



Miljøministeriet
Naturstyrelsen

Miljøfarlige stoffer og ålekvabbe

Samlet analyse

Kolofon

Titel:

Miljøfarlige stoffer og ålekvabbe.
Samlet analyse

Emneord:

Ålekvabbe, tungmetaller, organotin,
PFAS, phthalater, dioxin, bromerede
flammehæmmere

Serietitel- og nummer:**Udgiver:**

Naturstyrelsen

Ansvarlig institution:

DCE - Nationalt Centre for Miljø og
Energi, Aarhus Universitet

Copyright:

Må citeres med kildeangivelse

Forfattere:

Ingela Dahllöf, Jakob Strand, Kim
Gustavson, Institut for Bioscience,
Aarhus Universitet,
Poul Bjerregaard, Syddansk Universitet

Sprog:

Dansk

År:

2011

URL:

www.nst.dk

ISBN nr. elektronisk version:

978-87-7279-276-7

Udgiverkategori:

Statslig

Resume:

Årsagssammenhæng mellem misdannelser i ålekvabbeunger og miljøfarlige stoffer blev analyseret på baggrund af den samlede viden fra FORMÅL-projektet og andre tilgængelige data.

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

Indhold

Forord	5
Sammenfatning.....	7
Summary	9
Introduktion.....	11
Teratogene effekter af udvalgte stofgrupper.....	11
Kilder og tilførsel af miljøfarlige stoffer til vandmiljøet	13
Kildepåvirkning på de tre FORMÅL-lokaliteter	13
Sammenhæng mellem tilførsler og koncentrationer.....	15
Ålekvabbens reproduktionscyklus	16
Effekter af miljøfarlige stoffer i ålekvabbe.....	21
Misdannelser i danske ålekvabber 2004-2010	21
Misdannelser i danske ålekvabber i et internationalt perspektiv	24
Biomarkører i forhold til miljøfarlige stoffer og misdannelser.....	26
Sammenhæng mellem miljøfarlige stoffer og misdannelser.....	27
Konklusioner og anbefalinger.....	35
Konklusioner	35
Anbefalinger.....	35
Referencer	37

Miljøfarlige stoffer og ålekvabbe. Samlet analyse

Forord

I forbindelse med den nationale overvågning af vandmiljøet (NOVANA) i årene 2004-2008 er der fundet et stigende antal misdannede ålekvabbeunger i danske fjorde. I andre lande, herunder Tyskland og Sverige, er der gjort lignende fund af misdannede ålekvabbeunger.

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

Konklusionerne fra disse udredninger var, at ålekvabbeunger med misdannelser er hyppigst forekommende i kystnære områder med menneskelig aktivitet.

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

I FORMÅL-projektet er uddybende undersøgelser blevet gennemført på tre lokaliteter, Agersø, Roskilde og Frederiksværk i 2009, udvalgt på baggrund af forskelle i forekomst af misdannelser. Ud fra det samlede billede af forekomst og koncentrationer af metaller og miljøfarlige stoffer i muslinger, sediment og ålekvabber er der i projektet udpeget en række kandidatstoffer/stofgrupper som mulig årsag til øget forekomsten af misdannelser hos ålekvabber.

Kobber, organotin, polyaromatiske hydrokarboner (PAH'er), dioxin, dioxinlignende PCB'er, bromerede flammehæmmere (BFR) blev, sammen med perfluorerede stoffer (PFAS), udpeget som stærke kandidatstoffer. Kviksølv, kadmium, og bly kunne ikke udpeges som kandidatstoffer på ovennævnte lokaliteter.

I 2010 gennemførtes et laboratorieforsøg, hvor ålekvabbeunger blev eksponeret for enkeltstoffer samt for blandinger af miljøfarlige stoffer.

Resultaterne fra feltstudiet og laboratorieforsøget er udgivet som rapporter, og denne rapport er en samlet analyse af den viden, som er opbygget inden for projektet, sat i perspektiv i henhold til andre relevante undersøgelser af ålekvabber, marine fisk og miljøtilstand.

Sammenfatning

Projektet FORMÅL ("Et undersøgelsesforløb til at **FOR**klare fund af **Misdannede Å**Lekvabbeunger i danske fjorde") er fase 3 i Naturstyrelsens (tidligere By- og Landskabsstyrelsens) undersøgelsesforløb iværksat for at klarlægge en eventuel sammenhæng mellem miljøfarlige stoffer og misdannelser. FORMÅL er inddelt i tre trin omfattende 1) et måleprogram, som vurderer vandmiljøets og ålekvabbens tilstand med hensyn til miljøfarlige stoffer, 2) et laboratorieforsøg, hvor ålekvabber blev eksponeret for miljøfarlige stoffer og 3) analyse og overordnet sammenfatning (denne rapport).

I den samlede analyse er der benyttet data fra FORMÅL-projektet, det nationale overvågningsprogram NOVANA samt data fra EU-BONUS-projektet BALCO-FISH.

Analysen viser, at når ålekvabber bliver eksponeret for blandinger af stoffer, er effekterne mindre end for visse enkeltstoffer, dvs. der er hæmmende interaktioner mellem stoffer. Omvendt kan der også være additive effekter, når der er flere stofgrupper til stede. En bedre forståelse af disse to typer af interaktioner kræver dog et større datamateriale med målinger af miljøfarlige stoffer i forbindelse med undersøgelser af misdannelser.

Akuttoksiske stoffer, såsom polyaromatiske kulbrinter (PAH'er) og organotin, ser ud til at være de mest betydende stoffer mht. tidlig død af unger. De mere lipofile stofgrupper, såsom bromerede flammehæmmere og perfluorede stoffer, har større betydning for forekomst af andre typer af misdannelser.

Der er en stærkere sammenhæng mellem misdannelser i unger og forekomst af miljøfarlige stoffer i æg end i ungerne, selv om stoffer optages under hele udviklingsperioden. Det betyder, at den mest sårbare periode er fra æggene anlægges til ungerne klækkes.

Store rumlige og tidsmæssige variationer i frekvens og typer af misdannelser peger på, at det er de lokale variationer i tilførsler af miljøfarlige stoffer, som er af betydning.

Summary

The Danish Ministry of the Environment has instigated a series of projects with the aim to clarify whether deformities in eelpout (*Zoarces viviparous*) larvae are caused by hazardous substances. The conclusions of the earlier literature-based projects were that substances such as heavy metals, organotin, polyaromatic hydrocarbons (PAHs), and halogenated aromatic compounds like dioxins, PCBs and flame retardants, were likely candidates to have caused the deformities.

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

The integrated analysis shows that when female eelpout are exposed to mixtures of hazardous substances, the effects are smaller compared to when exposed to single substances. On the other hand, when additional groups of hazardous substances are included there are additive effects. A better understanding of these two types of interactions can only be achieved when more data on exposure in combination with analysis of deformities are available.

Acutely toxic substances, such as polyaromatic hydrocarbons and organotin, are suggested to be more important for early lethality of embryos, compared to more lipophilic substances. The less acutely toxic substances, such as brominated flame retardants and perfluorinated substances, increase in importance for the development of other types of deformities.

There is a stronger correlation between deformities and exposure levels in eggs, than in larvae, although uptake of hazardous substances occurs during the whole developmental period. Therefore the most sensitive time-period seems to be from the time that eggs are developed until the fry are hatched.

Large spatial and temporal variations in occurrence of deformities, and in different types of deformities, suggest that it is local variation in exposure and sources of hazardous substances that determine the frequency of deformed broods.

Introduktion

Det overordnede formål med undersøgelsesforløbet var at belyse årsagen til misdannelser i ålekvabbeunger. Hypotesen er, at den øgede forekomst af misdannelser i fiskeunger er forårsaget af miljøfarlige stoffer, der inducerer toksiske effekter og processer, som kan lede til misdannelser. Test af hypotesen og opfyldelse af det overordnede formål forudsætter kendskab til belastning med miljøfarlige stoffer i forhold til forekomsten af misdannelser samt en forståelse af ålekvabbens reproduktionscyklus, og derved hvordan ålekvabbens unger kan påvirkes.

Indledningen sammenfatter viden om misdannelser i ålekvabbeunger, som tidligere er publiceret i FORMÅL-projektet, videnskabelig litteratur og andre projektrapporter med fokus på de udpegede kandidatstoffer.

Afsnittet om effekter er en samlet analyse af de forskellige delprojekter i FORMÅL, dvs. feltstudiet med ålekvabber i 2009 og laboratorieforsøget i 2010 suppleret med bidrag fra BONUS+-projektet BALCOFISH.

Teratogene effekter af udvalgte stofgrupper

Et stof der kan fremkalde misdannelser, siges at have teratogene egenskaber. Ved teratogene effekter forstås enhver skade - morfologisk, biokemisk eller adfærdsmæssig - der er fremkaldt under fosterudviklingen, og som først viser sig ved fødslen eller senere.

Overførslen af miljøfarlige stoffer fra moderfisken til ægcellerne kan spille en vigtig rolle i eksponeringen allerede i de tidlige livsstadier hos fisk. Når miljøfarlige stoffer inkorporeres i blommematerialet, bliver de en del af embryonets direkte fødekilde. Hos levendefødende fisk som ålekvabbe kan både æg og embryoner eksponeres for miljøfarlige stoffer fra moderfisken.

Hovedparten af data vedrørende toksiske effekter på fisk er fra såkaldte *in-vitro* studier, hvor forsøgsforholdene kan kontrolleres, men disse forhold er meget forskellige fra dem, som forekommer i miljøet. Det er derfor forbundet med betydelig usikkerhed at forudsige deformiteter i fisk ud fra sådanne *in-vitro* studier. Teratogene effekter af miljøfarlige stoffer hos fisk og fiskeyngel i laboratorieforsøg er tidligere rapporteret i Halling-Sørensen et al. (2008) og er her kort sammenfattet.

De rapporterede misdannelser hos fiskelarver eksponeret for bisphenol A er væskeansamlinger og blødning i blommesækken og i hovedet omkring gællebuerne samt histologiske ændringer i cellekernerne i leveren. Tilsvarende er det rapporteret, at PCB kan forsinke embryoernes udvikling, medføre deformiteter i

forkroppen og øge dødelighed. Enkelte studier beskriver, at DDT kan skabe deformiteter på skelettet og i øjnene hos fiskeyngel, og at DDT-metabolitten p,p-DDE kan inducere en lav rate af hjerte- og rygmarvsdeformiteter hos fisk. Det er rapporteret, at TBT kan forårsage effekter på syns- og lugtesansen hos fisk, anormaliteter i fiskelarvers haler, ufuldstændig klækning, ændret morfologi i form af krumninger på rygsøjlen, ændret pigmentering af øjnene samt manglende blommesækabsorption.

Deformiteter på bl.a. skelettet og blommesækken er blevet observeret hos yngel af flere fiskearter eksponeret for forskellige PAH-forbindelser. En række studier indikerer, at graden og antallet af deformiteter vokser med koncentrationen af PAH. Adskillige typer af deformitet ses ved eksponering af fiskeyngel for PAH'er. PAH-eksponering af hunner udviste teratogene effekter, herunder interne blødninger, ødemdannelse samt øje- og blommesækdeformiteter på afkommet. Fiskeynglen havde også en reduceret overlevelse i forhold til en kontrolgruppe, der aldrig var blevet eksponeret. Deformiteter i hjertet og ødemdannelse hos fiskeyngel er fundet ved eksponering for dioxin. Desuden er væskeansamlinger i blommesækken, nedsat vækst, deformiteter på rygsøjlen, reduceret hjerterate og underudviklet hjerte, finner og underkæbe blevet observeret hos embryoner eksponeret for dioxin.

For metaller er det vist, at bly, krom, cadmium, kobber og kviksølv (både som frit kviksølv og som metylkviksølv) kan medføre misdannelser hos fisk selv ved lave koncentrationer. Skeletdeformitet er observeret hos zebrafiskeyngel ved eksponering for 10 ppm bly. Tilsvarende viser en række undersøgelser, at cadmium kan forårsage forskellige former for skeletdeformiteter i fiskeyngel. Rygmarvsdeformitet er set hos yngel af den australske ørred eksponeret for cadmium. I laboratorieundersøgelser er det påvist, at kobber kan forårsage deformiteter på skelettet og i nervesystemet på bl.a. zebrafiskeyngel. Kviksølv er formentligt det mest potente tungmetal, når det drejer sig om deformitetsdannelse i fiskeyngel. I laboratorieforsøg har både kviksølv og metylkviksølv kunnet deformere skelettet på fiskeyngel ved en eksponering for blot 5 ppb.

Flere af de udpegede kandidatstoffer har også hormonforstyrrende effekt på fisk og påvirker derved reproduktionen. Nonylphenol, bisphenol A, DEHP, PCB'er, DDT samt PAH'er kan påvirke hormonsystemet hos fisk. Litteraturen viser ikke en direkte sammenhæng mellem en hormonforstyrrende effekt og deformitetsdannelse. Det kan dog ikke udelukkes, at hormonforstyrrende mekanismer kan føre til deformiteter (Halling-Sørensen et al. 2008). Metallerne har ikke direkte hormonforstyrrende effekt, men kan til gengæld påvirke cellemembran, forstyrre enzymsystemer og ændre metabolismen af stoffer.

Halling-Sørensen et al. (2008) konkluderer, at udviklingen af skeletdeformiteter i fiskelarver og juvenile fisk synes at have baggrund i endnu ukendte mekanismer. En række miljøfarlige stoffer og metaller (se ovenfor) har alle evnen til at inducere disse effekter, og gennemgangen viser også, at der ikke er en klar sammenhæng mellem stof og type af misdannelse, idet flere forskellige typer af stoffer kan forårsage de samme skader.

Kilder og tilførsel af miljøfarlige stoffer til vandmiljøet

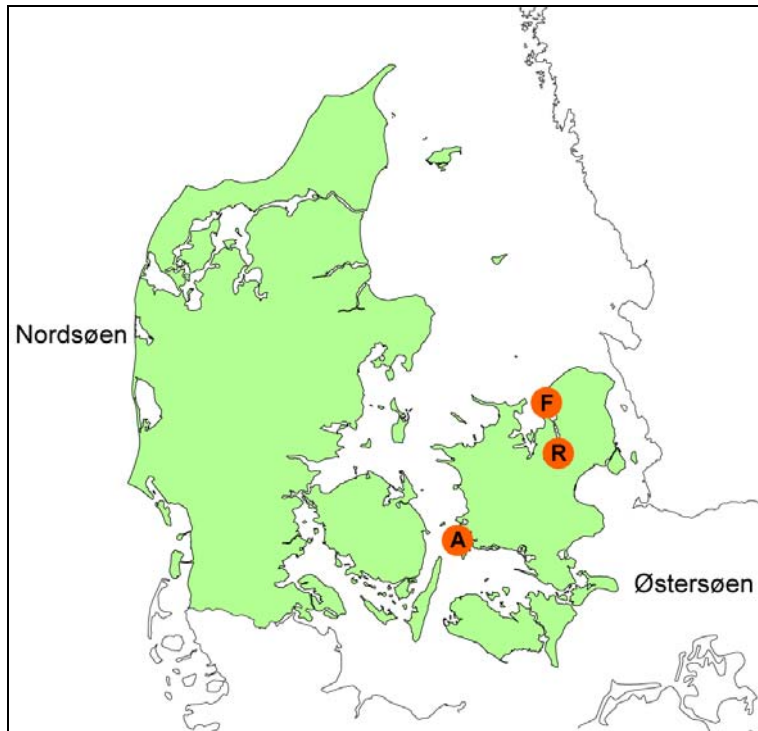
Vandområder kan potentielt tilføres miljøfarlige forurenende stoffer via spildevand fra bl.a. renselanlæg, ejendomme i det åbne land, overfladeafstrømning, afstrømning fra regnvandsbetingede udløb (fælles- og separatkloak), havbrug, industrier med særskilt udledning og landbrug. Herudover er der potentiel tilførsel fra forurenede grunde. Endvidere kan skibstrafik potentielt frigive giftstoffer fra skibsmalingen samt oliespild, og der kan spredes miljøfarlige stoffer i forbindelse med klapning, uddybning og oprensning af havne og sejltreder. Endelig kan der tilføres miljøfarlige forurenende stoffer via atmosfærisk deposition. For den enkelte lokalitet er det vigtigt at vurdere den samlede belastning fra alle kilder.

Landbrug kan være en væsentlig kilde til bl.a. kobber og cadmium. Havbrug kan være en kilde til kobber fra imprægnering af net og som hjælpestof, samt PCB'er, dioxin og dioxinlignende PCB'er via spild af fiskefoder. Skibstrafik kan være en væsentlig kilde til organotin, kobber og PAH'er. Oprensning og klapning af havnesedimenter kan potentielt sprede store mængder kobber, cadmium, kviksølv, PAH'er, PCB'er, dioxin og dioxinlignende PCB'er i miljøet. Kobber, kviksølv, cadmium, PAH'er, PCB'er, dioxin og dioxinlignende PCB'er kan også tilføres via atmosfærisk disposition.

Kildepåvirkning på de tre FORMÅL-lokaliteter

Generelt findes kun få og varierende data for tilførsel af miljøfarlige stoffer til vandområder i Danmark, og mange kilder er ikke opgjort. Med de foreliggende data er det ikke muligt at foretage detaljerede kvantitative lokale opgørelser af belastningen med miljøfarlige stoffer. I stedet er belastningen på de tre lokaliteter vurderet ud fra målte niveauer af miljøfarlige stoffer i muslinger, sedimenter og ålekvabber.

Undersøgelsen i FORMÅL fokuserer på nøje udvalgte lokaliteter, Agersø i Storebælt, og Roskilde Fjord ved hhv. Frederiksværk og Roskilde, hvor prøvetagningen af ålekvabber, muslinger og sediment blev gennemført i 2009 (*figur 1*).



Figur 1. Stationskort over de 3 undersøgelseslokaliteter: Agersø (A), Frederiksværk (F) og Roskilde (R).

Informationer og data om kilder til miljøfarlige stoffer på de tre lokaliteter er søgt i rapporter over opgørelse af punktkilder og basisanalyser for vanddistrikter.

Lokaliteterne er ikke belastet af klappladser, men spredning af miljøfarlige stoffer via ophvirvling af sedimenter forårsaget af bølger, stærk strøm og oprensning kan forekomme på alle lokaliteter. Kobber, kviksølv, kadmium, PAH'er, PCB'er, dioxin og dioxinlignende PCB'er kan tilføres vandmiljøet på de tre lokaliteter via atmosfærisk deposition, og landbrug kan være en væsentlig kilde til kobber og cadmium på alle lokaliteter.

Agersø

Lokaliteten ved Agersø er i projektet udpeget som referenceområde, idet forekomsten af misdannelser hos ålekvabber er lav. I oplandet findes en række kommunale og private renseanlæg, hvor flere renseanlæg har direkte udledning til havmiljøet. Der findes også flere industrier med særskilt udledning (bl.a. Stignæsværket, Harboe Bryggeri, Gulfhavn/Kuwait) samt et havbrug og saltvandsdambrug. Havbrug ved Agersø kan være en kilde til kobber fra imprægnering af net og som hjælpestof. PCB'er, dioxin og dioxinlignende PCB'er kan tilføres vandmiljøet via fiskefoder. Særligt ved Agersø, hvor skibstrafikken er stor,

kan tilførslen af organotin, kobber og PAH-forbindelser fra denne kilde være betydelig. Vandskiftet og hermed også fortyndingen af tilførte miljøfarlige stoffer vurderes at være relativt stor i området.

Roskilde

Området modtager vand fra renseanlæg bl.a. fra Roskilde by, hvor der er et større hospital. Der er ingen klappladser eller havbrug i vandområdet, men området er tæt på sejlrenden, som løber ind mod Roskilde havn. I oplandet er der, og har været, udledninger fra afværgeboringer ved forurenede industrigrunde. Der er også jordbrugsmarker, hvor overfladeafstrømning kan bidrage med tilførsler. Vandskiftet og hermed også fortyndingen af miljøfarlige stoffer vurderes at være relativt lille i området.

Frederiksværk

Oplandet er kendetegnet ved at have flere renseanlæg bl.a. Frederiksværk og Frederikssund. I oplandet er der, og har været, udledninger fra en række industrier med særskilt udledning bl.a. Dansteel. Der er ingen klappladser eller havbrug i vandområdet. Vandskiftet og hermed også fortyndingen af tilførte miljøfarlige stoffer vurderes at være middelstor i området.

Sammenhæng mellem tilførsler og koncentrationer

Koncentrationer af miljøfarlige stoffer i muslinger, sediment og ålekvabbe, samt variation over tid ved de tre lokaliteter, er tidligere rapporteret i FORMÅL (Dahl-löf & Strand 2010 a, b).

Koncentrationer i muslinger ses ofte som et mål for koncentrationen af miljøfarlige stoffer i vandsøjlen, som, alt andet lige, afspejler den aktuelle tilførsel af og belastning med miljøfarlige stoffer til vandmiljøet. Koncentrationen af kandidatstofferne i blåmuslinger indikerer, at tilførsel/belastning på de tre lokaliteter i 2009 var relativt ens, med undtagelse af PCB, hvor belastningen var markant højest ved Frederiksværk.

Modsat koncentrationen af miljøfarlige i blåmuslinger vil koncentrationen af miljøfarlige stoffer i overfladesediment afspejle tilførsel til og belastningen af lokaliteten over en længere tidsperiode, typisk år til årtier. Dette skyldes, at mange miljøfarlige stoffer bindes og ophobes i sedimenter dels pga. stoffernes affinitet for organiske stof og partikler, dels fordi nedbrydningen af miljøfarlige organiske stoffer generelt er langsommere ved reducerede iltforhold i sedimenter. I modsætning til blåmuslingedata indikerer resultaterne for tungmetaller, organotinforbindelserne TBT og DBT, PCB, dioxin og BFR relativt entydigt, at sedimenter ved Roskilde og Frederiksværk er markant højere belastet end sedimentet ved

referencestationen Agersø. Resultaterne for sediment indikerer desuden, at tilførslen til og belastningen af Roskilde og Frederiksværk tidligere må have været markant større end ved Agersø.

De målte koncentrationer i voksne ålekvabber stemmer bedst overens med koncentrationer og mønstret af miljøfarlige stoffer i sedimentet på lokaliteterne. Resultaterne indikerer, at ålekvabbers optagelse af miljøfarlige stoffer er domineret af optag via føden (bundlevende fauna), men at også optag af stoffer så som PFAS fra vandmassen kan være af betydning.

Ålekvabbens reproduktionscyklus

Ålekvabber yngler én gang om året, og kønsmodenhed indtræder i det andet leveår, når fiskene når en længde på 16-17 cm (Vetemaa et al. 1997). Voksne ålekvabber kan kønsbestemmes hele året rundt ud fra hannens parringsorgan, som er en forstørret kønspapil, eller i reproduktionsperioden på den forstørrede bug hos den drægtige hunålekvabbe.

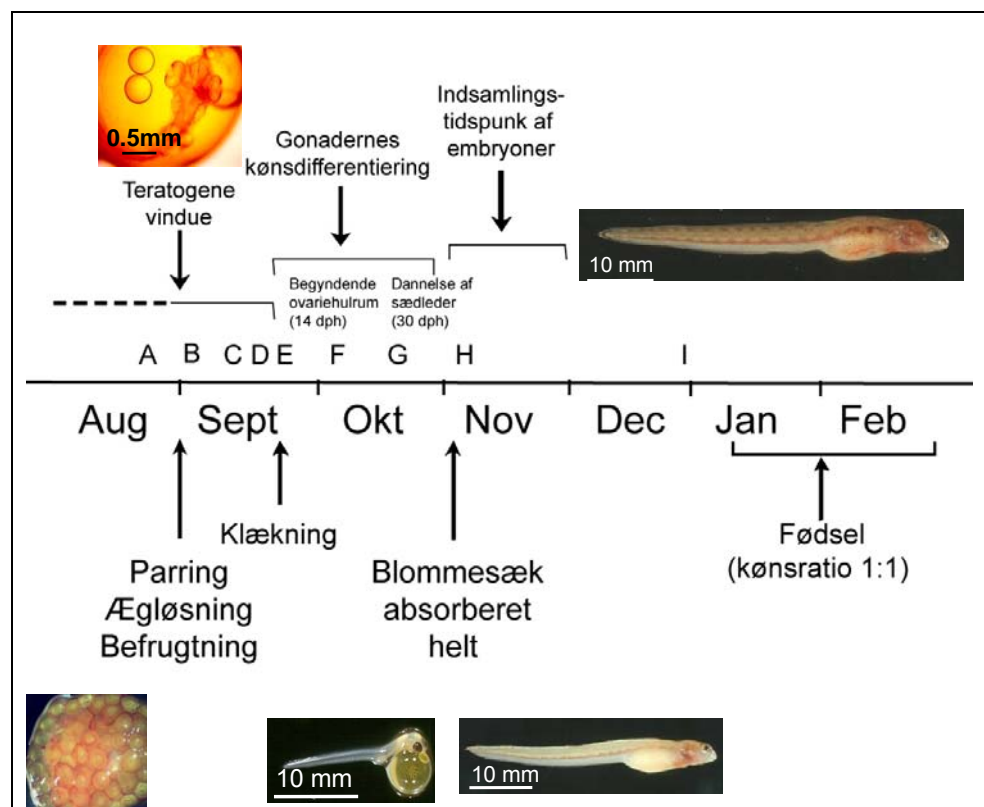
Testiklerne hos ålekvabben er et aflangt, parret organ, som har særligt store cylindriske nærings- og støttecelle for sædceller (Sertoli-celler) omkring og efter gydningstidspunktet (Christiansen et al. 2000; Christiansen et al. 1998). Hos hanålekvabber begynder spermatogenesisen i december/januar og varer indtil juli/august, hvor sædrørens sædvæske er fyldt med modnede sædceller (Christiansen et al. 1998; Kristoffersen & Pekkarinen, 1975). På grund af ålekvabbers indre befrugtning kan sædcellerne bevæge sig i sædvæsken i modsætning til forholdene hos fisk med ydre befrugtning (Rasmussen & Korsgaard 2004). Plasmakoncentrationen af det hanlige kønshormon 11-ketotestosteron (og testosteron) varierer hen over ynglesæsonen, idet den stiger gennem spermatogenesisen (februar-august) og falder drastisk i september (Larsson et al. 2002b). Under spermatogenesisen vokser testiklerne, og det gonade-somatiske indeks stiger fra 0,5 % i februar/marts til 2,5 % i august, hvorefter det falder drastisk, efter at gydning har fundet sted (Ronisz et al. 1999; Vetemaa et al. 1997).

Hos ålekvabbekvabben omfatter reproduktionscyklus og ægdannelsen (oogenesis) en intensiv periode i forårs- og sommermånederne, hvor blommemateriale inkorporeres i oocytterne (vitellogenese) (Korsgaard 1994a; Korsgaard & Petersen 1979). Efterfølgende kommer ægløsning, befrugtning og drægtighedsperiode fra september til og med februar. I ovariets epitel ligger en reservepulje af tidlige primære oocytter (0,3 mm), som begynder at modne omkring et år før ægløsning i august/september det efterfølgende år (Gotting 1976; Korsgaard 1983; Rasmussen et al. 2002a; Vetemaa et al. 1997). Plasmakoncentrationen af det hunlige kønshormon 17 β -østradiol varierer hen over sæsonen, idet den stiger

fra februar til maj og holder sig relativt lav under drægtigheden (Korsgaard 1994a; Larsson et al. 2002a). Under oogenesis og vitellogenese vokser ovariet, og det gonade-somatiske indeks stiger markant fra omkring 1 % i maj til omtrent 30 % lige før fødsel i januar/februar, hvorefter det falder drastisk, efter fødslen har fundet sted (Ronisz et al. 1999; Vetemaa et al. 1997).

Udvikling af ungerne i ovariet

Hos ålekvabben sker ægløsning, parring og befrugtning umiddelbart efter hinden sidst i august - tidligt i september (Korsgaard 1986; Korsgaard & Petersen 1979; Rasmussen et al. 2006), og processerne foregår synkront i populationen (figur 2). I nærværende projekt (i 2010) skete befrugtningen i ugen mellem 1. og 7. september, mens den i 2011 skete en uge tidligere (upublicerede resultater fra SDU).



Figur 2. Ålekvabbens reproduktionscyklus fra ægløsning til fødsel (fra Stuer-Lauridsen et al. 2008). Billeder fra Rasmussen et al. (2006).

Æggene (3 mm) frigives til ovariehulrummet, lige før befrugtningen finder sted, og efter befrugtningen forbliver æggene i hunnens ovariesæk. Embryonerne

klækker ca. 3 uger efter befrugtningen (sidst i september) med længder på 8-10 mm, og de ligger frit i ovariet omgivet af en såkaldt ovarievæske, hvilket er den eneste forbindelse mellem unger og moderfisk (Korsgaard 1983; Korsgaard & Petersen 1979; Kristofferson et al. 1973).

Ungernes blommesækfase varer ca. en måned (oktober), hvor deres vækst hovedsagelig er afhængig af den næringsrige blommesæk, men også til dels af næringsstoffer fra moderfisken (Korsgaard 1986). Det er under denne periode i udviklingen, det så kaldte teratogene vindue, ungerne antages at være mest følsomme overfor negativ påvirkning.

Efter absorptionen af blommesækken og indtil fødslen følger en periode med intensiv vækst, hvor ungerne vækst og udvikling udelukkende afhænger af optagelse af næringsstoffer fra moderfisken, dels via ovarievæsken (Korsgaard & Andersen 1985), dels som foreslået af Skov et al. (2010) via embryonerne 'dien' på dievortelignende follikler i ovarievæggen. Ungernes bagtarm er forstørret og specialiseret til at kunne optage.

Før klækning samt i en kort periode lige efter klækning er ovariet karakteriseret ved store væskefyldte follikler og meget lidt ovarievæske i ovariehulrummet. Efter klækning foregår der et pludseligt skifte i produktionen og fordelingen af væske i ovariet. Mængden af ovarievæske i ovariehulrummet øges markant sideløbende med, at væsken i folliklerne svinder ind (Korsgaard 1986). Ålekvabben har et tæt maternalt-føtalt forhold, idet næringsstoffer (aminosyrer, kulhydrater, lipider), kalcium og ilt, som er essentielle for ungerne vækst og udvikling, transporteres fra moderfiskens blodbane til ovarievæsken, hvor ungerne opholder sig, og hvorfra de indtager deres næring under store dele af deres udvikling i ovariet (Broberg & Kristoffersson 1983; Korsgaard 1983; Korsgaard 1986; Korsgaard 1987; Korsgaard 1992; Korsgaard 1994a; Korsgaard 1994b; Korsgaard 1994c; Korsgaard & Andersen 1985; Weber & Hartvig 1984).

Ungerne er i stand til både at optage og metabolisere nitrogenholdige næringsstoffer og inkorporere dem i væv samt udskille dem (Korsgaard 1994a; Korsgaard 1997). Ungerne optager desuden store mængder kalcium fra ovarievæsken til skeletdannelsen (Korsgaard 1994a). Ovariets tilstand og ovarievæskens biokemiske miljø er derfor meget vigtige for opretholdelse af det normale maternale-føtale forhold og dermed meget vigtige for ungerne almene tilstand (Korsgaard 1994a; Korsgaard 2005; Rasmussen et al. 2002a).

Ungernes vækstrate (længde og vægt) er synkron i et kuld og til dels også mellem kuld, og i de første måneder er ungerne vækstrate næsten lineær (Kors-

gaard & Andersen 1985; Rasmussen et al. 2006; Vetemaa et al. 1997). Ungerne bliver født fuldt udviklede og kønsdifferentierede i januar-februar fem til seks måneder efter befrugtningen. Den naturlige kønsfordeling er 50 % hanner og 50 % hunner (Larsson & Forlin 2002; Larsson et al. 2000; Rasmussen et al. 2002b).

Afhængig af moderfiskens størrelse (længde) fødes 20-200 (maksimalt 400) unger i et kuld (Gotting 1976; Vetemaa et al. 1997), og afhængig af kuld størrelsen er ungerne ca. 40-55 mm lange ved fødslen (Rasmussen et al. 2006). De er mere glasklare, men ellers ligner de den voksne fisk. Under normale omstændigheder dør nogle få procent af de nyudklækkede embryoner, hvorimod dødeligheden i senere udviklingsstadier er meget lav (Jacobsson et al. 1986).

Effekter af miljøfarlige stoffer i ålekvabbe

Dette afsnit er en samlet analyse baseret på felt- og laboratorieundersøgelserne gennemført i FORMÅL-projektet med supplerende data fra overvågningsprogrammet samt EU-BONUS-projektet BALCOFISH. I samarbejde med BALCOFISH har vi kunnet supplere FORMÅL med analyser af miljøfarlige stoffer i unger fra Agersø 2009. Disse data findes i den opdaterede version af Annex I, som erstatter udgaven fra 2010.

Misdannelser i danske ålekvabber 2004-2010

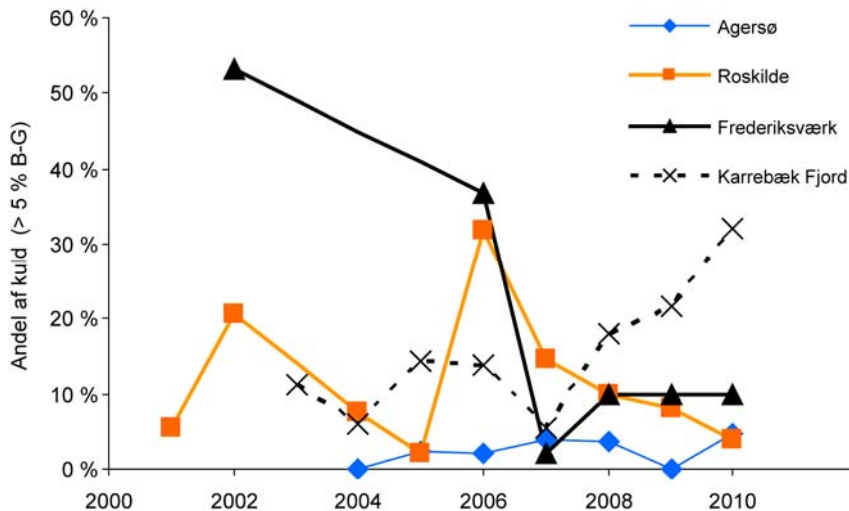
Fejludviklede unger hos ålekvabbeunger kan inddeles i 10 forskellige typer som beskrevet i den tekniske anvisning for NOVANA (Strand & Dahllöf 2005) (tabel 1).

Tabel 1. Karakterisering af forskellige typer af fejludviklede unger i kuld fra ålekvabbe (efter Strand & Dahllöf 2005).

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

Forekomsten af misdannelser i kuld fra ålekvabber er efter en indledende undersøgelse i 2001-2002 (Strand et al. 2004) blevet undersøgt årligt i perioden 2004-2010 i en række danske kystnære områder som en del af det nationale overvågningsprogram for vandmiljø og natur (NOVANA). Undersøgelserne har omfattet de tre undersøgelsesområder, som indgår i FORMÅL-projektet: Agersø i Storebælt og Roskilde Fjord ved Roskilde Bredning samt ved Frederiksværk.

Det mindst belastede område ved Agersø har gennemgående en lavere andel af kuld med misdannelser end områderne ved Roskilde og Frederiksværk. Ved Agersø har generelt < 5 % af kuldene en forhøjet forekomst af misdannelser af type B-G, hvorimod disse misdannelser findes i > 5 % af kuldene ved Roskilde og Frederiksværk. Der er også en væsentlig år til år variation i forekomsten af misdannelser, hvor niveauerne i Roskilde og Frederiksværk er blevet lavere i de seneste år (figur 3).



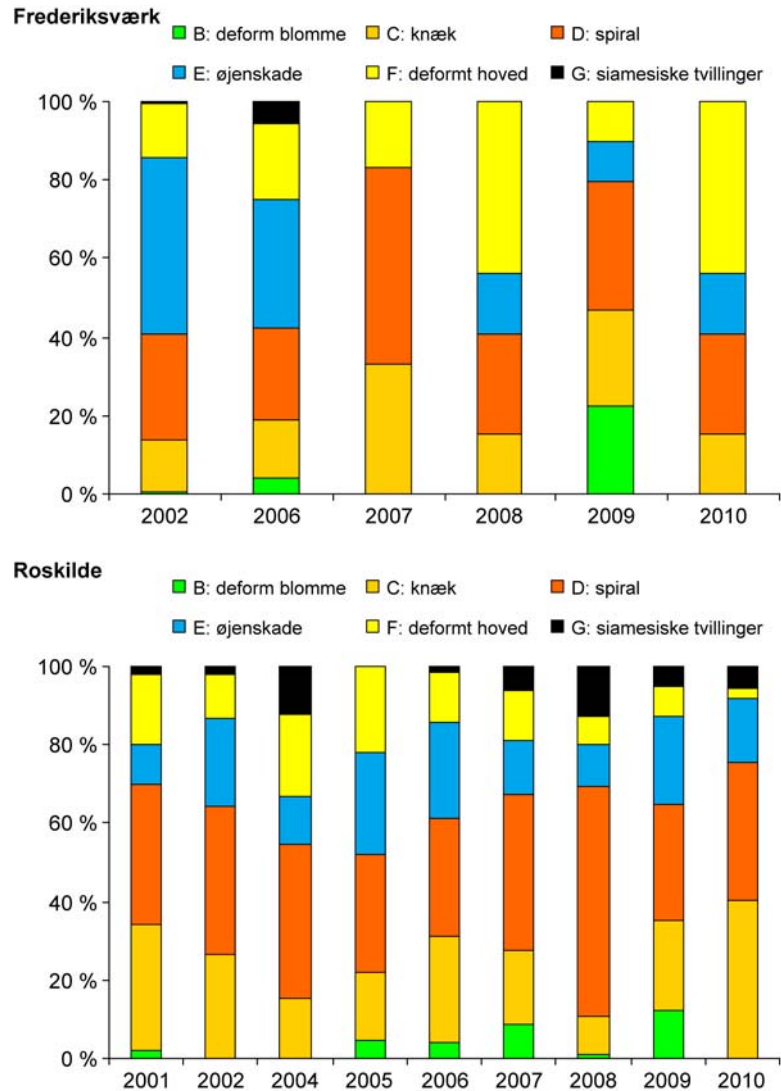
Figur 3. Den tidsmæssige udvikling (2001-2010) i andelen af ålekvabækuld med en øget forekomst af misdannelser af type B-G fra de tre FORMÅL-lokaliteter samt Karrebæk Fjord. Data er fra FORMÅL, NOVANA eller Strand et al. (2004).

Til forskel fra Roskilde og Frederiksværk er der i de seneste år observeret en stigning i niveauerne af misdannelser i NOVANA-området ved Karrebæk Fjord.

Fordelingen af de enkelte typer af deformiteter af type B-G gennem årene giver et uddybet billede af variation inden for og mellem områder (figur 4).

Der er større år til år variationer i typefordeling ved Frederiksværk end i Roskilde, og specielt øjenskade varierer kraftigt ved Frederiksværk. I starten af undersøgelserne var andelen af øjenskader stor, mens de ikke var til stede i 2007 og efterfølgende har udgjort en lavere andel. I Roskilde er typefordelingen mere ens over tid, og til forskel fra Frederiksværk findes der oftere siamesiske tvillinger.

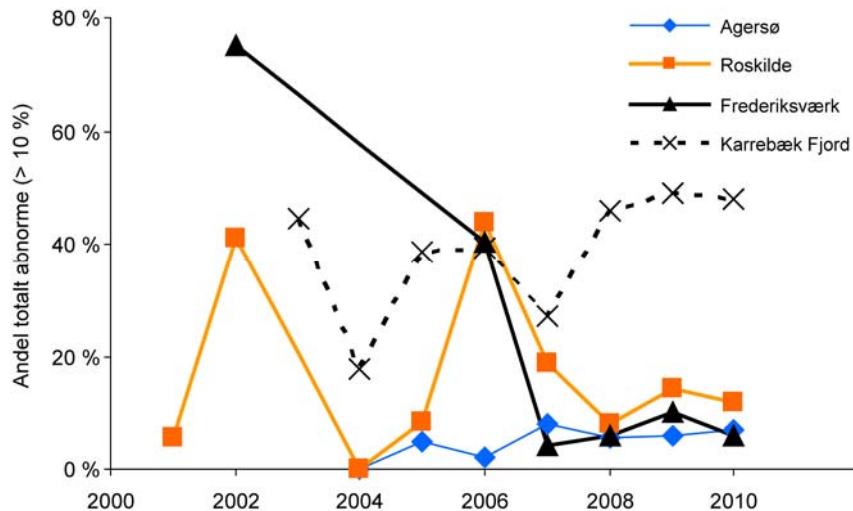
De samme overordnede tendenser som for type B-G gør sig gældende for andelen af kuld med en øget forekomst af totalt abnorme unger (dvs. > 10 % af både tidligt og sent døde unger, misdannede unger og dværge) (figur 5).



Figur 4. Relativ fordeling af deformiteter af type B-G ved Frederiksværk og Roskilde.

Igen er der store variationer mellem år og mellem lokaliteter, men totalt abnorme følger ikke altid mønstret for type B-G. Karrebæk Fjord har fx i en række år en højere andel totalt abnorme unger end Roskilde i forhold til deres niveauer af type B-G.

Variationer mellem stationer, og mellem år inden for stationer, må betyde, at det er lokale miljøforhold og variation i kildetilførsler, som ligger til grund for de områdemæssige forskelle i både de observerede niveauer og de tidsmæssige udviklinger.



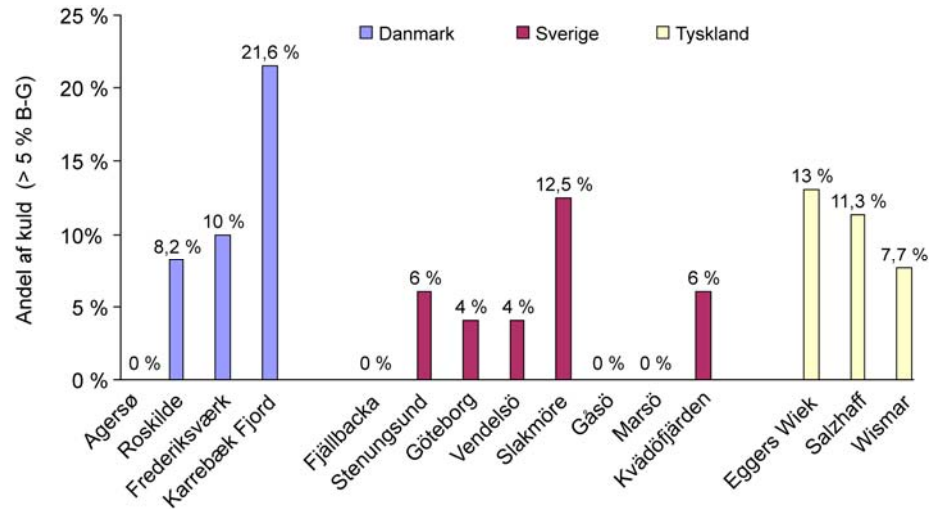
Figur 5. Den tidsmæssige udvikling (2001-2010) i andelen af ålekvabbekuld med totalt abnorme unger (>10 %) fra de tre FORMÅL-undersøgelelsesområder samt Karrebæk Fjord. Alle data er fra NOVANA eller Strand et al. (2004).

Misdannelser i danske ålekvabber i et internationalt perspektiv

Ålekvabbe er i en årrække blevet anvendt som indikatorart for både biologiske effekter og miljøfarlige stoffer i fisk i forbindelse med regionale og nationale overvågningsaktiviteter i flere af vores nabolande omkring Østersøen, herunder Tyskland og Sverige (Hedman et al. 2011). Ligesom i de danske undersøgelser under NOVANA-programmet er forhøjede frekvenser af misdannelser i kuld fra ålekvabbe i Sverige og Tyskland især fundet i områder tæt på byer og industri (bl.a. Vetema et al. 1997; Gercken et al. 2006). I flere af disse undersøgelser er der udover misdannelser også observeret en øget forekomst af fejludvikling som tidligt og sent døde unger hos ålekvabbe. En russisk undersøgelse har også i de voksne ålekvabber fundet flere misdannelser i områder, som anses som mere belastede (Yershov 2008).

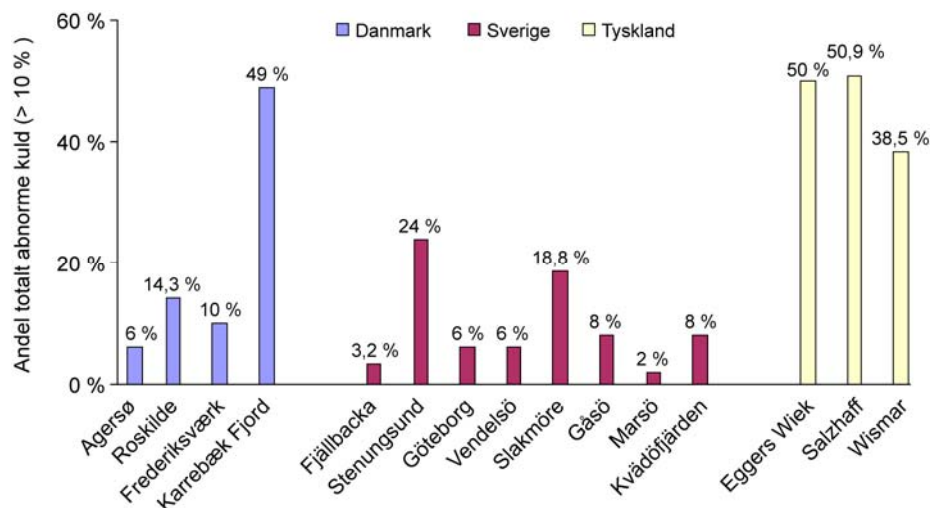
I 2009 er der ligesom i Danmark udført undersøgelser i både Tyskland og Sverige. Resultaterne er blevet sammenstillet indenfor BONUS+-projektet BALCO-FISH.

Der er betydelige geografiske forskelle i forekomsten af kuld med en øget andel af misdannelser af type B-G (figur 6). De højeste niveauer findes i Karrebæk Fjord efterfulgt af stationer ved den tyske Østersøkyst, den mest indelukkede station på den svenske østkyst samt Roskilde og Frederiksværk. De laveste niveauer forekommer ved Agersø samt i områder på den svenske vest og østkyst.



Figur 6. Sammenstilling af danske, svenske og tyske data fra 2009 for andelen af ålekvabbekuld med en øget forekomst af misdannelser (> 5 % type B-G). Data fra BALCO-FISH.

Der er også geografiske forskelle i andelen af kuld med > 10 % totalt abnorme unger, men mønsteret er lidt anderledes (figur 7).



Figur 7. Sammenstilling af danske, svenske og tyske data fra 2009 for andelen af ålekvabbekuld med en øget forekomst af totalt abnorme unger (>10 %). Data fra BALCO-FISH.

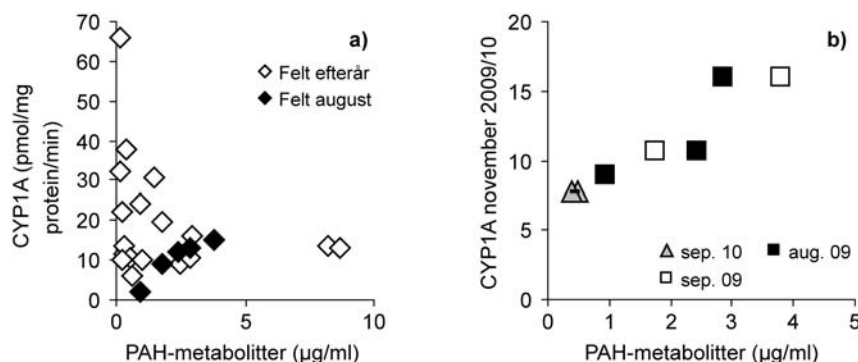
Niveauerne er her højest ved den tyske Østersøkyst og ved Karrebæk Fjord. Roskilde og Frederiksværk kan i denne sammenhæng betragtes som medium

høje i 2009. Blandt de svenske områder ses, at Slakmöre og Stenungsund, som er domineret af petrokemisk industri, har relativt høje niveauer af fejludviklede unger.

Biomarkører i forhold til miljøfarlige stoffer og misdannelser

Biomarkører forventes at kunne fortælle om eksponering for stoffer, men også om ålekubbens fysiologiske tilstand. CYP1A-aktivitet er brugt som et mål for eksponering for organiske stoffer, som inducerer produktion af CYP1A-enzymet, fx PAH'er og dioxiner.

Der er en sammenhæng mellem CYP1A-aktivitet og PAH-metabolitter i august, dog med forbehold for at datagrundlaget er begrænset (figur 8a). Denne sammenhæng ses dog ikke i november (figur 8b). Derimod er der en indikation af, at CYP1A-aktiviteten i november nogenlunde svarer til PAH-metabolitter i august – dog igen baseret på et begrænset datagrundlag.



Figur 8. Sammenhæng mellem PAH-metabolitter i galde (målt som 1-hydroxypyren ækvivalenter) og CYP1A-aktivitet (målt som EROD), hvor a) målingerne er foretaget på samme tidspunkt, og b) hvor CYP1A-aktiviteten er målt i november 2009 og PAH-metabolitter ca. 2 måneder tidligere.

Når ålekvabber bliver eksponeret for olie ved injektion, går der tre dage inden niveauerne af CYP1A-enzymet er forskellige fra kontroller (Celander et al. 1994). Enzymniveauet forblev på det forhøjede niveau 14 dage efter eksponering, hvor forsøget blev afsluttet (Celander et al. 1994). Der er også rapporteret enzymstabilitet i 28 dage i andre fisk (Zapata-Pérez 2002). På baggrund af dette kan det være rimeligt at antage, at niveauer målt i november svarer til eksponering langt tidligere. Det kræver dog flere feltdata, inden denne sammenhæng kan etableres med sikkerhed.

Andre mulige biomarkører såsom vitaminer og hormoner, som også kan have betydning for udvikling af unger, blev målt i feltstudiet i 2009, og resultaterne er tidligere beskrevet i rapporten "Biomarkører i ålekvabbe" (Strand & Dahllöf 2010). Her fandtes indikationer på, at vitaminniveauerne i hunner ved Agersø var højere end i fisk fra Roskilde og Frederiksværk og omvendt, at steroidniveauet var lavere, men datagrundlaget må betragtes som svagt.

Sammenhæng mellem miljøfarlige stoffer og misdannelser

I eksponeringsforsøget, hvor ålekvabbehunner blev injiceret med enkeltstoffer eller blandinger (Tabel 2), fandtes ikke direkte additive effekter, når eksponering for såvel enkeltstoffer som blandinger blev inkluderet (Brande-Lavridsen et al. 2011). Effekter af pyren og dioxin (TCDD) var fx på størrelse med eller større end effekterne, hvor disse stoffer indgik i blandinger i de samme koncentrationer. Endvidere svarede effekterne af blandingen Dk10 omtrent til effekt af kun pyren ved lavere koncentrationer.

Tabel 2. Forsøgsgrupper og eksponeringsniveau af stoffer.

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

En årsag til mangel på simple sammenhænge kan være, at der er interaktion, når stofferne forekommer i blandinger. De stoffer, som blev brugt i forsøget, tilhører forskellige kemiske stofgrupper, men påvirker mange af de samme enzymsystemer i cellerne. Dette betyder, at når stoffer forekommer i blandinger, kan effekten af det ene modvirkes af et andet. At kvantificere disse interaktioner kræver en forsøgsopstilling, som er mere kompleks end den, der blev benyttet i denne undersøgelse.

Derimod var der sammenhæng mellem effekter af tre af blandingerne, som indgik i forsøget. Effekterne, andel misdannelser af type B-G, af den blanding, som indeholdt 6 stoffer (Dk50+), var en sum af effekterne af blandingerne Dk50 og

Dk+, som hver indeholdt tre af stofferne (se tabel 1 i Brande-Lavridsen et al. 2011).

Denne sammenhæng er her undersøgt yderligere ved brug af multivariat regression (PLS - partial least square, *Dayal et al. 1997*) ved at konstruere modeller for, hvordan koncentrationen af de forskellige stoffer i æg og unger kan forklare andelen af misdannelser af type B-G og andelen af totalt abnorm yngel. Stabiliteten af modellen vurderes ved brug af kryds-validering (Wold 1978) og signifikante x-variabler vurderes ved Martens usikkerhedstest (Martens & Martens 2000). Modellerne er efterfølgende brugt til at forudsige (prædiktere) andelen af misdannelser i Agersø, Roskilde og Frederiksværk, baseret på data for miljøfarlige stoffer i æg og unger indsamlet i 2009 (Dahlöf et al. 2010a). Til modelleringen blev softwaren Unscramble version X (www.camo.no) benyttet.

Forudsætninger for modelleringen

I multivariat-modellering er det en forudsætning, at der er adgang til et større datasæt med mange prøver (mindst 4) og x-variabler. Da de modeller, vi her kan konstruere, indeholder det lavest anvendelige antal prøver, skal resultaterne fortolkes med forsigtighed. Modelleringen giver dog en mulighed for at øge forståelsen af sammenhæng mellem miljøfarlige stoffer og misdannelser.

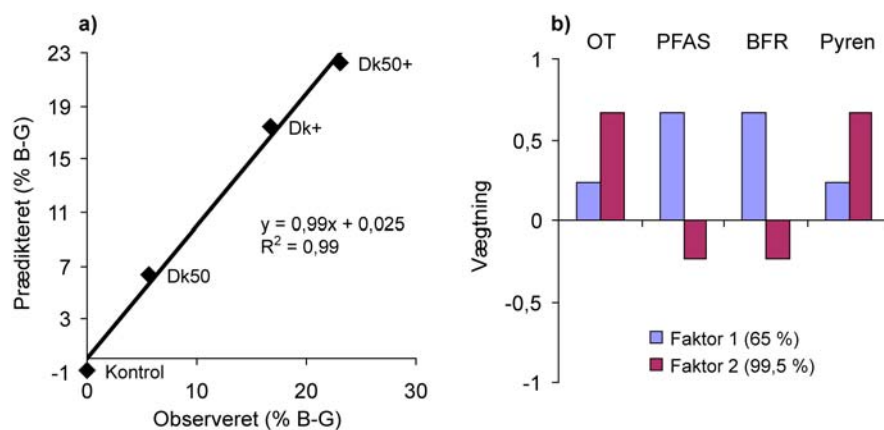
Koncentrationer af miljøfarlige stoffer i æg og unger fra forsøget (x-variabler i modellerne) blev kun målt på Dk50+ og kontrolgrupperne. Koncentrationer af stoffer i Dk+ er derfor sat til de målte koncentrationer af PFOS, BFR og nonylphenol i Dk50+, samt koncentrationerne for TBT, TCDD og PAH fra kontrolfisk. På tilsvarende måde er der til Dk50 brugt koncentrationer af stofferne TBT, TCDD og PAH målt i Dk50+, og koncentrationerne af PFOS, BFR og nonylphenol er fra kontrol. PAH-metabolitter i galde fra hunner i august respektive november blev brugt som proxy for pyreneksponering. Eftersom PFOS, BDE-47 og TBT i forsøget blev brugt som modelstoffer for eksponering af grupperne perfluorerede stoffer, bromerede flammehæmmere, og summen af organotinforbindelserne tributyltin (TBT) og triphenyltin (TPhT) er koncentrationer fra feltstudiet grupperet på tilsvarende måde. Tilsvarende blev toksiske ækvivalenter (TEQ) brugt som samlet vurdering af eksponering for dioxiner og dioxinlignende PCB'er. Nonylphenol indgik desværre ikke i modellerne, da der ikke fandtes data for stoffet fra feltstudier.

Effekterne (y-variabler i modellerne) er angivet som % af hunner med > 5 % type B-G-misdannelser i kuld eller som % af hunner med > 10 % totalt abnorme unger i kuld.

Sammenhæng mellem eksponering målt i æg og misdannelser

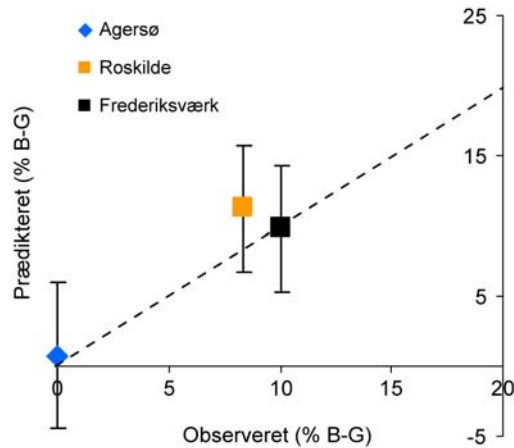
I modellerne af sammenhæng mellem koncentrationer af miljøfarlige stoffer i æg og misdannelser bruges som udgangspunkt de kemiske målinger for organotin (OT), bromerede flammehæmmere (BFR), perfluorerede forbindelser (PFAS) samt pyren (x-variabler). Dioxin TEQ og nonylphenol er udeladt fra modellen, da der ikke findes data for æg fra Agersø og Frederiksværk.

Der kunne etableres en signifikant model for misdannelser af type B-G (figur 9a) og eksponering i æg ved brug af to faktorer. Samtlige x-variabler bidrog signifikant til modellen, hvor BFR og PFAS bidrog mest til den første faktor, men med bidrag fra organotin (OT) og pyren. Organotin og pyren dominerede faktor 2, hvor BFR og PFAS påvirkede negativt (figur 9b).



Figur 9. a) Forhold mellem observerede og af modellen prædikterede misdannelser af type B-G fra ålekvabbeforsøget. b) x-variablenes indflydelse på de to faktorer i modellen. Tal i () angiver den forklarede varians ved brug af hhv. 1 og 2 faktorer.

Denne model, baseret på data fra forsøget, blev brugt til at forudsige misdannelser i feltpopulationer ud fra kemiske målinger i æg foretaget i 2009. Der var en god overensstemmelse mellem det prædikterede gennemsnit og de målte andele kuld med misdannelser af type B-G, men med store usikkerheder (figur 10).



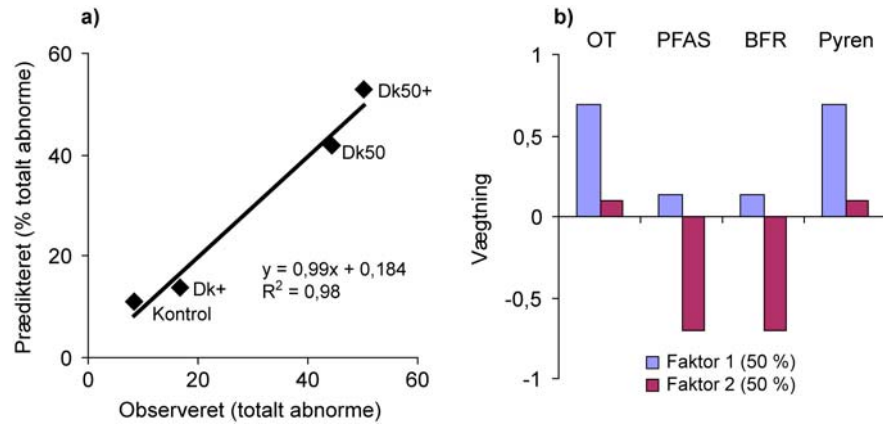
Figur 10. Forhold mellem observerede og af modellen prædikterede misdannelser af type B-G i felten. Den stiplede linje angiver 1:1 forhold mellem observerede og prædikterede effekter.

Det blev også undersøgt, om nogle af stofferne kunne udelades fra modellen og derved forbedre forudsigelsen, men det var ikke tilfældet. Modellerne baseret på forsøget blev stærke, men de prædikterede niveauer blev konsekvent overestimerede (data ikke vist). Resultatet fra modelleringen understøtter derfor antagelsen om, at der er interaktion mellem de forskellige stofgrupper, selv om disse interaktioner ikke direkte kan udledes fra modellen.

Desuden tyder afprøvningen af variationer af modellen på, at der ikke kan udpeges én stofgruppe som hovedansvarlig eller som uvedkommende for effekterne, men at det er den samlede påvirkning af mange stofgrupper, som er af betydning. Derved er det også forståeligt, at de fire stofgrupper, som indgik, ikke er nok til fuldkommen at forklare effekterne i miljøet, og at usikkerhederne er omfattende.

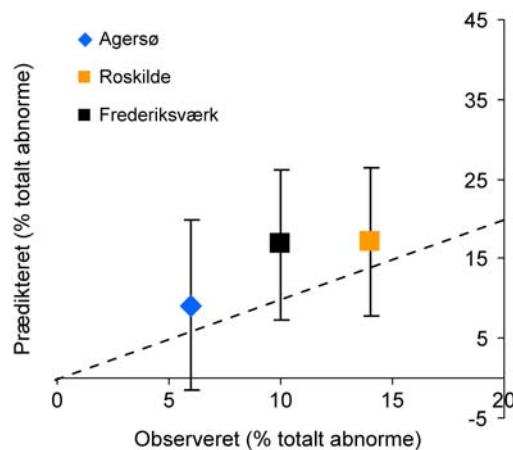
Den eneste af de to andre enkelt-typer af misdannelser, type 0 og I, som resulterede i en signifikant model, var type 0, hvor pyren og TBT var de eneste faktorer, som havde indflydelse. Men modellen var svag og prædikteringen af misdannelser i felten gav meget store usikkerheder.

Derimod var det muligt at etablere en sammenhæng mellem andel kuld med abnorme unger (> 10 %), hvor type 0, I og B-G er slået sammen, og målinger i æg. I dette tilfælde er modellen også signifikant, men mindre stærk (figur 11a), og indflydelsen af de signifikante variabler afspejler (figur 11b) en kombination af modellen for type B-G og type 0.



Figur 11. a) Forhold mellem observerede og af modellen prædikterede andel misdannede ålekvabbe-kuld med > 10 % abnorme unger. b) x-variablenes indflydelse på modellen. Tal i () angiver den forklarede varians ved brug af hhv. 1 og 2 faktorer.

Prædikteringen af andel kuld med > 10 % abnorme unger overvurderer effekterne (figur 12), og usikkerhederne er langt større end for prædikteringen af type B-G. Igen er fejlen i forudsigelsen sandsynligvis et resultat af, at der er flere stofgrupper, som påvirker udviklingen af unger. At usikkerheden i dette tilfælde er endnu større end for type B-G alene kan skyldes, at også andre stressfaktorer såsom iltsvind er af betydning.



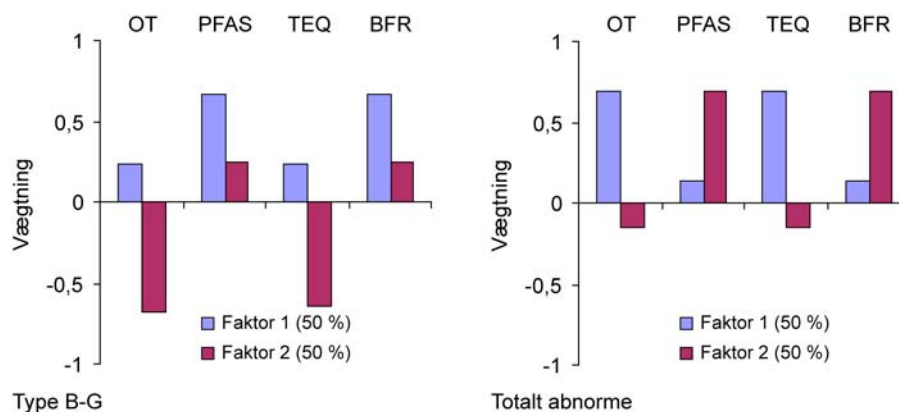
Figur 12. Forhold mellem observerede og af modellen prædikterede andel ålekvabbe-kuld med > 10 % abnorme unger. Den stiplede linje angiver 1:1 forhold mellem observerede og prædikterede effekter.

Sammenlignes de stoffer, som påvirkede modellernes faktorer for type B-G og totalt abnorme unger, ser det ud til, at stofgrupperne, som er sværere at omsæt-

te (PFAS og BFR), har større indflydelse på type B-G end på type I og 0. Omvendt har organotin og pyren større betydning for type I og 0. Organotin og PAH'er har en højere akut toksicitet end PFAS og BFR, hvilket kan forklare deres større bidrag til type 0 (tidligt døde unger). Det bør også bemærkes, at Stevnungsund, som er domineret af petrokemiske kilder, var den af de svenske lokaliteter, som i 2009 havde størst forskel mellem type B-G og totalt abnorme unger.

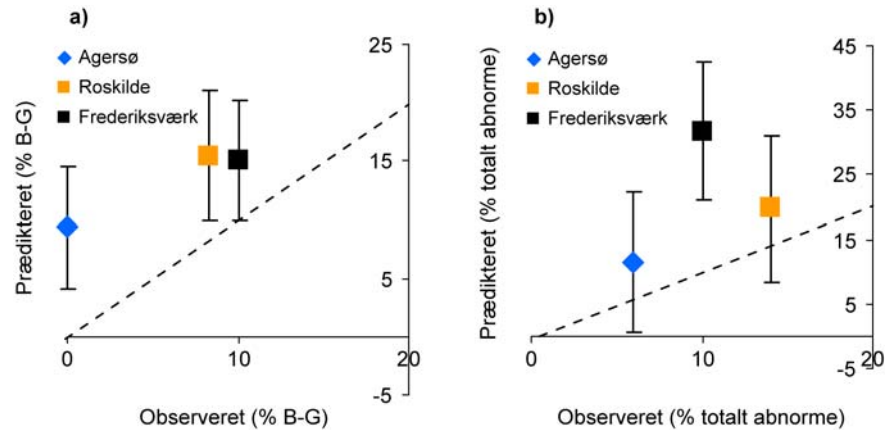
Sammenhæng mellem eksponering målt i unger og misdannelser

På tilsvarende måde som for æg blev der, baseret på målinger i unger, lavet modeller, som inkluderede TEQ. De stofgrupper, som kom ud som signifikante, var forskellige fra modellerne baseret på æg (figur 13), hvilket kan skyldes, at flere stofgrupper var med fra starten, men også at indholdet i unger er et resultat af optag og metabolisme igennem de to måneder efter eksponering.



Figur 13. X-variablenes indflydelse på modellerne for misdannelse af type B-G samt totalt abnorme kuld. Tal i () angiver den forklarede varians ved brug af hhv. 1 og 2 faktorer.

Selv om modellerne baseret på data fra forsøget var signifikante, er der en større overestimering af andelen af misdannelser i felten (figur 14a, b) end i modellerne baseret på målinger i æg (figur 10, 12).



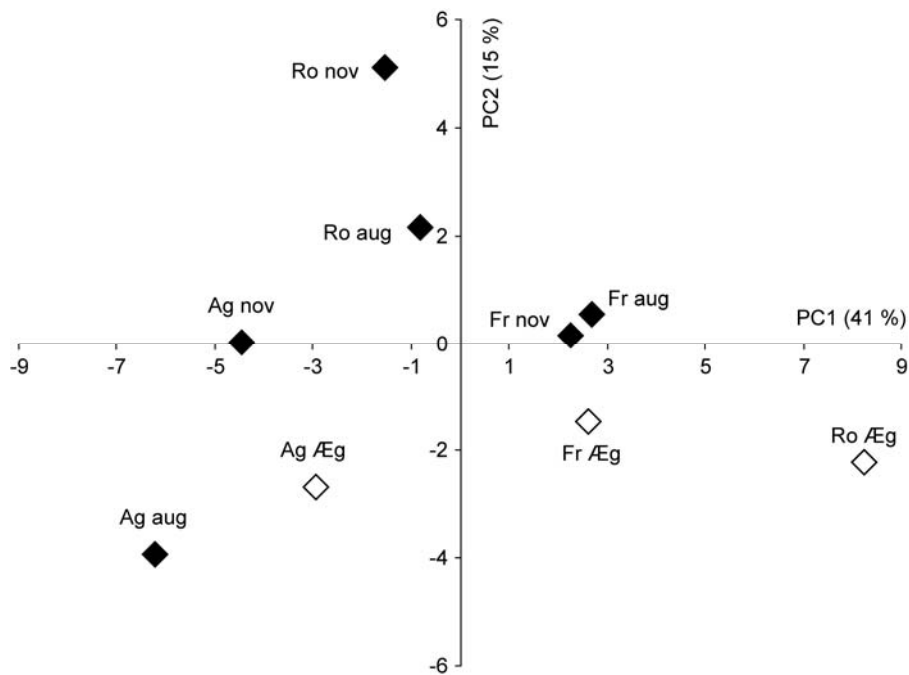
Figur 14. Forhold mellem observerede og af modellen prædikterede a) andel kuld af type B-G og b) andel kuld med > 10 % abnorme unger. Den stiplede linje angiver 1:1 forhold mellem observerede og prædikterede effekter.

Denne overestimering viser, at de observerede effekter i ringere grad kan tilskrives indholdet af miljøfarlige stoffer i unger end indholdet i æg. Dette er i overensstemmelse med, at det teratogene vindue, dvs. den mest følsomme periode i udviklingen af unger, er i den tidlige udviklingsfase. At modellerne baseret på eksperimentet alligevel blev signifikante skyldes formentligt, at alle hunner blev eksponerede én gang på det samme tidspunkt, og med ens blandinger. Det betyder, at der er entydig sammenhæng mellem eksponering i æg og de resulterende koncentrationer i ungerne i forsøget. Denne sammenhæng kan ikke forventes i felten, hvor der mellem hunner dels er større variation i tidspunkt for og størrelse af eksponering helt fra starten af den reproduktive periode, men også en kontinuerlig eksponering gennem efteråret.

For at styrke en fremtidig forståelse af sammenhæng mellem eksponering for forskellige stofgrupper og misdannelser, vil det være bedre at måle miljøfarlige stoffer i august end i november. Indsamling af et tilstrækkeligt antal hunner til at opnå nok prøvemateriale i form af æg betyder dog en større reduktion af populationen af reproduktive hunner. Et alternativ kunne være at måle miljøfarlige stoffer i muskler. For at afprøve dette blev indhold af miljøfarlige stoffer i muskel fra ålekvabbehunner og i æg målt i 2009 sammenlignet i en multivariat analyse (PCA).

Sammensætningen af miljøfarlige stoffer i æg fra Roskilde ligner mere indholdet i hunner fra august end fra november, hvilket også er tilfældet for Agersø, men forskellen er mindre (figur 15). For Frederiksværk derimod, er sammensætningen i muskler næsten ens i august og november. Det skal dog bemærkes, at der indgår flere analyser for Roskilde end for Agersø og Frederiksværk, idet di-

oxiner og dioxinlignende stoffer samt blodgørere ikke blev målt i æg på disse lokaliteter.



Figur 15. Sammenligning af det totale indhold af miljøfarlige stoffer i ålekvabbe ved brug af PCA. Sorte symboler er muskler fra hunner og hvide er æg. Ag, Ro og Fr er hhv. Agersø, Roskilde og Frederiksværk.

Selv om koncentrationerne i hunner i august ligner indholdet i æg, er der ikke helt sammenfald. For Roskilde, hvor flere stoffer indgår i analysen, er dette mest tydeligt. Dette skyldes formentlig, at koncentrationer i hunner varierer meget, idet stofferne fjernes fra hunnen og overføres til æg under hele vitellogenese fra det sene forår og gennem sommeren. Derfor angiver anbefalinger til rumlig og tidsmæssig monitoring af miljøfarlige stoffer i fisk som ålekvabbe i Østersøregionen, fx HELCOM-COMBINE (HELCOM 2006), at belastningsgraden måles i hanner, da de ikke udskiller de miljøfarlige stoffer i samme grad som hunner i forbindelse med deres reproduktion.

Konklusioner og anbefalinger

Konklusioner

- Der er interaktioner mellem stoffer i blandinger, såvel forstærkende som hæmmende, og derfor kan kombinationseffekter ikke udledes fra forsøg kun med enkeltstoffer.
- En stærkere sammenhæng mellem misdannelser i ålekvabbeunger og belastning med miljøfarlige stoffer i æg end i unger peger på, at det er eksponering i det såkaldte teratogene vindue i starten af embryoudviklingen, som er af størst betydning.
- Stoffer, som er mere akuttoksiske, fx organotin og PAH'er, ser ud til at have større betydning for udvikling af tidligt døde unger.
- Stoffer, som ikke er så akuttoksiske, fx bromerede flammehæmmere og perfluorerede stoffer, bidrager i større udstrækning til deformiteter af type B-G end til tidligt døde unger.
- De store variationer i misdannelser mellem år kan skyldes, at også tilførsler af miljøfarlige stoffer varierer fra år til år. Variationer i tilførsel fanges til dels af overvågningen af miljøfarlige stoffer i biota i november, men kan ikke forventes helt at dække den for ålekvabben vigtigste periode.
- På grund af de rumlige og tidsmæssige variationer i forekomst af misdannelser, samt at forholdet mellem type B-G og totalt abnorme unger varierer, tyder det på at det er de lokale tilførsler af miljøfarlige stoffer og ikke mere overordnede forskelle i miljøforhold fra år til år som er af betydning.
- Overførslen af miljøfarlige stoffer fra mor til æg og derved afkommet finder sted dels forud for det teratogene vindue i forbindelse med vitellogenese og dannelsen af æg, dels senere i udviklingsperioden, når ungerne begynder at optage næringsstoffer aktivt fra ovarievæsken.

Anbefalinger

- Det anbefales, at der gennemføres forsøg, som afklarer betydningen af eksponeringen under det teratogene vindue inden befrugtning af ålekvabbehunner. Denne eksponering kan foregå gennem føden, hvilket også gør det muligt at undersøge interaktioner mellem metaller og organiske miljøfarlige stoffer.
- For at styrke forståelsen af sammenhængen mellem belastning og misdannelser hos ålekvabber, og som supplement til målinger i f.eks. overvågningssammenhæng anbefales det, at belastninger analyseres i hanner. En samtidig sammenligning mellem belastning i hanner og hunner vil også direkte styrke brugen af resultaterne fra dette projekt.

Referencer

- Brande-Lavridsen, N., Bjerregaard, P., Korsgaard, B., Strand, J., Dahllöf, I., 2011, Eksponeringsforsøg med ålekvabbe, NST.
- Broberg, S. & Kristoffersson, R. 1983: Oxygen-Consumption and Lactate Accumulation in the Intra-Ovarian Embryos and Young of the Viviparous Fish, *Zoarces viviparus* (L) in Relation to Decreasing Water O-2 Concentration. - *Annales Zoologici Fennici* 20: 301-306.
- Celander, M., Nät, C., Broman, D. & Förlin, L. 1994: Temporal aspects of induction of hepatic cytochrome P4501A and conjugating enzymes in the viviparous blenny (*Zoarces viviparus*) treated with petroleum hydrocarbons. - *Aquatic Toxicology* 29: 183-196.
- Christiansen, T., Kinnberg, K., Bjerregaard, P. & Korsgaard, B. 2000: gamma-Glutamyl transpeptidase as a possible marker of Sertoli cells in fish testes for studies of xenoestrogens. - *Marine Environmental Research* 50: 213-216.
- Christiansen, T., Korsgaard, B. & Jespersen, A. 1998: Effects of nonylphenol and 17 beta-oestradiol on vitellogenin synthesis, testicular structure and cytology in male eelpout *Zoarces viviparus*. - *The Journal of Experimental Biology* 201: 179-192.
- Dahllöf, I. & Strand, J. 2010a: Miljøfarlige stoffer i ålekvabbe – Delrapport I. - Naturstyrelsen, www.nst.dk, ISBN: 978-87-92708-21-2.
- Dahllöf, I. & Strand, J. 2010b: Miljøfarlige stoffer i sediment of muslinger – Delrapport III. Naturstyrelsen, www.nst.dk, ISBN: 978-87-92708-23-6.
- Dayal, B.S. & MacGregor, J.F. 1997: Improved PLS Algorithms. - *Journal of Chemometrics* 11: 73-85.
- Gercken, J., Förlin, L. & Andersson, J. 2006: Developmental disorders in larvae of eelpout (*Zoarces viviparus*) from German and Swedish Baltic coastal waters. - *Marine Pollution Bulletin* 53: 497-507.
- Gotting, K.J. 1976: Reproduction and Oocyte-Development in *Zoarces viviparus* (Pisces, Osteichthyes). - *Helgolander Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen* 28: 71-89.
- Halling-Sørensen, B., Petersen, G., Stuer-Lauridsen, F., Slothuus, T., Kinnberg, K. & Bjerregaard, P. 2008: Kemiske stoffer der kan føre til misdannelser i fisk. Indkredsning af stoffer ud fra deres biokemiske virkemekanisme. Rapport fra By- og Landskabsstyrelsen. 112 s.
<http://www2.blst.dk/udgiv/Publikationer/2008/978-87-92256-41-6/pdf/978-87-92256-42-3.pdf>

- Hedman, J.E., Rüdél, H., Gercken, J., Bergek, S., Strand, J., Quack, M., Appelberg, M., Förlin, L., Tuvikene, A. & Bignert, A., 2011: Eelpout (*Zoarces viviparus*) in marine environmental monitoring. - Marine Pollution Bulletin 62: 2015-2029.
- HELCOM 2006: HELCOM COMBINE Manual. Part D. Programme for monitoring of contaminants and their effects. Helsinki, Finland.
http://www.helcom.fi/groups/monas/CombineManual/PartD/en_GB/main/
- Jacobsson, A., Neuman, E. & Thoresson, G. 1986: The Viviparous Blenny as an Indicator of Environmental Effects of Harmful Substances. - Ambio 15: 236-238.
- Korsgaard, B. 1983: The Chemical-Composition of Follicular and Ovarian Fluids of the Pregnant Blenny (*Zoarces viviparus* (L)). - Canadian Journal of Zoology - Revue Canadienne de Zoologie 61: 1101-1108.
- Korsgaard, B. 1986: Trophic adaptations during early intraovarian development of embryos of *Zoarces viviparus* (L.) - Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 98: 141-152.
- Korsgaard, B. 1987: Assimilation and metabolism of exogenous glucose by yolk-sac embryos after intraovarian preincubation and in vitro in *Zoarces viviparus*. -Canadian Journal of Zoology - Revue Canadienne de Zoologie 65: 1201-1205.
- Korsgaard, B. 1992: Amino Acid Uptake and Metabolism by Embryos of the Blenny *Zoarces Viviparus*. - The Journal of Experimental Biology 171: 315-328.
- Korsgaard, B. 1994a: Calcium-Metabolism in Relation to Ovarian Functions During Early and Late Pregnancy in the Viviparous Blenny *Zoarces viviparus*. - Journal of Fish Biology 44: 661-672.
- Korsgaard, B. 1994b: Nitrogen distribution and excretion during embryonic post-yolk sac development in *Zoarces viviparus*. - Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology 164: 42-46.
- Korsgaard, B., 1994c. Proteins and Amino-Acids in Maternal-Embryonic Trophic Relationships in Viviparous Teleost Fishes. Isr.J.Zool. 40, 417-429.
- Korsgaard, B., 1997. Ammonia and urea in the maternal-fetal trophic relationship of the viviparous blenny (eelpout) *Zoarces viviparus*. Physiol.Zool. 70, 712-717.

- Korsgaard, B., Andersen, F.O., 1985. Embryonic Nutrition, Growth and Energetics in Zoarces-Viviparus I As Indication of A Maternal-Fetal Trophic Relationship. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* 155, 437-444.
- Korsgaard, B., Petersen, I., 1979. Vitellogenin, Lipid and Carbohydrate-Metabolism During Vitellogenesis and Pregnancy, and After Hormonal Induction in the Blenny *Zoarces viviparus* (L). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 63, 245-251.
- Kristofferson, R., Broberg, S., Pekkarinen, M., 1973. Histology and physiology of embryotrophe formation, embryonic nutrition and growth in the eelpout *Zoarces viviparus* (L.). *Ann.Zool.Fennici* 10, 467-477.
- Larsson, D.G.J., Forlin, L., 2002. Male-biased sex ratios of fish embryos near a pulp mill: Temporary recovery after a short-term shutdown. *Environ.Health Perspect.* 110, 739-742.
- Larsson, D.G.J., Hallman, H., Forlin, L., 2000. More male fish embryos near a pulp mill. *Environ.Toxicol.Chem.* 19, 2911-2917.
- Larsson, D.G.J., Mayer, I., Hyllner, S.J., Forlin, L., 2002a. Seasonal variations of vitelline envelope proteins, vitellogenin, and sex steroids in male and female eelpout (*Zoarces viviparus*). *Gen.Comp.Endocrinol.* 125, 184-196.
- Larsson, D.G.J., Mayer, I., Hyllner, S.J., Forlin, L., 2002b. Seasonal variations of vitelline envelope proteins, vitellogenin, and sex steroids in male and female eelpout (*Zoarces viviparus*). *Gen.Comp.Endocrinol.* 125, 184-196.
- Martens, H. & Martens, M. 2000: Modified Jack-knife estimation of parameter uncertainty in bilinear modelling by partial least squares regression (PLSR). - *Food Quality and Preference* 11: 5-16.
- Rasmussen, T.H., Andreassen, T.K., Pedersen, S.N., Van der Ven, L.T.M., Bjerregaard, P., Korsgaard, B., 2002a. Effects of waterborne exposure of octylphenol and oestrogen on pregnant viviparous eelpout (*Zoarces viviparus*) and her embryos in ovario. *J.Exp.Biol.* 205, 3857-3876.
- Rasmussen, T.H., Andreassen, T.K., Pedersen, S.N., Van der Ven, L.T.M., Bjerregaard, P., Korsgaard, B., 2002b. Effects of waterborne exposure of octylphenol and oestrogen on pregnant viviparous eelpout (*Zoarces viviparus*) and her embryos in ovario. *J.Exp.Biol.* 205, 3857-3876.
- Rasmussen, T.H., Jespersen, A., Korsgaard, B., 2006. Gonadal morphogenesis and sex differentiation in intraovarian embryos of the viviparous fish *Zoarces viviparus* (Teleostei, Perciformes, Zoarcidae): A histological and ultrastructural study. *J.Morphol.* 267, 1032-1047.

- Rasmussen, T.H., Korsgaard, B., 2004. Estrogenic octylphenol affects seminal fluid production and its biochemical composition of eelpout (*Zoarces viviparus*). *Comp.Biochem.Physiol.C* 139, 1-10.
- Ronisz, D., Larsson, D.G.J., Forlin, L., 1999. Seasonal variations in the activities of selected hepatic biotransformation and antioxidant enzymes in eelpout (*Zoarces viviparus*). *Comparative Biochemistry and Physiology C- Pharmacology Toxicology & Endocrinology* 124, 271-279.
- Skov, P.V., Steffensen, J.F., Sorensen, T.F., Qvortrup, K., 2010. Embryonic suckling and maternal specializations in the live-bearing teleost *Zoarces viviparus*. *J.Exp.Mar.Biol.Ecol.* 395, 120-127.
- Strand, J., Andersen, L., Dahllöf, I. & Korsgaard, B. 2004: Impaired larval development in broods of eelpout (*Zoarces viviparus*) in Danish coastal waters. - *Fish Physiology and Biochemistry* 30: 37-46.
- Strand & Dahllöf 2010 Biomarkører i ålekvabbe – Delrapport II. Naturstyrelsen, www.nst.dk, ISBN: 978-87-92708-22-9
- Stuer-Lauridsen, F., Gustavson, K., Møhlenberg, F., Dahllöf, I., Strand, J., Bjerregaard, P., Korsgaard, B., Rasmussen, T.H. & Halling-Sørensen, B. 2008: Misdannet ålekvabbeyngel og andre biologiske effekter i danske vandområder. Litteraturudredning. Miljøministeriet, By- og Landskabsstyrelsen. 208 s. <http://www2.blst.dk/udgiv/Publikationer/2008/978-87-7052-384-4/html/default.htm>
- Vetemaa, M., Förlin, L. & Sandström, O. 1997: Chemical industry effluent impacts on reproduction and biochemistry in a North Sea population of viviparous blenny (*Zoarces viviparus*). - *Journal of Aquatic Ecosystems Stress and Recovery* 6: 33-41.
- Weber, R.E., Hartvig, M., 1984. Specific Fetal Hemoglobin Underlies the Fetal-Maternal Shift in Blood-Oxygen Affinity in A Viviparous Teleost. *Molecular Physiology* 6, 27-32.
- Wold, S. 1978: Cross-validatory estimation of the number of components in factor and principal components models. - *Technometrics* 20(4): 397-405.
- Zapata-Pérez, O., Gold-Bouchot, G., Ortega, A. López, T. & Albores, A., 2002: Effect of Pyrene on Hepatic Cytochrome P450 1A (CYP1A) Expression in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). - *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 42: 477-485.
- Yershov, P.N. 2008: The vertebral abnormalities in eelpout *Zoarces viviparus* (Linnaeus, 1758) (Pisces, Zoarcidae). - *Proceedings of the Zoological Institute RAS* 312(1/2): 74-82.



Naturstyrelsen
Haraldsgade 53
2100 København
www.nst.dk