

Effekter av miljøgifter på torsk (*Gadus morhua*) fra indre Oslofjord

Espen Erdahl



Masteroppgave i økotoksikologi

UNIVERSITETET I OSLO

Desember 2014

Effekter av miljøgifter på torsk (*Gadus morhua*) fra indre Oslofjord

© Espen Sollid Erdahl

2014

Effekter av miljøgifter på torsk (*Gadus morhua*) fra indre Oslofjord.

Espen Sollid Erdahl

<http://www.duo.uio.no>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Forkortelse	Beskrivelse
ALA	δ-Aminolevulinsyre
ALA-D	Aminolevulinsyre dehydratase
ATC	Acetyltiokolinioidid
BSA	Bovint serum albumin
CYP1A	Cytokrom P450 1 A
DMSO	Dimetylsulfoksid
DTNB	Ditiobisnitrobenzoesyre
EROD	Etoksyresorufin-O-deethylase
7-ER	7-etoksyresorufin
GSI	Gonadosomatisk indeks
HC-buffer	HEPES-cortland buffer
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IgG	Immunoglobulin G
LSI	Liversomatisk indeks
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NIVA	Norsk institutt for vann og avløp
PAH	Polyaromatiske hydrokarboner
PBDE	Polybromerte bifenyler
PCB	Polyklorinerte bifenyler
PBG	Porfobilinogen
PFOSA	Perfluoroktansulfonamid
TCA	Trikloreddiksyre
UiO	Universitetet i Oslo
v/v	vekt/vekt

Sammendrag

Denne studiens formål var å indikere eventuelle effekter av miljøgifter i torsk fra indre Oslofjord. En rekke fysiologiske og molekylære biomarkører ble benyttet til dette formålet. Biomarkørene hadde potensialet til å indikere eksponering eller effekt av miljøgifter som PAHer, PCBer, dioksiner, metaller og pesticider. De fysiologiske indeksene, LSI, GSI og kondisjonsfaktoren, kan brukes som biomarkører, men er mest nyttig i den helhetlige vurderingen av torskens helsetilstand.

Det ble funnet signifikant forskjell i størrelse (lengde og vekt) for 3 år gamle torsk, med større fisk i ytre sammenlignet med indre Oslofjord, men ingen forskjell mellom kjønn eller område for 1 og 2 år gamle fisk. Kondisjonsfaktoren var signifikant høyere i ytre Oslofjord, mens LSI og GSI var signifikant høyere i indre Oslofjord. Dette indikerer noe bedre helse for fisk i ytre Oslofjord (kondisjon) og tidligere kjønnsmodning for hunnfisk i indre Oslofjord (GSI og LSI).

Det var signifikant høyere CYP1A-aktivitet og -protein i leveren i fisk fra indre Oslofjord sammenlignet med ytre Oslofjord, men signifikant høyere CYP1A-aktivitet i gjellefilament fra hannfisk innsamlet fra ytre Oslofjord, sammenlignet med indre Oslofjord. Dette indikerer at indre Oslofjord var belastet med CYP1A-indusere som PCBer og PAHer, og at kilden til disse stoffene var via maten heller enn direkte absorpsjon fra vannfasen over gjellene.

PAH-metabolitter ble målt i galle og for 1-OH-pyren var det signifikant høyere nivå i fisk innsamlet fra indre sammenlignet med ytre Oslofjord. Det var ingen korrelasjon mellom 1-OH-pyren og noen av CYP1A-markørene, hverken i lever eller gjeller. For 1-OH-fenantren var det ingen signifikant forskjell mellom kjønnene eller områdene og for 3-OH-B(a)P var for få verdier over deteksjonsterskelen til at statistisk analyse kunne utføres.

Det var ingen signifikant forskjell mellom kjønn eller område for AChE- og ALA-D-aktivitet, noe som indikerer at torsk fra indre Oslofjord ikke var påvirket av henholdsvis nevrotoksiske pesticider (f.eks. organofosfater og karbamater) eller bly.

Denne studien inngår i et overvåkningsprogram for indre Oslofjord som har vært operativt siden 2002. Resultatene for CYP1A-aktivitet og -protein i lever samt 1-OH-pyren i galle var i

overenstemmelse med tidligere studier som fant høyere nivå i indre Oslofjord. Dette indikerer at indre Oslofjord har vært forurenset med PCBer og andre AhR-ligander, samt pyren, over flere år.

Forord

Jeg vil gjerne takke mine veiledere, Ketil Hylland, Tor-Fredrik Holth og Merete Grung. Dere har alle vært veldig vennlige og imøtekommende. Få spørsmål har fått stå ubesvart.

Oppgaven har blitt langt bedre med deres hjelp, og lab-arbeidet hadde strengt tatt ikke vært gjennomførbart uten deres bistand.

Mannskapet på Trygve Brårud skal også ha takk for jobben med båten, tips mot sjøsyke og spybøtte da disse tipsene feilet.

Takk til teknikerne på huset; Berit Kaasa for hjelp til å finne varmeskap og Per-Johan Færøvig for innføring i plateleseren.

Raol Wolf takkes for hjelp med feltarbeid, Jan-Erik Thrane og Lene Fredriksen for svar på spørsmål og Tage Bratrud for samarbeid på lab under optimaliseringen av kvikksølv-fri ALA-D-metode.

Anders Elverhøi (UiO Energi) må også få en stor takk for å ha underholdt min ukeslange interesse for Oslofjordens dannelse og mulig feilaktige klassifisering som fjord. Dette var komplett bortkastet mht. oppgaven, men veldig interessant uansett.

Benedicte Semb Hagen takkes for hjelp med korrekturlesing og for å ha holdt ut stresset mitt i flere måneder. Mor og søster takkes også for enestående støtte og gjentatte lørdagsfrokoster på lesesalen.

Innholdsfortegnelse

1. Introduksjon	1
1.1 Miljøgifter i Oslofjorden.....	1
1.2 Miljøovervåking.....	3
1.3 Indikatorart.....	4
1.4 Biomarkører.....	4
1.4.1 Vevsindekser.....	5
1.4.2 CYP1A og organiske miljøgifter.....	6
1.4.3 AChE og pesticider.....	7
1.4.4 ALA-D og bly.....	8
1.4.5 PAH-metabolitter i galle.....	8
1.5 Modifisert ALA-D metode.....	9
1.6 Hensikt og hypoteser.....	10
2. Materialer og metoder	12
2.1 Prøveinnsamling.....	12
2.2 Kondisjon og vevsindekser.....	15
2.3 Alder.....	15
2.4 EROD-aktivitet i gjeller.....	15
2.5 Hepatisk CYP1A-analyse.....	16
2.5.1 CYP1A-aktivitet (EROD) i lever.....	17
2.5.2 CYP1A-protein (ELISA) i lever.....	17
2.5.3 Proteinanalyse.....	18
2.6 AChE-aktivitet i muskel.....	19
2.6.1 Prøveopparbeiding.....	19
2.6.2 AChE -aktivitet.....	19
2.7 ALA-D-aktivitet i erythrocytter.....	19
2.7.1 Prøveopparbeiding.....	19
2.7.2 ALA-D-aktivitet.....	20
2.8 PAH-metabolitter i galle.....	21
2.8.1 Prøveopparbeiding.....	21
2.8.2 HPLC og fluorescens-deteksjon.....	21
2.9 Statistiske metoder og grafisk fremstilling.....	22
3. Resultater	24
3.1 Modifisert ALA-D metode.....	24
3.2 Alder og vekst.....	24
3.3 Kondisjon og vevsindekser.....	26
3.4 CYP1A-aktivitet i gjellefilament.....	28
3.5 CYP1A-aktivitet (EROD) i lever	29
3.6 CYP1A-protein i lever	30
3.7 AChE-aktivitet i muskel	30
3.8 ALA-D-aktivitet i erythrocytter	31
3.9 PAH-metabolitter i galle	32
3.10 Korrelasjon mellom biomarkørene	33

4. Diskusjon.....	35
4.1 Modifisert ALA-D-metode	35
4.2 Alder og vekst.....	36
4.3 Kondisjon og vevsindekser	37
4.4 Enzymatiske biomarkører.....	40
4.4.1 Effekter av koplanare organiske miljøgifter.....	40
4.4.2 Effekter av nevrotoksiske pesticider.....	44
4.4.3 Effekter av bly.....	46
4.5 PAH-metabolitter i galle	48
4.5.1 1-OH-fenantren.....	48
4.5.2 1-OH-pyren.....	49
4.5.3 3-OH-B(a)P.....	51
4.6 Sammenheng mellom biomarkørene.....	52
4.7 Konklusjoner.....	52
5. Litteraturliste	54
6. Vedlegg.....	68

1 Introduksjon

1.1 Miljøgifter i Oslofjorden

Oslofjorden er en terskelfjord inndelt i indre og ytre del ved det 12 km lange Drøbaksundet som ved utløpet til ytre Oslofjord er innskrenket av en 19,5 m dyp terskel. Indre del består av Vestfjorden og Bunnefjorden som deles inn av Nesodden og to 50 m dype terskler mellom Nesoddtangen og Oslo (Staalstrøm et al. 2012). Denne kompliserte topografien har ført til tidvis dårlig dypvannsutsiftning i bassengene i indre Oslofjord og dårlig vannutveksling mellom indre og ytre Oslofjord (Berge et al. 2014), noe som har gjort indre Oslofjord spesielt utsatt for de mange antropogene miljøgiftene som frigis i assosiasjon til Oslo by og omegn.

Miljøgifter som polyaromatiske hydrokarboner (PAH), metaller og organohalogener finner veien til indre Oslofjord via atmosfærisk deponering, elver, avrenning fra tette flater, overløp og renseanlegg (Skarbøvik et al. 2012). PAHer kan introduseres til miljøet i råolje eller etter ufullstendig forbrenning av fossilt og moderne brensel (Menzie et al. 1992, Lima et al. 2005, Hylland 2006 b). Den viktigste kilden til PAHer i indre Oslofjord har vært tilførsel via elver og avrenning fra tette flater (Berge et al. 2013 b). Metaller som f.eks. bly, kan forekomme i en rekke produkter som batterier, maling, kosmetikk, keramikk og plastikk (Konuk et al. 2010). De viktigste kildene til metaller og polyklorinerte bifenyler (PCB) i indre Oslofjord har vært avrenning fra tette flater og renseanlegg (Berge et al. 2013 b). Vesentlige bidrag til miljøgifter kommer også fra båttrafikk ettersom Oslofjorden har Norges høyeste tetthet av privatbåter og betydelig trafikk av cruise- og container-skip (Butt 2007, Thaulow og Faafeng 2014). I tillegg til forurensning fra normal bruk kommer også forurensning fra uhell relatert til marin trafikk. Mellom 1991 og 1996 ble det rapportert om hele 63 hendelser karakterisert som marine uhell fra indre Oslofjord (Thevik et al. 2001). Slike hendelser kan bidra til bl.a. petrogene PAHer gjennom oljesøl.

Indre Oslofjord har en over 100 år gammel lang historie med antropogen forurensning.

Uansvarlig utslipp av kloakk og industriavfall har vært vesentlige kilder til et dårlig miljø i fjorden (Alsvik 1999). Forholdene har ved flere anledninger vært så dårlige at myndighetene har måtte fraråde bading pga. tarmbakterier (Thaulow og Faafeng 2014). Forholdene har blitt noe bedre bl.a. grunnet renseanlegg, men kapasiteten til de ulike renseanleggene som fronter

fjorden er nesten sprengt (Berge et al. 2014), noe som er svært problematisk med tanke på at Oslo er Europas raskest voksende hovedstad (Thaulow og Faafeng 2014).

Befolkningsveksten vil naturlig nok medføre økt utbygging av tette urbane flater som i kombinasjon med hyppigere og kraftigere nedbør grunnet global oppvarming vil kunne øke trykket på avløpsnettene og renseanleggene (Thaulow og Faafeng 2014).

Overvåking viser at det siden 2002 har vært kontinuerlig eksponering for enkelte PAHer, PCBer og/eller dioksiner i torsk fra indre Oslofjord (Berge et al. 2014). Ved flere anledninger har det blitt målt høye nivåer av kvikksølv i torskefilet og PCBer i torskelever, som har ført til kostholdsråd mot konsum av torsk fra indre Oslofjord (Økland 2005, Green et al. 2013). Dette forringer verdien av fjorden med tanke på fiske for både kommersielle og private aktører. Undersøkelser av overflate-sediment i indre Oslofjord har vist relativt høye nivåer av flere miljøgifter som bly, kvikksølv, tributyltinn (TBT), pyren og PCBer. Enkelte, spesielt TBT og pyren, har så høye nivåer at de klassifiseres i tilstandsklasse fem (svært dårlig) i hele indre Oslofjord, mens de andre miljøgiftene primært har høye nivåer i Oslo havn (Berge et al. 2013). Nasjonal overvåking av kystnorge, fra Oslofjorden til Varangerfjorden, har vist at det over tid (fra 1980-tallet til 2012) stort sett har vært nedadgående trender for miljøgiftene som har blitt undersøkt. I indre Oslofjord ble det derimot funnet oppadgående trend for kvikksølv i torskefilet (1984 til 2012) og høye nivåer av PCBer i torskelever. Av alle stasjonene som ble undersøkt var de høyest nivåene av polybromerte bifenyleter (PBDE) og perfluoroktansulfonamid (PFOSA) i torskelever fra indre Oslofjord (Green et al. 2013).

Flere tiltak har blitt iverksatt lokalt, nasjonalt og internasjonalt, for å bedre den helhetlige miljøsituasjonen (Sørensen 2012). Norge har innført forbud og innstrammende regler for bruk og utslipp av miljøgifter som bly, kvikksølv, PAHer og PCBer m.fl. (Sørensen og Bakka 2014). På lokalt nivå har f.eks. forurenset sediment i indre Oslo blitt mudret opp og erstattet av ny ren sand (Berge 2014). Fra 2007 har Norge fulgt EUs vanddirektiv gjennom Vannforskriften som sier at alle vannforekomster skal oppnå minst god økologisk status og god kjemisk tilstand innen 2015-2021 (Berge et al. 2014). For å nå disse målene må flere tiltak iverksettes (Thaulow og Faafeng 2014).

1.2 Miljøovervåking

Miljøovervåking kan gi data om distribusjon av miljøgifter i naturen, samt endringer over tid, og slike data kan legges til grunn for nye miljøforbedrende tiltak og kan brukes til å evaluere effekten av tidligere tiltak (Hanson et al. 2013, Sørensen og Bakka 2014). Det finnes flere ulike tilnærminger til miljøovervåking (Van der Oost et al. 2003, Allan et al. 2006). I all hovedsak kan man gjøre kjemisk eller biologisk overvåking. Førstnevnte innebærer kjemisk analyse av ulike matrikser i miljøet (f.eks. vann, sediment og biota). Flere fordeler og ulemper med denne tilnærmingen har blitt beskrevet i Hanson et al. (2013). For biologisk overvåking anvendes biologiske endepunkt, på ulike nivå av biologisk organisering. Det er vanlig å skille mellom overvåking som bruker endepunkter på høyt nivå av biologisk organisering (populasjons-, samfunns- og økosystemnivå) og overvåking som anvender endepunkt på lavt nivå av biologisk organisering (individnivå og lavere) (Hanson et al. 2013).

Informasjon om responser på høyt nivå av biologisk organisering vil være mest tungtveiende for eventuelle miljøtiltak, men hvis det er snakk om tap av nøkkelarter eller kraftige reduksjoner i populasjonsstørrelse, kan slike tiltak allerede være for sent ute. Effekter på populasjoner, samfunn og økosystem har alltid et opphav i endrede biologiske prosesser på lavere nivå av biologisk organisering, og det er gjerne en tidsforskjell fra effekter inntreffer på cellulært nivå til effektene gjør seg gjeldene på høyere nivå av biologisk organisering. Dette gjør at målte endepunkter på lave nivå av biologisk organisering kan brukes som tidlige varselstegn for mulige fremtidige effekter på høyere nivå av biologisk organisering (Van der Oost et al. 2003). Biologisk overvåking er fordelaktige over kjemisk overvåking da informasjon om miljøgifters biotilgjengelighet, blandingseffekter og interaksjoner med miljøfaktorer, alltid inkluderes. Ulempen med biologisk overvåking er at det ofte er vanskelig å identifisere spesifikke miljøgifter (Hanson et al. 2013). Kombinatoriske tilnærminger er derfor ofte fornuftig.

Overvåking av miljøgiftforekomster i sediment, vann og biota, samt mulige effekter på biota, har vært utført over flere tiår på nasjonalt og internasjonalt plan (Green et al. 2013, OSPAR 2014). Siden 2002 har det også foregått lokal overvåking i indre Oslofjord (Berge et al. 2014). Denne studien er en del av dette programmet, som er finansiert av Fagrådet for

Indre Oslofjord og utført av Universitetet i Oslo (UiO) og Norsk Institutt for Vannforskning (NIVA).

1.3 Indikatorart

Til denne studien ble torsk (*Gadus morhua*) brukt som indikatorart. Kysttorsk er en god indikatorart da den er utbredt langs hele kysten og er relativt stasjonær (Hop et al. 1992, Jorde et al. 2007). Eventuelle effekter av miljøgifter vil dermed kunne reflektere belastningen i det aktuelle området. Oslofjorden har to torskepopulasjoner, separert av Drøbaksundet, med minimal vandring og genutveksling mellom populasjonene (Otterbech 1954, Knutsen et al. 2007, Rogers et al. 2014). Ytre Oslofjord regnes som et langt mindre forurenset område sammenlignet med indre Oslofjord (Green et al. 2013) og populasjonen i ytre Oslofjord vil dermed fungere som referansepopulasjon i denne studien. Torsk har en fettrik lever (40-80%) og er høyt i næringskjeden, noe som gjør den til en utmerket indikatorart for undersøkelse av fettløselige miljøgifter som kan bioakkumulere og biomagnifisere (Goksøyr et al. 1996, Berge et al. 2014). Torsk kan absorbere miljøgifter fra føden (Nahrgang et al. 2010 a), som i stor grad består av pelagisk fisk og bentiske vertebrater (Hop et al. 1992, Link et al. 2009), eller direkte fra vannfasen, over gjellene (Grung et al. 2009, Nahrgang et al. 2010 b). Det er også fordelaktig å velge en indikatorart som har vært brukt tidligere da dette letter eventuelle sammenligninger mellom studier. Torsk har inngått i biologisk overvåking langs norskekysten over flere 10 år (Green et al. 2013, Berge et al. 2014).

1.4 Biomarkører

Biomarkører er målbare biologiske endepunkt som indikerer eksponering eller effekt av miljøgifter. Enkelte definisjoner på biomarkører er vide og inkluderer alt fra molekylære endepunkt til endepunkter på samfunn- og økosystemnivå (Peakall et al. 1994). Andre definisjoner begrenser biomarkører til å gjelde endepunkter på individnivå og lavere (Galloway et al. 2006, Nordberg et al. 2009). Denne studien opererer bare med endepunkter på individ-nivå og lavere. Biomarkører er ofte subcellulære og innebærer målinger av enzymaktivitet, proteinkonsentrasjon, metabolitter o.l., men kan også være fysiologiske, histologiske og adferds-responser (Galloway et al. 2006). Biomarkører velges gjerne på bakgrunn av at de er spesifikke for enkelte grupper miljøgifter (Goksøyr et al. 1996).

Biomarkører på lavt nivå av biologisk organisering (f.eks. enzym-aktivitet) gir hurtig og sensitiv respons til miljøgifter, som er av høy toksikologisk relevans, men av lavere økologisk relevans siden det er vanskelig å ekstrapolere responser fra subcellulært nivå til responser på individ-, populasjon- og samfunnsnivå (Adams et al. 1989). For de aller fleste biomarkører på lavt nivå av biologisk organisering finnes det ingen direkte link til effekter på populasjonsnivå (Hylland et al. 2006).

Til denne studien ble en rekke fysiologiske og molekylære biomarkører målt.

1.4.1 Vevsindekser

Fysiologiske biomarkører kan gi informasjon om kondisjonen til enkeltfisk. To eksempler er kondisjonsfaktor og leversomatisk indeks (LSI). Begge gir en indikasjon på energireservene i fisk, hvor kondisjonsfaktoren indikerer energireserver i muskler (proteiner) og LSI indikerer energireserver i leveren (lipider) (Lambert og Dutil 1997). Begge kan påvirkes av miljøgifter gjennom ulike mekanismer. Et forurenset miljø kan føre til økt energiforbruk til detoksifisering som igjen kan føre til reduserte energireserver gitt at ikke andre kompensatoriske responser inntreffer (f.eks. økt konsum av føde). Dette kan redusere kondisjonsfaktoren og LSI, men LSI har også vist seg å øke i respons til miljøgifter som f.eks. PAH'er og PCB'er (Van der Oost et al. 2003). Begge parameterne kan også påvirkes av en rekke andre faktorer som næringstilgang og kjønnsmodning, men uavhengig av årsak kan de ofte være gode støtteparametere under tolkingen av de andre biomarkørene (Balk et al. 2012). Det samme gjelder gonadosomatisk indeks (GSI), en parameter som indikerer reprodusjon i fisk. GSI kan i tillegg brukes som en biomarkør da flere miljøgifter kan påvirke GSI (Arukwe og Goksøyr 1998, Balk et al. 2012). Endokrinforstyrrende stoffer, som f.eks. etinyløstradiol (EE2), kan i miljørelevante konsentrasjoner føre til økt eller redusert GSI i fisk (Versonnen og Janssen 2004, Parrott og Blunt 2005, Saaristo et al. 2010). Slike subletale påvirkninger på reproduksjon kan føre til effekter på populasjonen i sin helhet. Dette vil følgelig være av høy økologisk relevans, men endringer i GSI alene er ikke nok til å bekrefte påvirkning fra miljøgifter da flere andre biotiske og abiotiske faktorer kan påvirke GSI (Balk et al. 2012).

1.4.2 CYP1A og organiske miljøgifter

Planare organohalogener, PAHer og andre strukturelt like miljøgifter kan alle indusere cytokrom P450 1A (CYP1A) gjennom interaksjon med den cytosoliske arylhydrokarbon-resptoren (AhR) (Whyte et al. 2000, Zhou et al. 2010, Hylland et al. 2012 a). De samme miljøgiftene blir i stor grad også metabolisert av CYP1A i leveren og andre vev. Dette kan føre til detoksifisering, men også metabolsk aktivering. CYP1A-genererte metabolitter av f.eks. PAHer og PCBer kan bl.a. føre til oksidativt stress og protein- eller DNA-addukter (Schilderman et al. 2000, Aas et al. 2000, Andersson og Förlin 1992, Peters et al. 1996) og det er en sterk link som kobler PAH-eksponering og CYP1A-induksjon i lever til effekter på organ-nivå (hepatisk neoplasma) i en rekke fiskearter (review i Collier et al. 2013). Induksjon av CYP1A kan derfor brukes som et tidlig varsel om potensielt skadelige effekter i fisk. Katalytisk aktivitet kan bestemmes med en metode utviklet av Burke og Mayer (1974), 7-etoksyresorufin *O*-deetylase (EROD). Det CYP1A-spesifikke substratet 7-etoksyresorufin (7-ER) metaboliseres til resorufin som kan detekteres fluorometrisk (Burke og Mayer 1974). Metoden har i bruk i 40 år og informasjon om biotiske og abiotiske påvirkningsfaktorer foreligger (Andersson og Förlin 1992, Whyte et al. 2000). På bakgrunn av målinger fra flere referanseområder har det blitt utarbeidet bakgrunnsnivå for EROD-aktivitet i 7 marine fiskearter, deriblant torsk (Hylland et al. 2012 a). Det finnes flere miljøgifter og endogene stoffer som kan hemme CYP1A-aktivitet, f.eks. tributyltin (TBT), enkelte metaller og østrogen (Whyte et al. 2000, Benedetti et al. 2007, Mortensen og Arukwe 2007, Celandier 2011). I denne studien ble fisk samlet inn i november for å unngå høye østrogen-nivåer under den reproduktive metoden. Hemmere kan hemme CYP1A-aktivitet og -transkripsjon (Benedetti et al. 2007, Beijer et al. 2010), og i teorien oversettelse fra mRNA til protein, men sistnevnte er ikke dokumentert (Holth et al. 2014). I komplekse blandinger kan indusere opptre sammen med hemmere noe som kan maskere induksjon av CYP1A-aktivitet gjennom hemmet enzym eller transkripsjon. Hvis hemmingen forekommer på enzym-nivå kan induksjonen fortsatt detekteres med målinger av CYP1A-proteinkonsentrasjon. Dette kan gjøres med enzym-linket-immunosorbent-assay (ELISA) (Goksøyr og Förlin 1996).

CYP1A kan som nevnt uttrykkes i en rekke vev deriblant gjellevev. Målinger av CYP1A-aktivitet (EROD) i gjellefilament har blitt regnet som en god biomarkør for eksponering for vannbårne miljøgifter som kan indusere CYP1A (Andersson 2007, Abrahamson 2007). Miljøgifter absorbert fra føden kan også påvirke CYP1A-aktivitet i gjeller og miljøgifter

absorbert over gjellene kan også påvirke CYP1A-aktivitet i lever (Nahrgang et al. 2010 a, Holth et al. 2014). Ved lave konsentrasjoner av vannbårne CYP1A-indusere er det en mulighet for at CYP1A ikke induseres i leveren pga. effektiv CYP1A-metabolisme og -induksjon i gjellevev (Jönsson et al. 2006, Pampanin og Sydnes 2013). Dermed kan CYP1A-aktivitet i gjeller være en bra tilleggsmarkør til CYP1A-aktivitet og -proteinkonsentrasjon i lever.

I denne studien ble CYP1A-aktivitet målt med EROD i gjeller og lever, og konsentrasjonen av CYP1A-protein ble bestemt med ELISA i leveren.

1.4.3 AChE og pesticider

Effekter av plantevernmidler med nevrotoksisk effekt (organofosfater og karbamater) kan detekteres ved å måle AChE-aktivitet i ulike vev (Payne et al. 1996, Van der Oost et al. 2003). Organofosfat- og karbamat-pesticider kan hemme AChE gjennom henholdsvis fosforylering og karbamylering av serin i enzymets aktive sete (Assis et al. 2011, Pohanka 2012) og denne hemmingen kan forekomme ved svært lave konsentrasjoner av pesticider (Burgeot et al. 2012). AChE er et membranbundet enzym på post-synaptiske kolinergiske nerve- og muskel-cellemembraner. Den normale funksjonen er å terminere nervesignalisering gjennom hydrolyse av neurotransmitteren acetylkolin (ACh). Hemming av enzymet kan føre til opphopning av ACh og kontinuerlig nerve- og muskel-aktivering. Dette gir seg oftest uttrykk i skjelvinger og spasmer, noe som dramatisk vil kunne påvirke normal adferd knyttet til overlevelse og reproduksjon (Burgeot et al. 2012). Subletal eksponering for pesticider har dermed potensialet til å påvirke høyere nivå av biologisk organisering som populasjonen, samfunnet og i siste instans økosystemet. Over tid kan høy grad av AChE-hemming føre til paralysse og død. AChE-aktivitet er dermed en god biomarkør for eksponering for nevrotoksiske pesticider, og kan brukes som et tidlig varsel om mulige effekter på individer og høyere nivå av biologisk organisering.

Som nevnt kan AChE måles i flere ulike vev. Denne studien målte AChE-aktivitet i muskelvev da dette er mer informativt hva gjelder påvirkninger på individnivå og høyere. Flere fisk ser ut til å fungere normalt selv etter høy hemming i hjernevev, mens hemming i muskelvev som styrer respirasjon vil relativt hurtig kunne føre til død etter oksygenmangel.

Muskelvev er også lettere tilgjengelig, og i større kvanta, sammenlignet med hjernevev (Burgeot et al. 2012).

1.4.4 ALA-D og bly

Δ -aminolevulinsyre dehydratase (ALA-D) kan brukes som en biomarkør for blyeksponering (Hodson et al. 1976, Hylland 2004, Hylland et al. 2006). Bly hemmer ALA-D-aktivitet gjennom binding til sulfhydrylgrupper i enzymet (Granick et al. 1973). ALA-D er et vesentlig enzym i hemsyntesen, hvor det katalyserer dannelsen av porfobilinogen (PBG) fra to molekyler aminolevulinsyre (ALA). Heme inngår i bl.a. hemoglobin og cytokromer. Hemming av aktivitet kan føre til anemi i pattedyr og fugler, men ser ikke ut til å ha samme effekt i fisk (Hylland et al. 2006). ALA-D bruker sink (Zn) som kofaktor og tilstedeværelsen av Zn^{2+} vil kunne svekke blys hemmende effekt (Hylland et al. 2006, Lombardi et al. 2010, Malhotra og Dhawan 2014). Motstridende data foreligger for hemmende effekt av andre metaller, men høye nivåer av kadmium ser ut til å hemme ALA-D-aktivitet i blod fra flyndre (Hylland et al. 2006). Undersøkelser av ALA-D-aktivitet i blod har vært gjort i en rekke fiskearter (Krajnović-Ozretić og Ozretić 1980, Dwyer et al. 1988, Lombardi et al. 2010), deriblant torsk (Ruus et al. 2003). Det eksisterer et dose-respons-forhold mellom ALA-D-aktivitet og Pb-konsentrasjon i blod fra fisk på lab (Dwyer et al. 1988, Schmitt et al. 2009) og i felt (Lombardi et al. 2010). ALA-D overgår kjemisk analyse i sensitivitet for bly (Ruus et al. 2003, Hylland et al. 2009) og vil følgelig være av interesse for å vurdere blyforurensing i akvatiske miljøer. Selv om ALA-D-hemming ikke kan knyttes direkte til skadelige effekter i fisk vil det fortsatt være en nyttig biomarkør da hemming kan gi et tidlig varsel på mulige toksiske effekter av kronisk subletal blyeksponering. Studier har vist at kronisk eksponering for bly kan føre til endret svømmeadferd (Mager og Grosell 2011), hyperaktivitet, muskelatrofi og skjev rygg (lordoskoliose) (Davies et al. 1976) i fisk og alle disse symptomene kan stamme fra nevrotoksisitet (Davies et al. 1976, Mager 2011).

1.4.5 PAH-metabolitter i galle

PAH-metabolitter i galle kan brukes som en biomarkør for nylig eksponering for PAH-er i fisk (2-8 dager) (Hylland 2006, Hylland et al. 2012 b). Godt dose-respons-forhold mellom PAH-eksponering og PAH-metabolitter i galle har blitt bekreftet på lab og i felt for flere fiskearter (Wang et al. 2008, Blahova et al. 2014), deriblant torsk på lab (Aas et al. 2000).

Vertebrater metaboliserer PAHer hurtig gjennom fase 1 og fase 2 enzym i leveren forut for ekskresjon til galleblæren. PAHer vil dermed i liten grad akkumulere i vev (Van der Oost et al. 2003). Galleblæren tømmes periodisk i forbindelse med fordøyelse, akkumulering er kun kortvarig (Van der Oost et al. 2003, Hylland et al. 2012 b). I tillegg vil metabolittene være et direkte mål på mengden PAHer som går gjennom organismen, noe som vil være av større toksikologisk betydning enn mengden PAHer i vev (Hylland et al. 2012 b). Dette i stor grad fordi intermediære PAH-metabolitter er langt mer toksiske enn forløperstoffene (Pampanin og Sydnes 2013). Metabolsk aktivering kan skje gjennom CYP1A og andre fase 1 enzym. Den sterke linken mellom PAH-eksponering, CYP1A-induksjon og hepatisk neoplasma i flere fiskearter gjør PAH-metabolitter til en god komplementær biomarkør til CYP1A-markørene (Collier et al. 2013). I denne studien vil galle undersøkes for utvalgt PAHer (3, 4 og 5 benzenringer) med high performance liquid chromatography (HPLC)-analyse. Ettersom olje domineres av små (og oftere alkylerte) PAHer (2 og 3 benzenringer) og PAHer etter forbrenningsprosesser domineres av større PAHer (>4 benzenringer) vil det være mulig å indikere kilden til PAHer i galle (Silva et al. 2006, Tobiszewski og Namieśnik 2012).

I tillegg til karsinogene effekter i leveren har forsøk på lab vist at PAHer kan påvirke reproduksjonen i torsk (Sundt og Björkblom 2011, Khan 2013).

1.5 Modifisert ALA-D-metode

For å beregne ALA-D-aktivitet utføres et enzymatisk assay hvor ALA-D inkuberes sammen med aminolevulinsyre (ALA). Reaksjonsproduktet porfobilinogen (PBG) kan så måles og relateres til inkubasjonstiden og proteinkonsentrasjonen i blodet. Kvikksølv inngår i denne metoden for å avslutte enzym-reaksjonen og denaturere proteiner (Granick et al. 1973, Hodson et al. 1976, Hylland 2004).

Kvikksølv er et ikke-essensielt metall med høyt toksisk potensial. Det er følgelig ønskelig å redusere bruken, også i forskningssammenheng. I denne studien ble det undersøkt om metoden for analyse av ALA-D aktivitet kunne utføres uten bruk av kvikksølv. Dette har blitt gjort med suksess for ALA-D aktivitet i blod fra karpefisk, *Cyprinus carpio* (Nakagawa et al. 1995). Lovende resultater har også kommet fra forsøk med torskeblod (Bratrud 2014).

1.6 Hensikt og hypoteser

Hovedmålet med studien har vært å påvise om torsk i indre Oslofjord var påvirket av miljøgifter. Et homogent utvalg torsk ble samlet inn med tråltrekk fra fra indre og ytre Oslofjord (referanseområde) i slutten av november 2013. Biomarkørene som ble brukt hadde potensialet til å indikere effekter av PAHer, PCBer, dioksiner, metaller og pesticider. Flere enzymer ble undersøkt; CYP1A, AChE og ALA-D. I tillegg ble PAH-metabolitter analysert fra galleprøver. Biomarkører på noe høyere nivå av biologisk organisering ble også undersøkt; kondisjonsfaktor, LSI, GSI og vekst ble beregnet.

Biomarkørene må tolkes holistisk for best mulig oppløsning av miljøtilstanden for torsk. F.eks. kan CYP1A induseres av PAHer, hemmes av TBT og påvirkes av kjønnsmodning og næringstilgang. Dermed vil det være fornuftig å se hepatisk CYP1A-aktivitet i lys av hepatisk CYP1A-protein, PAH-metabolitter i galle, GSI, LSI og kondisjonsfaktoren. Sammenhenger mellom biomarkørene ble undersøkt med korrelasjonsanalyse. Resultatene ble også sett i forbindelse med resultater fra tilsvarende tidligere studier (Holth, 2004; Imrik, 2010; Nerland, 2011; Bergland, 2012; Fredriksen, 2013; Bratrud 2014).

Hovedmålet i studien ble delt inn i følgende null-hypoteser;

H₀: Det var ingen signifikant forskjell i kondisjonsfaktor, LSI og/eller GSI mellom områdene eller mellom kjønnene.

H₀: Det var ingen signifikant forskjell i CYP1A-aktivitet (EROD) i lever mellom områdene eller mellom kjønnene.

H₀: Det var ingen signifikant forskjell i CYP1A-aktivitet (EROD) i gjeller mellom områdene eller mellom kjønnene.

H₀: Det var ingen signifikant korrelasjon mellom CYP1A-aktivitet (EROD) i gjellevev og levervev.

H₀: Det var ingen signifikant forskjell i CYP1A protein (ELISA) i lever mellom områdene eller mellom kjønnene.

H₀: Det var ingen signifikant forskjell i AChE-aktivitet i muskelvev mellom områdene eller mellom kjønnene.

H₀: Det var ingen signifikant forskjell i ALA-D-aktivitet i røde blodceller mellom områdene eller mellom kjønnene.

H₀: Det var ingen signifikant forskjell i PAH-metabolitter i galle mellom områdene eller mellom kjønnene.

I tillegg til disse målene knyttet til miljøovervåking ble det også undersøkt om metoden for måling av ALA-D-aktivitet kunne utføres uten bruk av kvikksølv.

H₀: Det var signifikant forskjell i ALA-D-aktivitet i røde blodceller mellom metodene med og uten kvikksølvklorid.

2. Materialer og metoder

2.1 Prøveinnsamling

Torsk (*Gadus morhua*) ble samlet inn med trål fra FF Trygve Braarud fra 18 - 21 november 2013. Førte individer ble samlet inn fra indre Oslofjord (Fig 2.1, Midtmeie, 95 m dypt) og 40 individer fra ytre Oslofjord (Fig. 2.2, Travbanen, 111 m dypt). Sistnevnte til bruk som referanse. Innsamlet fisk ble oppbevart i gjennomstrømstank på dekk inntil prosessering. Fisk ble valgt ut på grunnlag av vekt og lengde for å holde utvalget homogent for best mulig sammenligningsgrunnlag (tabell 2.3).

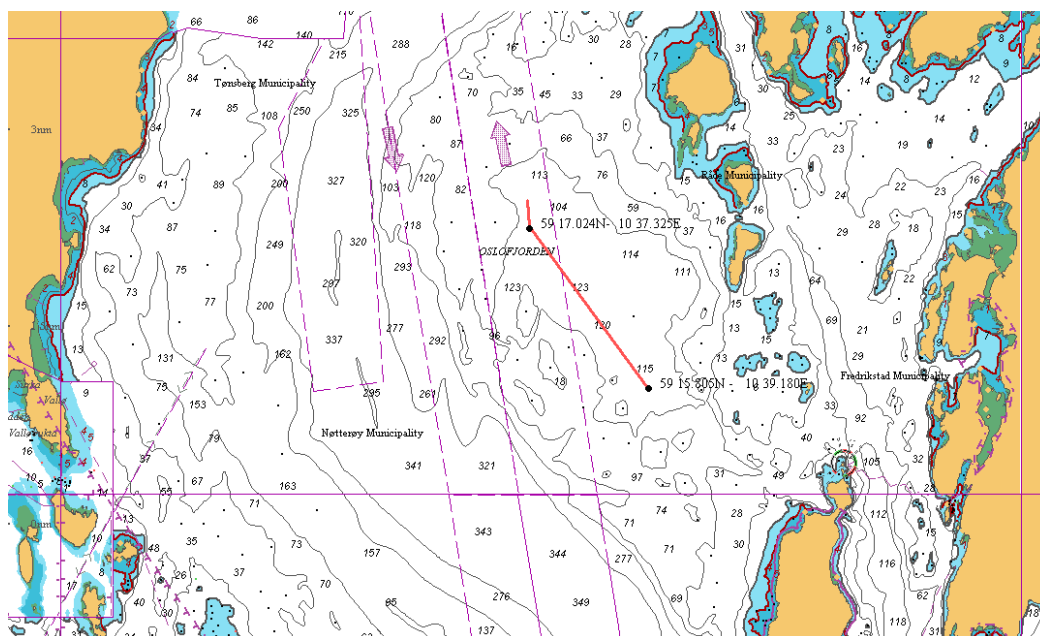


Fig. 2.1 Trålrute (rød linje) for ytre Oslofjord (Travbanen)

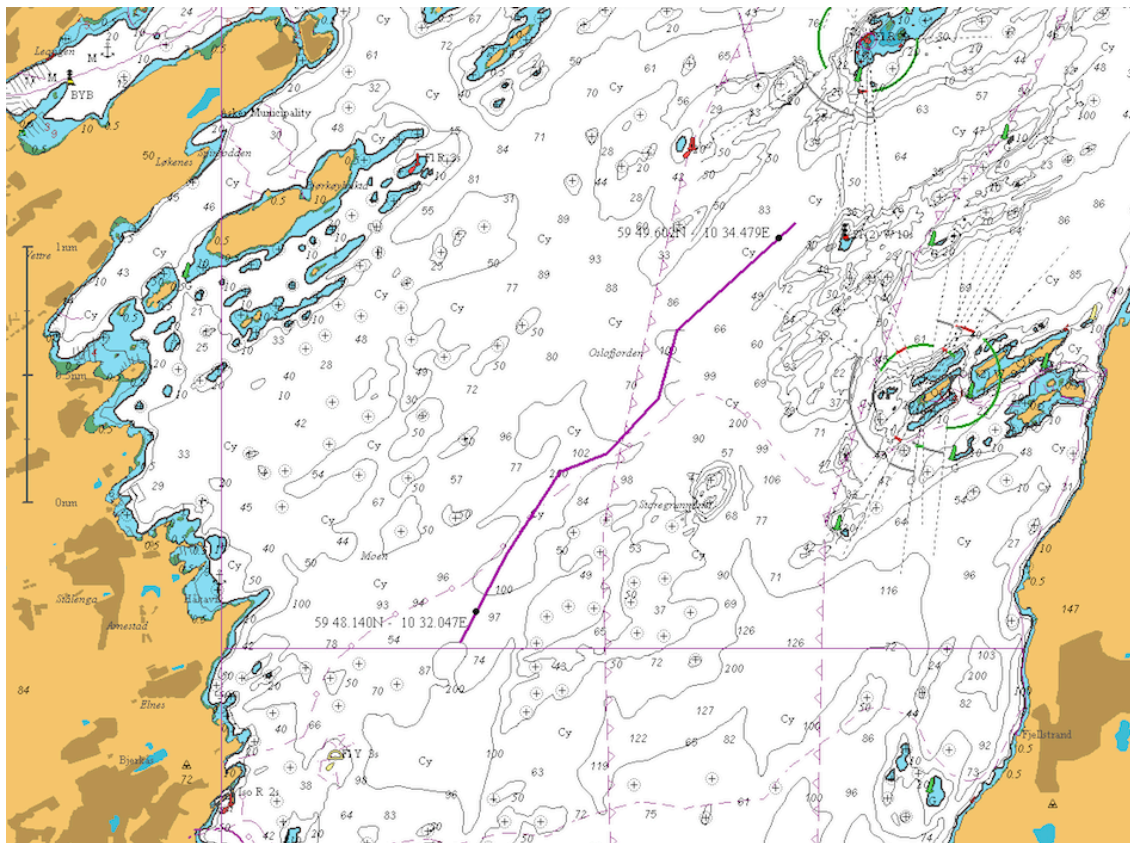


Fig 2.2: Trålrute (lilla linje) for indre Oslofjord (Midtmeie).

Tabell 2.3: Oversikt over antall, lengde og vekt for innsamlet fisk.

	Indre Oslofjord		Ytre Oslofjord	
	Hanner	Hunner	Hanner	Hunner
Antall	15	25	21	19
Lengde min/maks	34 / 53	35,5 / 58	35 / 50	35 / 59,5
Lengde median/ gjennomsnitt	45 / 44,4	41,5 / 42	43 / 43	44 / 45,7
Vekt min/maks	307 / 1302	39,2 / 1850	398 / 1140	365 / 2100
Vekt median/ gjennomsnitt	707 / 759,9	619 / 683,6	756 / 741,2	782 / 935,4

Fisken ble avlivet med slag mot hodet. Lengde og vekt ble målt (tabell 2.3). Sprøyter (1 ml, kanyle 25G, 0,6 x 30 mm) var på forhånd heparinisert (10 kU/ml). Disse ble brukt til å ta blodprøver fra kaudalvenen. Blodprøvene (ca. 1 ml) ble sentrifugert (5 min, 1000 x g) for å separere blodcellene fra plasma. Plasma ble sugd av med plastpipette og lagret i 1,5 ml

eppendorfrør på flytende nitrogen. Eppendorfrøret med pelleten ble også lagret på flytende nitrogen.

Buken ble forsiktig åpnet med skalpell/saks og galleprøve tatt med 1 ml sprøyte (kanyle 23G, 0,5 x 25 mm). Prøven ble overført til 0.5 ml eppendorfrør og satt på is under aluminiumsfolie, for beskyttelse mot lys. Prøvene ble så frosset i fryser om bord (-20°C), og ved landgang ble prøvene fraktet på is til Universitetet i Oslo (UiO) hvor de på nytt ble lagret i fryser (-20°C).

Leveren ble dissekert ut, veid og 2 replikate prøver på ca. 1 g hver ble tatt fra regionen rundt portalvenen og frosset ned i kryorør, på flytende nitrogen.

Gonadene ble brukt til kjønnsbestemmelse. Disse ble også frigjort og veid. Etter at alle innvollene var fjernet ble skrotten veid (somatisk vekt). Vektmålene ble brukt til å regne ut GSI, LSI og Fultons kondisjonsfaktor.

Muskelprøve på ca. 1 g ble tatt fra samme posisjon på alle individene (venstre side, ved ryggfinnen). Alt skinn ble skåret bort med skalpell. Prøvene ble lagret i kryorør og frosset på flytende nitrogen.

Den midtre delen av første gjellebue ble sakset ut og vasket i HEPES Cortland (HC)-buffer (pH 7,7, 5,1 mM KCl, 0,13 M NaCl, 0,9 mM MgSO₄*7H₂O, 1,6 mM CaCl₂*2H₂O, 2,4 mM NaH₂PO*2H₂O, 6 mM HEPES og 5,6 mM glukose) før ca. 20 primære filamenter, ca 10 mm lange, ble overført til 24 brønns mikrotiterplate (Falcon) på is. Gjelle-EROD ble undersøkt på båtens tørr lab.

Kraniet ble åpnet og otolittene ekstrahert. Disse ble lagret i 1,5 ml eppendorfrør i romtemperatur til senere analyse av kalsiumkrystallringene.

Prøvene som ble lagret på flytende nitrogen i felt ble overført til -80°C fryser etter toktet.

2.2 Kondisjon og vevsindekser

LSI og GSI er mål på hvor mange prosent henholdsvis leveren og gonadene utgjør av den somatiske kroppsvekten. Indisiene beregnes ved å dele organ-vekten på somatisk vekt og gange med 100. Siden torsk primært lagrer fett i leveren, blir LSI et godt mål på fiskens energireserver (Jangaard et al. 1967), mens GSI reflekterer fiskens reproduktive status (Guderley et al. 1996). Fultons kondisjonsfaktor er et mål på fiskens generelle kondisjon. Den antar isometrisk vekst og kan beregnes ved å se på forholdet mellom somatisk vekt (g) og lengde³ (cm³) (Nash et al. 2006). Skaleringfaktor på 100 ble brukt.

2.3 Alder

Metoden som ble brukt ble beskrevet i Williams og Bedford (1974).

Otolittene ble åpnet medialt ved å knekke dem over tommelneglen. Bruddflaten ble pusset med fint sandpapir, og for å øke kontrasten i kalsiumkrystallringene ble bruddflaten forsiktig brent og penslet med glyserol. Halve otolitten ble plassert i et improvisatorisk stativ, med bruddflaten opp. Videre ble innsiden av otolittene undersøkt under stereomikroskop (Leica) og sidelys. Antall hyaline ringer (avsatt under treg kalsifisering om vinteren) ble talt og brukt som fiskens alder i år.

2.4 EROD-aktivitet i gjeller

Metoden fulgte den beskrevet i Abrahamson et al. (2008).

HC-bufferen, som ble brukt til å lagre gjellefilamentene i, ble erstattet med 0.5 ml romtemperert reaksjonsbuffer (HC-buffer, pH 7,7 med 1 µM dikumarol, 20 µM 7-ER og 28 nM DMSO) til hver brønn i mikrotiterplaten. Gjellene ble inkubert i 10 minutter (romtemperatur, mørkt) før reaksjonsbufferen ble erstattet med nye 0.5 ml romtemperert reaksjonsbuffer. Ny inkubering i 30 min (romtemperatur, mørkt). Fra hver brønn ble 200 µl overført i duplikat til svart 96-brønns mikrotiterplate (NuncTM) med standardrekke av resorufin (6 konsentrasjoner, fra 6,25 - 200 nM) i duplikat, og 4 blankprøver med reaksjonsbuffer. Platen ble lest for fluorescens ved bølgelengder rundt 540 nm (eksitasjon) og

590 nm (emisjon) i plateleser (BioTek FL800x). Videre ble platen forseglet og frosset ved -20°C.

2.5 Hepatisk CYP1A-analyse

Homogenisering ble utført i henhold til Dignam (1990). Formålet var å isolere den mikrosomale fraksjonen, hvor CYP1A er lokalisert.

Leverprøver ble tint på is. Vekt per prøve ble notert før overføring av ca. 1 g til homogeniseringsrør på is. Iskald homogeniseringsbuffer (0,1 M Na-fosfatbuffer, pH 7,8, m/ 0,15 M KCl, 1 mM ditiotritol og 678 mM glyserol) ble øyeblikkelig tilført opp til et totalvolum på 5 ml. For prøver under 0.7 g ble det brukt 2.5 ml totalvolum.

Homogeniseringen ble utført med Potter-Elvehjem Teflon homogeniserer, hvor teflon pistillen ble beveget sakte opp og ned 10 ganger, med en rotasjonshastighet på 1500 rpm. Homogeniseringsrørene ble holdt på is. Homogenatet ble overført til sentrifugerør og sentrifugert i 30 min (10.000 x g, 4°C) for å fjerne intakte celler, større cellerester, mitokondrier og cellekjerner.

Supernatant ble overført til nye sentrifugerør (3,4 ml, Hitachi Koki) med Pasteur glasspipette. Fettlaget på toppen av hver prøve ble forsiktig skjøvet til siden for å sikre at bare mikrosomer og cytosol ble pipettert ut. Pelleten ble kastet. Ny sentrifugering i vakuumsentrifuge (Thermo scientific, Sorvall mTX 150) i 1 time (100.000 x g, 4°C).

Supernatant ble sugd av og kastet. Pelleten, som bestod av den mikrosomale fraksjonen, ble resuspendert i 500 µl mikrosomalbuffer (0,1 M Na-fosfatbuffer, pH 7,8, m/ 2,71 M glyserol) og homogenisert på nytt i Tenbroek homogenisator. Homogenatet ble så fordelt i 0.5 mL eppendorfrør: 100 µl til EROD, og 50 µl hver til proteinanalyse og ELISA.

2.5.1 CYP1A-aktivitet (EROD) i lever

Vi brukte metoden utviklet av Burke og Mayer (1974) og senere modifisert av Eggens og Galgani (1992).

K-fosfatbuffer (0,1 M, pH 8,0) ble brukt gjennom hele forsøket. Reaksjonsblanding (K-fosfatbuffer m/ 2,98 μ M 7-ER og 15,1 μ M DMSO) ble brukt til å lage standardrekke med Na-resorufin (8 konsentrasjoner; 0,64, 0,32, ... 0,02, 0,01 og 0 μ M). Arbeid med resorufin og 7-ER ble utført i fravær av direkte lys og lys fra lysstoffrør. Prøvene ble tint og oppbevart på is, og fortynnet til 1,25 mg protein/ml K-fosfatbuffer. NADPH (50 mM i K-fosfatbuffer) ble tint i romtemperatur og fortynnet til 2,4 mM i K-fosfatbuffer. Denne ble laget rett før bruk.

Standardrekken ble tilsatt i duplikat (à 275 μ l) til svart 96 brønns mikrotiterplate (NuncTM). Prøver og en referanse ble tilsatt platen (6 replikat à 50 μ l); 3 replikat fikk tilsatt 10 μ l standard (0,32 μ M resorufin). K-fosfatbuffer ble brukt som blank og tilsatt i 8 brønner. Romtemperert reaksjonsblanding (200 μ l), etterfulgt av romtemperert NADPH-løsning (25 μ l) ble tilsatt alle brønnene unntatt standardrekken. Platen ble så lest av over 4 min (30 sek intervaller, 8 avlesninger) i SynergyMX (BioTek) plateleser ved bølgelengder rundt 530 nm (eksitasjon) og 590 nm (emisjon). For resorufin ble 73 mM/cm brukt som ekstinksjonskoeffisient (Klotz et al. 1984).

2.5.2 CYP1A-protein (ELISA) i lever

Metoden vi brukte ble beskrevet av Goksøyr (1991) og er en semikvantitativ analyse av CYP1A protein i leverprøvene.

Mikrosomer fra lever ble tint på is og fortynnet i iskald coatingbuffer (50 mM karbonat-bikarbonat i dH₂O, pH 9,6 ved 25°C) til 10 μ g protein/ml. Prøver og en referanse ble tilsatt (4 replikat à 100 μ l) til 96 brønns mikrotiterplate (Maxisorp Nunc-Immunoplate). Coatingbuffer ble brukt som blank og tilsatt kolonne 1 (100 μ l pr. brønn). Platen ble forseglet med tape (BarSealTM) og inkubert i kjøleskap (12 t, 4°C).

Platen ble vasket 3 ganger (2x 30 sek + 1 min) med TTBS (20 mM Tris-buffer pH 8,5 ved 25°C, m/ 0,5 M NaCl og 446 μ M Tween-20) i Scan Washer 300 (Skatron). 300 μ l blokkeringsbuffer (TTBS m/ 150 μ M BSA) ble tilsatt alle brønnene etterfulgt av 45 min

inkubering (21°C). Primærantistoff (kanin anti-fisk CYP1A antistoff, Biosense Laboratories AS) ble fortynnet 1000 x i antistoffbuffer (TTBS m/ 15 µM BSA). Platen ble på nytt vasket 3 ganger med TTBS før 100 µl fortynnet primærantistoff ble tilsatt alle brønnene med unntak av A1-D1 som fikk 100 µl antistoffbuffer. Platen ble forseglet med tape og inkubert i kjøleskap (12 t, 4°C).

Sekundærantistoff (geit anti-kanin IgG konjugert med peroksidase fra pepperrot) ble fortynnet 3000 x i antistoffbuffer. Platen ble vasket 3 ganger med TTBS . 100 µl fortynnet sekundærantistoff ble tilført alle brønnene og platen ble forseglet med tape for 6 timers inkubasjon i kjøleskap (4°C).

Platen ble vasket 5 ganger (4 x 30 sek + 1 min) med TTBS før 100 µl TMB Plus (Kem-En-Tech) ble tilsatt alle brønnene. Platen ble inkubert i 24 min (mørkt, romtemperatur) før reaksjonen ble avsluttet med 50 µl svovelsyre (1,5 M) til alle brønnene. Absorbans ble målt ved 450 nm med Synergy MX (BioTek) plateleser.

2.5.3 Proteinanalyse

Vi brukte en kolorimetrisk metode, først beskrevet i Lowry et al. (1951), til å undersøke den totale proteinkonsentrasjonen i prøvene (fra lever, blod og muskel).

Standardrekke ble laget ved å fortynne stockløsning med BSA (Sigma-Aldrich) i Tris-buffer (0,1 M, pH 8,0 ved 4°C) til 4 konsentrasjoner mellom 1,875 µM og 22,5 µM BSA. For blod og muskel ble det brukt henholdsvis 6 og 5 konsentrasjoner innenfor det samme området. Prøvene ble tint på is og fortynnet i Tris-buffer (0,1 M, pH 8,0 ved 4°C). Leverprøvene ble fortynnet 15 x, mens blod og muskel ble fortynnet henholdsvis 40 x og 20 x.. Standard, prøver og referanse ble platet ut i triplikat (à 10 µl) på 96 brønns mikrotiterplate (Nunc) på is. Platen ble plassert mørkt (21°C) før romtemperert reagent A (25 µl) og reagent B (fotosensitiv, 200 µl) ble tilsatt. Platen ble forsiktig ristet og inkubert mørkt i 15 min (21°C). Synergy MX (BioTek) plateleser ble brukt til å lese av absorbansen ved 750 nm.

2.6 AChE-aktivitet i muskel

2.6.1 Prøveopparbeiding

Protokollen ble basert på metoden først beskrevet av Ellman et al. (1961) og senere modifisert av Herbert et al. (1995). Prøvene ble tint på is og veid. Tilnærmet 1 g ble plassert i homogeniseringsrør og øyeblikkelig fylt med K-fosfatbuffer (0,1M, pH 7,2) til et totalvolum på 5 ml. Der hvor prøvematerialet var < 0.7 g ble totalvolumet satt til 2.5 ml. Prøvene ble homogenisert på is med PRO 200 Ultra-Turrax (generatorsøyle 10 x 115 mm, hastighet 18-24.000 rpm., 2 x 20 sek.). Mellom hver prøve ble homogenisatoren vasket i etanol (12 M) og 2 ganger i dH₂O. Homogenatet ble overført med plastpipette til sentrifugerør og sentrifugert i 10 min (10.000 x g, 4°C). Supernatant ble overført til nytt rør, vortekset godt og allokert (400 µl) til 3 eppendorfrør. Disse ble øyeblikkelig frosset ned (- 80°C) for senere analyse.

2.6.2 AChE-aktivitet

Assayreagenten (K-fosfatbuffer (0,1 M, pH7,2) m/ 0,48 mM ATC, 0,32 mM DTNB og 0,57 mM NaCO₃) ble tilordnet på forhånd. Opparbeidede prøver ble tint på is og fortynnet 10 x i K-fosfatbuffer (0,1 M, pH 7,2). Prøver, 2 referanseprøver og blank (K-fosfatbuffer) ble tilsatt 96 brønns mikrotiterplate (4 replikat, 50 µl). Alt arbeid ble utført på is inntil 250 µl romtemperert assayreagent ble tilsatt alle brønnene. Platen ble temperaturadaptert i SynergyMX (BioTek) plateleser (5 min, 25°C), før absorbansen ble målt ved 414 nm i 10 min (2 min intervall, 6 avlesninger). Gjennomsnittlig økning i absorbans ble regnet ut for hver prøve og omgjort til konsentrasjonen av sluttproduktet (2-nitro-5-tiobenzosyre) ved hjelp av Lambert-Beer loven. AChE-aktivitet ble uttrykt som nanomol sluttprodukt min⁻¹ mg protein⁻¹.

2.7 ALA-D-aktivitet i erythrocytter

2.7.1 Prøveopparbeiding

Røde blodceller ble tint på is og tilført 0,5 ml iskald fortynningsbuffer (0,1 M Na-fosfatbuffer, pH 7,0, m/ 8,27 µM triton X-100). Prøvene ble homogenisert i 20 sek på is, med håndholdt homogenisator (VWR) med pistill av polybutylen-tereftalat. Homogenatet ble

sentrifugert i 15 min (10.000 x g, 4°C). Supernatant ble overført til 1,5 ml eppendorfrør. 300 µl ble overført til nytt rør og fortynnet 2 x i fortynningsbuffer. 100 µl ble allokert til 7 x 0,5 ml eppendorfrør. Ett rør ble frosset ned (-80°C) til proteinanalyse, og de andre ble øyeblikkelig brukt til analyse av ALA-D-aktivitet. Supernatant-restene ble blandet, fortynnet 2 x i fortynningsbuffer, vortekset og allokert til 30 eppendorfrør (à 400 µl). Rørene ble frosset (-80°C) og ett og ett ble tint opp pr. plate, til bruk som referanse.

2.7.2 ALA-D-aktivitet

ALA-D-aktivitet i erytrocytter ble målt etter to metoder, begge basert på protokollen beskrevet av Hodson (Hodson, 1976). Den første metoden involverer bruk av HgCl₂, og ble modifisert av Hylland (Hylland, 2004), mens den andre ekskluderer HgCl₂ (Nakagawa et al. 1995).

Metode m/ HgCl₂

Prøver og referanse (6 replikat à 50 µl); 3 replikat ble tilsatt 200 µl fortynningsbuffer (blank) og de siste 3 replikatene ble tilsatt 200 µl ALA-reagent (5,1 mM ALA i fortynningsbuffer). ALA-reagenten ble laget fersk hver dag. Alle rørene ble vortekset godt og inkubert i (Termaks) varmeskap (120 min, 25°C). 300 µl fellingsløsning (99,4 mM HgCl₂ og 245 mM TCA i dH₂O) ble tilsatt alle rørene under avtrekk. Rørene ble vortekset og latt stå på benken i 5 min (20°C), etterfulgt av 5 min sentrifugering (2500 x g, 20°C). Supernatant ble overført til nye rør og vortekset. Fra hvert rør ble 150 µl tilsatt 96 brønns mikrotiterplate (NuncTM) med standardrekke av PBG i fortynningsbuffer (6 konsentrasjoner i duplikat, 8,8 - 177 µM PBG). Modifisert Ehrlich reagent (dH₂O m/ 215 mM HgCl₂, 127 mM perklorisyre, 764 mM eddiksyre og 122 mM Ehrlich reagent) ble tilsatt alle brønnene (à 150 µl). Standardløsningen og modifisert Ehrlich reagent ble laget fersk hver dag. Platen ble inkubert i 15 min (20°C) før absorbans ble målt med SynergyMX (BioTek) plateleser ved 550 nm.

Metode uten HgCl₂

20 prøver fra både indre og ytre Oslofjord ble behandlet på samme måte som beskrevet ovenfor, men i tillegg fikk de en behandling uten HgCl₂ i fellingsløsning og modifisert Ehrlich reagent. I dette tilfellet ble TCA-konsentrasjonen i fellingsløsningen økt til 429 mM. Referanseprøven på hver plate ble behandlet etter metoden med HgCl₂ (og 245 mM TCA)

2.8 PAH-metabolitter i galle

2.8.1 Prøveopparbeiding

Vi brukte metoden som er beskrevet i Krahn et. al (1992), og modifisert av Grung et al. (2009).

Alt arbeid med prøvene ble utført uten direkte lys eller lys fra lysstoffrør. Prøvene ble tint på is. Eppendorfrør (0.5 mL) med 50 µl dH₂O ble tilsatt 20 µl prøve, 10 µl 65,22 µM trifenylamin (internstandard) og 20 µl β-glukuronidase med arylsulfatase-aktivitet. Blankprøver (4 replikat, galle ekskludert) og 2 husstandarder ble opparbeidet som vanlige prøver. Alle komponentene ble oppbevart på is før og etter veiing. Vekten ble nortert. Eppendorfrørene ble vortekset og inkubert (1t, 37°C) i varmeskap (Termaks, TS8000-serien). Metanol (200 µl) ble tilført hvert rør etter endt inkubering. Rørene ble vortekset og plassert i romtemperatur i 5 min for å kjøle seg ned forut for sentrifugering i 10 min (4000 x g, romtemperatur). Supernatant (ca.250 µl) ble overført til HPLC-rør (Chromacol, 03-FISV, 300 µl, 12x32 mm) og lagret ved -20°C for senere analyse med HPLC/F på NIVA. Pelleten (utfelte proteinrester) ble kastet.

2.8.2 HPLC og fluorescens-deteksjon

Analyse av dekonjugerte PAH-metabolitter i galle ble utført av Merete Grung på NIVA. Til HPLC/F ble det brukt en Waters 2695 separasjonsmodul koblet til en 2475 fluorescensdetektor. Waters PAH C₁₈ kolonne (4,6 x 250 mm) med forkolonne (type Vydac 201TP5415), med 5 µm partikkelstørrelse, ble brukt. Kolonnen ble varmet opp til 35°C forut for bruk. Mobilfasen hadde flowrate på 1 ml/min og bestod av en acetonitril (50 mM):vann-gradient (fra 40:60 til 100:0, over 30 min). For hver analyse ble det injisert 25 µl opparbeidet galle-prøve, og følgende eksitasjon/emisjons-bølgelengder ble brukt for å detektere de ulike hydroksy-PAHene; naftalene (325/358 nm), fenantren (251/364 nm), pyren (246/384 nm) og B[a]P (380/430 nm). Internstandard, trifenylamin, ble detektert ved 300 nm (eksitasjon) og 360 nm (emisjon).

2.9 Statistiske metoder og grafisk fremstilling

Statistiske analyser ble utført med JMP 11 eller Microsoft Excel, og alle grafene ble produsert med GraphPad Prism 6. Alle data ble undersøkt for normalfordeling og homogen varians, med henholdsvis Shapiro-Wilk-test og Levenes test. Data som ikke oppfylte disse kravene ble log-transformert (med grunntall 10) og testet på nytt. Variablene lengde, vekt og 1-OH-fenantren var alle normalfordelt med homogen varians. Variablene kondisjon, log LSI, log CYP1A protein, AChE-aktivitet, ALA-D-aktivitet og 1-OH-pyren hadde alle homogen varians, men en av de 4 gruppene (hunnfisk indre, hannfisk indre, hunnfisk ytre, hannfisk ytre) hadde ikke-normalfordelte verdier. Dette ble ignorert siden parametriske tester er forholdsvis robuste mot små avvik fra normalfordeling (Whitlock og Schluter 2009). Toveis ANOVA ble utført på de nevnte variablene.

Data som ikke oppfylte kravene til parametrisk test (GSI, gjelle-EROD og lever-EROD) ble undersøkt med den ikke-parametriske Wilcoxon rank sum testen. Her ble det først testet for signifikante forskjeller mellom kjønnene innen hvert område. Der hvor det var signifikante forskjeller ble like kjønn testet mellom de to områdene. I fravær av kjønnsforskjeller ble kjønnene samlet og områdene testet mot hverandre i sin helhet. Hvis kravene til parametrisk test ble oppfylt ble uavhengig t-test brukt. Hvis ikke ble Wilcoxon rank sum test brukt.

Kji-kvadrat-test ble brukt for å undersøke aldersfrekvensen mellom kjønnene innen områdene og mellom områdene i sin helhet.

Vekst (lengde, vekt) ble undersøkt innen aldersgruppene 1, 2, 3 og 4 år. Toveis ANOVA eller uavhengig t-test ble brukt for aldersgrupper som oppfylte kravene til parametriske tester, mens Wilcoxon rank sum test ble brukt for aldersgrupper som brøt med disse kravene eller hadde for lavt antall fisk innen hver gruppe til at normalfordeling kunne vurderes tilstrekkelig (Whitlock og Schluter 2009).

Den grafiske presentasjonen baserte seg på signifikante forskjeller. Der hvor det var signifikant effekt av kjønn eller interaksjonseffekt mellom område og kjønn (to-veis ANOVA), eller der hvor det var signifikante kjønnsforskjeller innen ett eller begge områdene

(Wilcoxon), ble kjønnene presentert grafisk. I fravær av kjønnsforskjeller ble bare områdene presentert grafisk.

Spearman's korrelasjonsanalyse ble utført for å undersøke sammenhengen mellom de ulike variablene. Variabler med signifikant kjønnsforskjell innen ett eller begge områdene (LSI, GSI og gjelle-EROD) ble testet mot alle de andre variablene for hvert kjønn innen hvert område. Alle de andre variablene (alder, lengde, vekt, kondisjon, 1-OH-fenantren, 1-OH-pyren, lever-EROD, AChE-aktivitet og ALA-D-aktivitet) ble testet mot hverandre innen hvert område.

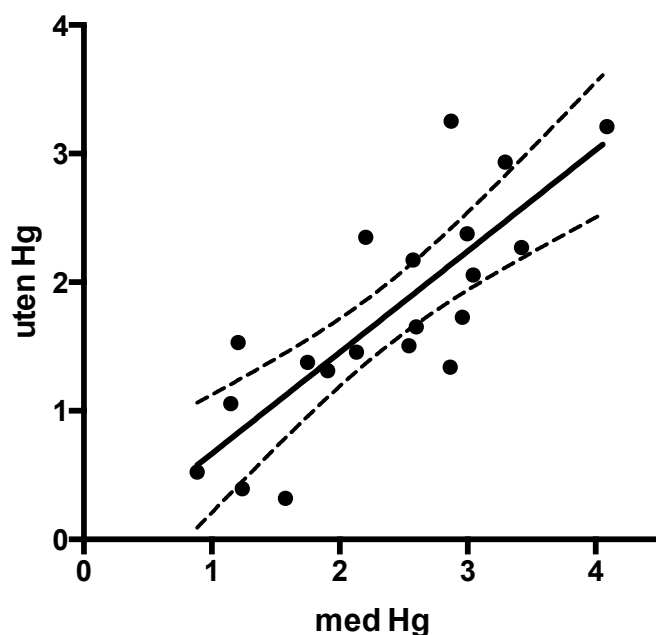
Data fra ALA-D-metodene med og uten kvikksølv ble testet for normalfordeling og homogen varians. Parvis t-test ble brukt for å evaluere den nye metoden opp mot den gamle. Pearsons korrelasjonsanalyse ble brukt for å undersøke korrelasjonen mellom metodene.

3. Resultater

3.1 Modifisert ALA-D-assay

For å undersøke om kvikksølv kunne ekskluderes fra løsningene i ALA-D-analysen ble en metode uten kvikksølv sammenlignet med den regulære metoden med kvikksølv.

Det ble detektert signifikant forskjell mellom metodene med og uten kvikksølvklorid (parvis t-test, $p < 0,0001$). Korrelasjonsanalyse viste imidlertid signifikant korrelasjon mellom metodene (Pearsons korrelasjon, $p < 0,0001$) og en korrelasjonskoeffisient på 80% (fig. 3.1). Verdiene for metoden uten kvikksølv var i 85% av tilfellene lavere enn tilhørende verdi for metoden med kvikksølv.



Figur 3.1. Resultater fra analyser av ALA-D med og uten kvikksølv. Regresjonslinjen er uthevet i sort, med 95% konfidensintervall markert med stiplede linjer på hver side.

3.2 Alder og vekst

Det ble ikke funnet signifikant kjønnsforskjell i aldersfordelingen innen områdene (kji-kvadrat-test, indre; $p = 0,5$, ytre; $p = 0,2$). Med kjønnene samlet innen områdene ble det funnet signifikant forskjell i aldersfordelingen mellom områdene (kji-kvadrat-test, $p = 0,0008$). Det var flere 2 åringer i ytre Oslofjord, og flere 3 åringer i indre Oslofjord. Maks alder i indre Oslofjord var 6 år mot 4 år i ytre Oslofjord (tabell 3.1).

For lengde og vekt ble det ikke funnet signifikant forskjell mellom områdene eller kjønnene (resultat ikke vist, fig. 3.2 a og b), men for lengde ble det funnet en svak, men signifikant interaksjon mellom område og kjønn (toveis ANOVA, $p = 0,03$), som kan antydes i figur 3.2 a.

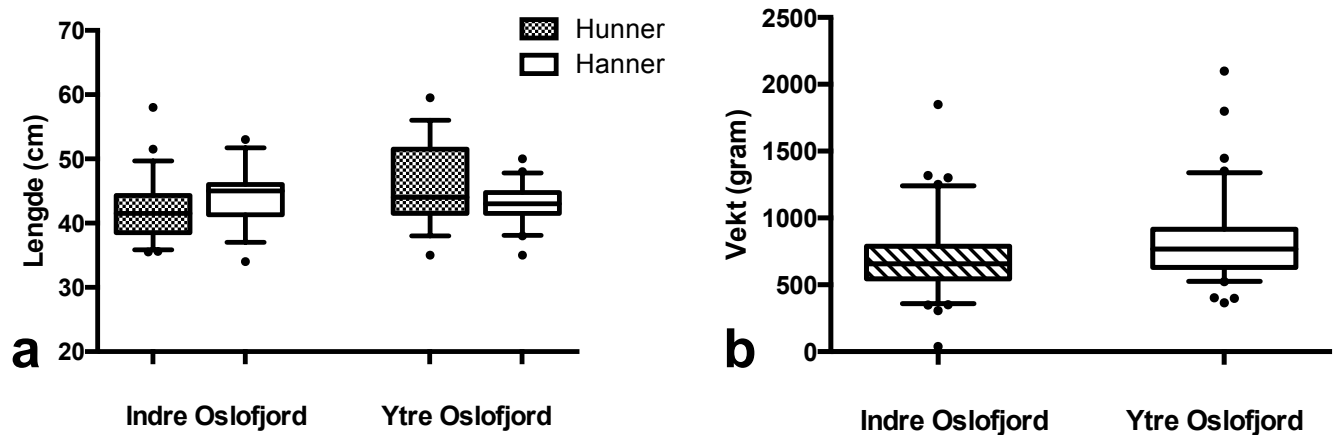


Fig. 3.2. Lengde for hann- og hunnfisk i indre og ytre Oslofjord (venstre panel) og vekt for fisk fra indre og ytre Oslofjord (høyre panel); median, kvartiler, persentiler (10/90) og utliggere.

Individer ble delt inn i grupper basert på alder (tabell 3.1). For aldersgruppe 1 år ble det ikke funnet signifikante kjønnsforskjeller for lengde ($p=0,2$) og vekt ($p=0,2$) i ytre Oslofjord (t-test), og for indre Oslofjord var det for få hannfisk til å undersøke kjønnsforskjeller. Det var ingen signifikant forskjell mellom områdene for lengde (t-test, $p=0,2$) eller vekt (Wilcoxon test, $p=0,6$) for alle fisk testet sammen.

To-veis ANOVA ble brukt til å analysere aldersgruppe 2 år for responsen lengde. Det var ingen signifikant effekt av område ($p=0,9$) eller kjønn (0,1), men signifikant interaksjonseffekt ($p = 0,02$). For responsen vekt var det brudd på antagelsen om normalfordeling. Det var ingen signifikant kjønnsforskjell i indre (Wilcoxon test, $p=0,3$) eller ytre Oslofjord (Wilcoxon test, $p=1$). Kjønnene ble samlet og områdene testet mot hverandre uten at det ble funnet noen signifikant forskjell (Wilcoxon test, $p=0,6$).

For aldersgruppe 3 år ble det ikke funnet signifikant forskjell mellom kjønnene i indre Oslofjord, for responsene vekt og lengde (Wilcoxon test, $p=$ henholdsvis 0,6 og 0,06), og for ytre Oslofjord var det for få hannfisk til å undersøke kjønnsforskjeller. Kjønnene ble samlet og områdene testet mot hverandre. Det var signifikant forskjell mellom områdene for både

lengde og vekt (t-test, $p =$ henholdsvis 0,002 og 0,0008). Fisk i ytre Oslofjord var større enn fisk i indre Oslofjord.

I aldersgruppe 4 år ble det ikke detektert signifikante kjønnsforskjeller i indre Oslofjord, for vekt eller lengde (t-test, $p =$ henholdsvis 0,6 og 0,7).

Tabell 3.1. Lengde (cm), vekt (g) og antall fisk, inndelt etter alder (år), område og kjønn. Tallene presenteres som median; 1 kvartil - 3 kvartil.

Alder		Indre Oslofjord		Ytre Oslofjord	
		Hun	Han	Hun	Han
1	Vekt	631; 580 - 740	791	499; 394 - 641	660; 615 - 719
	Lengde	42; 41 - 44	45	38; 37 - 40	42; 41 - 43
	Antall	5	1	4	4
2	Vekt	485; 413 - 742	979; 706 - 1263	766; 700 - 896	767; 723 - 808
	Lengde	37; 35 - 42	48; 44 - 51	43; 42 - 45	43; 43 - 45
	Antall	4	4	10	15
3	Vekt	604; 535 - 656	656; 570 - 783	1350; 1240 - 1447	653
	Lengde	40; 38 - 42	45; 41 - 46	52; 51 - 55	41
	Antall	8	5	5	1
4	Vekt	705; 602 - 751	647; 593 - 696	-	718
	Lengde	42; 41 - 44	41; 40 - 42	-	44
	Antall	7	3	0	1
5	Vekt	782	-	-	-
	Lengde	42	-	-	-
	Antall	1	0	0	0
6	Vekt	-	892	-	-
	Lengde	-	46	-	-
	Antall	0	1	0	0

3.3 Kondisjon og vevsindekser

Med toveis ANOVA ble det ikke detektert noen signifikant kjønnsforskjell ($p = 0,7$), eller interaksjonseffekt mellom område og kjønn ($p = 0,08$), men det ble funnet signifikant forskjell mellom områdene ($p = 0,004$), med noe høyere verdi for fisk i ytre Oslofjord (fig. 3.3).

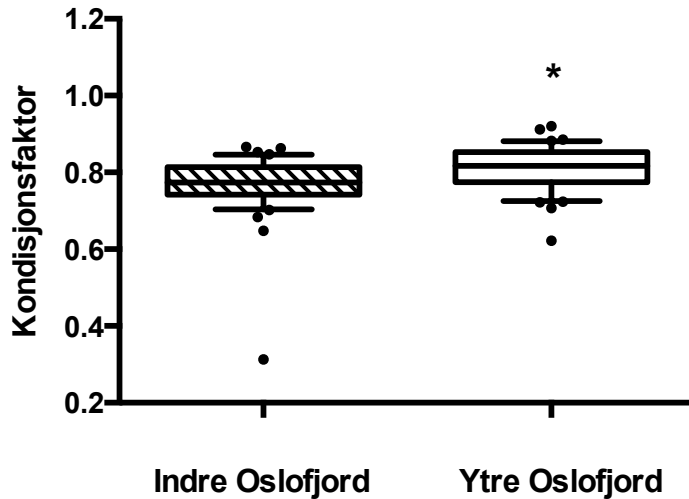


Fig. 3.3. Kondisjonsfaktor for fisk fra indre og ytre Oslofjord; median, kvartiler, persentiler (10/90) og utliggere. Gruppe med signifikant høyere verdi markert med stjerne (*) (p-verdi $\leq 0,05$)

For LSI ble det funnet signifikant forskjell mellom kjønnene og områdene (toveis ANOVA på log-transformerte verdier, $p =$ henholdsvis 0,003 og 0,008), men ingen signifikant interaksjonseffekt mellom område og kjønn ($p = 0,2$) (fig. 3.4).

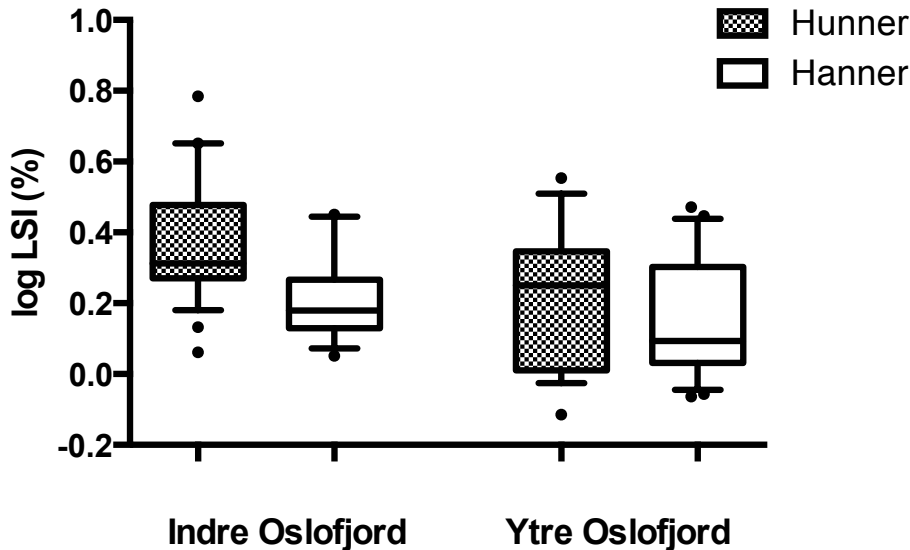


Fig. 3.4. Leversomatisk indeks (LSI) for hann- og hunnfisk fra indre og ytre Oslofjord; median, kvartiler, persentiler (10/90) og utliggere.

Analyse av data for GSI viste signifikante kjønnsforskjeller innen indre og ytre Oslofjord (Wilcoxon, $p =$ henholdsvis 0,0001 og 0,007), med høyere verdi for hunnfisk. For hannfisk ble det ikke detektert signifikant forskjell mellom områdene (Wilcoxon test, $p = 0,5$), men for

hunnfisk var det klar signifikant forskjell (Wilcoxon, $p = 0,001$), med høyere verdier i indre Oslofjord (fig. 3.5).

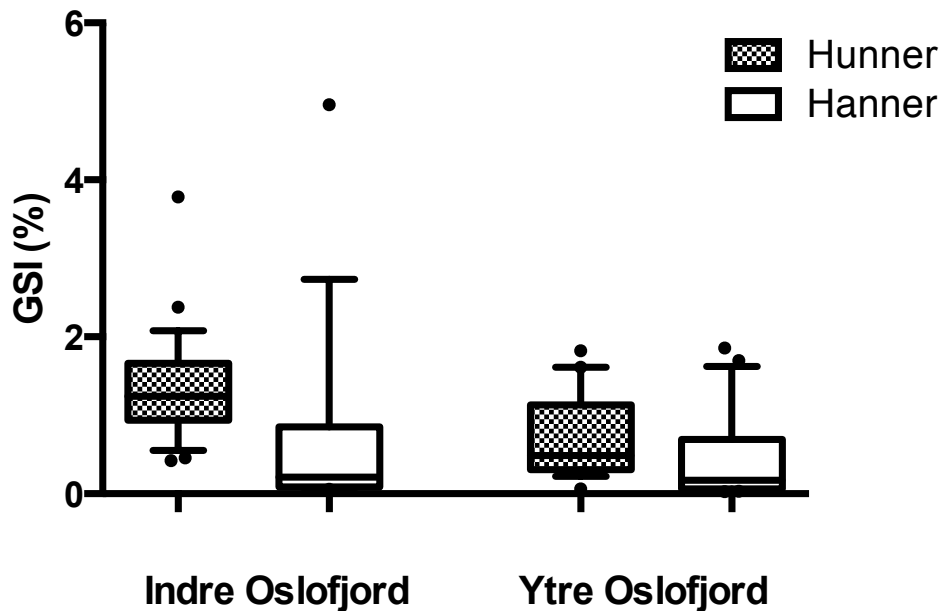


Fig. 3.5. Gonadosomatisk indeks (GSI) for hunn- og hannfisk fra indre og ytre Oslofjord; median, kvartiler, persentiler (10 og 90) og utliggere.

3.4 CYP1A-aktivitet i gjellefilament

Det var signifikant kjønnsforskjell for CYP1A-aktivitet i gjellefilament i fisk fra ytre Oslofjord (Wilcoxon, $p = 0,02$), med høyere verdi for hannfisk. I indre Oslofjord ble det ikke detektert signifikant kjønnsforskjell (Wilcoxon, $p = 0,7$). Mellom områdene var det signifikant forskjell for hannfisk (Wilcoxon, $p = 0,009$), med høyest aktivitet i ytre Oslofjord. Det var ingen signifikant forskjell mellom hunnfisk fra indre og ytre Oslofjord (Wilcoxon, $p = 0,07$) (fig. 3.6).

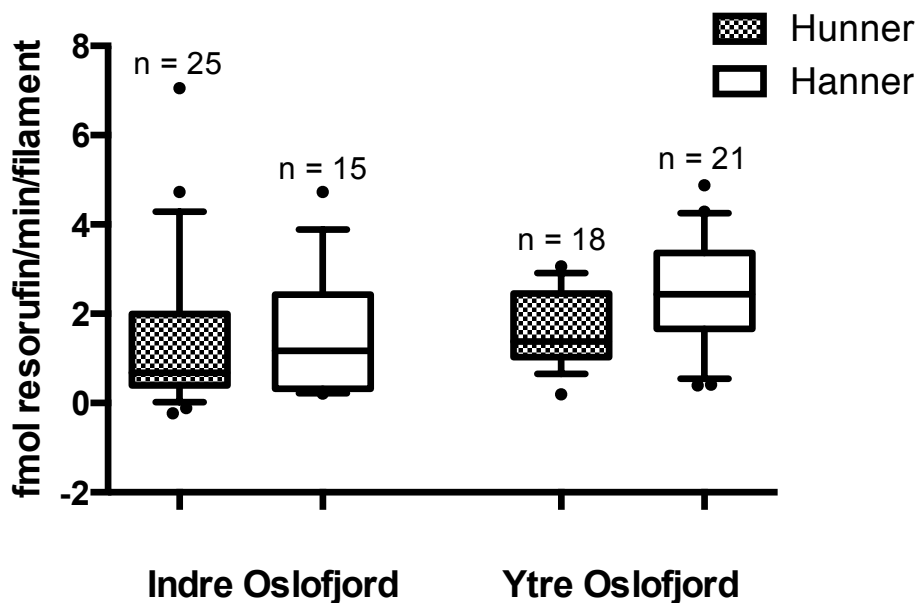


Fig. 3.6. EROD-aktivitet i gjeller for hunn- og hannfisk i indre og ytre Oslofjord; median, kvartiler, persentiler (10/90) og utliggere markert som prikker over og under persentilene. n = antall prøver i hver gruppe.

3.5 Hepatisk CYP1A-aktivitet

Det var ingen signifikant forskjell i CYP1A-aktivitet i lever mellom kjønnene innen hvert område (Wilcoxon, indre; $p = 0,6$, ytre; $p = 0,4$). Det var imidlertid signifikant høyere aktivitet for torsk (begge kjønn) innsamlet i indre Oslofjord enn for torsk innsamlet i ytre Oslofjord (Wilcoxon, $p < 0,0001$) (fig. 3.7).

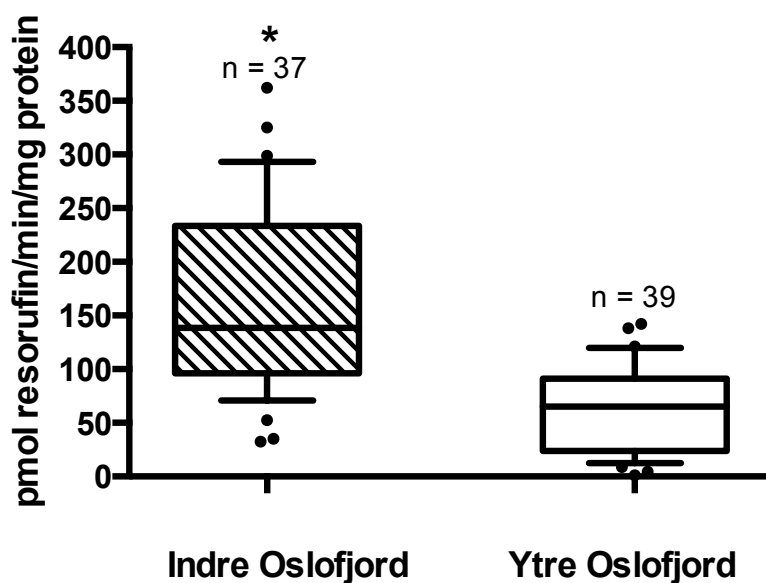


Fig. 3.7. EROD-aktivitet i lever fra torsk innsamlet i indre og ytre Oslofjord; median, kvartiler, persentiler (10/90) og utliggere. Gruppe med signifikant høyere verdi markert med stjerne (*) (p -verdi $\leq 0,05$). n = antall prøver i hver gruppe.

3.6 CYP1A protein i lever

Det ble funnet signifikant forskjell i konsentrasjon av CYP1A-protein mellom områdene (toveis ANOVA, $p < 0,0001$), med høyere nivå av CYP1A-protein i fisk fra indre Oslofjord (fig. 3.8). Det ble ikke funnet noen signifikante kjønnsforskjell ($p = 0,8$), eller interaksjonseffekt mellom område og kjønn ($p = 0,9$).

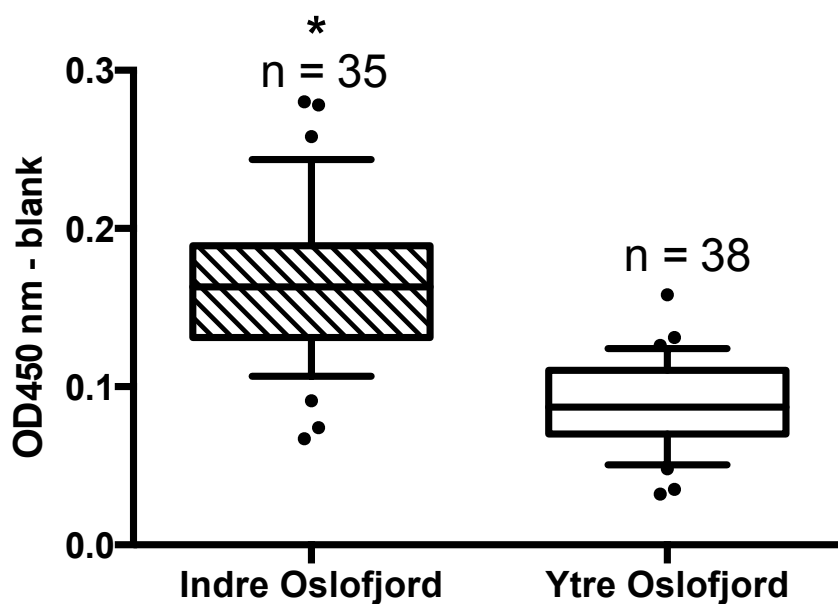


Fig. 3.8. Relativ mengde CYP1A-protein i lever fra torsk innsamlet i indre og ytre Oslofjord; median, kvartiler, percentiler (10/90) og utliggere. Gruppe med signifikant høyere verdi markert med stjerne (*) (p -verdi $\leq 0,05$). n = antall prøver i gruppen.

3.7 AChE-aktivitet i muskel

For AChE-aktivitet i muskel ble det ikke funnet noen signifikante effekt av område (toveis ANOVA, $p = 0,09$) eller kjønn ($p = 0,4$), og heller ingen interaksjonseffekt mellom område og kjønn ($p = 0,7$) (fig. 3.9).

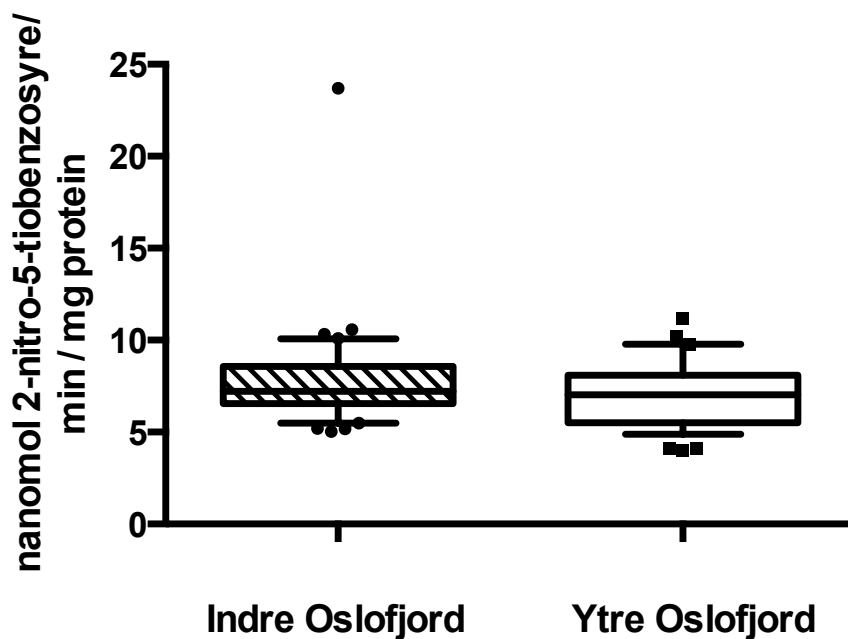


Fig. 3.9. AChE-aktivitet i muskel fra torsk (begge kjønn) innsamlet i indre og ytre Oslofjord; median, kvartiler, persentiler (10 og 90) og utliggere. Det var ingen signifikante forskjeller mellom gruppene.

3.8 ALA-D-aktivitet i erythrocytter

Det ble ikke funnet signifikant forskjell mellom kjønnene (toveis ANOVA, $p = 0,7$) eller områdene ($p = 0,4$) for ALA-D-aktivitet i blod (fig. 3.10). Det ble heller ikke funnet noen signifikant interaksjonseffekt mellom område og kjønn ($p = 0,4$).

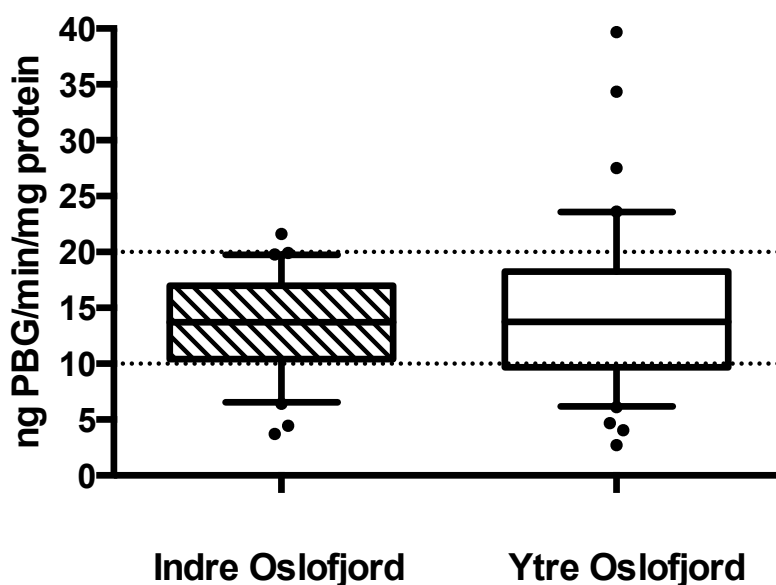


Fig. 3.10. ALA-D-aktivitet i blod fra torsk (begge kjønn) innsamlet i indre og ytre Oslofjord; median, kvartiler, persentiler (10 /90) og utliggere. Verdier mellom de stiplede linjene regnes som normale (OSPAR 2007). Det var ingen signifikante forskjeller mellom gruppene.

3.9 PAH-metabolitter i galle

Alle analyserte prøver hadde verdier over deteksjonsgrensen (2 ng/g galle) for 1-OH-fenantren. Det var ingen signifikant forskjell mellom områdene (toveis ANOVA, $p = 0,6$) eller kjønnene ($p = 0,7$), og det var heller ingen signifikant interaksjonseffekt mellom område og kjønn ($p = 0,4$) (fig. 3.11).

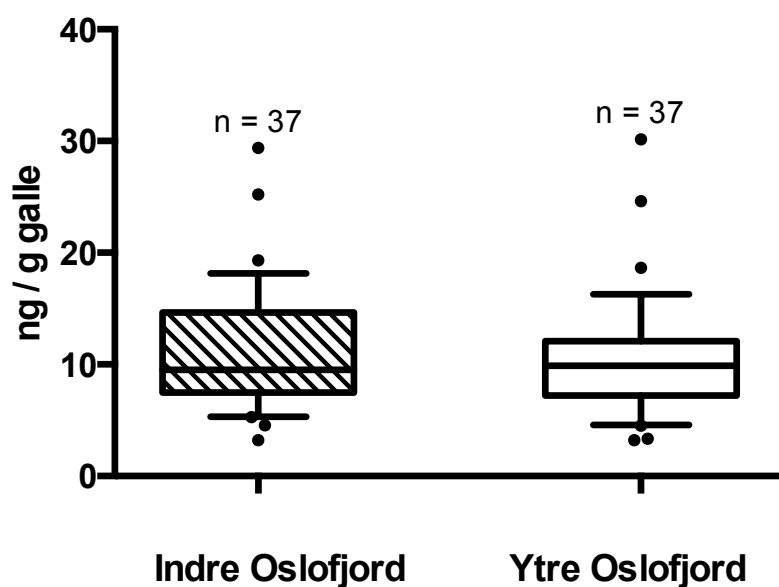


Fig. 3.11. 1-OH-fenantren i galle fra torsk (begge kjønn) innsamlet i indre og ytre Oslofjord; median, kvartiler, persentiler (10/90) og utliggere. $n =$ antall prøver i gruppen. Det var ingen signifikante forskjeller mellom gruppene.

Alle unntatt en prøve hadde verdier over deteksjonsgrensen (1,5 ng/g galle) for 1-OH-pyren (fig. 3.12). Det ble funnet signifikant forskjell mellom områdene for 1-OH-pyren (toveis ANOVA på log-transformerte verdier, $p < 0,001$), med høyere verdier i indre Oslofjord. Det var ingen signifikant kjønnsforskjell ($p = 0,6$), og heller ingen signifikant interaksjonseffekt mellom område og kjønn ($p = 0,9$).

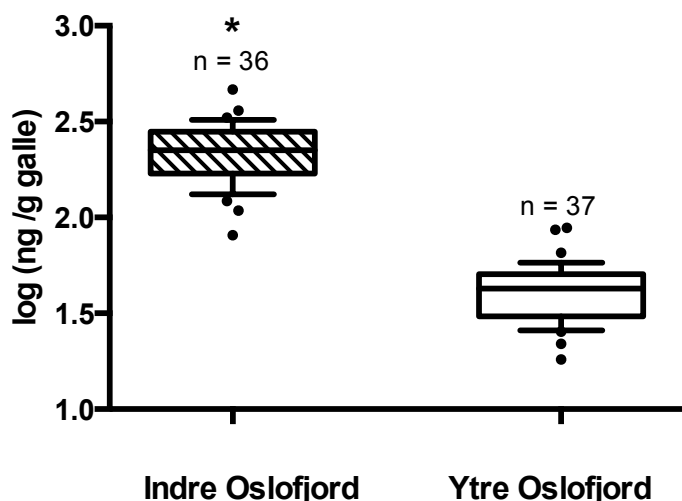


Fig. 3.12. 1-OH-pyren i galle fra torsk (begge kjønn) innsamlet i indre og ytre Oslofjord; median, kvartiler, persentiler (10/90) og utliggere. Gruppe med signifikant høyere verdi markert med stjerne (*) (p-verdi $\leq 0,05$). n = antall prøver i gruppen.

Data ble også analysert for 3-OH-B(a)P og 2-OH-naftalen. Det ble ikke gjort statistisk analyse av dataene fordi bare en prøve hadde verdi over deteksjonsgrensen (2 ng/g galle) for 3-OH-B(a)P, og resultatene for 2-OH-naftalen var ikke mulig å skille fra bakgrunnsstøy. Før den høyeste blankprøven ble subtrahert fra OH-B(a)P-dataene var 18 prøver i indre Oslofjord over 2 ng/g galle, mot 1 prøve i ytre Oslofjord.

3.10 Korrelasjon mellom biomarkørene

Spearman's korrelasjonsanalyse ble brukt for å undersøke sammenhenger mellom de ulike biomarkørene. Variablene med signifikant kjønnsforskjell (LSI, GSI og gjelle-EROD) ble testet mot alle de andre variablene innen hvert kjønn i hvert område. Variabler med signifikant korrelasjon ($p \leq 0,05$) med LSI, GSI eller gjelle-EROD, for ett eller begge kjønnene innen ett område, ble presentert i tabell 3.3 og 3.4. Alle de andre variablene (alder, lengde, vekt, kondisjon, OH-fenantren, OH-pyren, lever-EROD, AChE-aktivitet og ALA-D-aktivitet) ble testet mot hverandre innen hvert område. Variabler med signifikant korrelasjon ($p \leq 0,05$) innen ett eller begge områdene ble presentert i tabell 3.5.

Tabell 3.3. Tabellen viser variabler som korrelerte med enten LSI, GSI eller gjelle-EROD innen hvert kjønn i indre Oslofjord. Bare variabler som var signifikant korrelert for hannfisk og/eller hunnfisk ble presentert (markert med *).

Tabell 3.3		Hunnfisk		Hannfisk	
Variabel	Variabel	Spearman's ρ	p-verdi	Spearman's ρ	p-verdi

LSI	Lengde	-0,1244	0,6	-0,5381	0,04*
GSI	Lengde	-0,2951	0,2	-0,5471	0,03*
GSI	LSI	0,5616	0,004*	0,3857	0,2
CYP1A protein	LSI	0,5919	0,04*	-0,3905	0,07
ALA-D	GSI	-0,2905	0,2	-0,5879	0,03*
1-OH-fenantren	GSI	0,4812	0,02*	-0,5077	0,06
1-OH-pyren	GSI	0,5490	0,008*	-0,6714	0,006*
EROD i lever	EROD i gjeller	-0,3597	0,1	0,5879	0,03*

Tabell 3.4. Tabellen viser variabler som korrelerte med enten LSI, GSI eller gjelle-EROD innen hvert kjønn i ytre Oslofjord. Bare variabler som var signifikant korrelert for hannfisk og/eller hunnfisk ble presentert.

Tabell 3.4		Hunnfisk		Hannfisk	
Variabel	Variabel	Spearman's ρ	p-verdi	Spearman's ρ	p-verdi
LSI	Lengde	0,7135	0,0006*	0,1263	0,6
LSI	vekt	0,7632	0,0001*	0,1871	0,4
LSI	kondisjonsfaktor	0,4960	0,03*	0,1377	0,6
GSI	Lengde	0,5072	0,03*	0,0105	1
GSI	vekt	0,4877	0,03*	0,1143	0,6
GSI	kondisjonsfaktor	0,4969	0,03*	0,1312	0,6
GSI	LSI	0,4754	0,04*	0,2675	0,2
Alder	LSI	0,5116	0,03*	-0,2921	0,2
Alder	GSI	0,5617	0,01*	0,1522	0,5
EROD i lever	LSI	0,0147	1	0,4566	0,04*

Tabell 3.5. Tabellen viser korrelerte variabler innen indre og ytre Oslofjord. Bare variabler som var signifikant korrelert i indre og/eller ytre Oslofjord er presentert.

Tabell 3.5		Indre		Ytre	
Variabel	Variabel	Spearman's ρ	p-verdi	Spearman's ρ	p-verdi
vekt	Lengde	0,8959	<,0001*	0,9395	<,0001*
kondisjonsfaktor	vekt	0,3875	0,01*	0,0965	0,6
Alder	Lengde	-0,0473	0,8	0,5302	0,0004*
Alder	vekt	0,0183	0,9	0,4784	0,002*
CYP1A protein	EROD i lever	0,3616	0,04*	0,2956	0,08
AChE-aktivitet	Lengde	-0,4808	0,002*	-0,6073	<,0001*
AChE-aktivitet	vekt	-0,6215	<,0001*	-0,5796	0,0001*
AChE-aktivitet	kondisjonsfaktor	-0,4908	0,001*	0,0656	0,7
ALA-D-aktivitet	kondisjonsfaktor	-0,3684	0,02*	-0,0167	0,9
1-OH-pyren	1-OH-fenantren	0,8628	<,0001*	0,7670	<,0001*

4. Diskusjon

4.1 Modifisert ALA-D-metode

Kvikksølv er et ikke-essensielt metall og konsekvensene av eksponering har vist å være potensielt fatale for organismer (Kidd og Batchelar 2011). Reguleringen har derfor vært streng nasjonalt og internasjonalt. Fra 2008 ble det i Norge innført et generelt forbud mot kvikksølv og høsten 2013 ble Minamatakonvensjonen skrevet under, som ytterligere forsøker å redusere bruk og utslipp. Konvensjonen har allerede blitt ratifisert av flere land og vil tre i kraft når > 50 land ratifiserer den (Sørensen og Bakka 2014). Økonomiske insentiv har allerede blitt satt på plass for å redusere utslippene i Norge. For bruk av kvikksølv til denne studien ble det betalt 3000.- i avgift. Det er dermed ønskelig, fra et økonomisk og miljømessig ståsted, å ekskludere bruk av kvikksølv i forskningssammenheng. Av denne grunnen ble det undersøkt om ALA-D-analysen kunne utføres uten kvikksølvklorid.

Kvikksølvs rolle i ALA-D-analysen er å avslutte den enzymatiske reaksjonen ved å binde til SH-grupper og å denaturere proteiner (Granick et al. 1973). Forsøk med karpefisk (*Cyprinus carpio*) har vist at en økning av TCA i fellingsløsningen kan gi tilsvarende resultat som med regulær fellingsløsning (Nakagawa et al. 1995). Kvikksølv ble ekskludert fra både fellingsløsningen og modifisert Ehrlich-reagent, og ulike TCA-konsentrasjoner (4, 5, 6, 7 og 14%) ble brukt. Konsentrasjoner < 7% TCA ga høyere gjennomsnittresultat sammenlignet med den regulære metoden (rød supernatant pga. hemoglobin), og i tilfellet med 14% TCA ble resultatet lavere enn den regulære metoden. Med 7% TCA ble resultatene tilfredsstillende like metoden med kvikksølv (Nakagawa et al. 1995). Bratrud (2014) undersøkte om metoden kunne anvendes på torskeblod. TCA i fellingsløsningen ble økt til 10%, og resultatene ble konsekvent lavere enn metoden med kvikksølv. Det var 84% korrelasjon mellom metodene (Bratrud 2014). Av denne grunnen ble 7% TCA valgt i denne studien.

Det var signifikant forskjell mellom metodene, men god korrelasjon (80%). Majoriteten (85%) av verdiene var lavere i metoden uten kvikksølv. Dette var svært likt verdiene fra Bratrud (2014) og indikerer at metoden kan brukes.

4.2 Alder og vekst

Det var signifikant forskjell i aldersfordeling mellom torsk av samme størrelse innsamlet i indre og ytre Oslofjord, men ikke mellom kjønnene innen hvert område. Indre Oslofjord hadde 1/3 så mange 2 åringer og dobbelt så mange 3 åringer sammenlignet med ytre Oslofjord. Den eldste fisken i indre Oslofjord var 6 år, mot 4 år i ytre Oslofjord. Fisk i indre Oslofjord var signifikant eldre enn fisk i ytre Oslofjord. Signifikant eldre fisk i indre Oslofjord enn i ytre Oslofjord til tross for samme størrelse har også vært funnet tidligere (Holth 2004, Fredriksen 2013, Bratrud 2014). Eldre fisk i ytre Oslofjord (>3 år) kan ha vært større og dermed blitt ekskludert fra studien ettersom det ble forsøkt å samle inn fisk av lik størrelse.

For vekt og lengde var det ingen signifikant forskjell mellom områdene eller kjønnene innen områdene for aldersgruppe 1 og 2 år, men i aldersgruppe 3 år var fisk i ytre Oslofjord større (tyngre og lengre). Dette indikerte normal, eller lik vekst, mellom områdene for fisk de to første leveårene, etterfulgt av tregere vekst i indre sammenlignet med ytre Oslofjord for eldre fisk. Forskjeller i vekst attribueres gjerne til forskjeller i næringstilgang eller næringskvalitet (Brett 1979). Siden torsk av ulik størrelse har noe forskjellig byttepreferanse (Hop et al. 1992, Link et al. 2009, Demain et al. 2011, Magnussen 2011) kan forskjeller i vekst mellom områdene for 3-åringer, men ikke 1 og 2-åringer, indikere at næringstilgangen for eldre fisk var dårligere i indre Oslofjord sammenlignet med ytre Oslofjord. Berge et al. (2014) fant spesielt gode reke-forekomster i indre Oslofjord i 2013. Reker og andre krepsdyr utgjør en vesentlig del av dietten til torsk (Hop et al. 1992, Link et al. 2009), men undersøkelser har vist at torske-populasjoner med høyt rekeinhold i dietten har tregere vekst sammenlignet med torske-populasjoner med en mer variert diett, bestående av mer pelagisk fisk (Sherwood et al. 2007).

Flere andre faktorer kan også bidra til å forklare forskjeller i vekst, som f.eks. temperatur (Brander 1995, Björnsson et al. 2007), oksygen-nivå (Brett 1979), populasjonstetthet (Bromley 1989) og kjønnsmodning (Davidson et al. 2014). Forskjeller i eksponering for miljøgifter kan også føre til redusert vekst, gjennom flere ulike mekanismer, som f.eks.

forstyrrelse av tyroid-systemet (PCBer m.fl.) og nervesignalisering (pesticider m.fl.) (Tierney et al. 2010, Weis 2014) eller energikrevende detoksifisering (Forbes og Calow 1996). Eldre fisk kan ha vært mer belastet av miljøgifter sammenlignet med yngre fisk ettersom de har hatt lengre tid akkumulere miljøgifter som kan bioakkumulere. En annen mulighet er at endringer i ernæringspreferanse kunne ført til økt konsum av organismer på høyere trofisk nivå som dermed kan føre til økt eksponering for kontaminanter gjennom føden, som f.eks. PCBer, som er kjent for å biomagnifisere. Disse to mulighetene kunne vært plausible forklaringer på lavere vekst for eldre fisk (>2 år) i indre Oslofjord, men som nevnt, andre naturlige forklaringer som større populasjonstetthet og dermed økt konkurranse om næring (Bromley 1989), kan også være plausible forklaringer.

4.3 Kondisjon og vevsindekser

Det finnes flere ulike fysiologiske mål som kan gi informasjon om helsen til enkeltindivid og populasjoner, som f.eks. kondisjonsfaktoren og LSI (Bolger og Collonny 1989, Balk et al. 2012, Van der Oost et al. 2003). Begge er relativt enkle å beregne da de bare krever lengde og/eller vekt. Grovt sett kan man si at kondisjonsfaktoren og LSI reflekterer energi tilgjengelig i henholdsvis muskler (protein) og lever (lipider) (Lambert og Dutil 1997, Yaragina og Marshall 2000). Ettersom lipider inneholder mer energi enn proteiner vil fettreservene i leveren forbrukes før proteiner i muskler med den konsekvens at LSI blir mer dynamisk enn kondisjonsfaktoren (Yaragina og Marshall 2000).

Kondisjonsfaktoren antar isometrisk vekst, noe man ikke har funnet grunn til å betvile for torsk (Daan 1974). Kondisjon mellom 0,8 - 1 regnes som bra, mens verdier under 0,6 gir økt risiko for mortalitet (Dutil og Lambert 2000). Majoriteten av verdiene fra både indre og ytre Oslofjord har i tidligere studier ligget mellom 0,8 og 1 (Holth 2004, Imrik 2010, Nerland 2011, Bergland 2012, Fredriksen 2013, Bratrud 2014). I andre studier har det ikke vært signifikante forskjeller mellom områdene (Imrik 2010, Nerland 2011, Bergland 2012, Bratrud 2014), men i 2002 og 2011 var det signifikant bedre kondisjon for torsk som ble innsamlet i indre Oslofjord sammenlignet med ytre Oslofjord (Holth 2004, Fredriksen 2013). I denne studien ble det også funnet signifikant forskjell i kondisjon mellom områdene, men denne gangen med høyere verdier i ytre Oslofjord. Dette indikerer bedre næringstilgang i ytre

Oslofjord (Bolger og Collonny 1989, Mallowney og Rose 2014) og korresponderer med noe bedre vekst for eldre fisk i ytre Oslofjord. De fleste verdiene var omkring 0,8 for begge områdene. Dette var relativt lavt med tanke på at torsk har maksimal kondisjon om høsten (Schwalme og Chouinard 1999). Kondisjonsfaktoren tidligere år har vært litt høyere enn i denne studien og i Fredriksen (2013). Dette kan skyldes, som Fredriksen (2013) poengterte, at tidligere studier har brukt total kroppsvekt (Holth 2004, Imrik 2010, Nerland 2011, Bergland 2012). Ved å bruke somatisk vekt reduseres kondisjonsfaktoren. I tillegg vil variasjonen reduseres siden mageinnhold ikke lenger tas med. Bratrud (2014) brukte også somatisk vekt for å beregne kondisjonsfaktor, men hans verdier var noe høyere enn i denne studien.

Torsk lagrer overskuddslipider primært i leveren (Lambert og Dutil 1997, Svåsand et al. 2004). Lipidnivået varierer mye, men kan bli så høyt som 60% for villtorsk (Lie et al. 1986) og 70% for oppdrettstorsk (Shahidi og Dunajski 1994). LSI er ratioen mellom levervekt og somatisk vekt uttrykt i prosent, et mål som kan indikere fiskens energireserver (Lambert og Dutil 1997). LSI mellom to og seks prosent har blitt regnet som normalt for villtorsk (Jobling 1988). I denne studien hadde torsk fra både indre og ytre Oslofjord median LSI under 2 prosent. Dette indikerte at flere torsk fra begge områdene hadde relativt små energireserver. LSI var signifikant høyere for fisk i indre Oslofjord, noe som indikerte bedre næringstilgang/kvalitet enn i ytre Oslofjord. Dette var motstridende med resultatene for kondisjon og vekst, som indikerte bedre næringstilgang i ytre Oslofjord.

Både kondisjon og LSI kan påvirkes av en rekke biotiske (f.eks. kjønn, størrelse, kjønnsmodning) og abiotiske faktorer (f.eks. temperatur, miljøgifter) (Balk et al. 2012, Van der Oost et al. 2003). Effekter av miljøgifter er i denne sammenhengen av spesiell interesse. Flere studier har funnet signifikant forskjell i kondisjon mellom fisk fra miljøgift-forurensede områder sammenlignet med fisk fra referanseområder. Både økt og redusert kondisjon har blitt påvist (Van der Oost et al. 2003). Miljøgifter kan på lik linje påvirke LSI i positiv eller negativ retning. Eksponering for miljøgifter kan f.eks. føre til hepatisk hypertrofi (økt celledørrelse) (Zodrow et al. 2004) eller hepatisk hyperplasi (økt celledeling) (Menescal et al. 2012), som kan føre til økt levervekt og potensielt økt LSI. Flere studier har vist de samme histologiske symptomene i fisk eksponert for vann fra kontaminert område (Van der Oost et al. 2003). Miljøgifter kan også føre til celledød i lever som kan føre til redusert LSI, gjennom apoptose (Risso-de Faverney et al. 2004) eller nekrose (Tashjian et al. 2006). Det er selvsagt

også mulig at eksponering for miljøgifter ikke påvirker LSI direkte (se f.eks. Holth et al. 2010).

I denne studien ble det funnet signifikant forskjell i LSI mellom kjønn og område. Hunnfisk hadde høyere LSI innen begge områdene, og fisk fra indre Oslofjord hadde noe høyere LSI sammenlignet med fisk fra ytre Oslofjord. Median LSI for hunnfisk i indre Oslofjord var på grensen til god (to prosent), mens de andre gruppene hadde median under to prosent. Tidligere studier i indre Oslofjord har funnet verdier fra én til tre prosent (Holth 2004, Imrik 2010, Nerland 2011, Bergland 2012, Bratrud 2014) og med unntak av Bergland (2012) ble det ikke funnet noen signifikant forskjell mellom områdene. I Bergland (2012) var det høyere LSI i ytre Oslofjord. Fredriksen 2013 fant i likhet med denne studien at LSI var høyere for hunner innen områdene, og høyest i indre Oslofjord. Mulig forklaring kan være tidligere kjønnsmodning for hunner i forhold til hanner, og tidligst kjønnsmodning i indre Oslofjord. I denne og tidligere studier ble torsk samlet inn på samme tidspunkt (slutten av november) (Holth 2004, Imrik 2010, Nerland 2011, Bergland 2012, Fredriksen 2013, Bratrud 2014) bl.a. for å unngå reproduktiv modning ettersom fysiologiske og biokjemiske endringer relatert til reproduktiv modning kan påvirke de andre biomarkørene.

GSI er ratio mellom gonadevekt og somatisk vekt uttrykt i prosent, og er en generelt en indikator på reproduktiv modning (Balk et al. 2012). Hunnfisk i indre Oslofjord hadde signifikant høyere GSI sammenlignet med de andre gruppene, men også innen ytre Oslofjord var det signifikant forskjell, med høyere verdi for hunnfisk. Dette indikerer tidligere kjønnsmodning for hunnfisk i indre, og til en viss grad, ytre Oslofjord. Tidligere studier har også funnet signifikant høyere GSI for hunnfisk i indre Oslofjord (Nerland 2011, Fredriksen 2013). I 2012 ble det funnet signifikant høyere GSI i indre sammenlignet med ytre Oslofjord, men ingen signifikant kjønnsforskjell innen områdene (Bratrud 2014).

Kjønnsmodning er en kompleks prosess som kan påvirkes av en rekke faktorer som f.eks. fotoperiode, temperatur og miljøgifter (Donker et al. 1993, Arukwe og Goksøyr 1998, Morgan et al. 2010). Organismer som eksponeres for kontaminanter over lengre perioder kan akklimatisere med en påfølgende kostnad for gonadeproduksjon (Farwell et al. 2012). Andre eksempler er xenoøstrogener som i svært lave konsentrasjoner kan stimulere leveren til å syntetisere gonade-relaterte proteiner, som dermed kan øke GSI (Arukwe og Goksøyr 1998,

Van der Oost et al. 2003). Kontaminanter kan dermed føre til både redusert og økt GSI, men forskjellene mellom områdene kan også skyldes naturlig påvirkning.

Under reproduktiv modning vil energireserver normalt allokeres til gonadevekst (Holth et al. 2010, Sutharshiny et al. 2013, Davidson et al. 2014), som dermed gir økt GSI. Følgelig vil LSI bli redusert, men dette skjer ikke med en gang. Økt hepatisk aktivitet relatert til produksjon av eggeskallprotein (zona radiata) og pre-eggeplommeprotein (vitellogenin) krever økt investering i hepatiske ribosomer, endoplasmatisk retikulum og Golgi-apparat, som dermed kan øke LSI (Arukwe og Goksøyr 1998, Banks et al. 1999, Dahle et al. 2003). Dette kan dermed forklare den signifikant positive korrelasjonen mellom GSI og LSI for hunnfisk innen indre og ytre Oslofjord. Det samme ble funnet av Fredriksen (2013). Positiv korrelasjon mellom de samme parameterne har blitt funnet i flere tidligere studier også (Imrik 2008, Nerland 2011, Bergland 2013, Bratrud 2014), uten at det har vært signifikant forskjell mellom områdene eller kjønnene for både LSI og GSI.

En årsak til høyere GSI i indre Oslofjord kunne vært den større andelen eldre fisk som ble fanget inn derfra. Det var f.eks. 23 fisk på 3 år eller eldre i indre Oslofjord, mot 7 fisk i ytre Oslofjord. Analyse av GSI for hunnfisk mellom områdene, separert i aldersgrupper 1- 3 år, fant overraskende nok bare signifikant høyere verdi for 1 år gamle hunnfisk i indre Oslofjord. Dette kan skyldes få individer i analysen. Torsk kan bli kjønnsmodne så tidlige som 1 år, men investerer gjerne mindre i gonadeproduksjon sammenlignet med eldre fisk (Svåsand et al. 2004).

4.4 Enzymatiske biomarkører

4.4.1 Effekter av koplanare organiske miljøgifter

Det var signifikant høyere hepatisk CYP1A-aktivitet og -konsentrasjon, som målt som henholdsvis EROD og protein (med ELISA), i torsk fra indre Oslofjord sammenlignet med torsk fra ytre Oslofjord. Dette indikerer høyere eksponering for CYP1A-induserende stoffer som koplanare PAHer og organohalogener (f.eks. PCBer og dioksiner) i indre Oslofjord

(Goksøyr og Förlin 1992, Whyte et al. 2000, Van der Oost et al. 2003, Gagnon og Bakhtyar 2013).

Tidligere studier har også funnet signifikant forskjell mellom områdene, med høyere CYP1A-aktivitet (EROD) i indre Oslofjord (Holth 2004, Imrik 2010, Nerland 2011, Bergland 2012, Fredriksen 2013, Bratrud 2014). Frem til og med 2011 var alle verdiene i indre Oslofjord under 145 pmol/min/mg protein, som regnes som bakgrunnsnivå for hepatisk EROD-aktivitet i torsk (Hylland et al. 2012 a). I 2012 og 2013 var henholdsvis 25% (Bratrud 2014) og 52% av prøvene i indre Oslofjord over bakgrunnsnivå. Dette indikerte en markant økning i eksponering for AhR-ligander i indre Oslofjord. Det var ingen korrelasjon mellom noen av PAH-metabolittene (1-OH-fenantren, 1-OH-pyren og 3-OH-B(a)P) og CYP1A-markørene, noe som indikerte at andre stoffer var ansvarlig for induksjonen, som f.eks. PAHer med >5 benzen-ringer, PCBer eller dioksiner (Goksøyr og Förlin 1992, Whyte et al. 2000, Van der Oost et al. 2003). Tidligere studier har vist at nivået av PCB (Σ PCB-7) i sediment fra indre Oslofjord har vært relativt lavt, konsentrasjoner i torskelever har blitt klassifisert som "god", selv om det i havneområdet og i Bjørvika har vært noe høyere verdier (Berge et al. 2013 b). Målinger av PCB (Σ PCB-7) i lever viser at torsk fra indre Oslofjord har vært markert PCB-forurenset over lengre tid (1990 - 2012) (Green et al. 2013), og det er dermed lite trolig at PCBer alene kan ha ført til de økte EROD-verdiene de to siste årene, såfremt det ikke har vært økt tilførsel av PCB-kongener som ikke ble målt i sediment eller lever. Alternativt kan blandingseffekter ha gjort seg gjeldende. Slike effekter kan både maskere og forsterke CYP1A-induksjon (Celandier 2011).

Målinger av hepatisk EROD i torsk ble utført i indre Oslofjord fra 1997 - 2012, uten at det ble funnet noen signifikant trend, og bare i 2000 og 2002 var median over bakgrunnsnivå (Green et al. 2013). Dette strider dermed med Holth (2004) som i 2002 fant svært lavt nivå av CYP1A-aktivitet med median 7,7 pmol/min/mg protein. Fra 2011 til 2012 fant Green et al. (2013) en reduksjon i median fra 92 til 32 pmol/min/mg protein, mens Fredriksen (2013) og Bratrud (2014) fant en økning i median fra 34 til 87 pmol/min/mg protein. Det er dermed relativt stor variasjon i EROD-aktivitet innenfor samme område over et kort tidsrom.

De toksiske mekanismene til AhR-ligander som PAHer og organohalogener er svært kompliserte, men i all hovedsak medieres toksisiteten via AhR-pathwayen (review i Zhou et

al. 2010). Selv om CYP1A kan føre til detoksifisering kan det også føre til metabolsk aktivering av fremmedstoffene (Andersson og Förlin 1992, Whyte et al. 2000, Celander 2011). CYP1A-produserte metabolitter etter f.eks. PAHer og PCBer kan bl.a. føre til oksidativt stress og protein- eller DNA-addukter (Andersson og Förlin 1992, Peters et al. 1996, Schilderman et al. 2000, Aas et al. 2000). CYP1A-induksjon har blitt knyttet til effekter på reproduksjon, LSI og overlevelse, selv om disse linkene ikke er spesielt veletablerte (Whyte et al. 2000). CYP1A-induksjon etter PAH-eksponering har blitt knyttet til mer alvorlige effekter på organ, som f.eks. hepatisk neoplasma (kreftsvulst), i flere ulike fiskearter (review i Collier et al. 2013). Linken mellom hepatisk neoplasma og CYP1A-induksjon utgjør den sterkeste for å koble CYP1A-induksjon til effekter i organismer (Collier et al. 2013). Pga. den sterke koblingen til negative effekter på organ-nivå er det svært problematisk at CYP1A-aktiviteten overskrider bakgrunnsnivå for flere av prøvene i indre Oslofjord.

Verdiene i ytre Oslofjord har ligget under bakgrunnsnivå i denne og tidligere studier (Holth 2004, Imrik 2010, Nerland 2011, Bergland 2012, Fredriksen 2013, Bratrud 2014). Dette indikerer at ytre Oslofjord har vært og er relativt uforurenset, og dermed et bra referanseområde, med tanke på CYP1A-induserende stoffer.

Det er flere naturlige faktorer som kan påvirke EROD-aktivitet (Hylland et al. 2012 a). Temperatur, pH, oksygen-nivå, fotoperiode, næringstilgang, reprodutiv status og adferd kan alle ha en innvirkning på CYP1A-responsen i fisk (bl.a. Andersson og Förlin 1992, Whyte et al. 2000). Prøvetakingen ble gjort innen 4 dager i slutten av november for å redusere effekten av ulik temperatur, pH, fotoperiode og reprodutiv status mellom områdene. Fravær av mat over lengre perioder har i flere tilfeller vist seg å redusere EROD sammenlignet med kontroll (Whyte et al. 2000), men induksjon kan også forekomme (Ferraro et al. 2003). Forskjeller i næringstilgang, som målt med kondisjonsfaktor, indikerte at fisk i ytre Oslofjord hadde noe bedre næringstilgang sammenlignet med fisk i indre Oslofjord. For begge områdene var median kondisjonsfaktor omkring 0,8, som regnes som god kondisjon (Dutil og Lambert 2000). Dette indikerer at forskjeller i næringstilgang ikke kan bidra til å forklare den signifikante forskjellen i CYP1A-markørene mellom områdene. Endogene hormoner (og exogene hormon-hermere) kan påvirke CYP1A. Flere studier har påvist at østrogen kan føre til redusert EROD-aktivitet i hunnfisk forut for og under gyteperioden (review, Whyte et al. 2000), men i denne studien ble det ikke detektert kjønnsforskjeller i CYP1A-aktivitet til tross

for at GSI indikerte gryende kjønnsmodning for hunnfisk i indre, og til en viss grad ytre, Oslofjord. Reduksjonen i CYP1A-markørene i gonadeutviklende hunnfisk skjer gradvis (Andersson og Förlin 1992), og blir dermed mer uttrykt mot slutten av gyteperioden. Manglende kjønnsforskjell i CYP1A-markørene kan indikere at gonadene i hunnfisk ikke hadde utviklet seg nok, selv om den positive korrelasjonen mellom GSI og LSI for hunnfisk indikerte at leveren var østrogen-påvirket. Alt i alt er det sterk grunn til å anta at forskjellen i CYP1A-markørene mellom indre og ytre Oslofjord skyldtes forskjeller i eksponering for fremmedstoffer, heller enn noen av disse naturlige faktorene.

Målinger av CYP1A-aktivitet akkompagneres gjerne av CYP1A-konsentrasjon siden CYP1A-aktivitet kan hemmes av en rekke miljøgifter (Van der Oost et al. 2003, Celander 2011). I tillegg er det en mulighet for at enkelte vannbårne stoffer som hurtig metaboliseres ikke vil nå leveren, men heller metaboliseres av CYP450 i gjeller eller annet vev (Abrahamson et al. 2008). En rekke arter, bl.a. torsk, viser en klar gjelle-EROD-respons etter eksponering for vannbårne miljøgifter på lab (Holth et al. 2014, Jönsson et al. 2003, Jönsson et al. 2006, Nahrgang et al. 2010 a og b) og i felt (Abrahamson et al. 2007, Abrahamson et al. 2008). Jönsson et al. 2006 viste at lave konsentrasjoner av B(a)P og indigo ga signifikant CYP1A-induksjon i gjeller, men ikke i lever. Dette kan skyldes at stoffene ble metabolisert i gjellene og dermed aldri nådde leveren. Siden selv lave konsentrasjoner av miljøgifter over tid kan føre til en kostnad for individet vil det være av stor betydning å inkludere gjelle-EROD som en biomarkør for vannbårne kontaminanter (Abrahamson 2007). CYP1A kan selvsagt hemmes av miljøgifter i gjeller også (Beijer et al. 2010) så det vil følgelig være fornuftig å inkludere målinger av CYP1A-konsentrasjon i gjellefilament også.

Polartorsk (*Boreogadus saida*) eksponert for råolje via føde eller vann viste signifikant CYP1A-induksjon i både gjeller og lever etter to uker (Nahrgang et al. 2010 a, b). Målinger av mRNA ble gjort i leveren, hvor det ble detektert signifikant induksjon etter syv timers eksponering for råolje via vannfasen (Nahrgang et al. 2010 b). Dette indikerer at CYP1A-responsen kan forekomme hurtigere i leveren enn i gjellene, selv etter eksponering via vannfasen. Resultatene må imidlertid tolkes med varsomhet.

I denne studien ble det funnet signifikant høyere CYP1A-aktivitet i gjellefilament i hannfisk fra ytre Oslofjord. Det var ingen signifikant forskjell mellom hunnfisk fra de to områdene. Siden CYP1A ikke var indusert i leveren fra fisk innsamlet i ytre Oslofjord indikerer dette at

de induserene i ytre Oslofjord var vannbårne og at metabolismen i gjellene forhindret eksponering i leveren. At hunnfisk ikke ble påvirket i ytre Oslofjord fremstår som merkelig hvis induserene var vannbårne.

Det var signifikant korrelasjon mellom de hepatiske CYP1A-markørene for fisk i indre Oslofjord, men ikke i ytre Oslofjord. Tidligere studier har også funnet relativt lav korrelasjon mellom CYP1A-aktivitet (EROD) og -protein (ELISA). En undersøkelse av 1341 fisk fordelt over 11 arter fant gjennomsnittlig korrelasjon mellom EROD og CYP1A ELISA til å være 47% (Goksøyr og Förlin 1992). I denne studien var korrelasjonen 36% i indre og 29% i ytre Oslofjord (Spearman's korrelasjonsanalyse, p-verdi henholdsvis 0,03 og 0,07).

4.4.2 Effekter av nevrotoksiske pesticider

Ingen signifikant forskjell ble funnet i AChE-aktivitet mellom områdene eller mellom kjønnene innen områdene. Det samme var tilfellet i 2010 (Bergland 2012). Oftest har verdiene i ytre Oslofjord vært signifikant lavere enn i indre Oslofjord (Nerland 2011, Fredriksen 2013, Bratrud 2014). Dette indikerer at indre Oslofjord stort sett har vært mindre belastet av AChE-inhibitorer sammenlignet med ytre Oslofjord.

AChE-aktivitet kan brukes som biomarkør for eksponering for marine nevrotoksiske miljøgifter (Burgeot et al. 2012) som f.eks. organofosfater og karbamater (Olson og Christensen 1980, Payne et al. 1996, Klumpp et al. 2002, Van der Oost 2003, Scott og Sloman 2004). Dette er av de mest brukte pesticidene i dag (Assis et al. 2011), i stor grad pga. deres hurtige nedbrytning i vann og lave persistens i miljøet (Dembélé et al. 1999), spesielt sammenlignet med klororganiske pesticider så nå fases ut (Liu et al. 2013, Jebali et al. 2013). Lekkasje fra forurenset grunnvann og avrenning fra dyrket pesticid-behandlet mark kan være kilder til pesticider i det akvatiske miljøet. Det er anslått at bare 0,1% av pesticidene som brukes verden over faktisk når mål-organismen(e) og at den overveldende majoriteten av pesticidene dermed spres i miljøet (Assis et al. 2011). Hvor mye og ofte slike pesticider brukes, i tillegg til nedbørsmengde etter tilførsel, vil ha stor betydning for den endelige belastningen i det akvatiske miljøet. Tidligere studier har antydnet at forskjellen i AChE-aktivitet mellom områdene kan forklares med flere jordbruksforetak (og dermed mer

pesticid-bruk) i nedbørsfeltene til ytre Oslofjord sammenlignet med indre Oslofjord (Imrik 2010, Nerland 2011, Fredriksen 2013, Bratrud 2014).

Hvis intensjonen er å bruke AChE-aktivitet som biomarkør for eksponering for organofosfat- og karbamat-pesticider må man være oppmerksom på at enkelte klororganiske stoffer (Olson og Christensen 1980, Kaviraj og Gupta 2014), metaller (Olson og Christensen 1980, Jebali et al. 2006) og PAHer (Kang og Fang 1997) også kan hemme AChE-aktivitet. I tillegg kan flere planter, sopp og alger også produsere AChE-inhibitorer (Houghton et al. 2006, Mukherjee et al. 2007, Pangestuti og Kim 2011). I 1997 ble *Anabaena lemmermannii* detektert i algeoppblomstring i det Baltiske hav (Burgess 1999). *A. lemmermannii* produserer det eneste kjente naturlige organofosfatet, anatoksin-a(s), som er en svært potent AChE-inhibitor (Laws 2013). Prøvetaking i slutten av november reduserer problematikken med algeoppblomstring da disse gjerne forekommer på våren og om sommeren (Skylstad 2013). Det samme tidspunktet kan være problematisk hvis man ønsker å detektere AChE-hemming pga. pesticider. Dette pga. enkelte pesticiders sesongbestemte bruk, lave persistens i miljøet (Dembélé et al. 1999) og relativt hurtige restitusjon av AChE-aktivitet etter endt eksponering. Sistnevnte avhenger av hvilke stoff som fører til hemming. Organofosfater og karbamater henholdsvis fosforylerer og karbamylterer serine i det aktive setet til AChE (Assis et al. 2011, Pohanka 2012). Organofosfater kan binde kovalent til serin, noe som dermed krever de novo enzym-syntese for restituert AChE-aktivitet (Sturm et al. 2007, Pohanka 2012), mens karbamylert AChE kan hydrolyseres slik at enzymets aktivitet restitueres (Jebail et al. 2013). Organofosfater produserer dermed mer stabile kompleks sammenlignet med karbamater, og dette fører til at restitusjonstiden generelt er kortere etter karbamat-eksponering (Sturm et al. 2007, Assis et al. 2011, Jebali et al. 2013). Enkelte organofosfat- og karbamat-pesticider blir mer persistente i sjøvann (Bondarenko et al. 2004). Dette vil følgelig gjøre det mulig å detektere molekylære effekter på AChE lengre enn ellers.

Det ble funnet signifikant negativ korrelasjon mellom AChE-aktivitet og størrelse (lengde og vekt) innen indre og ytre Oslofjord. Tidligere studier har også rapportert om negativ korrelasjon mellom disse parameterne (Solé et al. 2006, Pathiratne et al. 2008, Imrik 2008, Nerland 2011, Fredriksen 2013, Bratrud 2014, Koenig og Solé 2014).

I denne studien ble det som nevnt ikke funnet signifikant forskjell mellom områdene. Dette indikerte lave konsentrasjoner av AChE-inhibitorer i indre Oslofjord mot slutten av november.

4.4.3 Effekter av bly

Det ble ikke funnet signifikant forskjell i ALA-D-aktivitet mellom områdene eller kjønn innen områdene. Tidligere studier har vært delt, hvor halvparten har funnet signifikant lavere ALA-D-aktivitet i indre Oslofjord (Holth 2004, Imrik 2010, Fredriksen 2013), mens resten ikke har funnet noen signifikant forskjell (Nerland 2011, Bergland 2012, Bratrud 2014).

Data fra det nasjonale overvåkningsprogrammet i Norge mellom 1997 - 2001 viste ALA-D-aktivitet i torsk fra referanseområder til å ligge mellom 15 og 21 ng PBG/min/mg protein (Ruus et al. 2003). Det ble funnet relativt høy variasjon innenfor samme område, mellom områdene og innenfor samme område mellom år (Hylland et al. 2009). På bakgrunn av disse dataene, i tillegg til informasjon om ALA-D-responsen i andre fiskearter, har OSPAR kommisjonen (2007) besluttet at normale verdier for ulike fiskearter ligger mellom 10 og 20 ng PBG/min/mg protein (OSPAR 2007). I denne studien var majoriteten (78%) av verdiene fra både indre og ytre Oslofjord innenfor normalen. Det samme har vært tilfellet for den nedre grensen de siste årene (Holth 2004, Imrik 2010, Nerland 2011, Bergland 2012, Fredriksen 2013, Bratrud 2014), men i 2011 var majoriteten (63%) av verdiene i indre Oslofjord under normalen (Fredriksen 2013). Hele populasjonen må ha verdi signifikant lavere enn 15 ng PBG/min/mg protein for at populasjonen skal regnes som påvirket av bly (OSPAR 2007). Det kan se ut til at dette var tilfellet i 2011 (median 8,5 ng PBG/min/mg protein). Dette kan forklares med økt nedbør forut for prøvetakingen (Skarbøvik et al. 2012, Fredriksen 2013, Bratrud 2014), som vil føre til økt avrenning fra tette flate og økt vannføring i elver, som begge er vesentlige bidragsytere til bly i indre Oslofjord (Berge et al. 2013 b). Elver med tilførsel til indre Oslofjord ble undersøkt for bly i 2011. Halvparten hadde normale bakgrunnsnivåer og resten var enten god eller moderat bly-forurenset (tilstandsklasse to og tre) (Berge et al. 2013 b). For hele kyst-Norge ble det fra 2010 til 2011 funnet 67% økning i bly-tilførsel fra elver (Skarbøvik et al. 2012). Det ble også funnet høy vannføring og høyt bly-nivå i Drammenselva og Glomma i månedene før november 2011. Siden disse elvene forsyner ytre Oslofjord ville det vært naturlig at også torsk i ytre Oslofjord

skulle vært mer belastet enn tidligere og senere år. Verdiene i ytre Oslofjord var i 2011 noe lave sammenlignet med tidligere år (Holth 2004, Imrik 2010, Nerland 2011, Bergland 2012), men majoriteten (71%) var over 10 ng PBG/min/mg protein (Fredriksen 2013), og median var tilsvarende med 2012 og 2013 (Bratrud 2014).

Nedbørsmengden forut for toktet i 2013 viste relativt like verdier sammenlignet med gjennomsnittet for perioden 1961 - 1990 (Berge et al. 2014) og dette kan være årsaken til at ALA-D-verdiene i både indre og ytre Oslofjord var innenfor normalen, nemlig at tilførselen av bly fra elver og tett flater ikke var særlig uttrykt dette året. Sammenlignet med 2012 var det i 2013 mindre nedbør i månedene forut for prøvetaking (Berge et al. 2013, Berge et al. 2014), men dette ga ikke nevneverdig utslag på ALA-D-verdiene, som var veldig like for begge årene, i både indre og ytre Oslofjord (Bratrud 2014).

Hepatiske blynivåer i torsk fra innerst i Oslofjorden (Bekkelaget og Frognerkilen) var høyere i 2013 sammenlignet med 2006, 2009 og 2010, men i alle tilfellene under det som regnes som høye bakgrunnsnivå (Berge et al. 2014), og for denne studiens trål-område (Steilene) har det vært bekreftet en nedadgående trend for bly i torskelever (Green et al. 2013). Dette korresponderte med ALA-D-verdiene i denne studien som indikerte minimal eller ingen bly-belastning i indre Oslofjord (Steilene). I det hele tatt rapporteres det om nedgang i eksponering og effekt av bly i henholdsvis lever og blod i torsk fra indre Oslofjord (Green et al. 2013, Berge et al. 2014). En rekke forbud mot bly har blitt iverksatt siden 1995, men viktigst var kanskje begrensningen av bly i bensin som antas å ha vært en vesentlig bidragsyter til reduserte utslipp av bly (Sørensen 2012). Andre vesentlige bidragsytere har vært reduksjon og forbud mot bly i ammunisjon (Sørensen og Bakka 2014).

Ved bruk av ALA-D-aktivitet som biomarkør bør man merke seg at andre stoffer og miljøforhold kan modulere responsen i organismer. Spesielt sink (Zn) er viktig da det kan redusere blyes evne til å binde til cystein i det aktive setet i enzymet (Hylland et al. 2009, Lombardi et al. 2010, Mager 2011, Malhotra og Dhawan 2014). Nivået av Zn i torskelever fra indre Oslofjord viste ingen trend mellom 1986 - 2012 og var i alle tilfellene under tilstandsklasse 1 (< 40 mg/kg v.v.) (Green et al. 2013). Det er ikke helt avklart om andre metaller kan påvirke ALA-D (Hylland et al. 2006), men metaller som f.eks. kadmium, kobber, nikkel og sink kan påvirke opptaket av bly (Mager 2011) og høye nivåer av kadmium ser ut til hemme ALA-D i flyndre (Hylland et al. 2006). Costa et al. (2007) fant at lave nivåer

av metylkvikksølv i føden kunne hemme ALA-D i *Hoplias malabaricus* på lab. I hvert fall ett pesticid (carbosulfan, nå forbudt i EU) ser ut til å ha inhibitorisk effekt på ALA-D, gjennom oksidasjon av thiol-grupper (Altinok et al. 2012). Abiotiske faktorer som salinitet, temperatur, vannets hardhet og oppløst organisk materiale (OGM) vil ha betydning for blysbiotilgjengelighet. Generelt vil redusert temperatur og hardhet, samt økt salinitet og OGM, føre til redusert biotilgjengelighet (Mager 2011). For parameterne temperatur og salinitet var disse som nevnt svært like i indre og ytre Oslofjord, og verdiene har også vært nokså like tidligere år (Holth 2004, Imrik 2010). Vannets hardhet og OGM ble ikke undersøkt under denne studien. Andre faktorer som individers størrelse og kjønn har også vist seg å ha betydning for ALA-D-aktiviteten etter eksponering for bly (Hylland et al. 2009). Det ble ikke funnet signifikant korrelasjon mellom størrelse (lengde, vekt) eller kjønn, og ALA-D-aktivitet, i denne studien, men i indre Oslofjord var det så vidt signifikant negativ korrelasjon mellom ALA-D-aktivitet og kondisjon.

Fisk eksponert for høye konsentrasjoner av bly kan oppleve asfyksi som en følge av overdreven mucus-produksjon i gjellene, mens mer miljørelevante konsentrasjoner kan forstyrre ionebalansen. Kronisk eksponering kan føre til bl.a. neurotoksisitet i fisk (Mager 2011). Selv om ALA-D-hemming har vist seg å være knyttet til anemi i pattedyr og fugler er det mer usikkert om disse effektene forekommer etter ALA-D-hemming i fisk (Hylland et al. 2006). ALA-D-hemming kan derfor anses som et tidlig varselstegn på andre mulige toksiske effekter av bly. De relativt like ALA-D-verdiene i indre og ytre Oslofjord indikerer at torsk i indre Oslofjord ikke er spesielt belastet av bly og at mulige toksiske effekter av bly ikke er spesielt sannsynlige.

4.5 PAH-metabolitter i galle

4.5.1 1-OH-fenantren

Fenantren er et petrogent PAH med 3 fusjonerte benzenringer. Det er å finne i olje og oljederivater. Kilder til fenantren i indre Oslofjord kan være oljesøl relatert til skipstrafikk og avrenning fra urbane strøk (Hylland 2006). Fenantren og andre petrogene PAHer (2-3 fusjonerte benzenringer) har lavere fettløselighet enn PAHer med flere benzenringer

(pyrogene PAHer). Dette gjør petrogene PAHer mer biotilgjengelige sammenlignet med pyrogene PAHer som i kraft av sin relativt høyere fettløselighet i større grad vil adsorbere til sediment, partikler og kolloider, og dermed bli mindre tilgjengelig for biota (Hylland 2006, Amodu et al. 2013). Majoriteten av sedimentprøvene tatt fra ulike områder i indre Oslofjord har vist seg å ha relativt lave nivåer av fenantren (tilstandsklasse 2) (Berge et al. 2013 b). Dette var i tråd med resultatene fra denne studien, som ikke fant noen signifikant forskjell i 1-OH-fenantren i galle mellom indre og ytre Oslofjord. Det samme var tilfellet i 2009, 2010 og 2012 (Nerland 2011, Bergland 2012, Bratrud 2014). Gjennomsnitt og median for indre Oslofjord var 10 og 9 ng/g galle, som var tilsvarende med majoriteten av tidligere studier (Nerland 2011, Bergland 2012, Fredriksen 2013). I 2011 ble det funnet signifikant høyere verdier i indre sammenlignet med ytre Oslofjord (Fredriksen 2013), men denne forskjellen ble tilskrevet til lavere eksponering i ytre Oslofjord sammenlignet med tidligere og senere år. Dette indikerer at eksponeringen for fenantren har vært jevnt lav i indre Oslofjord de siste årene, som igjen indikerer at olje-kontaminering ikke har vært et stort problem i indre Oslofjord de siste årene.

4.5.2 1-OH-pyren

I tråd med tidligere studier ble det også denne gangen funnet høye nivå av 1-OH-pyren i galle fra indre Oslofjord (Holth 2004, Imrik 2010, Nerland 2011, Bergland 2012, Fredriksen 2013, Bratrud 2014). Gjennomsnitt og median var 221 og 220 ng/g galle i indre Oslofjord, og 42 og 42 ng/g galle i ytre Oslofjord. Verdiene tilsvarer de funnet tidligere. Dette indikerer at eksponeringen for pyren har vært forholdsvis jevn i slutten av november de siste 11 årene (2002 - 2013; mangler data for 2003 - 2007).

Pyren er et i hovedsak pyrogent PAH med 4 benzenringer. Det produseres gjerne gjennom ufullstendig forbrenning av fossilt (f.eks. bensin og fyringsolje) og moderne brensel (f.eks. ved, biodiesel) (Menzie et al. 1992, Lima et al. 2005, Hylland 2006). Industrielle prosesser, spesielt de som involverer antrasitt og koks (f.eks. smelteverk), er kjente bidragsyttere til pyrogene PAHer (Berge et al. 2013). Studier i indre Oslofjord har vist at de største bidragsytterne til PAHer er, i prioritert rekkefølge, elver, avrenning fra tette flater, atmosfærisk deponering, renseanlegg og overløp (Berge et al. 2013). Høyere verdier av 1-OH-pyren i galle i indre Oslofjord, og jevnt høye verdier over flere år, tyder på jevn

eksponering for pyren. Selv om pyren forekommer i råolje også (Krahn et al. 1993) så er høye verdier en indikator på at kilden til forurensningen kommer fra forbrenningsprosesser heller enn olje og oljesøl.

Pyrogene PAHer har som nevnt lavere vannløselighet sammenlignet med petrogene PAHer. Dette gjør at pyrogene PAHer effektivt adsorberer til sediment (Hylland 2006, Amodu et al. 2013), hvor bl.a. pyren er bekreftet svært persistent. En studie i Mexicogolfen viste at halveringstiden i sediment var 9 år mot 0,3 år i vannsøylen. Av PAHene som ble undersøkt (3 og 4 ringer) var pyren det mest persistente stoffet i sediment (Tansel et al. 2011). Berge et al. (2013 b) fant at sediment (øvre 5 cm) tatt fra flere områder i indre Oslofjord har vært betydelig kontaminert av pyren over flere år (tilstandsklasse 4 og 5). Dette betyr at de høye verdiene av 1-OH-pyren som ble målt i indre Oslofjord ikke nødvendigvis reflekterer jevn tilførsel av pyren fra land og atmosfære, men også kan skyldes jevn frigivning fra sediment. Frigivning av kontaminanter fra sediment til vannsøylen kan skje naturlig gjennom biologiske eller fysiske krefter, eller gjennom antropogen aktivitet som f.eks. mudring eller bunntråling (Latimer et al. 1999, Eggleton og Thomas 2004, Sørensen 2012, Viana et al. 2012). Dermed kan dette være en kilde til PAHer i torsk, gjennom absorpsjon over gjellene eller konsum av partikler med PAHer. Det er stor forskjell i PAH-metabolisme mellom ulike taksonomiske grupper, hvor f.eks. fisk, krepsdyr og flerbørstemark er langt mer effektive sammenlignet med bløtdyr og andre invertebrater (Eisler 1987, Meador et al. 1995). Dette innebærer at PAHer kan bioakkumulere i bentiske invertebrater som videre kan konsumeres av torsk og dermed føre til relativt høy eksponering for PAHer, selv om PAH-konsentrasjonen i vannsøylen var lav.

Pyren er en svak agonist for aryl hydrokarbonreseptoren, som fører til transkripsjonen av en rekke gener, bl.a. CYP1A (Barron et al. 2004, Lee og Anderson 2005). CYP1A er involvert i fase 1 metabolisme av en rekke PAHer, deriblant pyren (review i Pampanin og Sydnes 2013). Reaktive metabolitter produsert gjennom CYP1A kan føre til negative konsekvenser som f.eks. oksidativt stress og genotoksisitet (Incardona et al. 2006, Hauser et al. 1997). Slike effekter på subcellulært og cellulært nivå kan potensielt føre til effekter på vev, organ og individ-nivå. Flere lab-studier har påvist slike negative effekter på individ-nivå og lavere, etter eksponering for pyren. Her har man f.eks. sett økt mortalitet, abnormal ontogenese og endret svømmeadferd etter at nyfertiliserte egg ble eksponert for pyren (f.eks. Jianqing og Xinhong, 2010, Sugahara et al. 2014). Flere studier har også påvist økt enzymatisk aktivitet

for CYP1A og andre enzymer relevante for oksidativt stress (superoksid dismutase, katalase, glutation *S*-transferase) (Husøy et al. 1996, Sun et al. 2008, Incardona et al. 2006, Hendon et al. 2008). Høye nivåer av pyren kan også hemme EROD (Kopecka-Pilarczyk og Correia 2009). I denne studien ble det ikke funnet signifikant korrelasjon mellom pyren og hepatisk CYP1A-aktivitet eller -konsentrasjon. Effekter på DNA ble ikke undersøkt, men i 2008 og 2011 ble DNA-skader i røde blodceller undersøkt med comet assay (Imrik 2010, Fredriksen 2013). I begge tilfellene ble det bekreftet signifikant mer DNA-skade i indre Oslofjord sammenlignet med ytre Oslofjord. Selv svært lave konsentrasjoner av PAHer i vann har vist seg å føre til DNA-addukter i torsk (Aas et al. 2000). DNA-skader trenger ikke skyldes pyren alene, men kan også skyldes andre PAHer.

Pyren er en langt mindre potent AhR-agonist sammenlignet med dioksin (Barron et al. 2004), men ettersom stoffet kan føre til induksjon av CYP1A, og CYP1A kan uttrykkes i flere ulike vev, ville vi forventet mer uttrykt CYP1A-aktivitet i gjellefilament i indre Oslofjord dersom kilder til pyren var via vannet. De relativt lave gjelle-EROD-verdiene i indre Oslofjord kan dermed indikere at de høye nivåene av 1-OH-pyren i galle skyldes inntak av kontaminert føde framfor absorpsjon over gjellene.

4.5.3 3-OH-B(a)P

Nivåene av 3-OH-B(a)P var ikke høye nok til å overkomme deteksjonsterskelen (2 ng/g galle). Før den høyeste blanken (0,9) ble trukket fra prøvene var det langt flere prøver over deteksjonsgrensen i indre Oslofjord (18 stk) sammenlignet med ytre Oslofjord (1 stk).

Tidligere studier har også funnet flere verdier over deteksjonsterskelen i indre Oslofjord (Holth 2004, Imrik 2010, Bergland 2012). Nerland (2011) fant ingen signifikant forskjell mellom områdene i 2009, men Fredriksen (2013) og Bratrud (2014) fant begge signifikant høyere verdier i indre Oslofjord i henholdsvis 2011 og 2012. Deteksjonsterskelen har variert mellom tidligere studier, noe som naturligvis har påvirket de statistiske resultatene. Nerland (2011) brukte samme deteksjonsterskel for 3-OH-B(a)P som i denne studien (2 ng/ g galle), mens Fredriksen (2013) valgte 0,75 ng/ g galle og Bratrud (2014) valgte 3 ganger høyeste blank. Dette gjør resultatene noe vanskelig å tolke, men totalt sett ser det ut til å være lav belastning av B(a)P i indre Oslofjord, men noe mer enn i ytre Oslofjord. Undersøkelser av

sediment i 2012 viste også relativt lave nivåer av B(a)P, men enkelte områder bl.a. i nærheten av Oslo havn hadde nivåer tilsvarende moderat B(a)P-forurensning (tilstandsklasse 3) (Berge et al. 2013 b).

4.6 Sammenhenger mellom biomarkørene

Korrelasjon mellom par av biomarkører har blitt beskrevet der hvor det har vært relevant i teksten over. I tillegg til disse korrelasjonene var det signifikant korrelasjon mellom vevsindeksene og størrelse (lengde og vekt) i ytre Oslofjord, men bare for hunnfisk. Det var relativt høy p-verdi. I indre Oslofjord var LSI korrelert med lengde, men ikke med vekt.

Det forventes å eksistere et positivt forhold mellom alder og størrelse (lengde og vekt), noe man ser for fisk i ytre Oslofjord. Dette ble ikke observert i indre Oslofjord. Her var det ingen signifikant korrelasjon mellom alder og vekt, og negativ, men ikke signifikant, korrelasjon mellom alder og lengde. Siden otolittene er vanskeligere å tolke i indre Oslofjord (Otterbech 1954) er det en mulighet for at større feil ble gjort for aldersbestemmelse av fisk i indre sammenlignet med ytre Oslofjord.

Ettersom faren for å begå type 1 feil øker med antall tester (Whitlock og Schluter 2009) bør en del av disse korrelasjonene vurderes varsomt. Bonferroni-korreksjon kan brukes, men gir et veldig konservativt signifikansnivå. Få av korrelasjonene fortsatte å være signifikante etter Bonferroni-korreksjon. Det ble derfor vurdert fornuftig å bruke vanlig signifikansnivå ($p > 0,05$).

5. Konklusjoner

Enkelte av biomarkørene i denne studien indikerte at torsk fra indre Oslofjord var påvirket av miljøgifter. Det var høyere nivå av CYP1A-aktivitet og -protein i lever og høyere nivå av 1-OH-pyren i galle fra fisk i indre Oslofjord sammenlignet ytre Oslofjord. Det var ingen signifikant korrelasjon mellom CYP1A-aktivitet/ -protein i lever og 1-OH-pyren i galle noe som antyder at induksjonen av CYP1A skyldtes andre koplanare miljøgifter enn pyren. CYP1A-aktiviteten i leveren var høyere enn tidligere år, og halvparten av verdiene var over

bakgrunnsnivå (Hylland et al. 2012 a). Dette antyder en endring i miljøgiftsituasjonen fra tidligere år. Hvilke stoffer som eventuelt er ansvarlige kan ikke besvares uten kjemiske analyser.

CYP1A-aktivitet i gjellfilament indikerte at hannfisk fra ytre Oslofjord var eksponert for høyere nivåer av vannbårne AhR-ligander sammenlignet med hunnfisk og fisk (begge kjønn) fra indre Oslofjord. Dette kan indikere lave konsentrasjoner av vannbårne AhR-ligander i ytre Oslofjord, men hvorfor ikke hunnfisk skulle være påvirket fremstår som noe merkelig. Det tilsynelatende fraværet av CYP1A-aktivitet i gjellefilament fra fisk innsamlet i indre Oslofjord indikerer at kilden til hepatiske CYP1A-indusere i fisk fra indre Oslofjord var via føden heller enn via vannet.

Ingen av de andre molekulære biomarkørene (ALA-D-aktivitet, AChE-aktivitet og 1-OH-fenantren) indikerte noen påvirkning av miljøgifter i indre Oslofjord, da verdiene ikke var signifikant forskjell fra verdiene i ytre Oslofjord.

Fisk i ytre Oslofjord hadde marginalt, men signifikant, bedre kondisjon sammenlignet med fisk fra indre Oslofjord. Eldre fisk (3 år) var også større i ytre Oslofjord sammenlignet med indre Oslofjord. Dette indikerer dårligere vekstforhold for eldre fisk i indre Oslofjord, noe som potensielt kan indikere påvirkning fra miljøgifter, men også, og kanskje mer sannsynlig, forskjeller i næringstilgang. LSI viste derimot høyere verdi i indre Oslofjord, noe som kan støtte opp under mulig forstørret lever pga. miljøgifteksponering, men siden LSI var høyest for hunnfisk, og GSI indikerte kjønnsmodning for hunnfisk i indre Oslofjord, var antageligvis forskjellen i LSI mellom områdene relatert til økt produksjon av gonaderelevante proteiner i hunnfisk fra indre Oslofjord. Det var en sterk positiv korrelasjon mellom LSI og GSI for hunnfisk innen begge områdene. Økt GSI er assosiert med økt østrogen-påvirkning i leveren, noe som også er kjent for å redusere CYP1A-aktivitet og -protein (Whyte et al. 2000), men utfra målt CYP1A-aktivitet og -protein i lever i denne studien så det ikke ut til å være noen hemming av CYP1A i indre Oslofjord.

Litteraturliste

- Aas, E., Baussant, T., Balk, L., Liewenborg, B., og Andersen, O. K. (2000). PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. *Aquatic Toxicology*, 51(2), 241-258.
- Abrahamson, A., Brandt, I., Brunstrom, B., Sundt, R. C. og Jorgensen, E. H., (2008). Monitoring contaminants from oil production at sea by measuring gill EROD activity in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Environmental Pollution*. 153(1), 169-175.
- Abrahamson, A., Andersson, C., Jonsson, M. E., Fogelberg, O., Orberg, J., Brunstrom, B. og Brandt, I. (2007). Gill EROD in monitoring of CYP1A inducers in fish: a study in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) caged in Stockholm and Uppsala waters. *Aquatic toxicology*, 85(1), 1-8.
- Amodu, O. S., Ojumu, T. V., og Ntwampe, S. K. O. (2013). Bioavailability of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons using renewable resources. *Environmental Biotechnology-New Approaches and Prospective Applications*, 171-194.
- Andersson, T. og Förlin, L. (1992). Regulation of the cytochrome P450 enzyme system in fish. *Aquatic Toxicology*, 24(1), 1-19.
- Arukwe, A. og Goksøyr, A. (1998). Xenobiotics, xenoestrogens and reproduction disturbances in fish, *Sarsia*, 83(3), 225-241.
- Assis, C. R. D., Bezerra, R. S. og Carvalho Jr, L. B. (2011). Fish cholinesterases as biomarkers of organophosphorus and carbamate pesticides. *Pesticides in the Modern World—Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment*, 13, 254-278.
- Axiak, V., Vella, A.J., Agius, D., Bonnici, P., Cassar, G., Casson, R., Chircop, P., Micallef, D., Mintoff, B. og Sammut, M. (2000). Evaluation of environmental levels and biological impact of TBT in Malta (central Mediterranean). *Science of the total environment*, 258(1), 89-97.
- Balk, L., Martínez-Gómez, C., Gubbins, M. og Thain, J. (2012). Technical annex: supporting parameters for biological effects measurements in fish and mussels. I Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects. (ed. Davies, I.M. og Vethaak, D.) *ICES Cooperative Research Report No. 315*: 191-196
- Banks, S. D., Thomas, P. og Baer, K. N. (1999). Seasonal variations in hepatic and ovarian zinc concentrations during the annual reproductive cycle in female channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 124(1), 65-72.

- Barron, M. G., Heintz, R. og Rice, S. D. (2004). Relative potency of PAHs and heterocycles as aryl hydrocarbon receptor agonists in fish. *Marine environmental research*, 58(2), 95-100.
- Beijer, K., Abrahamson, A., Brunstrom, B. og I. Brandt. (2010). CYP1A inhibition in fish gill filaments: a novel assay applied on pharmaceuticals and other chemicals. *Aquatic toxicology*. 96, 145-150.
- Berge, J. A., Amundsen, R., Fredriksen, L., Bjerkeng, B., Gitmark, J., Holt, T. F., Haande, S., Hylland, K., Johnsen, T. M., Kroglund, T., Ledang, A. B., Lenderink, A., Lømsland, E. R., Rohrlack, T., Sørensen, K. og Wisbech, C. (2013a). Overvåking av Indre Oslofjord i 2012, *NIVA rapport* l.nr. 6533-2013.
- Berge, J. A., Rannekleiv, S., Selvik, J. R. og Steen, A. O. (2013b). Indre Oslofjord – Sammenstilling av data om miljøgifttilførsler og forekomst av miljøgifter i sediment, *NIVA rapport* l.nr. 6565-2013.
- Berge, J. A., Amundsen, R., Bratrud, T., Bølling, N., Erdahl, E., Gitmark, J., Gundersen, H., Haande, S. Hinchcliffe, C., Johnsen, T. M., Kroglund, T., Ledang, A. B., Lømsland, E. R., Staalstrøm, A., Wisbech, C. og Wolf, R. (2014). Overvåking av Indre Oslofjord i 2013. *NIVA rapport* l.nr. 6697-2014.
- Berge, J. A., Schøyen, M., og Øxnevad, S. (2008). Supplerende tiltaksovervåking i indre Oslofjord – miljøgifter i blåskjell, fisk og reker. Årsrapport 2007. *NIVA rapport* TA-2383/2008.
- Bergland, K. G. (2012). Effekter av miljøgifter på torsk (*Gadus morhua*) fra indre Oslofjord. Master thesis, University of Oslo.
- Björnsson, B., Steinarsson, A., og Árnason, T. (2007). Growth model for Atlantic cod (*Gadus morhua*): Effects of temperature and body weight on growth rate. *Aquaculture*, 271(1), 216-226.
- Bolger, T. og Connolly, P. L. (1989). The selection of suitable indices for the measurement and analysis of fish condition. *Journal of Fish Biology*, 34(2), 171-182.
- Bondarenko, S., Gan, J., Haver, D. L., og Kabashima, J. N. (2004). Persistence of selected organophosphate and carbamate insecticides in waters from a coastal watershed. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(11), 2649-2654.
- Brander, K. M. (1995). The effect of temperature on growth of atlantic cod (*Gadus Morhua*). *ICES Journal of Marine Science*, 52, 1-10.
- Bratrud, T. (2014). Effekter av miljøgifter på torsk (*Gadus morhua*) fra indre Oslofjord. Masteroppgave, Universitetet i Oslo.
- Brett, J. R. (1979). 10 Environmental Factors and Growth. I Fish physiology (ed. Hoar, W.S., Randall, D. J. og Brett, J. R.). *Fish Physiology*, 8, 599-675.

- Burgeot, T., Bocquené, G., Forget-Leray, J., Guilhermino, L., Martínez-Gómez, C. og Lehtonen, K. (2012). Background document: acetylcholinesterase assay as a method for assessing neurotoxic effects in aquatic organisms. I Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects. (ed. Davies, I.M. og Vethaak, D.) *ICES Cooperative Research Report No. 315*: 49-53.
- Burgess, J. G., Osinga, R. og Wijffels, R. H. (1999). *Marine Bioprocess Engineering*. Elsevier. 62
- Burke, M. D. og Mayer, R. T. (1974). Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metabolism and Disposition*, 2(6), 583-588.
- Butt, N. (2007). The impact of cruise ship generated waste on home ports and ports of call: A study of Southampton. *Marine Policy*, 31, 591–598.
- Celander, M. C. (2011). Cocktail effects on biomarker responses in fish. *Aquatic Toxicology*, 105(3), 72-77.
- Collier, T. K., Anulacion, B. F., Arkoosh, M. R., Dietrich, J. P., Incardona, J. P., Johnson, L. L. og Myers, M. S. (2013). Effects on fish of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and naphthenic acid exposures. *Fish Physiology: Organic Chemical Toxicology of Fishes: Fish Physiology*, 33, 195.
- Costa, J. R. M. A., Mela, M., Silva de Assis, H. C. D., Pelletier, É., Randi, M. A. F. og Oliveira Ribeiro, C. A. D. (2007). Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67(1), 82-88.
- Daan, N. (1974). Growth of North Sea cod, *Gadus morhua*. *Netherlands Journal of Sea Research*, 8(1), 27-48.
- Dahle, R., Taranger, G. L., Karlsen, O., Kjesbu, O. S. og Norberg, B. (2003). Gonadal development and associated changes in liver size and sexual steroids during the reproductive cycle of captive male and female Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular og integrative physiology*, 136, 641-653.
- Davidson, J. W., Kenney, P. B., Manor, M., Good, C. M., Weber, G. M., Aussanasuwannakul, A., Turk, P. J., Welsh, C. og Summerfelt, S. T. (2014). Growth performance, fillet quality, and reproductive maturity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured to 5 kilograms within freshwater recirculating systems. *Journal of Aquaculture Research Development*, 5(238), 2.
- Davies, P. H., Goett. Jr., J. P., Sinley, J. R. og Smith, N. F. (1976). Acute and chronic toxicity of lead to rainbow trout *Salmo gairdneri*, in hard and soft water. *Water Research*, 10, 199-206.
- Demain, D. K., Gallego, A., Jaworski, A., Priede, I. G. og Jones, E. G. (2011). Diet and feeding niches of juvenile *Gadus morhua*, *Melanogrammus aeglefinus* and *Merlangius*

- merlangus* during the settlement transition in the northern North Sea. *Journal of fish biology*, 79(1), 89-111.
- Dembélé, K., Haubruge, E. og Gaspar, C. (1999). Recovery of acetylcholinesterase activity in the common carp (*Cyprinus carpio L.*) after inhibition by organophosphate and carbamate compounds. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. 62(6), 731-742
- Dignam, J.D. (1990). Preparation of extracts from higher eukaryotes. *Methods in enzymology*. 182, 194-203.
- Donker, M. H., Zonneveld, C. og Van Straalen, N. M. (1993). Early reproduction and increased reproductive allocation in metal-adapted populations of the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Oecologia*, 96(3), 316-323.
- Dutil, J. D. og Lambert, Y. (2000). Natural mortality from poor condition in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57(4), 826-836.
- Dwyer, F. J., Schmitt, C. J., Finger, S. E. og Mehrle, P. M. (1988). Biochemical changes in longear sunfish, *Lepomis megalotis*, associated with lead, cadmium and zinc from mine tailings. *Journal of Fish Biology*, 33, 307-317.
- Eggens, M. L. og Galgani, F. (1992). Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in flatfish: fast determination with a fluorescence plate-reader. *Marine Environmental Research*, 33(3), 213-221.
- Eisler, R. (1987). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review. *U.S. Fish and Wildlife Service*, Washington, DC. Biological Report No 85(1.11).
- Ellman, G. L., Courtney, K. D. og Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.
- Ferraro, M., Curetsy, K. og Crivello, J. F. (2003). The effects of feeding restriction on metallothionein levels and ethoxyresorufin-O-deethylase activities in mummichogs. *Journal of Aquatic Animal Health*, 15(1), 31-38.
- Farwell, M., Drouillard, K. G., Heath, D. D. og Pitcher, T. E. (2012). Acclimation of life-history traits to experimental changes in environmental contaminant concentrations in brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(4), 863-869.
- Forbes, V. L. og Calow, Peter (1996) Costs of Living with Contaminants: Implications for Assessing Low-Level Exposures, *Comments On Toxicology* 6(4), 255-270.
- Fredriksen, L. (2013). Effects of environmental contaminants on Atlantic cod (*Gadus morhua*) from the inner Oslofjord. Master thesis, University of Oslo
- Gagnon, M. M. og Bakhtyar, S. (2013). Induction of Fish Biomarkers by Synthetic-Based Drilling Muds. *PloS one*, 8(7), e69489.

- Goksøyr, A. (1991). A semi-quantitative cytochrome P450IA1 ELISA: a simple method for studying the monooxygenase induction response in environmental monitoring and ecotoxicological testing of fish. *Science of the total environment*, 101(3), 255-262.
- Goksøyr, A. og Förlin, L. (1992) The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquatic Toxicology*, 22, 287-311.
- Granick, J. L., Sassa, S., Granick, S., Levere, R. D., and Kappas, A. (1973). Studies in lead poisoning. II. Correlation between the ratio of activated to inactivated delta-aminolevulinic acid dehydratase of whole blood and the blood lead level. *Biochemical medicine*, 8, 149-159.
- Green, N. W., Schøyen, M., Øxnevad, S., Ruus, A., Allan, I., Høgåsen, T., Beylich, B., Håvardstun, J., Gudmundson Rogne Å. K., og Tveiten, L. (2013). Contaminants in coastal waters of Norway 2012. *NIVA report M-69/2013*.
- Grung, M., Holth, T. F., Jacobsen, M. R. og Hylland, K. (2009). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) metabolites in Atlantic cod exposed via water or diet to a synthetic produced water. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 72(3-4), 254-265.
- Guderley, H., Dutil, J. D. og Pelletier, D. (1996). The physiological status of Atlantic cod, *Gadus morhua*, in the wild and the laboratory: estimates of growth rates under field conditions. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53(3), 550-557.
- Hauser, B., Schrader, G. og Bahadir, M. (1997). Comparison of acute toxicity and genotoxic concentrations of single compounds and waste elutriates using the Microtox/Mutatox test system. *Ecotoxicology and environmental safety*, 38(3), 227-231.
- Hendon, L. A., Carlson, E. A., Manning, S. og Brouwer, M. (2008). Molecular and developmental effects of exposure to pyrene in the early life-stages of *Cyprinodon variegatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 147(2), 205-215.
- Herbert, A., Guilhermino, L., Da Silva De Assis, H.C. og Hansen, P.D. (1995) Acetylcholinesterase activity in aquatic organisms as pollution biomarker. *Angewandte Zoo*, 3, 1-15.
- Hodson, P. V. (1976). δ -Amino levulinic acid dehydratase activity of fish blood as an indicator of a harmful exposure to lead. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 33(2), 268-271.
- Holth, T. F. (2004). Effekter av miljøgifter på torsk og skrubbe fra indre Oslofjord. Masteroppgave, Universitet i Oslo.
- Holth, T. F., Eidsvoll, D. P., Farmen, E., Sanders, M. B., Martínez-Gómez, C., Budzinski, H., Burgeot, T., Guilhermino, L. og Hylland, K. (2014). Effects of water accommodated fractions of crude oils and diesel on a suite of biomarkers in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquatic Toxicology*, 154, 240-252.

- Hop, H., Gjørseter, J. og Danielssen, D. S. (1992). Seasonal feeding ecology of cod (*Gadus morhua* L.) on the Norwegian Skagerrak coast. *ICES Journal of marine Science*, 49, 453-461.
- Houghton, P. J., Ren, Y., og Howes, M. J. (2006). Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural product reports*, 23(2), 181-199.
- Husøy, A.M., Myers, M.S. og Goksøyr, A. (1996). Cellular localization of cytochrome P450 (CYP1A) induction and histology in Atlantic cod (*Gadus morhua*) and European flounder (*Platichthys flesus*) after environmental exposure to contaminants by caging in Sørfjorden, Norway. *Aquatic Toxicology*, 36(1), 53-74.
- Hylland, K. (2004) Biological effects of contaminants: quantification of delta - aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in fish blood. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences*, 34(i), 1-9.
- Hylland, K. (2006). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ecotoxicology in marine ecosystems. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 69(A), 109-123
- Hylland, K., Ruus, A., Børseth, J. F., Bechmann, R., Barsiene, J., Grung, M., Tollefsen, K. og Myhre, L. (2006). Biomarkers in moitoring: A review. Rapport SNO 5205–2006
- Hylland, K., Ruus, A., Grung, M. og Green, N. (2009). Relationships between physiology, tissue contaminants, and biomarker responses in Atlantic Cod (*Gadus morhua* L.). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 72(3-4), 226-233.
- Hylland, K., Maes, T., Martínez-Gómez, C., Kamman, U., Gubbins, M. og Davies, I. M. (2012a). Background document: cytochrome P450 1A activity (EROD). I Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects. (ed. Davies, I. M. og Vethaak, D.) *ICES Cooperative Research Report* No. 315: 26-29.
- Hylland, K., Vethaak, D. og Davies, I. M. (2012b). Background document: polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in fish bile. I Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects. (ed. Davies, I. M. og Vethaak, D.) *ICES Cooperative Research Report* No. 315: 18-20.
- ICES (2005), FishMap; cod. Tilgjengelig på http://www.ices.dk/explore-us/projects/EU-RFP/EU_Repository/ICES_FIshMap/ (besøkt 28.11.2014)
- Imrik, E.C.R. (2010). Effekter av miljøgifter på torsk fra indre Oslofjord. Masteroppgave, Universitet i Oslo.
- Incardona, J. P., Day, H. L., Collier, T. K. og Scholz, N. L. (2006). Developmental toxicity of 4-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish is differentially dependent on AH receptor isoforms and hepatic cytochrome P4501A metabolism. *Toxicology and applied pharmacology*, 217(3), 308-321.
- Jangaard, P. M., Brockerhoff, H., Burgher, R. D. og Hoyle R. J. (1967). Seasonal changes in general condition and lipid content of cod from inshore waters. *Journal of the fisheries research board of Canada*, 24(3), 607-612

- Jebali, J., Banni, M., Guerbej, H., Almeida, E. A., Bannaoui, A. og Boussetta, H. (2006). Effects of malathion and cadmium on acetylcholinesterase activity and metallothionein levels in the fish *Seriola dumerilli*. *Fish physiology and biochemistry*, 32(1), 93-98.
- Jebali, J., Khedher, S. B., Sabbagh, M., Kamel, N., Banni, M. og Boussetta, H. (2013). Cholinesterase activity as biomarker of neurotoxicity: utility in the assessment of aquatic environment contamination. *Journal of Integrated Coastal Zone Management*, 13(4), 525-537.
- Jianqing, L. og Xinhong, W. (2010). Acute Toxicity Effects of Naphthlene, Phenanthene and Pyrene on *Spraus macrocephalus*, Embryos. I Bioinformatics and Biomedical Engineering (iCBBE), 2010 4th International Conference on (pp. 1-4). IEEE.
- Jobling, M. (1988). A review of the physiological and nutritional energetics of cod, *Gadus morhua* L., with particular reference to growth under farmed conditions. *Aquaculture*, 70(1), 1-19.
- Jönsson, M., Abrahamson, A., Brunstrom, B., Brandt, I., Ingebrigtsen, K. og Jorgensen, E. H. (2003). EROD activity in gill filaments of anadromous and marine fish as a biomarker of dioxin-like pollutants. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 136(3), 235-243.
- Jönsson, E. M., Abrahamson, A., Brunstrom, B. and Brandt, I. (2006). Cytochrome P4501A induction in rainbow trout gills and liver following exposure to waterborne indigo, benzo[a]pyrene and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl. *Aquatic toxicology*, 79(3), 226-232.
- Kang, J. J. og Fang, H. W. (1997). Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit the activity of acetylcholinesterase purified from electric eel. *Biochemical and biophysical research communications*, 238(2), 367-369.
- Kaviraj, A. og Gupta, A. (2014). Biomarkers of type II synthetic pyrethroid pesticides in freshwater fish. *BioMed research international*.
- Khan, R. A. (2013). Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on sexual maturity of *Atlantic cod*, *Gadus morhua*, following chronic exposure. *Environment and Pollution*, 2(1), 1-10
- Kidd, K. og Batchelar, K. (2011). 5 Mercury. I *Fish Physiology: Homeostasis and Toxicology of Non-Essential Metals* (ed. Wood, C. M., Fareell, A. P. og Brauner, C. J.) 31(B), 237-295. Academic press.
- Klotz, A. V., Stegeman, J. J., og Walsh, C. (1984). An alternative 7-ethoxyresorufin O-deethylase activity assay: A continuous visible spectrophotometric method for measurement of cytochrome P-450 monooxygenase activity. *Analytical biochemistry*, 140(1), 138-145.
- Klumpp, D. W., Humphrey, C., Huasheng, H. og Tao, F. (2002). Toxic contaminants and their biological effects in coastal waters of Xiamen, China. II. Biomarkers and embryo malformation rates as indicators of pollution stress in fish. *Marine Pollution Bulletin*, 44(8), 761-769.

- Knutsen, H., Olsen, E. M., Ciannelli, L., Espeland, S. H., Knutsen, J. A., Simonsen, J. H., Skreslet, S. og Stenseth, N. C. (2007). Egg distribution, bottom topography and small-scale cod population structure in a coastal marine system. *Marine Ecology Progress Series*, 333, 249–255.
- Koenig, S. og Solé, M. (2014). Muscular cholinesterase and lactate dehydrogenase activities in deep-sea fish from the NW Mediterranean. *Marine Environmental Research*, 94, 16-23.
- Kopecka-Pilarczyk, J. og Correia, A.D. (2009). Biochemical response in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to in vivo exposure to pyrene and fluorene. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 372(1), 49-57.
- Krahn, M. M., Burrows, D. G., Ylitalo, G. M., Brown, D. W., Wigren, C. A., Collier, T. K., Chan, S.L. og Varanasi, U. (1992). Mass spectrometric analysis for aromatic compounds in bile of fish sampled after the Exxon Valdez oil spill. *Environmental Science & Technology*, 26(1), 116-126.
- Krajnović-Ozretić, M. og Ozretić, B. (1980). The ALA-D activity in lead-exposed grey mullet *Mugil auratus*. *Marine Ecology - Progress Series* 3, 187-191.
- Lambert, Y. og Dutil, J.-D. (1997). Can simple condition indices be used to monitor and quantify seasonal changes in the energy reserves of Atlantic cod (*Gadus morhua*)? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54, 104-112
- Latimer, J. S., Davis, W. R. og Keith, D. J. (1999). Mobilization of PAHs and PCBs from in-place contaminated marine sediments during simulated resuspension events. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 49(4), 577-595.
- Laws, E. A., (2013). Environmental Toxicology *Selected Entries from the Encyclopedia of Sustainability Science and Technology*, Springer, 339.
- Lee, R. F. og Anderson, J. W. (2005). Significance of cytochrome P450 system responses and levels of bile fluorescent aromatic compounds in marine wildlife following oil spills. *Marine Pollution Bulletin*, 50, 705-723.
- Lie, O., Lied, E. og Lambertsen, G. (1986) Liver retention of fat and fatty acids in cod (*Gadus morhua*) fed different oils. *Aquaculture*, 59(3), 187-196.
- Lima, A. L. C., Farrington, J. W. og Reddy, C. M., (2005) Combustion-Derived Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Environment—A Review, *Environmental Forensics*, 6(2), 109-131.
- Link, J. S., Bogstad, B., Sparholt, H. og Lilly, G. R. (2009). Trophic role of Atlantic cod in the ecosystem. *Fish and Fisheries*, 10, 58-87.
- Lombardi, P. E., Peri, S. I. og Guerrero, N. R. V. (2010). ALA-D and ALA-D reactivation as biomarkers of lead contamination in the fish *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, 1704-1711.

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. og Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 193(1), 265-275.
- Mager, E. M. (2011). 4 Lead. I *Fish Physiology: Homeostasis and Toxicology of Non-Essential Metals* (ed. Wood, C. M., Farell, A. P. og Brauner, C.J.) 31(B), 185-236. Academic press.
- Mager, E. M. og Grosell, M. (2011). Effects of acute and chronic waterborne lead exposure on the swimming performance and aerobic scope of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 154(1), 7-13.
- Magnussen, E. (2011). Food and feeding habits of cod (*Gadus morhua*) on the Faroe Bank. *ICES Journal of Marine Science*, 68(9), 1909–1917.
- Malhotra, A. og Dhawan, D. K. (2014). Current view of zinc as a hepatoprotective agent in conditions of chlorpyrifos induced toxicity. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 112, 1–6.
- Meador, J. P., Stein, J. E., Reichert, W. L. og Varanasi, U. (1995). Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 143, 79-165.
- Menescal, L.A., Schmidt, C., Liedtke, D. og Schartl, M. (2012). Liver hyperplasia after tamoxifen induction of Myc in a transgenic medaka model. *Disease models and mechanisms*, 5(4), 492-502.
- Menzie, C. A., Potocki, B. B. og Santodonato, J. (1992). Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environmental Science and Technology*, 26(7), 1278-1284.
- Morgan, M. J., Rideout, R. M. og Colbourne, E. B. (2010). Impact of environmental temperature on Atlantic cod *Gadus morhua* energy allocation to growth, condition and reproduction. *Marine Ecology Progress Series*, 404, 185-195.
- Mortensen, A. S. og Arukwe, A. (2007). Modulation of xenobiotic biotransformation system and hormonal responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) after exposure to tributyltin (TBT). *Comparative Biochemistry and Physiology*, del C, 145, 431–441.
- Mukherjee, P. K., Kumar, V., Mal, M. og Houghton, P. J. (2007). Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 14(4), 289-300.
- Mullowney, D. R. og Rose, G. A. (2014). Is recovery of northern cod limited by poor feeding? The capelin hypothesis revisited. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, fst188.
- Nahrgang, J., Jönsson, M. og Camus, L. (2010a). EROD activity in liver and gills of polar cod (*Boreogadus saida*) exposed to waterborne and dietary crude oil. *Marine Environmental Research*, 70(1),120-123

- Nahrgang, J., Camus, L., Jönsson, M., Christiansen, Jørgen S., Carls, M. G., Gonzalez, P., Taban, I. C., Bechmann, R. K. og Hop, H. (2010b). Biomarker responses in polar cod (*Boreogadus saida*) exposed to the water soluble fraction of crude oil. *Aquatic Toxicology*, 97(3), 234-242
- Nakagawa, H., Sato, T. og Kubo, H. (1995). Method not requiring mercury chloride for the determination of Activity of 5-aminolevulinic acid dehydrates in blood of carp *Cyprinus carpio*. *Fisheries science*, 61, 97-99.
- Nash, R. D., Valencia, A. H. og Geffen, A. J. (2006). The origin of Fulton's condition factor—setting the record straight. *Fisheries*, 31(5), 236-238.
- Nerland, I. L. (2011) Effects of environmental toxicants in Atlantic cod (*Gadus morhua*) from the Inner Oslofjord. Master thesis, University of Oslo.
- Nordberg, M., Templeton, D. M., Andersen, O. og Duffus, J. H. (2009). Glossary of terms used in ecotoxicology. *Pure and Applied Chemistry*, 81(5), 829–970.
- Olson, D. L., og Christensen, G.M. (1980). Effects of water pollutants and other chemicals on fish acetylcholinesterase (*in vitro*). *Environmental research*, 21(2), 327-335.
- OSPAR Commission 2007. Background document on biological effects monitoring techniques. Assessment and Monitoring Series, 1-122.
- OSPAR Commission 2014. Levels and trends in marine contaminants and their biological effects – CEMP Assessment report 2013.
- Otterbech, F. (1954). Undersøkelser over torsken i Oslofjorden. *Fiskeridirektoratets Skrifter Serie Havundersøkelser*, 11(2), 1–17.
- Pampanin, D. M. og Sydnes, M. O. (2013). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons a Constituent of Petroleum: Presence and Influence in the Aquatic Environment. I Hydrocarbon (ed. Kutcherov, V. og Kolesnikov, A.). *InTech, Rijeka*. 80-118.
- Pangestuti, R. og Kim, S. K. (2011). Neuroprotective effects of marine algae. *Marine drugs*, 9, 803-818.
- Parrott, J. L. og Blunt, B. R. (2005). Life-Cycle Exposure of Fathead Minnows (*Pimephales promelas*) to an Ethinylestradiol Concentration Below 1 ng/L Reduces Egg Fertilization Success and Demasculinizes Males. *Environmental Toxicology*, 20(2), 131-141.
- Pathiratne, A., Chandrasekera, L. W. H. U. og De Seram, P. K. C. (2008). Effects of biological and technical factors on brain and muscle cholinesterases in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: implications for biomonitoring neurotoxic contaminations. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 54(2), 309-317.
- Payne, J. F., Mathieu, A., Melvin, W. og Fancey, L. L. (1996). Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Marine Pollution Bulletin*, 32(2), 225-231.

- Peters, L. D., O'hara, S. C. M., og Livingstone, D. R. (1996). Benzo [a] pyrene metabolism and xenobiotic-stimulated reactive oxygen species generation by subcellular fraction of larvae of turbot (*Scophthalmus maximus L.*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 114(3), 221-227.
- Pohanka, M. (2012). Acetylcholinesterase inhibitors: a patent review (2008-present). *Expert opinion on therapeutic patents*, 22(8), 871-886.
- Rice, C.D. og Roszell, L.E. (1998). Tributyltin modulates 3, 3', 4, 4', 5-pentachlorobiphenyl (PCB-126)-induced hepatic CYP1A activity in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 55(3), 197-212.
- Risso-de Faverney, C., Orsini, N. de Sousa, G. og Rahmani, R. (2004), Cadmium-induced apoptosis through the mitochondrial pathway in rainbow trout hepatocytes: involvement of oxidative stress, *Aquatic Toxicology*, 69(3), 247-258.
- Rogers, L. A., Olsen, E. M., Knutsen, H. og Stenseth, N. C. (2014). Habitat effects on population connectivity in a coastal seascape. *Marine Ecology Progress Series*, 511, 153–163
- Ruus, A., Hylland, K., og Green, N. W. (2003). Biological effects methods, Norwegian monitoring 1997–2001. *Norwegian Institute for Water Research (NIVA) Rep*, 4649-2003.
- Sandvik, M., Beyer, J., Goksøyr, A., Hylland, K., Egaas, E. og Skaare, J. U. (1997). Interaction of benzo [a] pyrene, 2, 3, 3', 4, 4', 5 hexachlorobiphenyl (PCB 156) and cadmium on biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus L.*). *Biomarkers*, 2(3), 153-160.
- Sarristo, M., Craft, J. A., Lehtonen, K. K. og Lindström, K. (2010). An endocrine disrupting chemical changes courtship and parental care in the sand goby. *Aquatic Toxicology*, 97, 285-292.
- Schilderman, P. A. E. L., Maas, L. M., Pachen, D. M. F. A., De Kok, T. M. C. M., Kleinjans, J. C. S., og Van Schooten, F. J. (2000). Induction of DNA adducts by several polychlorinated biphenyls. *Environmental and molecular mutagenesis*, 36(2), 79-86.
- Schwalme, K. og Chouinard, G. A. (1999). Seasonal dynamics in feeding, organ weights, and reproductive maturation of Atlantic cod (*Gadus morhua*) in the southern Gulf of St Lawrence – *ICES Journal of Marine Science*, 56, 303–319.
- Scott, G. R. og Sloman, K. A. (2004). The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic toxicology*, 68(4), 369-392.
- Shahidi, F. og Dunajski, E. (1994) Lipid fatty acids, growth and compositional characteristics of farmed cod (*Gadus morhua*). *Journal of Food Lipids*, 1(4), 265-271.
- Sherwood, G. D., Rideout, R. M., Fudge, S. B. og Rose, G. A. (2007). Influence of diet on growth, condition and reproductive capacity in Newfoundland and Labrador cod (*Gadus*

- morhua*): Insights from stable carbon isotopes ($\delta^{13}\text{C}$). *Deep-Sea Research II*, 54, 2794–2809.
- Silva, D. A. M. da, Buzitis, J., Krahn, M. M., Bicego, M. C. og Pires-Vanin, A. M. S. (2006). Metabolites in bile of fish from São Sebastião Channel, São Paulo, Brazil as biomarkers of exposure to petrogenic polycyclic aromatic compounds. *Marine Pollution Bulletin*, 52, 175–183.
- Skarbøvik, E., Stålnacke, P., Austnes, K., Selvik, J. R., Aakerøy, P. A., Tjomsland, T., Høgåsen, T. og Beldring, B. (2012). Riverine inputs and direct discharges to Norwegian coastal waters – 2011. *NIVA report*, TA-2986/2012.
- Skylstad, V. A. (2013). Seasonal variation in phytoplankton diversity with an emphasis on the seasonality and morphology of *Dinophysis* Ehrenberg (*Dinophyceae*) in the outer Oslo Fjord. Master thesis, University of Oslo.
- Solé, M., García de la Parra, L. M., Alejandre-Grimaldo, S. og Sardá, F. (2006). Esterase activities and lipid peroxidation levels in offshore commercial species of the NW Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 52, 1708-1716.
- Sorrentino, C., Roy, N. K., Courtenay, S. C. og Wirgin, I. (2005). Co-exposure to metals modulates CYP1A mRNA inducibility in Atlantic tomcod *Microgadus tomcod* from two populations. *Aquatic toxicology*, 75(3), 238-252.
- Sturm, A., Radau, T. S., Hahn, T. og Schulz, R. (2007). Inhibition of rainbow trout acetylcholinesterase by aqueous and suspended particle-associated organophosphorous insecticides. *Chemosphere*, 68(4), 605-612.
- Sugahara, Y., Kawaguchi, M., Itoyama, T., Kurokawa, D., Tosa, Y., Kitamura, S., Handoh, I. C., Nakayama, K. og Murakami, Y. (2014). Pyrene induces a reduction in midbrain size and abnormal swimming behavior in early-hatched pufferfish larvae. *Marine pollution bulletin*, 85, 479-486.
- Sun, Y., Yin, Y., Zhang, J., Yu, H., Wang, X., Wu, J. og Xue, Y. (2008). Hydroxyl radical generation and oxidative stress in *Carassius auratus* liver, exposed to pyrene. *Ecotoxicology and environmental safety*, 71(2), 446-453.
- Sundt, R. C. og Björkblom, C. (2011). Effects of produced water on reproductive parameters in prespawning Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 74, 543–554.
- Sutharshiny, S., Sivashanthini, K. og Thulasitha, W. (2013). Lipid Changes in Relation to Maturation and Spawning of Tropical Double Spotted Queenfish, *Scomberoides lysan* (Forsskaal, 1775). *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8(4), 555-570.
- Svåsand, T., Otterå, H. M., Taranger, G. L., Litvak, M., Skiftesvik, A. B., Bjelland, R. M., Pavlov, D.A., Holm, J.C., Harboe, T., Mangor-Jensen, A., Norberg, B. og Howell, B. (2004). The status and perspectives for the species. *Culture of cold-water marine fish*, 433-474.

- Sørensen, P. (2012). Prioriterte miljøgifter. Nasjonale utslipp – status 2010. *Klima- og forurensningsdirektoratet*, TA 2981/2012.
- Sørensen, P. og Bakka, L. (2014). Utslippsreduksjoner for prioriterte helse- og miljøfarlige kjemikalier (2020 målet). Statusrapport. Miljødirektoratet. M210/2014. 1-27
- Tansel, B., Fuentes, C., Sanchez, M., Predoi, K. og Acevedo, M. (2011). Persistence profile of polyaromatic hydrocarbons in shallow and deep Gulf waters and sediments: effect of water temperature and sediment-water partitioning characteristics. *Marine pollution bulletin*, 62(12), 2659-2665.
- Tashjian, D. H., Teh, S. J., Sogomonyan, A., og Hung, S. S. (2006). Bioaccumulation and chronic toxicity of dietary l-selenomethionine in juvenile white sturgeon *Acipenser transmontanus*. *Aquatic toxicology*, 79(4), 401-409.
- Thevik, H. J., Sørsgård, E. og Fowler, T. (2001). A method for assessing the risk of sea transportation: Numerical examples for the Oslofjord. *Proceedings of ESREL*.
- Tierney, K. B., Baldwin, D. H., Hara, T. J., Ross, P. S., Scholz, N. L., og Kennedy, C. J. (2010). Olfactory toxicity in fishes. *Aquatic toxicology*, 96(1), 2-26.
- Tobiszewski, M. og Namieśnik, J. (2012). PAH diagnostic ratios for the identification of pollution emission sources. *Environmental Pollution*, 162, 110-119.
- Van der Oost, R., Beyer, J., og Vermeulen, N. P. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*, 13(2), 57-149.
- Versonnen, B. J. og Janssen, C. R. (2004). Xenoestrogenic effects of ethinylestradiol in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology*, 19(3), 198-206.
- Viana, P. Z., Yin, K., og Rockne, K. J. (2012). Field measurements and modeling of ebullition-facilitated flux of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons from sediments to the water column. *Environmental science and technology*, 46(21), 12046-12054.
- Wang, X. H., Hong, H. S., Mu, J. L., Lin, J. Q., og Wang, S. H. (2008). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) metabolites in marine fishes as a specific biomarker to indicate PAH pollution in the marine coastal environment. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 43(3), 219-226.
- Weis, J. S. (2014). Physiological, Developmental and Behavioral Effects of Marine Pollution. *Springer Science*, 253
- Whitlock, M. C. og Schluter, D. (2009). The analysis of biological data. Greenwood Village, Colorado. Robert and Company Publishers.

- Whyte, J. J., Jung, R. E., Schmitt, C. J., og Tillitt, D. E. (2000). Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 30(4), 347-570.
- Williams, T. og Bedford, B. C. (1974). The use of otoliths for age determination. In: Bangenl TB (ed) *Aging of fish*. University of Reading.
- Zhou, H., Wu, H., Liao, C., Diao, X., Zhen, J., Chen, L. og Xue, Q. (2010). Toxicology mechanism of the persistent organic pollutants (POPs) in fish through AhR pathway. *Toxicology mechanisms and methods*, 20(6), 279-286.
- Zodrow, J. M., Stegeman, J. J., og Tanguay, R. L. (2004). Histological analysis of acute toxicity of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 66(1), 25-38.

Vedlegg / Appendiks

Vedlegg 6.1. Rådata for hann- og hunnfisk fra indre Oslofjord.

Fisk nr	Kjønn	Alder	Lengde	Somatisk vekt	Vekt	Kondisjon	LSI	GSI
i1	♂	3	45	285	307	0.313	1.579	0.211
i2	♂	3	37	383	432	0.726	3.159	0.888
i3	♂	2	45	652	707	0.716	1.304	0.077
i4	♂	4	49	928	1047	0.813	2.857	1.456
i5	♂	3	41	512	571	0.743	2.266	0.195
i6	♂	4	41	576	648	0.817	2.762	1.251
i7	♂	4	45	640	746	0.721	1.844	0.406
i8	♂	4	38	412	503	0.751	2.767	2.379
i9	♂	3	44	694	768	0.809	2.725	1.673
i10	♂	6	46	805	892	0.827	1.404	0.075
i11	♂	5	43	655	782	0.853	1.634	0.458
i12	♂		34	308	348	0.783	2.827	0.097
i13	♂	2	51	1117	1251	0.847	1.513	0.251
i14	♂	3	40	509	599	0.807	4.479	1.847
i15	♂	3	42	539	610	0.755	3.541	3.782
i16	♂	4	42	589	705	0.795	1.986	1.562
i17	♂	4	41	488	544	0.735	2.049	1.352
i18	♂	2	39	490	550	0.826	2.143	1.531
i19	♂	4	42	619	714	0.866	1.906	1.050
i20	♂	4	46	709	789	0.753	1.354	1.241
i21	♂	4	43	580	660	0.756	1.741	1.121
i22	♂	3	41	534	619	0.769	3.539	1.742
i23	♂	3	45	731	835	0.802	2.011	0.657
i24	♂	1	42	520	580	0.702	1.154	0.423
i25	♂	2	36	368	421	0.789	1.984	1.005
i26	♂	3	50	1049	1153	0.839	1.602	0.086
i27	♂	3	39	520	569	0.863	1.827	1.365
i28	♂	4	39	469	540	0.791	1.450	0.853
i29	♂	2	53	1173	1302	0.788	1.219	0.060
i30	♂	2	52	1112	1318	0.814	2.644	0.612
i31	♂	1	42	531	632	0.742	1.753	1.074
i32	♂	1	45	666	740	0.756	1.967	0.991
i33	♂	2	44	638	705	0.749	1.348	0.784
i34	♂	3	38	410	434	0.746	4.492	1.880
i35	♂	1	36	290	352	0.648	2.207	1.655
i36	♂	1	58	1600	1850	0.820	6.100	1.050
i37	♂	1	45	673	792	0.738	1.635	0.877
i38	♂	2	36	350	392	0.776	1.971	0.857
i39	♂	3	46	666	783	0.684	1.127	0.090
i40	♂	3	42	555	656	0.771	1.424	4.957

Vedlegg 6.2. Rådata for hann- og hunnfisk fra ytre Oslofjord.

Fisk nr	Kjønn	Alder	Lengde	Somatisk vekt	Vekt	Kondisjon	LSI	GSI
y1	♂	1	43	639	699	0.804	1.236	0.031
y2	♂	2	47	770	862	0.742	1.104	1.857
y3	♂	2	48	956	1003	0.864	1.496	0.042
y4	♂	2	44	698	772	0.819	2.350	0.056
y5	♂	2	43	634	707	0.797	1.009	0.032
y6	♂	2	43	725	800	0.912	1.862	1.076
y7	♂	1	39	525	597	0.920	1.295	0.171
y8	♂	2	46	728	799	0.773	0.865	0.027
y9	♂	2	50	973	1140	0.778	2.569	1.696

y10	3	41	564	653	0.818	1.011	1.330
y11	1	42	562	621	0.759	1.957	0.285
y12	2	42	533	581	0.746	0.769	0.863
y13	3	52	1110	1240	0.813	2.045	0.360
y14	2	43	624	757	0.813	1.538	0.529
y15	2	39	480	524	0.841	1.021	0.292
y16	1	44	710	779	0.833	2.056	0.197
y17	2	44	655	692	0.796	1.023	0.489
y18	2	50	905	975	0.724	0.950	0.221
y19	2	46	853	934	0.876	2.251	0.481
y20	2	45	711	775	0.807	1.561	0.309
y21	3	60	1700	2100	0.807	3.235	1.612
y22	2	43	692	767	0.870	2.962	0.275
y23	4	45	636	718	0.722	1.132	0.157
y24	2	43	697	767	0.877	1.406	0.072
y25	2	44	707	782	0.830	1.782	0.438
y26	3	46	796	945	0.818	2.952	1.131
y27	1	38	388	404	0.707	1.881	0.258
y28	2	39	523	623	0.882	1.243	0.210
y29	2	38	482	547	0.878	1.120	0.104
y30	2	35	358	398	0.835	1.117	0.084
y31	2	45	734	817	0.805	1.049	0.095
y32	1	39	525	594	0.885	1.276	0.762
y33	2	44	655	740	0.769	2.794	1.237
y34	2	43	649	756	0.816	0.878	0.308
y35	2	42	629	724	0.849	1.622	0.588
y36	1	43	651	784	0.819	1.920	0.061
y37	3	53	1215	1447	0.840	2.222	1.481
y38	3	55	1035	1350	0.622	1.952	1.449
y39	1	35	318	365	0.742	0.943	0.346
y40	2	56	1500	1800	0.854	3.580	1.820

Vedlegg 6.3. Behandlet data for hann- og hunnfisk fra indre Oslofjord

Fisk nr	Gjelle- EROD	Hepatisk EROD	ELISA	AChE	ALA-D	1-OH- fenantren	1-OH- pyren	3-OH- B(a)P
i1	3.330	225.0	0.167	23.70	19.92	9.187	198.7	1.8
i2	0.447	116.9	0.150	8.97	8.51	9.838	238.3	
i3	2.703	257.1	0.232	6.59	21.62	25.231	465.9	6.3
i4	0.863	116.5	0.169	6.03	15.43	9.327	242.0	2.5
i5	2.427	277.0	0.189	6.94	19.56	12.855	300.5	1.8
i6	1.243	236.9	0.258	6.56	11.92	9.183	228.1	2.2
i7	1.280	91.3	0.166	9.22		11.385	270.7	2.8
i8	1.071	120.3	0.194	7.40	4.45			
i9	2.575	52.5	0.118	7.27	10.46			
i10	0.212	32.5	0.067	6.01	16.21	14.677	252.6	2.1
i11	0.105	298.7	0.181	8.77	6.57	9.532	198.8	2.2
i12	1.401			8.09	10.23	5.297	173.6	2.0
i13	4.728	190.3	0.163	5.49	13.71	7.658	198.6	2.2
i14	0.609	204.0	0.117	6.37	11.90	16.589	361.2	2.7
i15	-0.225	291.6	0.128	7.94	11.38	17.204	331.6	2.7
i16	1.451	90.9	0.172	6.56	10.54			
i17	0.912	325.2	0.191	7.72	17.34	11.702	256.8	2.1
i18	0.128	196.8	0.150	6.91	16.53	14.626	304.8	2.4
i19	2.053			7.15	15.88	3.204	80.7	1.2
i20	0.512	118.2	0.163	7.51	14.77	7.401	204.3	2.7
i21	0.170	80.2	0.199	7.77	10.39	5.854	164.5	2.6
i22	0.680	104.0	0.074	6.40	3.71	17.307	283.9	1.7
i23	1.424	206.2	0.139	5.04	13.20	4.541	108.4	1.4
i24	0.358			10.32	19.73	7.598	159.5	1.8

i25	0.437	155.1	0.278	7.01	10.31	9.317	234.5	2.0
i26	0.968	232.1	0.182	7.69	12.85	17.862	319.8	1.9
i27	1.941	194.0	0.131	8.61	14.97	19.312	305.7	2.6
i28	0.227	87.4	0.166	7.83	12.07	12.558	220.6	2.4
i29	0.299			5.18	14.05	15.133	299.5	2.4
i30	3.000	138.4	0.120	5.53	19.80	8.902	142.1	2.0
i31	0.574	75.6	0.136	6.91	17.41	13.974	205.7	1.4
i32	-0.111	256.4	0.136	7.12	13.95	7.182	136.4	1.6
i33	0.590	192.1	0.154	6.88	12.68	5.301	155.9	1.4
i34	0.665	234.7	0.234	10.10		9.239	121.6	1.1
i35	3.996		0.129	9.84	16.91	7.127	177.6	2.4
i36	4.729	124.2	0.091	5.20	6.43	11.933	244.3	1.9
i37	1.172	362.0	0.280	6.88			29.4	0.0
i38	7.053	101.1	0.180	10.57	18.29	6.579	171.6	2.6
i39	0.371	119.4	0.155	8.43	17.04	8.381	246.9	
i40	0.320	85.2		8.92	8.47	11.192	168.8	1.7

Vedlegg 6.4, Behandlet data for hann- og hunnfisk fra ytre Oslofjord.

Fisk nr	Gjelle- EROD	Hepatisk EROD	ELISA	AChe	ALA-D	1-OH- fenantren	1-OH- pyren	3-OH- B(a)P
y1	4.285	38.4	0.124	8.16	34.35	11.065	47.7	1.6
y2	4.876	107.0	0.119	6.29	13.66	10.280	65.4	2.1
y3	3.795	119.8	0.118	5.05	11.08	7.652	25.8	
y4	2.460	91.0	0.107	5.89	13.19	11.861	46.4	
y5	1.754	63.2	0.052	8.19	23.63	6.408	30.4	1.2
y6	2.982	38.7	0.111	6.67	9.99	9.289	42.7	
y7	2.279	8.9	0.071	7.15	8.40	24.603	86.4	1.6
y8	4.114	21.3	0.079	8.06	14.84	7.750	39.0	
y9	1.091	99.5	0.110	5.87	39.68			
y10	2.440	16.5	0.102	11.17	16.96	4.609	29.0	
y11	2.334	88.6	0.070	9.30	8.53	11.593	56.0	
y12	0.192	89.7	0.072	7.23	6.99	14.693	29.7	1.6
y13				5.31	4.67	3.362	18.2	
y14	2.434	38.9	0.084	8.82	14.17	6.049	21.9	
y15	1.347	51.8	0.097	9.79	13.99	7.312	32.6	
y16	3.078	73.9	0.048	5.45	4.05	11.172	45.5	
y17	1.403	138.1	0.085	7.38	20.13	5.000	32.4	
y18	2.746	83.5	0.105	6.69	7.69	8.836	49.7	
y19	2.050	57.2	0.104	7.23	23.04	6.680	34.4	1.4
y20	1.283	37.8	0.035	4.96	13.87	7.274	44.7	1.4
y21	1.073	79.6	0.112	9.15	9.57	9.877	32.4	
y22	0.409	87.8	0.126	4.13	15.59			
y23	2.323	4.6	0.086	5.25	9.45	12.709	53.1	
y24	2.755	118.6	0.072	7.77	13.16	4.523	34.9	1.7
y25	0.707	81.1	0.051	7.04	16.96	8.057	28.0	
y26	2.893	75.0	0.158	5.67	16.47	12.332	48.0	
y27	2.512	121.0	0.131	7.14	17.49	12.851	56.3	
y28	1.899	119.8	0.077		2.72	12.832	52.3	1.5
y29	3.642	12.5	0.070	9.78	12.29	10.693	30.6	1.5
y30	0.394	65.0	0.068	10.20	19.99	15.692	51.3	
y31	2.630	21.7	0.069	5.66	12.14	3.211	28.1	1.4
y32	3.066	21.9	0.083		17.18	11.696	45.0	
y33	1.564	69.2	0.088	7.03	11.46			
y34	1.431			5.49	11.78	7.188	25.4	
y35	1.087	49.1	0.032	6.87	21.87	18.640	52.0	
y36	0.821	95.8	0.113	7.72	27.50	30.142	88.2	
y37	1.694	65.1	0.067	5.52	22.76	11.383	42.6	
y38	1.219		0.099	4.11	13.64	8.758	41.8	1.0
y39	1.635	12.4	0.093	7.93	18.51	8.654	36.0	

y40 0.887 23.7 0.104 3.98 6.11 11.036 49.3

Vedlegg 6.5. Kjemikalieliste

Kjemkalier	Produktnummer	Produsent
Acetyltiokoliniodid	A5751	Sigma-Aldrich
Askorbinsyre	1.0027.0250	Merck
Bovint serum albumin	A3803	Sigma-Aldrich
Dimetylsulfoksid	472301	Sigma-Aldrich
Ditiobisnitrobenzosyre	D8130	Sigma-Aldrich
Ditiotreitol	43819	Fluka Analytical
Eddiksyre	33209	Sigma-Aldrich
7-Etoksyresorufin	E3763	Sigma-Aldrich
Folin reagent	500-0114	Bio-Rad
Geit anti-kanin IgG konjugert med HRP	A0545	Sigma-Aldrich
Glyserol	G7757	Sigma-Aldrich
Heparin	H5515	Sigma-Aldrich
HEPES	A1069	AppliChem
Kaliumfosfat (dibasisk)	221317	Sigma-Aldrich
Kaliumfosfat (monobasisk)	P5379	Sigma-Aldrich
Kaliumklorid	1.04936.1000	Merck
Kanin anti-fisk CYP1A antistoff	CP226	Cayman Chemical Company
Karbonat-bikarbonat	C3041	Sigma-Aldrich
Kvikksølvklorid	203777	Sigma-Aldrich
Kobber-tartrat-løsning (Reagent A)	500-0113	Bio-Rad
Metanol	32213	Sigma-Aldrich
Natriumbikarbonat	S5761	Sigma-Aldrich
Natriumfosfat (dibasisk)	30412	Sigma-Aldrich
Natriumfosfat (monobasisk)	71504	Sigma-Aldrich
Natriumklorid	S7653	Sigma-Aldrich
Natriumresorufin	R3257	Sigma-Aldrich
Nikotinamid adenin dinukleotidfosfat	N1630	Sigma-Aldrich
Perklorsyre	589.293	Prolabo
Porfobilinogen	P1134	Sigma-Aldrich
Svovelsyre	1.00731.1000	Merck
TMB Plus	4390A	KEM EN TEC Diagnostics
Trifenylamine	T81604	Sigma-Aldrich
Triklorreddiksyre	1.00807.0250	Merck
Triton X-100	X100	Sigma-Aldrich
Trizma Base	T1503	Sigma-Aldrich
Trizma Hydroklorid	T3253	Sigma-Aldrich
Tween-20	P1379	Sigma-Aldrich
β-glukuronidase/aryl sulfatase	1.04114.0002	Merck
δ-Aminolevulinsyre	A3785	Sigma-Aldrich
ρ-dimethylaminobenzaldehyde (Ehrlich reagent)	D2004	Sigma-Aldrich

Vedlegg 6.6 Utstysrlist

Produkt**Produsent**

Centrifuge 5424

Eppendorf

Gen5

Bio Tek

LAB pH meter, PHM 92

Radiometer Copenhagen

Mikro-ultrasentrifuge, SORVALL MTX 150

Thermo Scientific

Multifuge 3 S-R

Heraceus

Potter-Elvehjem homogenizer

SkanWasher 300

Skatron

SynergyMX

Bio Tek

Ultraturax, PRO 200

PRO Scientific inc.

Vortex mixer, SA8

Stuart

Whirlimixer

Fisons

Vedlegg 6.7. ALA-D-metode med og uten kvikksølv.

Fisk nr.	Metode med Hg	Metode uten Hg
1	1,21	1,53
2	1,58	0,32
3	2,86	1,34
4	2,96	1,73
5	2,60	1,65
6	3,29	2,93
7	1,75	1,38
8	3,04	2,06
9	4,09	3,21
10	2,54	1,51
11	3,00	2,38
12	2,13	1,46
13	2,20	2,35
14	2,57	2,17
15	0,89	0,52
16	1,24	0,39
17	3,42	2,27
18	2,87	3,25
19	1,91	1,31
20	1,15	1,06