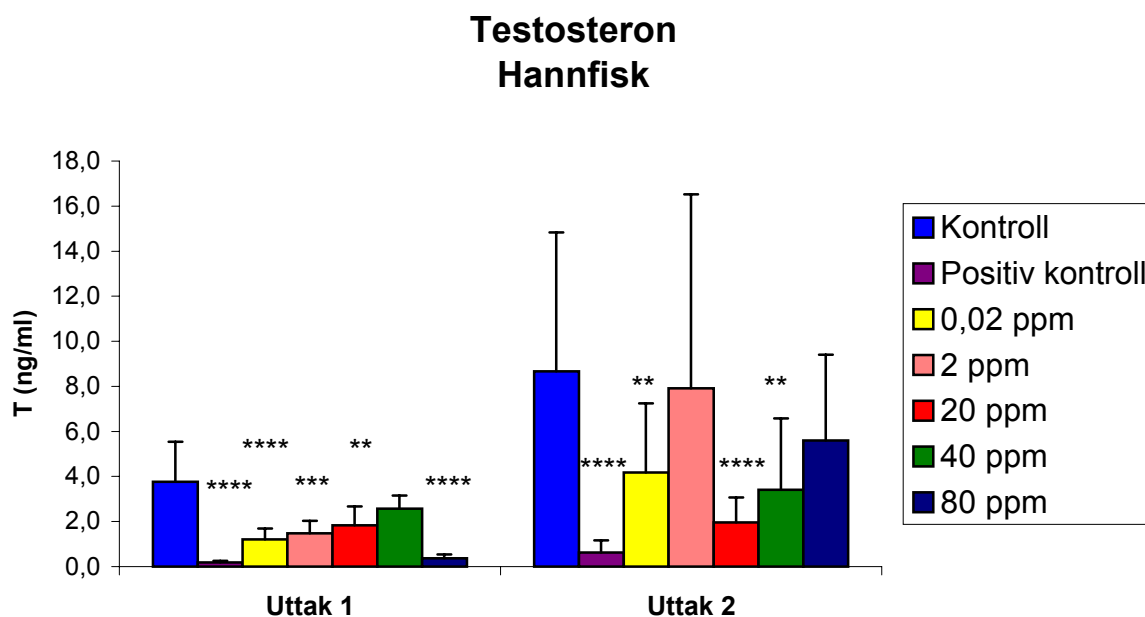


Figur 17. Testosteron i hunnfisk plasma (ng/ml) fra kontroll, positiv kontroll (5 ppm E2), 0,02 ppm, 2 ppm, 20 ppm, 40 ppm og 80 ppm alkylfenol eksponerte grupper. Gjennomsnittsverdi \pm 1 standardavvik. Stjernene markerer signifikant forskjell fra kontrollgruppen (unpaired t-test), * = P-verdi < 0,05, ** = P-verdi < 0,01, *** = P-verdi < 0,001. På figuren er enkeltdosene av de fire alkylfenolene multiplisert med 4 for å vise totalkonsentrasjonen.

Ekspirement 2. Hannfisk

Testosteron

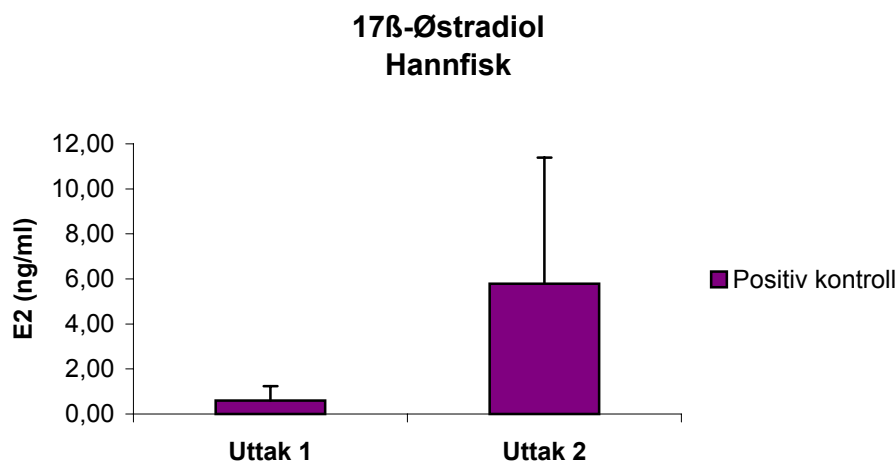
Testosteronnivået gikk betydelig ned i de fleste grupper av hannfisk som var blitt eksponert for alkylfenoler både etter uttak 1 og 2. Dosens størrelse og varighet synes å ha betydning for påvirkningen og det er ingen klar dose-respons. Fra positiv kontroll ser en at sterk østrogenpåvirkning kan redusere testosteronnivået i hannfisk til et minimum.



Figur 18. Testosteron i hannfisk plasma (ng/ml) fra kontroll, positiv kontroll (5 ppm E2), 0,02 ppm, 2 ppm, 20 ppm, 40 ppm og 80 ppm alkylfenol eksponerte grupper. Gjennomsnittsverdi \pm 1 standardavvik. Stjernene markerer signifikant forskjell fra kontrollgruppen (unpaired t-test), * = P-verdi < 0,05, ** = P-verdi < 0,01, *** = P-verdi < 0,001, **** = P-verdi < 0,0001. På figuren er enkeltdosene av de fire alkylfenolene multiplisert med 4 for å vise totalkonsentrasjonen.

Østrogen

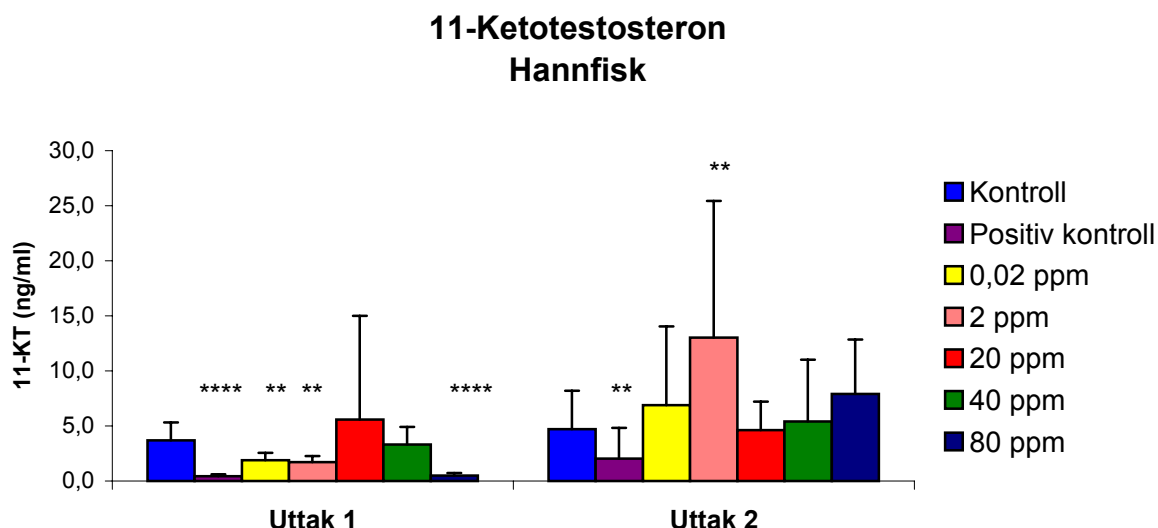
Som en skulle forvente fikk en et meget høyt nivå av 17β -østradiol i positiv kontroll hannfisk, om lag i samme størrelsesorden som i positiv kontroll hunnfisk (Fig. 19).



Figur 19. 17 β -Østradiol i hannfisk plasma (ng/ml). Positiv kontroll (5 ppm E2).

11-Ketotestosteron

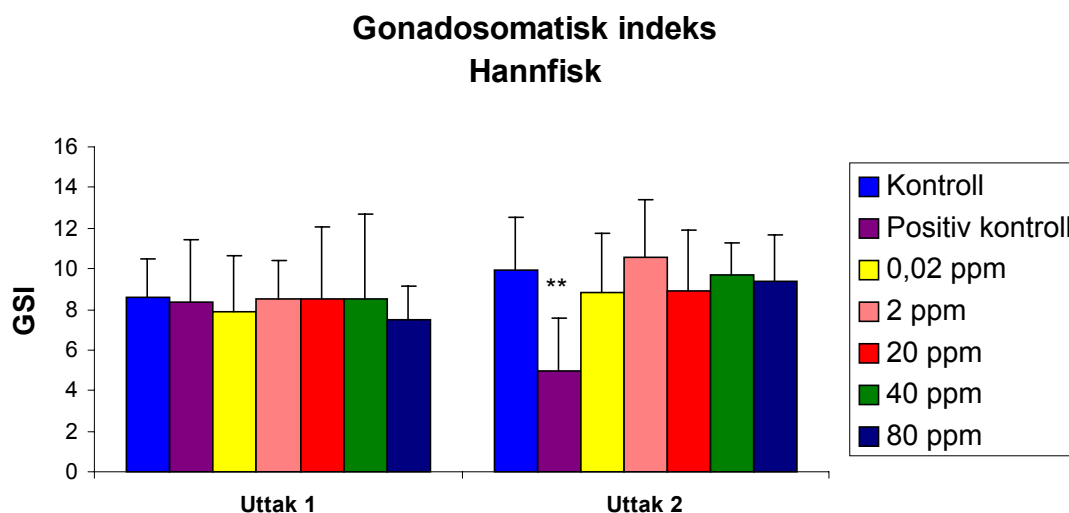
I uttak 1 fikk en en markert nedgang i 11-ketotestosteron i de fleste gruppene. I uttak 2 synes situasjonen å være omvendt der en enten har tilsvarende nivå 11-ketotestosteron som kontroll eller noe høyere, avhengig av dose (Fig. 20).



Figur 20. 11-Ketotestosteron i hannfisk plasma (ng/ml) fra kontroll, positiv kontroll (5 ppm E2), 0,02 ppm, 2 ppm, 20 ppm, 40 ppm og 80 ppm alkylfenol eksponerte grupper. Gjennomsnittsverdi \pm 1 standardavvik. Stjernene markerer signifikant forskjell fra kontrollgruppen (unpaired t-test), * = P-verdi < 0,05, ** = P-verdi < 0,01, *** = P-verdi < 0,001, **** = P-verdi < 0,0001. På figuren er enkeltdosene av de fire alkylfenolene multiplisert med 4 for å vise totalkonsentrasjonen.

Gonadosomatisk indeks

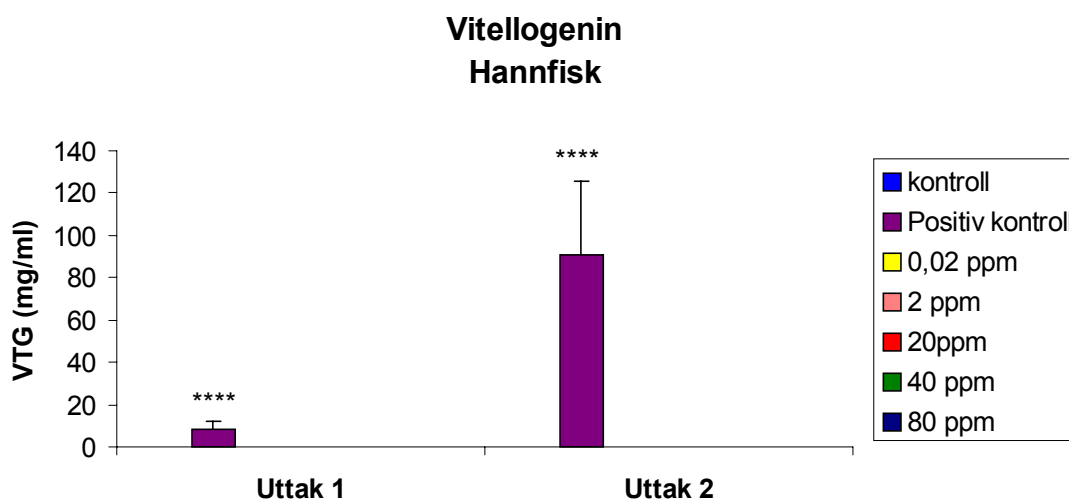
Lengre tids eksponering for østradiol (positiv kontroll, uttak 2) førte til en statistisk signifikant nedgang i GSI (Fig. 21). For de andre gruppene var det ikke påvisbare forskjeller i GSI.



Figur 21. Gonadosomatisk index (GSI) for hannfisk: kontroll, positiv kontroll (5 ppm E2), 0,02 ppm, 2 ppm, 20 ppm, 40 ppm og 80 ppm alkylfenol eksponerte grupper. Gjennomsnittsverdi \pm 1 standardavvik. Stjernene markerer signifikant forskjell fra kontrollgruppen (unpaired t-test),**=P-verdi < 0,01. På figuren er enkeltdosene av de fire alkylfenolene multiplisert med 4 for å vise totalkonsentrasjonen.

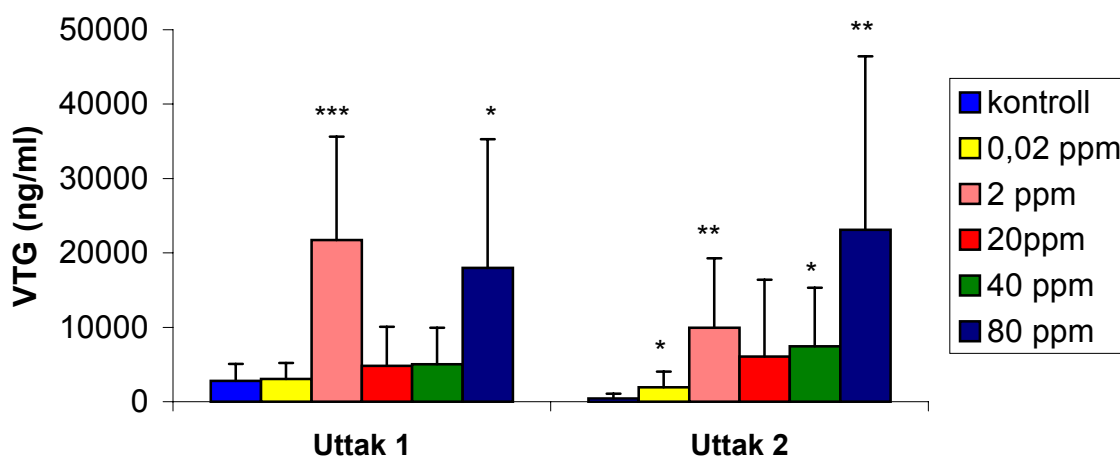
Vitellogenin

Eksponering for 17β -østradiol (positiv kontroll) fører til en enorm induksjon av vitellogenese i hannfisk (Fig. 22). Alkylfenolene induserer også vitellogeninproduksjonen i hannfisk (Fig. 23; statistisk signifikant i de fleste grupper fra uttak 2), men i mye mindre grad enn 17β -østradiol. Sistnevnte faktum ses tydelig fra Fig. 22 der nivåene av vitellogenin i de alkylfenoleksponerte gruppene ikke kommer frem i det hele (merk forskjellen i skalaen på ordinatene i Fig. 22 og 23!).



Figur 22. Vitellogenin i hannfisk plasma (mg/ml). Positiv kontroll har fått en meget kraftig induksjon av VTG. Mange tusen ganger større verdier enn for de alkylfenol eksponerte grupper. Gjennomsnittsverdi \pm 1 standardavvik. Stjernene markerer signifikant forskjell fra kontrollgruppen (unpaired t-test), **** = P-verdi < 0,0001. På figuren er enkeltdosene av de fire alkylfenolene multiplisert med 4 for å vise totalkonsentrasjonen.

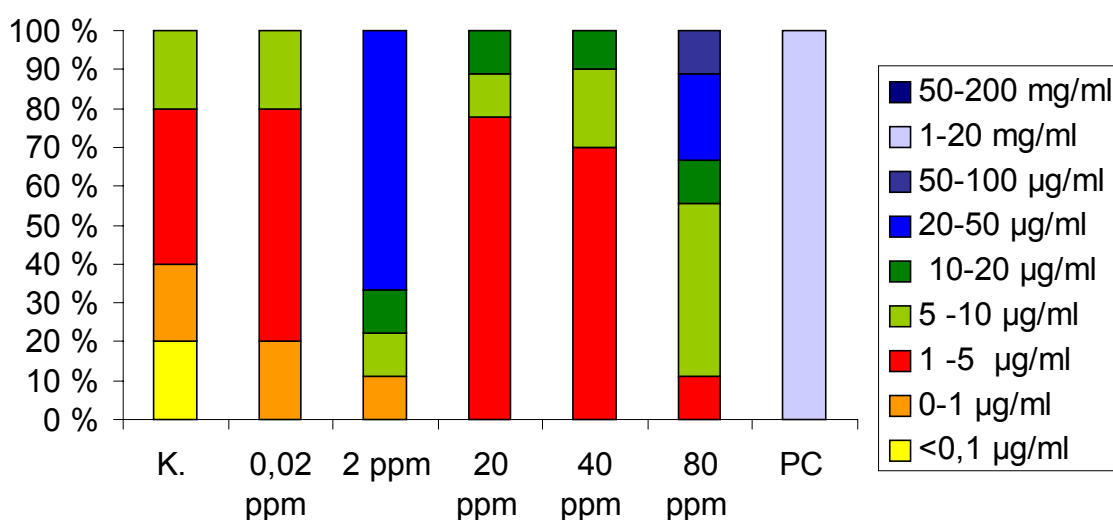
Vitellogenin Hannfisk



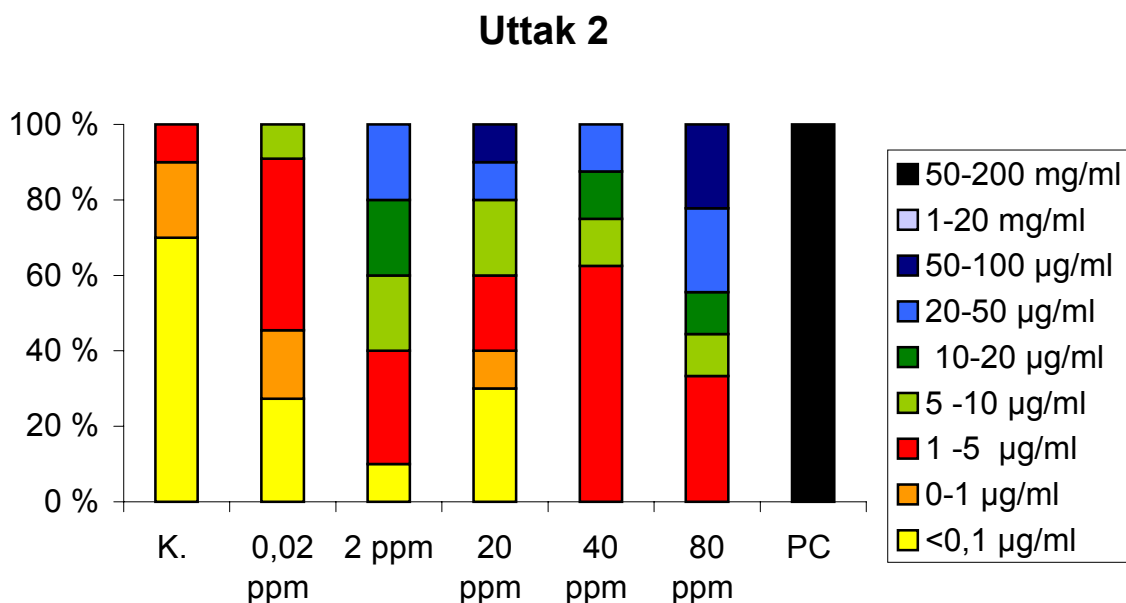
Figur 23. Vitellogenin i hannfisk plasma (ng/ml): kontroll, 0,02 ppm, 2 ppm, 20 ppm, 40 ppm og 80 ppm alkylfenol eksponerte grupper. Gjennomsnittsverdi \pm 1 standardavvik. Stjernene markerer signifikant forskjell fra kontrollgruppen (unpaired t-test), * = P-verdi < 0,05, ** = P-verdi < 0,01, *** = P-verdi < 0,001. På figuren er enkeltdosene av de fire alkylfenolene multiplisert med 4 for å vise totalkonsentrasjonen.

Intervallfordelingen av VTG i de ulike gruppene viser at antall individer med høy vitellogenin øker i de eksponerte gruppene i forhold til kontroll. Dette skjer allerede etter uttak 1 (Fig. 24 og 25).

Uttak 1



Figur 24. Intervallinndeling av VTG-nivåer i hannfisk, uttak 1. Kontroll, positiv kontroll (5 ppm E2), 0,02 ppm, 2 ppm, 20 ppm, 40 ppm og 80 ppm alkylfenol eksponerte grupper. På figuren er enkeltdosene av de fire alkylfenolene multiplisert med 4 for å vise totalkonsentrasjonen.



Figur 25. Intervallinndeling av VTG-nivåer i hannfisk, uttak 2. Kontroll, positiv kontroll (5 ppm E2), 0,02 ppm, 2 ppm, 20 ppm, 40 ppm og 80 ppm alkylfenol eksponerte grupper. På figuren er enkeltdosene av de fire alkylfenolene multiplisert med 4 for å vise totalkonsentrasjonen.

5. Oppsummering

Steroider

Det ble funnet at eksponering for alkylfenoler har store effekter på de naturlige steroidnivåene i både hunn- og hannfisk. Til vår store overraskelse fant vi en meget kraftig og signifikant nedregulering av 17β -østradiolnivået hos de eksponerte grupper. I langtidseksponeringsforsøket (eksperiment 1) fremkom denne effekten allerede i november og fortsatte med økende signifikans i de to påfølgende uttak (desember og januar) (Fig. 5). I januaruttaket var også lavdosegruppen (0,02 ppm) signifikant lavere enn kontrollgruppen med hensyn til 17β -østradiol (Fig. 5). Tilsvarende funn ble også gjort i forsøk 2. Alle alkylfenoleksponerte grupper i uttak 2 (unntatt 2 ppm-gruppen) hadde lave østrogennivåer. Selv om en fant størst nedregulering av 17β -østradiolnivået ved høyeste dose (80 ppm) viste ikke resultatene noen klar dose-responsammenheng (Fig. 14).

Det ble også funnet effekter på testosteron hos hunnfisk samt 11-ketotestosteron og testosteron hos hannfisk, men bildet var ikke så entydig som for østrogeneffektene. Disse resultatene vil bli diskutert nærmere i den endelige rapport.

Som forklart i innledningen styres steroidsyntesen gjennom den såkalte hjerne-hypofyse-gonadeaksen. Dette er et meget komplekst system som regulerer de sesongmessige variasjonene i hormonnivåene og som en følge styrer alle de fysiologiske prosessene som finner sted under gonademodningen. Det ligger i

sakens natur at et meget stort antall mekanismer er involvert i denne reguleringen og at det derfor finnes multiple steder hvor det kan skje forstyrrelser. Ut fra våre data kan vi ikke si noe om hvilke mekanismer som er forstyrret. Mange nivåer kan tenkes å være påvirket.

Hjerne og hypofyse styrer syntesen av gonadotropiner som igjen regulerer gonadenes steroidsyntese. Denne gonadotropinsekresjonen er underlagt et komplekst reguleringssystem som inneholder flere trinn hvor forstyrrelser kan finne sted (Jalabert *et al.*, 2000). Det er i dag meget stor fokusering på alkylfenoler og neuroendokrine forstyrrelser (Harris *et al.*, 2001, Jones *et al.*, 198, Piva & Martini, 1998 og Yadetie *et al.*, 1999).

Steroidsyntesen er på gonadenivå avhengig av gonadotropinets reseptorsystem og reguleringen av de steroidsyntetiserende enzymer. Dette er også trinn som kan være sårbare for endokrine forstyrrelser (Arukwe *et al.*, 1997).

Alkylfenoler og andre xenobiotika kan også tenkes å påvirke den naturlige metabolismen av steroidene gjennom å indusere enzymsystemer som deltar i felles metabolisme.

Et interessant funn fra forsøkene er at det ikke er noen tydelig dose-respons relasjon. Gruppen som har fått den laveste dosen (0,02 ppm) har samme fall i østradiolnivået som noen av gruppene som har fått høyere doser (Fig. 14). Dette kan tyde på at nedreguleringen fremkommer ved overskridelse av en viss grenseverdi.

Mangel på dose-respons relasjoner er et typisk fenomen for steroidhormonsystemet. Det er ofte forskjellig respons på lave og høye doser steroid. Lave doser østrogen og testosteron stimulerer til sekresjon av gonadotropin hos fisk, mens høye doser inhiberer denne sekresjonen (Jalabert *et al.*, 2000). Likeledes er det observert forskjeller på alkylfenolenes påvirkning på de steroidsyntetiserende enzymer ved lav og høy dose (Arukwe *et al.*, 1997).

I det videre vil vi arbeide ut fra den hypotese at de beskrivne effekter fremkommer fra forstyrrelser på hjernenivå og at dette henger sammen med fiskens naturlige "feed back" system. Vi har ingen data fra disse forsøk som kan svare på disse spørsmål.

Vitellogenin

Figur 15 og 22 viser at eksponering for østradiol fører til en kraftig vitellogenininduksjon (VTG) i både hann- og hunnfisk (positiv kontroll, 5 ppm E2). Dette bekrefter at VTG er en sensitiv biomarkør for østrogenpåvirkning og at torsk er en brukbar modellorganisme i disse forsøk.

Resultatene fra hannfisk som er blitt eksponert for alkylfenoler viser en tydelig og doserelatert induksjon av VTG (Fig. 23). Nivåene etter alkylfenoleksponeringen var flere tusen ganger lavere enn hos de E2 eksponerte fiskene. Generelt er det en del spredning i VTG-konsentrasjonene innenfor gruppene noe som medvirker til at de eneste signifikante forskjellene en fant i forsøk 1 var mellom kontrollgruppen og 2 ppm-gruppen fra oktoberuttaket fra

hannfisk. Ved å dele VTG-nivåene inn i konsentrasjonsintervaller fremstår likevel et ganske entydig bilde. I langtidseffektstudiet (eksperiment 1) har 20% av kontrollgruppen målbare mengder VTG (hannfisk), mens andelen for 0,02 ppm- og 2 ppm-gruppene er henholdsvis 50% og 70% (Fig. 13).

Tilsvarende resultater ble også funnet i det oppfølgende forsøk (eksperiment 2). En så her en klar doserelasjon og signifikante forskjeller i konsentrasjoner. Det ble observert noen overraskende sesongvariasjoner som gikk igjen i begge forsøk. I november måned var det generelt høye nivåer av VTG i plasma fra hannfisk, det gjaldt både kontrollfisken og de eksponerte grupper. I første uttak forsøk 2 (november) ble det detektert målbare mengder av VTG i hele 80% av kontrollfisken (Fig. 24), mens det sist i desember (uttak 2) kun var 30% av kontrollfisken som hadde VTG i plasma (Fig. 25). På det nåværende tidspunkt har vi ikke noen forklaring på disse effekter. Fisken fra uttak 1 i forsøk 2 og novemberuttaket i forsøk 1 har til tross for forhøyede verdier av VTG i kontrollgruppen fremdeles en klar økning i VTG i relasjon til alkylfenoleksponeringen.

Vitellogenin og zona radiata-proteiner (ZR) har vært brukt i en årrekke som biomarkører for østrogeninduksjon (review: Jones *et al.*, 2000). Forskjellige alkylfenoler er vist i tidligere forsøk å indusere VTG i hannfisk selv i meget lave vannkonsentrasjoner: nonylfenol, 5,4 ppb (shephead minnow) (Hemmer *et al.*, 2001); oktylfenol, 4,8 ppb og nonylfenol 20,3 ppb (regnbueørret) ((Jobling *et al.*, 1997).

En stor engelsk undersøkelse av vitellogeninkonsentrasjoner i hannfisk flyndre viste at fisk fanget i engelsk sektor av Nordsjøen hadde signifikant forhøyede verdier sammenlignet med 3 referansegrupper fanget i "ikkeforurensede" områder (Matthiessen *et al.*, 1998).

Gonadosomatisk indeks

Hunntorsken øker sin gonadevekt fra ca 2% av kroppsvekten i slutten av oktober til 11% rett før gyting i slutten av januar. Denne store vektøkningen skyldes hovedsakelig transport og inkorporering av lipider og proteiner fra leveren til gonaden i form av vitellogenin. Dette er beskrevet i innledningen. Normalt er det en direkte sammenheng mellom østrogen, vitellogenin og gonadetilvekst.

Det er derfor ikke overraskende at lave østrogennivåer følges av nedgang i gonadevekt. I eksperiment 1 var det en lavere snittverdi for GSI (hunnfisk) i de to eksponerte grupper enn i kontroll, men denne var ikke statistisk signifikant (Fig. 7). I eksperiment 2 derimot var det en stor og signifikant nedgang i GSI (hunnfisk) (Fig. 16). I positiv kontroll (5 ppm E2) kunne en observere en betydelig resorpsjon av gonaden og det er lite sannsynlig at denne gruppen har kunnet gjennomføre gytingen. De andre gruppene viste ingen "ytre" påvirkningstegn på eksponeringen, men vekten var betydelig mindre. I eksperiment 1 undersøkte en også gytesuksess, eggkvalitet og larveoverlevelse. Gruppene gytte normalt og det ble ikke registrert noe unormalt verken med hensyn til overlevelse eller tilvekst.

Bioakkumulering, giftighet og opptak

Alkylfenoler er akutt giftige for fisk. Data for nonylfenol viser LC 50 verdier fra 17-3000 ppb for fisk. For invertebrater ligger LC 50 på 20-3000 ppb og for alger 27-2500 ppb. Alkylfenoler blir raskt opptatt og bioakkumulerer i fiskevev. Bioakkumuleringsfaktoren (BCF) for langkjedede alkylfenoler (>C4) ligger fra 280-300 (Servos, 1999). Et eget arbeid på torsk viste en BCF for heptylfenol på ca 600 (Tollefsen *et al.*, 1998).

Alkylfenolene metaboliseres hurtig og primært av fase to enzymer som konjugerer intakt alkylfenol til de korresponderende glucuronider. Noe fase en metabolisme forekommer også. Alkylfenolene utskilles hovedsakelig gjennom galle og feces. Opptaksstudier viser at alkylfenolene akkumuleres spesielt i gallen, fordøyelsessystemet og leveren, men det er også vist at nonylfenol opptas i hjernen på laks (Arukwe *et al.*, 2000) og torsk (Tollefsen *et al.*, 1998). Dette er spesielt interessant i forhold til hormonforstyrrende effekter. Forsøk med PCB viser at torsken (mager fisk) er mer utsatt enn ørret (fet fisk) for akkumulering av lipofile stoffer i hjernen (Ingebrigtsen, 1990).

Alkylfenoler i det marine miljø

Innholdet av langkjedede alkylfenoler (C4-C7) i produksjonsvannet er lavt og befinner seg i det nedre ppb-området (2-237 ppb) (Brendehaug *et al.*, 1992). I tillegg kommer den meget høye fortynningsfaktoren ved offshoreutslipp. Konsentrasjonene i det marine miljø blir derfor ekstremt lave.

Rye og samarbeidspartnere (Rye *et al.*, 1996) har kombinert en 3-D hydrodynamisk modell (beregner havstrømmer), en 3-D "multi-source" numerisk modell (beregner fortynningsfaktorer for oljekomponentene) og en biologisk modell (for å simulere egg- og larvedrift, svømmende fisk og har innebygget bioakkumuleringsfaktorer). De bruker denne kombinerte modellen til å estimere kroppskonsentrasjonen til heptylfenol (C7) hos fisk og larver som lever innenfor en radius på 20 km av Haltenbanken.

Ut fra Haltenbankens samlede utslipp av heptylfenol (0,5 kg/dag) beregner de en bakgrunnskonsentrasjon av denne på 0,001 ppb (1 ng/L). Med en BCF på 600 (hentet fra Tollefsen *et al.*, 1998) estimerer de en populasjons "body burden" på 0,6 ppb. Modellering på enkeltfisk (random fish) viste at størsteparten av fiskene ville få en "body burden" på 1-10 ppb.

Det finnes ingen empiriske data som bekrefter disse modelleringer. I det hele tatt vet en lite om skjebnen til disse langkjedede alkylfenoler. Nedbrytningshastigheten til alkylfenolene minker dramatisk med lengden av alkylkjeden. Brendehaug *et al.*, 1992 målte bionedbrytningen av fenoler i produksjonsvann fortynt med sjøvann og fant at fenol og kresol (C1) ble nedbrutt meget hurtig (etter en uke var bare 0,1‰ tilbake), mens det av hexylfenol (C6) og heptylfenol (C7) fremdeles var igjen henholdsvis 33% og 60% av utgangskonsentrasjonen etter en måned.

Et annet av ytterst få studier av nedbrytningen av nonylfenol (C9) i sjøvann konkluderer med en DT95-tid på 401 dager (DT95-tid er tiden det tar å bryte ned 95% av forbindelsen) (Heins *et al.* 1999). Dette indikerer at utslippene kan akkumulere over tid, men som før nevnt har en ikke reell viten om den virkelige skjebnen til disse stoffene i felten. Måling av PAH (Frost *et al.*, 1999) i sjøvann har vist at så langt som 15 km fra utslippskilden kan det være forhøyete verdier i forhold til bakgrunnsnivåer.

Vi har brukt Rye-artikkelen (Rye *et al.*, 1996) som utgangspunkt for vårt valg av doseringsregime i vårt eksponeringsforsøk. Vi har også prøvt å ta hensyn til at produksjonsvannet inneholder en mangeartet blanding av forskjellige fenoler ved å bruke en blanding av 4 alkylfenoler med ulik kjedelengde, fra butyl- til heptylphenol. Forsøkets intensjon ble å dosere fisken til en "body burden" tilsvarende Rye's estimater. Vi fant derfor at 5 ppb av hver av de 4 alkylfenolene skulle tilsvare en realistisk dose.

Når dosene i våre forsøk skal regnes tilbake til sjøvannskonsentrasjoner, må en ta hensyn til bioakkumuleringsfaktorene. Vårt doseringsregime vil således tilsvare en teoretisk sjøvannskonsentrasjon på 0,008 ppb. Dette er en ekstrem lav konsentrasjon som ligger innenfor det området en kan forvente rundt oljeinstallasjonene.

Denne konsentrasjonen er ekstremt mye lavere enn dem som tidligere er rapportert å ha effekt.

6. Referanser

Arukwe,A., Förlin,L. and Goksøyr,A.. (1997). Xenobiotic and steroid biotransformation enzymes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) liver treated with an estrogenic compound, 4-nonylphenol. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16 (12):2576-2583.

Arukwe,A., Goksøyr,A, Thibaut,R. and Cravedi, J.P. (2000). Metabolism and organ distribution of nonylphenol in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Marine Environmental Research* 50 (1-5):141-145.

Beullens,K., Eding, E.H., Gilson, P., Ollevier, F., Komen, H. and Richter, C.J.J. (1997). Gonadal differentiation, intersexuality and sex ratios of European eel (*Anguilla anguilla* L.) maintained in captivity. *Aquaculture*: 153: 135-150.

Brendehaug, J., S. Johnsen, K.H. Bryne, A.L. Gjåse, T.H. Eide, and E. Aamot. (1992). Toxicity testing and chemical characterization of produced water - A preliminary study. In Produced water. J.P. Ray and F.R. Engelhart, editors. Plenum Press, New York. 245-256.

Colborn,T. and Clement, C (eds.) (1992). "Chemically induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection", Princeton Scientific Publishing.

Folkvord, A., Otterlei, E. og Svardal, A.M. (1999). Alkylerte fenolers hormonelle innvirkning på torsk - generasjonseffekter. IFM rapport Nr. 15, 1999, Universitetet i Bergen. ISSN 0803-1924

Frost, T.K., Johnsen, S. and Utvik, T. I. R. (1999)
Produced water discharges to the North Sea: Fate and effects in the water column summary report.
OLF, The Norwegian Oil Industry Association

Harris, C. A., Santos, E. M., Janbakhsh, A., Pottinger, T. G., Tyler, C. R. and J. P. Sumpter. (2001). Nonylphenol affects gonadotropin levels in the pituitary gland and plasma of female rainbow trout. *Environmental Science & Technology* 35 (14):2909-2916.

- Heinis, L.J., Knuth, M.L., Liber, K., Sheedy, B.R., Tunell, R.L., and Ankley, G.T. (1999). Persistence and distribution of 4-nonylphenol following repeated application to littoral enclosures. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18 (3):363-375.
- Hemmer, M.J., Hemmer, B.L., Bowman, C.J., Kroll, K.J., Folmar, L.C., Marcovich, D., Hoglund, M.D. and Denslow, N.D. (2001). Effects of p-nonylphenol, methoxychlor, and endosulfan on vitellogenin induction and expression in sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (2):336-343.
- Ingebrigtsen, K., Hektoen, H., Andersson, T., Bergman, A. and Brandt, I. (1990) Species-specific accumulation of the polychlorinated biphenyl (pcb) 2,3,3',4,4'-pentachlorobiphenyl in fish brain - a comparison between cod (*Gadus morhua*) and rainbow-trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pharmacology & Toxicology* 67 (4):344-345.
- Jalabert, B., Baroiller, J.F., Breton, B., Fostier, A., LEGAC, F., Guiguen, Y. and Monod, G. (2000). Main neuro-endocrine, endocrine and paracrine regulations of fish reproduction, and vulnerability to xenobiotics. *Ecotoxicology* 9 (1-2):25-40.
- Jobling, S., and Sumpter, J.P. (1994). Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An *in vitro* study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat. Toxicol.* 27: 361-372.
- Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J. A., Matthiessen, P. and Sumpter, J.P. (1996) Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15 (2):194-202.
- Jones, P. D., DeCoen, P. D., Tremblay, W. M. and Giesy, J. P. (2000) Vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. *Water Science and Technology* 42 (7-8):1-14.
- Jones, S. B., King, L. B., Sappington, L., CDwyer, F. J., Ellersieck, M. and Buckler, D. R.. (1998). Effects of carbaryl, permethrin, 4-nonylphenol, and copper on muscarinic cholinergic receptors in brain of surrogate and listed fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology, c-pharmacology toxicology & endocrinology* 120 (3):405-414.
- Kah, O., Madigou, T., Mazurais, D., and Le Drean, G. (2001). Aspects of the central regulation of reproduction in teleost fish. *Proceedings of the 6th international symposium on the Reproduction physiology of fish*:27-34.
- Kelce, W.R., Stone, C.R., Laws, S.C., Gray, L.E., Kemppainen, J.A. and Wilson, E.M. (1995). Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature* 375: 581-585.
- Matthiessen, P. Allen, Y.C. Allchin, R. Feist, S. W. Kirby, M. F. Law, R. J. Scott, A. P. Thain, J. E. and Thomas, K. V. (1998). Oestrogenic endocrine disruption in flounder (*Platichthys flesus L.*) from United kingdom estuarine and marine waters. Science series technical report. CEFAS. Anonymous. Lowestoft: CEFAS. 107:1-49.
- Meier, S. Svardal, A., Lignell, M and B. Norberg
Establishment and validation of cod vitellogenin ELISA. Determination of plasma sex steroids, vitellogenin and fatty acids levels during the annual reproductive cycle of female and male cod (*Gadus morhua L.*) and the lipid accumulation into the gonade. (in preparation).
- Nash, J. P., Cuisset, B. D., Bhattacharyya, S., Suter, H. C., LeMenn, F., and Kime, D. E. (2000). An enzyme linked immunosorbant assay (ELISA) for testosterone, estradiol, and 17,20 beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one using acetylcholinesterase as tracer: application to measurement of diel patterns in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry* 22 (4):355-363.
- Nimrod, A.C. and W.H. Benson. (1996). Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates. *Critical reviews in toxicology* 26:335-364.
- Piva, F. and Martini, L. (1998). Neurotransmitters and the control of hypophyseal gonadal functions: possible implications of endocrine disrupters. *Pure and Applied Chemistry* 70 (9):1647-1656.
- Romkes, M. and Safe, S. (1988). Comparative activities of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and progesterone as antiestrogens in the female rat uterus. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 92: 368-380.

Routledge, E.J. and J.P. Sumpter. (1997). Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. *J. Biological Chemistry* 272(6): 3280-3288

Rye, H., Reed, M., Slagstad, D., Melbye, A. and S. Johnsen. (1996). Modeling transport and dilution of produced water and the resulting uptake and biomagnification in marine biota. *Society of Petroleum Engineers SPE* 35911:231-246.

Røe, T.I. (1998). Produced water discharges to the North Sea – A study of bioavailability of organic produced water compounds to marine organisms. Dr. scient. thesis.

Servos, M.R. (1999). Review of the aquatic toxicity, estrogenic responses and bioaccumulation of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. *Water Quality Research Journal of Canada* 34 (1):123-177.

Somarakis, S., I. Kostikas, N. Peristeraki, and N. Tsimenides. (1997). Fluctuating asymmetry in the otoliths of larval anchovy *Engraulis encrasicolus* and the use of developmental instability as an indicator of condition in larval fish. *Marine Ecology Progress Series* 151:191-203.

Svardal, A.M. (1999). Produsert vann - sammensetning og effekter på det marine miljø. Aure, J *et al.*, Havets miljø 1999, *FiskenHav, Særn.* 2:1999.

Thorsen, A., Andersen, T. E., Fonn, M., Kjesbu, O. S. Klungsøyr, J. Meier, S. og Svardal, A.M. (1998). Effekter av alkylfenoler på torskens reproduksjon. Rapport 2 A
Adresse: Senter for Marint Miljø, Havforskningsinstituttet,
Nordnesgaten 50, P.O. Box. 1870, N-5024, Nordnes-Bergen

Tollefsen, K. E., Ingebrigtsen, K., Olsen, A. J., Zachariassen, K. E. and Johnsen, S. (1998). Acute toxicity and toxicokinetics of 4-heptylphenol in juvenile atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Environmental Toxicology and Chemistry* 17 (4):740-746.

Yadette, F., Goksøyr, A., and Male, R. (1999). Effects of the environmental chemical 4-nonylphenol on the pituitary gonadal axis in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Proceedings of the 6th international symposium on the Reproduction physiology of fish*:377.