

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

Daniel Severinsen Neo



Masteroppgave i økotoksikologi

UNIVERSITETET I OSLO

Desember 2015

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

© Daniel Severinsen Neo

2015

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

Daniel Severinsen Neo

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

Trykk: Representeren, Universitetet i Oslo

Sammendrag

Indre Oslofjord er en delvis innelukket fjord som er omkranset av et av landets mest tettbebygde områder, noe som medfører en høy tilførsel av miljøgifter. Formålet med denne oppgaven var å undersøke effekter av disse miljøgiftene på torsk i indre Oslofjord. Dette ble utført ved å benytte ytre Oslofjord som et referanseområde. Både fysiologiske indekser og en rekke biomarkører ble benyttet for å bestemme effekter av pesticider som organofosfater og karbamater, bly, planare organiske forbindelser og gentoksiske forbindelser.

I slutten av november 2014 ble det innsamlet totalt 80 torsk, 40 fra indre Oslofjord og 40 fra ytre Oslofjord. Torsk fra indre Oslofjord var både eldre og hadde hatt langsommere vekst enn torsk fra ytre Oslofjord. Kondisjonsfaktor (K) var lik for torsk mellom de to områdene. Det ble funnet høyere hepatosomatisk indeks (HSI) og gonadosomatisk indeks (GSI) for torsk i indre Oslofjord enn i ytre Oslofjord, men ved å analysere hvert årskull separat, fremkom det at disse forskjellene sannsynligvis skyldtes aldersforskjellene mellom torsk innsamlet fra de to områdene. Ingen kjønnsforskjeller ble funnet mellom kjønn innad i hvert område for kondisjon eller vevsindeksene.

Det ble ved biomarkørene acetylkolinesterase (AChE) aktivitet og δ -aminolevulinsyre dehydratase (ALA-D) aktivitet ikke funnet effekter av bly eller pesticider på torsk fra indre Oslofjord i forhold til torsk fra ytre Oslofjord. Det ble ikke funnet forskjeller mellom kjønn innad i hvert område for disse markørene.

En høyere konsentrasjon av PAH-metabolittene 1-hydroksyfenantren og 1-hydroksypyren ble funnet i galle hos torsk fra indre Oslofjord, hvilket tyder på en høyere eksponering for PAHer for torsk i indre Oslofjord. For begge metabolittene ble det funnet høyere konsentrasjoner i gallen til hanntorsk i forhold til hunntorsk i indre Oslofjord. Biomarkørene for cytokrom P450 1A hadde også høyere konsentrasjon og aktivitet i lever fra torsk fra indre Oslofjord, hvilket indikerer høyere eksponering for planare organiske miljøgifter som PCBer i dette området. Det ble funnet høyere cytokrom P450 1A aktivitet i hanner enn i hunner i ytre Oslofjord, og ingen kjønnsforskjeller for CYP1A-protein. Mikronukleus analysen viste en høyere grad av DNA skade i torsk i indre Oslofjord i forhold til ytre Oslofjord og ingen forskjell mellom kjønn innad i hvert

område, noe som indikerer at torsk fra indre Oslofjord har vært eksponert for gentoksiske forbindelser i høyere grad enn torsk fra ytre Oslofjord.

Forord

Jeg ønsker først og fremst å takke mine veiledere Ketil Hylland, Tor Fredrik Holth og Merete Grung. Takk Ketil Hylland for god veiledning under både skrive-, felt- og laboratoriearbeidet, og for at du alltid er tilgjengelig for å svare på spørsmål. Tusen takk til Tor-Fredrik Holth for hjelp under feltarbeid, og Merete Grung for gjennomføring av HPLC analysen.

Takk til Fagrådet for Indre Oslofjord for finansiering av deler av denne oppgaven.

En stor takk til Per-Johan Færøvig og Berit Kaasa for opplæring og god hjelp under laboratoriearbeidet. Takk til Sindre, Tom og Jan på forskningsfartøyet Trygve Braarud og til Rita for hjelp med feltarbeidet.

Takk Andreas Otterbeck for mange trivelige sene kvelder på lesesalen, og for gode råd under skrivingen. En stor takk til Mathilde Skarsjø for samarbeid på lab, tilbakemeldinger på oppgaven og ekspedisjoner til fysikkbakken. Takk til alle studenter på AKVA for utallige lange og trivelig lunsj- og kaffepauser de siste to årene. Takk til Tonje for hjelp med referanselisten.

Takk til Kristian Aandstad, Anders Evjen Bakke og Audun Dahl for beroligende nærvær, og for at dere minner meg på at det finnes en verden utenfor lesesalen.

Takk til Sunniva Reitan for din utrolige tålmodighet, varme og støtte, uten deg hadde dette ikke vært mulig!

Forkortelser

AChE	Acetylkolinesterase
Ah	Aryl hydrokarbon
ALA-D	δ -aminolevulinsyre dehydratase
ANOVA	Analysis of variance
BDE-47	2,2',4,4'-tetrabromodifenyl eter
BSA	Bovint serum albumin
CYP1A	Cytokrom P450 1A
DDE	Diklordifenyl dikloretylen
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzosyre
DTT	Ditiothreitol
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EROD	7-etoksyresorufin O-deetylase
GSI	Gonadosomatisk indeks
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSI	Hepatosomatisk indeks
IgG	Immunoglobulin G
K	Kondisjonsfaktor
MN	Mikronukleus
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
PAH	Polisyklisk aromatisk hydrokarbon
PBDE	Polybromerte difenyleter
PBG	Porfobilinogen
PBS	Phosphate buffered saline
PCA	Principal component analysis
PCB	Polyklorinert bifenyl
TBT	Tributyltinn
TTBS	Trisbuffered saline med tween 20
v/v	Volum/volum
w/w	Vekt/vekt
Zn	Sink

Innholdsfortegnelse

1	Introduksjon	1
1.1	Bakgrunn	1
1.2	Biomarkører	2
1.3	Hypoteser og mål	6
2	Materialer og metoder	7
2.1	Prøveinnsamling	7
2.2	Aldersbestemmelse	9
2.3	Kondisjon og vevsindekser	9
2.4	Opparbeiding av muskel	10
2.5	Opparbeiding av blod	10
2.6	Opparbeiding av lever	11
2.7	Proteinanalyse	12
2.8	Acetylkolinesterase (AChE) aktivitet i muskel	12
2.9	δ -aminolevulinsyre dehydratase (ALA-D) aktivitet i erythrocytter	13
2.10	PAH-metabolitter i galle	14
2.11	7-etoksyresorufin <i>O</i> -deetylase (EROD) aktivitet i lever	15
2.12	CYP1A konsentrasjon i lever	16
2.13	Mikronukleus i erythrocytter	17
2.14	Statistikk	18
3	Resultater	19
3.1	Alder, lengde og vekt	19
3.2	Kondisjon og vevsindekser	21
3.3	Acetylkolinesterase (AChE) aktivitet i muskel	26
3.4	δ -aminolevulinsyre dehydratase (ALA-D) aktivitet i erythrocytter	27
3.5	PAH-metabolitter i galle	28
3.6	7-etoksyresorufin <i>O</i> -deetylase (EROD) aktivitet i lever	30
3.7	CYP1A konsentrasjon i lever	31
3.8	Mikronukleus	32
3.9	PCA	33

4	Diskusjon.....	37
4.1	Alder, lengde og vekt.....	37
4.2	Kondisjon og vevsindekser.....	38
4.3	Acetylkolinesterase (AChE) aktivitet i muskel	40
4.4	δ -aminolevulinsyre dehydratase (ALA-D) aktivitet i erythrocytter	43
4.5	PAH-metabolitter i galle.....	44
4.6	Cytokrom P450 i lever.....	47
4.7	Mikronukleus i erythrocytter	50
4.8	Konklusjoner	51
4.9	Fremtidige studier.....	52
5	Referanser.....	54
6	Vedlegg	65

1 Introduksjon

1.1 Bakgrunn

Antropogen påvirkning er et vanlig problem i kystnære marine miljøer, hvor spesielt utslipp av miljøgifter har vært et vedvarende problem siden begynnelsen av forrige århundre. I takt med den økte industrialiseringen ble stadig flere forbindelser utviklet og tatt i bruk. Flere av disse, som for eksempel polyklorinerte bifenyler (PCB), har vist seg å ha uønskede effekter på organismer, lang nedbrytningstid og evne til å biomagnifisere (Safe 1994). Miljøgifter vil ende opp i det marine økosystemet via direkte utslipp, avrenning fra urbane områder, atmosfærisk transport, avløpsvann fra husholdninger og industri i tillegg til transport via elver.

Indre Oslofjord strekker seg over et område på rundt 190 km² (Berge et al. 2013), og er oseanografisk adskilt fra ytre Oslofjord ved en grunn terskel ved Drøbak som er 19,5 meter på det dypeste og omtrent 1 km bred (Baalsrud og Magnusson 2002). Den delvis innelukkede topografien til indre Oslofjord innebærer begrenset vannutskiftning og kan medføre at miljøgifter som slippes ut i indre Oslofjord i redusert grad forlater disse vannmassene, og samles opp i sedimenter (Wania 1999). Indre Oslofjord er igjen inndelt i to dype bassenger, Vestfjorden og Bunnfjorden, med et grunt område mellom disse.

Den kjente forurensningen av indre Oslofjord går tilbake til starten av 1900 tallet, og siden har både tilførsel av næringssalter og miljøgifter vært et problem (Thaulow og Faafeng 2014). Indre Oslofjord har en sterkt trafikkert havn, og fjorden er omgitt av tett bebyggelse. Dette medfører betydelige utslipp av forbindelser som er potensielt skadelige for det marine økosystemet. Utslipp av de fleste miljøgifter har blitt sterkt redusert de siste 20 årene (Sørensen 2012), men høye nivåer av flere forbindelser blir fortsatt funnet i indre Oslofjord. Under overvåkningsstudier hvor miljøgifter i torsk fra kystnære områder langs Norge ble undersøkt ble det i indre Oslofjord funnet, i henhold til klassifiseringssystemet beskrevet av Molvær et al. (1997), markert forurensning (klasse 3) av kvikksølv i filet og PCB i lever og moderat forurensning (klasse 2) av diklordifenyl-dikloretylen (DDE) i lever (Green et al. 2014). I tillegg til dette fant Green et al. (2014) høyere konsentrasjoner av polybromerte difenyletere (PBDE), tetrabromodifenylyl eter (BDE47), perfluoroktylsulfonat (PFOS), perfluoroktylsulfonamid (PFOSA) og heksabromsyklododekan (HBCD) i torsk fra indre

Oslofjord enn i noe annet område langs norskekysten. Overflatesedimenter i indre Oslofjord har nivåer av PAHer inkludert benzo[a]pyren, pyren og fenantren i tillegg til tributyltinn (TBT), kobber, kvikksølv og sink i klasse 5 (svært dårlig) (Berge et al. 2013).

Torsk (*Gadus morhua*) ble valgt som indikatorart. Dette er en fisk med utbredelse langs hele norskekysten, i tillegg til at den er en av de viktigste kommersielle fiskeartene i Norge og en vanlig matfisk. Den norske kysttorsken er relativt stasjonær og vandrer sjeldent over fjordterskler (Bergstad et al. 2008). Fisk fra de to områdene i denne oppgaven anses som ulike populasjoner (Knutsen et al. 2003). Den stasjonære naturen til kysttorsken gjør det enklere å koble eventuelle forskjeller i effekter av miljøgifter til forskjell i eksponering mellom områdene. Torsken langs skagerakkysten blir kjønnsmoden i en alder mellom 2 og 3 år, og gyter i perioden mellom januar og mars (Olsen et al. 2004). På grunn av sin fettrike lever (Goksøyr et al. 1996) og høye posisjon i næringskjeden vil torsken kunne akkumulere lipofile miljøgifter, både via diett og direkte over gjellene (Grung et al. 2009, Ruus et al. 2012). I tillegg har flere tidligere studier undersøkt effekter av miljøgifter på torsk i indre Oslofjord (Holth 2004, Imrik 2010, Nerland 2011, Bergland 2012, Fredriksen 2013, Bratrud 2014, Erdahl 2014), slik at ved å benytte torsk som indikatorart i denne oppgaven kan effekter over tid vurderes og slik gi et bedre bilde av forurensningssituasjonen.

1.2 Biomarkører

For å undersøke tilstedeværelse og nivåer av miljøgifter i fisk kan det benyttes kjemiske analyser hvor miljøgiftkonsentrasjon i sjøvann, sediment eller fiskens vev bestemmes. Det er imidlertid problematisk å relatere konsentrasjoner i fisk til effekter, og tilsvarende problematisk for konsentrasjoner i miljø som ikke forteller hvor mye som tas opp i organismer. I tillegg utsettes torsk i indre Oslofjord for en stor mengde forskjellige miljøgifter slik at et stort antall analyser hadde vært nødvendig. Dette er både tidkrevende og kostbart. Et alternativ til kjemiske analyser er å benytte biomarkører.

Peakall (1994) definerte en biomarkør som en biologisk respons på en kjemikalie eller kjemikalier som gir et mål for eksponering eller effekt. Den biologiske responsen kan strekke seg over hele hierarkiet av biologisk organisering, fra molekylære effekter som endringer i enzymaktivitet til endringer av populasjon og samfunnsstruktur (van der Oost et al. 2003).

Eventuelle effekter av miljøgifter manifesteres først som endringer i organismens biokjemi, og vil deretter kunne forplante seg til fysiologiske endringer og til responser på individ og populasjonsnivå (Walker et al. 2012). En av fordelene ved å bruke biomarkører på lave nivåer av biologisk organisering er at det gir mulighet til å observere responser av kjemikalier på et tidlig tidspunkt (van der Oost et al. 2003). Ytterligere fordeler er at biomarkørene er relatert til fiskens helse, og er spesifikke responser på eksponering for miljøgifter (Hylland et al. 2006). Disse biomarkørene er imidlertid mindre biologisk relevante enn responser på høyere nivåer.

Variasjon i biomarkør-responser kan påvirkes av faktorer som reproduktiv status, kjønn samt alder og størrelse (Thain et al. 2008). For å redusere påvirkning fra disse faktorene ble prøver samlet inn utenfor gyteperioden, når påvirkning av kjønn og reproduktiv status vil være lavest. Ved innsamling ble torsk av samme størrelse valgt ut fra de to undersøkte områdene for å redusere eventuell innvirkning fra størrelse på responser.

Kondisjonsfaktor (K) og heptosomatisk indeks (HSI) representerer henholdsvis forholdet mellom fiskens lengde og vekt, og hvor stor prosentandel leveren utgjør av den somatiske kroppsvekten. Torskens energilagre finnes hovedsakelig i lever og muskel hvor majoriteten av energien i leveren stammer fra lipider og majoriteten av energien i muskel er i form av proteiner (Lambert og Dutil 1997a). Ved næringsmangel over lengre perioder er det lipidene i leveren som vil tømmes først, mens proteiner i muskel vil utnyttes sist (Black og Love 1986). Både K og HSI har vist seg å være gode mål på tilgjengelig energi i torsk, hvor K representerer fiskens totale energilagre og HSI forklarer tilgjengelig energi i form av lipider og indikerer dermed fiskens helsetilstand innenfor et kortere tidsintervall enn kondisjon (Lambert og Dutil 1997a). Lavere kondisjon og HSI indikerer lavere generell helse hos torsken og kan forekomme etter perioder med sult, eksponering for miljøgifter som krever detoksifisering, gyting eller sykdom. Informasjon om helse, og spesielt energilagre, er nyttig informasjon når biomarkør-responser skal tolkes ettersom næringsmangel vil kunne påvirke respons (Andersson et al. 1985).

Gonadosomatisk indeks (GSI) representerer hvor stor prosentandel gonadene utgjør av den somatiske kroppsvekten, og er dermed et mål på hvor utviklet fiskens gonader er. Dette er en hensiktsmessig markør ettersom man kan undersøke hvorvidt prosesser assosiert med reproduksjon har hatt en innvirkning på markørene.

Hemming av acetylkolinesterase (AChE) er en veletablert biomarkør for eksponering for pesticider som karbamater og organofosfater (Payne et al. 1996). Acetylcholinesterase er et enzym som katalyserer hydrolytisk nedbrytning av neurotransmitteren acetylkolin som overfører nerveimpulser mellom nerveceller (Fulton og Key 2001). Dersom acetylkolinesterase hemmes av forbindelser, som de nevnte pesticider, vil acetylkolin kunne samle seg opp i synapsen hvilket fører til kontinuerlig stimulering av nerver. I muskelvev kan dette resultere i kramper, spasmer og eventuelt paralysen (Kirby et al. 2000). Acetylkolinesterase er til stede både i muskelvev og i hjernen hos fisk (Fulton og Key 2001). I denne studien ble AChE aktivitet i muskel bestemt ettersom det er klarere relatert til negative helseeffekter (Fulton og Key 2001), samt at det gjør prøvetaking enklere

Hemming av δ -aminolevulinsyre dehydratase (ALA-D) aktivitet er en spesifikk biomarkør for blyeksponering (Hodson 1976, Hylland 2004). ALA-D er et enzym som katalyserer en kondensasjonsreaksjon hvor to aminolevulinsyre molekyler danner et molekyl porfobilinogen (Jaffe 2004). Denne reaksjonen inngår i synteseveien til heme, som inngår i en rekke endogene forbindelser som hemoglobin og cytokromer (Hylland 2004). Enzymet krever sink som kofaktor (Jaffe 2004), og bly hemmer ALA-D ved at det fortrenger sink og forandrer proteinets kvartærstruktur (Kelada et al. 2001). Enzymets affinitet for bly er mye høyere enn for sink (Simons 1995), og aktiviteten hemmes av lave konsentrasjoner av bly (Hylland 2004).

Polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAHer) er organiske forbindelser som består av to eller flere benzenringer. Det finnes to viktige antropogene kilder til PAHer, pyrogene kilder assosiert med ufullstendig forbrenning av organisk materiale og petrogene kilder som er assosiert med fossilt brennstoff (Neff et al. 2005). Opptak av PAHer skjer i torsk både gjennom diett og over gjellene (Grung et al. 2009). Etter opptak vil PAHer raskt metaboliseres av fase 1 og fase 2 enzymer i leveren til mer hydrofile metabolitter som deretter skilles ut i gallen. På grunn av den effektive metabolismen i fisk vil ikke PAHer akkumulere i vev, men metabolittene til PAHer kan kvantifiseres i gallen (Aas et al. 2000b). Forholdet mellom PAH-metabolitter i galle og eksponering, både over gjellene og gjennom diett, har i torsk vist seg å være dose avhengig (Grung et al. 2009). Dette, i tillegg til metodens sensitivitet, gjør bestemmelse av PAH-metabolitter i galle til en velegnet biomarkør for eksponering for PAHer. Ettersom innholdet i galleblæren tømmes jevnlig vil konsentrasjoner

av PAH-metabolitter i gallen imidlertid kun representere eksponering den siste uken (van der Oost et al. 2003).

Cytokrom P450 1A (CYP1A) er en enzym-underfamilie involvert i biotransformasjon av en rekke eksogene forbindelser. CYP1A er involvert i fase 1 metabolisme, hvor eksogene forbindelser oksideres i den hensikt å øke forbindelsenes vannløselighet. Substrater for CYP1A inkluderer forbindelser som PAHer, PCBer og dioksiner (Whyte et al. 2000). Disse forbindelsene vil i tillegg indukere CYP1A ved at de binder til aryl-hydrokarbon (Ah) reseptoren i cytosol. Ved binding vil Ah reseptoren aktiveres hvorpå den translokteres til cellekjernen hvor den interagerer med et Ah reseptor-respons element hvilket initierer transkripsjon av CYP1A genet (Sarasquete og Segner 2000). Induksjon av CYP1A som respons på eksponering for organiske miljøgifter gjør CYP1A til en velegnet biomarkør. CYP1A induksjon kan måles som både mRNA mengde, CYP1A protein mengde og CYP1A aktivitet målt som 7-etoksyresorufin *O*-deetylase aktivitet (van der Oost et al. 2003). I denne studien ble bestemmelse av EROD aktivitet og CYP1A protein mengde benyttet. EROD aktivitet er ansett som en mer sensitiv markør, men flere forbindelser som i utgangspunktet inducerer CYP1A kan ved høye konsentrasjoner hemme EROD aktiviteten (Hahn et al. 1996). Denne hemmingen påvirker imidlertid ikke CYP1A konsentrasjonen (Hahn et al. 1996), slik at ved å benytte begge markørene oppnås et bedre bilde av eksponeringssituasjonen.

Mikronukleus (MN) dannes av kromosomfragmenter eller hele kromosomer som ikke har blitt inkludert i en av cellekjernene under anafasen i mitosen (Al-Sabti og Metcalfe 1995). Etter mitosen fremstår da kromosomet eller kromosomfragmentet som en ekstra kjerne i cytoplasma ved siden av cellekjernen. Dannelse av mikronukleus induseres av eksponering for genotoksiske forbindelser med enten klastogen effekt, som fører til brudd i kromosomer, eller aneugen effekt som inaktiverer spindelapparatet (Baršienė et al. 2012). Mikronukleus analysen kan utføres på celler fra en rekke vev som gjeller, finner, nyrer, lever og røde blodceller (Bolognesi og Hayashi 2011). Røde blodceller er mest brukt i analyser av mikronukleus i fisk (Bolognesi og Hayashi 2011), og ble også benyttet i dette studiet.

1.3 Hypoteser og mål

Målet med denne oppgaven var å kvantifisere eventuelle effekter av miljøgifter som polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH), polyklorinerte bifenyler (PCB), bly, pesticider som organofosfater og karbamater, og genotoksiske forbindelser på torsk i indre Oslofjord. For å kvantifisere effektene ble responsen av en rekke biomarkører, i tillegg til fysiologiske faktorer som vekst, kondisjon og vevsindekser, bestemt for torsk fra både indre og ytre Oslofjord. Torsk fra ytre Oslofjord ble antatt til å være relativt upåvirket av miljøgifter og ble brukt som referanse. I tillegg til forskjeller mellom områdene ble også potensielle kjønnsforskjeller innen hvert område undersøkt. Effekter av miljøgifter på torsk fra indre Oslofjord har blitt undersøkt i flere tidligere masteroppgaver (Holth 2004, Nerland 2011, Bergland 2012, Fredriksen 2013, Bratrud 2014, Erdahl 2014), og resultatene fra denne oppgaven vil sammenlignes med resultatene fra tidligere oppgaver for å vurdere eventuelle endringer over tid.

Det overordnede målet ble testet med følgende nullhypoteser:

H_0 : Det var ingen signifikant forskjell i vekst mellom fisk fra indre og ytre Oslofjord

H_0 : Det var ingen signifikant forskjell i K, GSI eller HSI mellom fisk fra indre og ytre Oslofjord, eller mellom kjønn innen hvert område.

H_0 : Det var ingen signifikant forskjell i konsentrasjon av PAH-metabolitter i galle mellom fiske fra indre og ytre Oslofjord, eller mellom kjønn innen hvert område.

H_0 : Det var ingen signifikant forskjell i AChE aktivitet i muskel mellom fisk fra indre og ytre Oslofjord, eller mellom kjønn innen hvert område.

H_0 : Det var ingen signifikant forskjell i ALA-D aktivitet i erythrocytter mellom fisk fra indre og ytre Oslofjord, eller mellom kjønn innen hvert område.

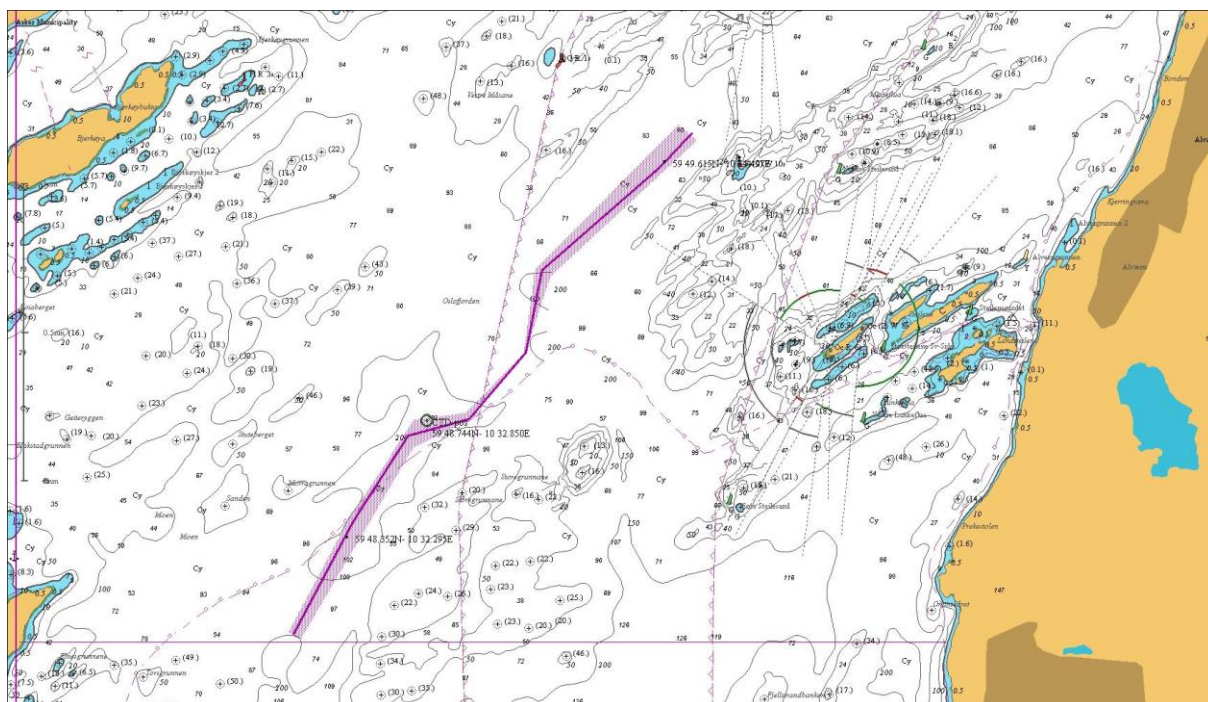
H_0 : Det var ingen signifikant forskjell i CYP1A konsentrasjon eller aktivitet i lever mellom fisk fra indre og ytre Oslofjord, eller mellom kjønn innen hvert område.

H_0 : Det var ingen signifikant forskjell i mikronukleus frekvens i mellom fisk fra indre og ytre Oslofjord, eller mellom kjønn innen hvert område.

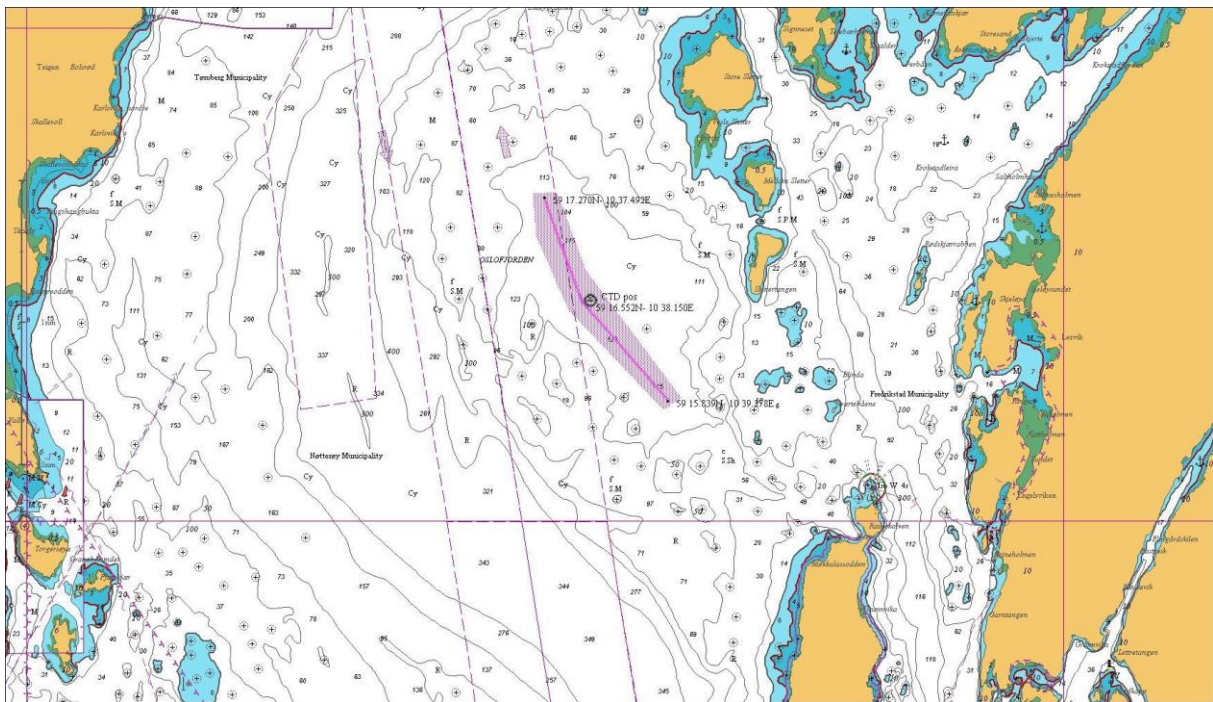
2 Materialer og metoder

2.1 Prøveinnsamling

Prøver ble samlet inn under et tokt med forskningsskipet R/R Trygve Brårud 17. til 20. November 2014. Ved tråling ble totalt 80 torsk fanget, 40 individer fra indre Oslofjord ved trålfeltet Midtmeie (figur 2.1) og 40 fra ytre Oslofjord ved trålfeltet Travbanen (figur 2.2). Torsk ble umiddelbart overført til kar med kontinuerlig vanngjennomstrømming.



Figur 2.1 Trålområdet i indre Oslofjord, Midtmeie.



Figur 2.2 Trålområdet i ytre Oslofjord, Travbanen.

Fisk av omtrentlig samme størrelse ble valgt ut og avlivet ved et slag til hodet, hvorpå lengde og vekt ble notert for hvert individ. Eventuelle skader og forekomst av parasitter ble notert.

Blod ble ekstrahert fra kaudalvenen med en sprøyte behandlet med heparin og overført til 1,5 mL eppendorfrør på is. Et volum på 150 μ L blod ble tatt ut, en dråpe av dette ble plassert på objektglass, og resten ble blandet med 50 μ L 4 % glutaraldehyd i PBS (145.5 mM NaCl, 6.0 mM Na_2HPO_4 , 4.0 mM KH_2PO_4 i dH_2O) for flow cytometri. Bloddråpen på objektglasset ble smurt ut til et tynt lag som fikk tørke i romtemperatur etterfulgt av lagring mørkt i en objektglassboks. Rør med blod og glutaraldehyd ble etter en time i romtemperatur lagret i kjøleskap. Det resterende volum av ubehandlet blod ble sentrifugert i en bordsentrifuge i 5 minutter, hvorpå plasma ble overført til kryorør med en pasteurpipette og plassert på flytende nitrogen for mulig videre analyse. Blodcellene ble plassert på flytende nitrogen i eppendorfrør, og lagret ved $-80\text{ }^\circ\text{C}$ på Universitet i Oslo.

Buken til fiskene ble åpnet med en saks og gallen ble ekstrahert med en sprøyte. Gallen ble så overført til eppendorfrør på is under folie for å beskytte den fra lys. Rørene ble plassert i kjøleskap om bord på forskningsskipet, og siden lagret ved $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

Leveren ble kuttet ut og vekt ble notert. To leverbiter på omtrent 1 gram ble skåret ut fra området rundt portalvenen, lagt i separate kryorør og fryst på flytende nitrogen. Etter hjemkomst til Universitet i Oslo ble prøvene lagret ved -80 °C

Individets kjønn ble bestemt ut fra gonadene, som så ble skåret ut og veid. Fiskens vekt uten innvoller ble så notert.

En muskelbit på omtrent 1 gram ble skåret ut fra ryggen ved ryggfinnen og plassert på kryorør og fryst i flytende nitrogen, og siden lagret ved -80 °C.

Kraniet på fiskene ble så skåret opp med en kniv, hvorpå otolittene ble fjernet og lagret mørkt i kryorør.

2.2 Aldersbestemmelse

Individer ble aldersbestemt ved å telle hyalinringer i fiskens otolitter som beskrevet av Williams og Bedford (1974).

Otolittene ble knekt lateralt og bruddflaten filt ned med fint sandpapir til den fikk en jevn overflate. Bruddflaten ble så brent forsiktig i en gassbrenner til den fikk en mørk brun farge hvilket fremhevet kontrasten mellom ringene. En dråpe glyserol ble så påført og otolitten ble plassert under et Leica MZ 8 (Leica) stereomikroskop med sidelys. Hyalinringene fremstod her som lysere, og kunne telles.

2.3 Kondisjon og vevsindekser

Fultons kondisjonsfaktor (K), hepatosomatisk indeks (HSI) og gonadosomatisk indeks (GSI) ble beregnet for hvert individ ved følgende formler:

$$K = 100 \frac{Vekt(g)}{Lengde(cm)^3}$$

$$HSI = 100 \frac{\text{Levervekt (g)}}{\text{Somatis kroppsvekt (g)}}$$

$$GSI = 100 \frac{\text{Gonadevekt (g)}}{\text{Somatis kroppsvekt (g)}}$$

Somatisk kroppsvekt angir fiskens vekt uten indre organer, mens vekt som brukt i Fultons kondisjonsfaktor innebærer individets totale vekt.

2.4 Opparbeiding av muskel

Muskelprøver ble satt på is umiddelbart etter de ble hentet fra fryser. På forhånd ble Precellysrør forberedt, hvor hvert rør ble tilsatt 8 stålkuler (2,8 mm) og satt på is. En muskelbit på omtrent 0,15 gram ble skåret ut og overført til precellysrørene. Iskald kaliumfosfatbuffer (0,1 M, pH 7,2) ble tilsatt rørene til et totalvolum på 1,5 mL.

Precellysrørene ble så plassert i en Precellys 24 (Bertin Technologies) homogenisator med en Cryolys (Bertin Technologies) kjøler tilkoblet. Prøvene ble homogenisert ved 4 °C og 6 000 rpm i 3 × 10 sekunder med 5 sekunders pauser. Homogenatet ble så overført til eppendorfrør og sentrifugert 5 minutter ved 5 000 × g med en Multifuge 3 S-R (Heraeus) sentrifuge.

Supernatanten ble deretter overført til nye eppendorfrør og fortynnet 10x i kaliumfosfatbuffer. Et volum på 50 µL ble tatt ut og lagret ved – 80 °C for proteinanalyse, og resten benyttet direkte til bestemmelse av enzymaktivitet til acetylkolinesterase.

2.5 Opparbeiding av blod

Prøver med røde blodceller ble tint på is, tilsatt 500 µL iskald fortynningsbuffer (0,1 M natriumfosfatbuffer pH 7,0 med 0,5 % (v/v) Triton X-100) og homogenisert med en håndholdt homogenisator med teflon-pistill i eppendorfrøret. Homogenatet ble sentrifugert 15 minutter ved 10 000 × g ved 4 °C i en Multifuge 3 S-R (Heraeus) sentrifuge hvorpå supernatanten ble overført til nytt eppenforfrør og fortynnet 3 ganger i fortynningsbuffer. Et

volum på 400 μL ble overført til nye eppendorfrør og umiddelbart analysert for δ -aminolevulinsyre dehydratase (ALA-D) aktivitet og ble resten fryst for proteinanalyse.

Blod ble ekstrahert fra regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) på samme måte som for torsk (se del 2.1: Prøveinnsamling), disse ble behandlet på samme måte som de øvrige prøvene, og ble benyttet som referanse i ALA-D analysen

2.6 Opparbeiding av lever

Homogenisering av lever ble utført etter metode beskrevet av Dignam (1990). Leverprøver ble plassert på is umiddelbart etter at de tatt opp fra $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ fryser. Prøvene ble veid, og en bit på mellom 0,3 og 0,5 gram ble overført til et Precellysrør på is med omtrent 20 keramiske kuler (1,4 mm). Til disse rørene ble det tilsatt kald homogeniserings buffer (0,1 M natriumfosfat buffer (pH 7,8) med 0,15 M KCl, 1 mM DTT og 5 % (v/v) glyserol) til et totalvolum på 1 mL. Rørene ble så plassert i en Precellys 24 (Bertin Technologies) homogenisator med en Cryolys (Bertin Technologies) kjøler. Homogenisatoren ble kjølt ned med flytende nitrogen og når temperaturen var under $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ble prøvene homogenisert 3×10 sekunder med 5 sekunders pauser ved 6 000 rpm. Homogenatet ble deretter overført til 1,5 mL eppendorfrør og sentrifugert ved $10\,000 \times g$ ved $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 30 minutter i en Multifuge 3 S-R (Heraeus) sentrifuge. Supernatanten ble overført til sentrifugerør, og sentrifugert ved $100\,000 \times g$ ved $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 60 minutter i en Sorvall mTX 150 (Thermo Scientific) ultrasentrifuge i den hensikt å separere den mikrosomale proteinfraksjonen fra cytosol. Etter fullført sentrifugering ble supernatanten, som inneholdt cytosol, overført til 1,5 mL eppendorfrør og lagret ved $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pelleten ble tilsatt 0,5 mL mikrosomal buffer (0,1 M natriumfosfat buffer (pH 7,8) med 0,15 M KCl, 1 mM EDTA og 20 % glyserol) og overført til eppendorfrør hvor pelleten ble homogenisert med en håndholdt homogenisator med teflon-pistill. Homogenatet ble deretter overført til eppendorfrør for videre analyse; 200 μL til EROD, 50 μL til ELISA og 50 μL til protein-analyse, og lagret ved $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.7 Proteinanalyse

Analyse av total mengde protein ble utført etter metode beskrevet av Lowry et al. (1951). Dette ble utført på homogenisert muskel, røde blodceller og mikrosomale leverprøver i den hensikt å standardisere biomarkør-respons til proteinmengde.

Bovint serum albumin ble benyttet som standard ved konsentrasjoner på 1400 µg/mL, 700 µg/mL, 350 µg/mL og 175 µg/mL. Fortynning av bovin serum albumin ble gjort med en 0,1 M Tris buffer (pH 8,0 ved 4 °C). Alle prøvene ble tint i romtemperatur og fortynnet i Tris buffer. Muskel og mikrosomale leverprøver ble fortynnet 20 ganger, mens blodprøver ble behandlet på en egen måte ettersom det hadde oppstått en felling i dem. Bunnfallet ble først brutt ned til et fint pulver ved 10 minutter i et Sonorex (Bandelin) ultralyd vannbad. Løsningen ble så blandet godt og 50 µL ble tatt ut, blandet med 200 µL 1 M NaOH og inkubert i en AccuBlock (Labnet) varmeblokk ved 60 °C i 30 minutter. Dette ble nøytralisert ved tilsetning av 300 µL 1,67 M HCl og fortynnet 3 ganger i Tris buffer, hvilket totalt utgjorde en 33 ganger fortynning for blod.

Til en 96-brønns mikrotiterplate ble det tilsatt 10 µL prøve, standard eller blank (Tris buffer) i triplikat. For hver plate ble det inkludert en referanseprøve, bestående av overskudd fra prøvene som på forhånd var blandet sammen og fryst. Med en multipipette ble først 25 µL reagens A (alkaisk kobber tartrat løsning), så 200 µL reagens B (folins reagens) tilsatt hver brønn. Platen ble så inkubert mørkt i 15 minutter før absorbans ble avlest ved 750 nm i en Synergy MX (BioTek) plateleser. Proteinkonsentrasjon ble så kalkulert ut fra lineærregresjon av standardprøvene.

2.8 Acetylkolinesterase (AChE) aktivitet i muskel

Enzymaktiviteten til acetylkolinesterase ble bestemt kolorimetrisk ved å la enzymet omgjøre tilsatt dithiobisnitrobenzoyl (DTNB) til 5-thio-2-nitrobenzoyl på en mikrotiterplate. Økning i konsentrasjon av sluttprodukt ble bestemt ut i fra økning i absorbans ved 414 nm over et tidsintervall på 10 minutter.

Til brønnene i en 96-brønns mikrotiterplate ble det tilsatt 50 µL fortynnet muskelhomogenat på is (fra del 2.4) i fire replikater. En referanseprøve bestående av overskudd fra prøvene og

en blank (0,1 M kaliumfosfatbuffer, pH 7,2) ble tilsatt de øvrige brønnene i fire replikater. Med en multipipette ble 250 μ L AChE assay reagent (0,1 M kaliumfosfatbuffer, pH 7,2 med 0,48 mM acetylthiokolinjodid, 0,32 mM dithiobisnitrobenzoesyre og 0,57 mM natrium bikarbonat) tilsatt samtlige brønner. Mikrotiterplaten ble så plassert i en Synergy MX (BioTek) plateleser i 5 min ved 25 °C, før absorbans ved 414 nm ble målt hvert 2 minutt i 10 minutter. Enzymaktivitet ble beregnet ut fra økning i absorbans per minutt og konvertert til nmol/min ved Lambert-Beers lov, hvor ekstinksjonskoeffisienten til 5-thio-2-nitrobenzoesyre ved 414 nm ble satt til $1,36 \times 10^4$ ml/mmol/cm. Resultatet ble så standardisert til proteinkonsentrasjon og uttrykt som nmol 5-thio-2-nitrobenzoesyre/min/mg protein.

I tillegg ble det utført en sammenligning for muskelhomogenisering mellom Precellys 24 (Bertin Technologies) og PRO 200 Ultra-Turrax (PRO Scientific). Fra 10 muskelprøver ble det tatt ut to muskelbiter, en ble homogenisert med Precellys 24 (Bertin Technologies) som forklart ovenfor, den andre leverbiten ble homogenisert 2×20 sekunder med en PRO 200 Ultra-Turrax (PRO Scientific) med en 5×75 mm generator. Homogenisatoren ble mellom hver prøve vasket en gang i etanol og to ganger i destillert vann. Begge prøvene ble så behandlet videre som forklart ovenfor (se vedlegg).

2.9 δ -aminolevulinsyre dehydratase (ALA-D) aktivitet i erythrocytter

For å bestemme aktivitet av δ -aminolevulinsyre dehydratase (ALA-D) ble det benyttet en metode først beskrevet av Hodson (1976) og siden modifisert til en kvikksølvkloridfri versjon av Nakagawa et al. (1995), Bratrud (2014) og Erdahl (2014). Aktiviteten ble bestemt ved å la enzymet kondensere to molekyler aminolevulinsyre (ALA) til et molekyl porfobilinogen (PBG) over en periode på to timer, hvorpå mengde PBG bestemmes ved absorbans.

En standardrekke ble fremstilt ved å fortynne porfobilinogen i fortynningsbuffer (0,1 M natriumfosfatbuffer (pH 7,0) med 0,5 % (v/v) Triton X-100) til følgende konsentrasjoner; 40 μ g/mL, 32 μ g/mL, 16 μ g/mL, 8 μ g/mL, 4 μ g/mL og 2 μ g/mL.

Fortynnete røde blodceller på is (fra del 2.5) ble pipettert ut i et volum på 50 μ L til seks eppendorfrør på is. Til tre av rørene ble det tilsatt 200 μ L kald fortynningsbuffer (0,1 M

natriumfosfatbuffer (pH 7,0) med 0,5 % (v/v) Triton X-100), og til de resterende tre rørene ble det tilsatt 200 µL ALA-reagent (4 mM δ-aminolevulinsyre). Alle rør ble blandet godt og inkubert i 2 timer ved 25 °C i varmeskap (Termaks). Ved fullført inkubering ble 300 µL fellingsbuffer (10 % trikloroeddiksyre i dH₂O) tilsatt og rørene ble blandet godt. Etter 5 minutter i romtemperatur ble prøvene sentrifugert ved 2 500 × g i en 5424 Microcentrifuge (Eppendorf) sentrifuge. Supernatanten ble deretter overført til nye eppendorfrør og blandet godt. Referanseprøver fra regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) ble behandlet etter samme prosedyre.

Til en 96 brønns mikrotiterplate ble det overført et volum på 150 µL prøve, standard, referanse eller blank (fortynningsbuffer) i duplikater. Deretter ble det med en multipipette tilført 150 µL modifisert Ehrlichs reagent (Eddiksyre med 2,1 M perklorisyre, 5,5 % (v/v) dH₂O og 18,2 mg/mL p-dimetylaminoaldehyd). Platen ble ristet forsiktig og inkubert 15 minutter før avlesing av absorbans ved 550 nm i en Synergy MX (BioTek) plateleser. ALA-D aktiviteten ble kalkulert ut fra lineærregresjon av standardprøvene, standardisert til proteinmengde og uttrykt som ng PBG/min/mg protein.

2.10 PAH-metabolitter i galle

PAH-metabolitter i galle ble analysert etter metode beskrevet av Krahn et al. (1992) og siden videreutviklet av Grung et al. (2009). Prøvene ble opparbeidet i så dempet belysning som mulig for å unngå lysnedbrytning av fotosensitive polysykliske aromatiske hydrokarboner.

Galleprøvene ble tint på is tildekket av folie. Til et 0,5 mL eppendorfrør ble det pipettert 50 µL dH₂O, røret ble så plassert på en vekt som ble nullstilt. Til dette røret ble det så tilsatt 20 µL galle hvorpå vekt ble notert, og vekten igjen nullstilt. Det ble deretter tilsatt 10 µL internstandard (16 µg/mL trifenyylamin i 80 % isopropanol med 1 % askorbinsyre), vekt ble notert og 20 µL β-glucuronidase/aryl sulfatase ble tilsatt. Alle prøver samt enzym (β-glucuronidase/aryl sulfatase), intern standard og dH₂O ble holdt på is under innveiling. I tillegg til galleprøvene ble det inkludert fire blanke prøver (dH₂O) og fire standardprøver fra NIVA (Norsk Institutt for Vannforskning), disse ble behandlet som de øvrige prøvene. Prøver ble så satt til inkubering (hydrolyse) i en time ved 37 °C i varmeskap (Termaks). Etter fullført inkubering ble den enzymatiske reaksjonen stoppet ved tilsetning av 200 µL metanol og

prøvene avkjølt i 10 minutter ved romtemperatur. Prøvene ble så sentrifugert ved $4\,000 \times g$ i 10 minutter i en 5424 Microcentrifuge (Eppendorf) sentrifuge hvorpå supernatanten ble overført til HPLC rør og lagret ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ frem til analyse.

HPLC (high performance liquid chromatography) analysen ble utført ved Norsk Institutt for Vannforskning (NIVA) av Merete Grung. Det ble benyttet en Waters 2695 separasjonsmodul med en Waters 2475 fluorescens detektor. Separasjonsmodulen var utstyrt med en Waters PAH C_{18} (4,6 x 250 mm, med partikkelstørrelse $5\ \mu\text{m}$) kolonne. Mobilfasegradienten var 40 % acetonitril i vann som gradvis ble økt til 100 % acetonitril over et intervall på 30 minutter, med en flowrate på 1 mL/min. Kolonnetemperaturen var $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ og for hver prøve ble det injisert et volum på $25\ \mu\text{L}$ opparbeidet galle. PAH-metabolittene ble detektert fluoremetrisk ved følgende bølgelengde (eksitasjon/emisjon); 1-OH-fenantren ved 251 nm/364 nm etter 8,6 minutter, 1-OH-pyren ved 246 nm/384 nm etter 13,5 minutter, 3-OH-benzo[a]pyren ved 380 nm/430 nm etter 22,5 minutter, og internstandardens trifenylamin ved 300 nm/360 nm. Metabolittenes og internstandardens respektive topper ble integrert fra kromatogrammene og konsentrasjonen til PAH-metabolittene ble så kalkulert på bakgrunn av internstandardens kjente konsentrasjon. PAH-metabolittenes konsentrasjon ble standardisert med gallevekt og oppgitt som ng metabolitt/g galle.

2.11 7-etoksyresorufin O-deetylase (EROD) aktivitet i lever

Bestemmelse av EROD aktivitet i mikrosomale leverproteiner ble utført etter metode utviklet av Burke og Mayer (1974) og modifisert for plateleser av Eggens og Galgani (1992). Hele analysen ble utført uten direkte lys og lysstoffrør ettersom både 7-etoksyresorufin og resorufin er lyssensitive. Aktiviteten ble bestemt ved å la CYP1A konvertere 7-etoksyresorufin til resorufin, som kan bestemmes ved fluorescens.

Leverprøver ble tint på is og fortynnet til en total proteinkonsentrasjon på 1 mg/mL med iskald kalium-fosfatbuffer (0,1 M, pH 8,0). Resorufin standard (resorufin Na-salt, 1 mM i DMSO) ble fortynnet først 100x i fosfatbuffer, og så videre til $0,64\ \mu\text{M}$ i reaksjonsblanding ($2,98\ \mu\text{M}$ 7-etoksyresorufin i kalium-fosfatbuffer). Denne standarden ble videre fortynnet i en 2x fortynningsrekke med reaksjonsblanding for å oppnå standarder med følgende

konsentrasjon; 0,01 μM , 0,02 μM , 0,04 μM , 0,08 μM , 0,16 μM , 0,32 μM og 0,64 μM . Reaksjonsblanding ble benyttet som 0 μM standard.

Til en sort 96-brønns mikrotiterplate det ble det tilført 275 μL resorufin-standarder i duplikater. Fortynnete prøver ble tilsatt i seks replikater på 50 μM , til tre av disse replikatene ble det tilsatt 10 μL 0,32 μM resorufin standard for å korrigere for quench. Kalium-fosfatbuffer ble benyttet som blank, og tilsatt til 8 brønner, 50 μL i hver brønn. Til brønner med prøver og blank ble det tilsatt først 200 μL reaksjonsblanding og deretter 25 μL fortynnet NADPH (2,4 mM i kalium-fosfatbuffer, tillaget rett før bruk) med multipipette. Brønnenes fluorescens ble så avlest 8 ganger med 30 sekunders intervaller med eksitasjon ved 530 nm og emisjon ved 590 nm i en Synergy MX (BioTek) plateleser. Enzymaktivitet ble kalkulert fra lineærregresjon av standardrekken, standardisert til proteinkonsentrasjon og uttrykt som pmol resorufin/min/mg protein.

2.12 CYP1A konsentrasjon i lever

Relativ konsentrasjon cytokrom P450 1A i den mikrosomale leverfraksjonen ble bestemt semi-kvantitativt ved ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), i hovedsak som beskrevet av Goksøyr (1991).

Mikrosomale proteiner ble tint på is og fortynnet til 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ med kald coatingbuffer (0,05 M karbonat-bikarbonat buffer). Til en 96-brønns mikrotiterplate (Nunc MaxiSorp) ble prøver og en referanse (bestående av blandet overskudd fra prøvene) tilsatt i fire replikater på 100 μL . Til en kolonne (8 brønner) ble det tilsatt kun coatingbuffer som blank. Platen ble dekket med tape og inkubert ved 4 °C til neste dag (17 timer).

Neste dag ble platene vasket 3 ganger (2×30 sekunder + 1 minutt) med TTBS (20 mM Tris-buffer med pH 8,5, med 0,5 M NaCl og 0,05 % Tween-20) i en ScanWasher 300 (Skatron). Til alle brønner ble de så tilsatt 300 μL TTBS med 1 % (w/w) BSA, hvorpå platene ble inkubert 35 minutter. Platene ble så vasket igjen 3 ganger med TTBS. Primærantistoff (kanin anti-fisk cytokrom P450-1A antistoff) ble fortynnet 1000 ganger i en antistoffbuffer (TTBS med 0,1 % (w/w) BSA) og tilsatt i et volum på 100 μL til alle brønner med prøver samt til 4 av brønnene med kun coatingbuffer. Til de resterende 4 brønnene uten prøve ble det tilsatt

100 μL antistoffbuffer. Platen ble så dekket med teip og inkubert ved 4 °C til neste dag (21 timer).

Etter inkubering ble platene vasket 3 ganger med TTBS. Sekundærantistoff (geit anti-kanin IgG konjugert med HRP (GAR-HRP)) ble fortynnet 3000 ganger i antistoffbuffer og et volum på 100 μL ble overført til alle brønner. Platene ble så dekket med teip og inkubert ved 4 °C i 7 timer. Ved fullført inkubering ble platene vasket 5 ganger (4×30 sekunder + 1 minutt) med TTBS, og 100 μL romtemperert TMB pluss ble så tilsatt alle brønner. Platene ble plassert mørkt, og etter 22 minutter ble 50 μL 1,5 M H_2SO_4 tilsatt for å stoppe fargeutviklingen. Absorbans ved 450 nm ble så avmålt i en Synergy MX (BioTek) plateleser. På grunn av variasjon i blankprøver i de forskjellige platene ble blankverdien i en plate trukket fra alle, hvorpå platene ble standardisert slik at alle referanseprøvene fikk lik verdi.

2.13 Mikronukleus i erythrocytter

Objektglass med blod ble først skylt i PBS (145,5 mM NaCl, 6,0 mM Na_2HPO_4 , 4,0 mM KH_2PO_4 i dH_2O) etterfulgt av 5 minutter farging nedsenket i 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bisbenzimid H 33258 før de avslutningsvis ble skylt i destillert vann. En dråpe glyserol-McIlvaine buffer (McIlvaine buffer pH 7 (9,8 mM sitronsyre, 81,5 mM Na_2HPO_4 i dH_2O) blandet 1:1 med glyserol) ble plassert på objektglasset, og et dekkglass ble lagt forsiktig over. Prøvene ble holdt mørkt under farging og ved oppbevaring frem til analyse.

Objektglassene ble analysert under et Eclipse LV100ND (Nikon) fluorescens mikroskop med en pE-300 (CoolLED) lyskilde ved 800x forstørring. For hver prøve ble minst 2000 celler med intakt cellemembran telt. Mikronukleus ble identifisert etter følgende kriterier:

- Sfærisk cytoplasmisk legeme med distinkt omriss.
- Diameter mindre enn en tredjedel av cellekjernen.
- Lik farge og tekstur som cellekjernen.
- Ingen direkte kontakt med cellekjernen.

Resultat ble oppgitt som mikronukleus frekvens, antall mikronukleus per antall celler telt.

2.14 Statistikk

Alle statistiske analyser og grafiske fremstillinger ble utført i R versjon 3.2.1 (R Core Team 2015), med pakkene "car" for å utføre Levenes test og "ggbiplot" for å fremstille resultatet av PCA som et biplot. For å teste om ANOVA kunne benyttes ble data testet for normalfordeling og homogen varians (Field et al. 2012). Verdiene for hver variabel ble gruppert etter område og kjønn til fire grupper; hanner indre, hanner ytre, hunner indre og hunner ytre. Levenes test (Levene 1960) ble benyttet for å teste for homogen varians mellom gruppene og Shapiro-Wilk test (Shapiro og Wilk 1965) ble benyttet for å teste for normalfordeling i hver gruppe.

Variabler som oppfylte disse kravene (ELISA og ALA-D) ble analysert med en toveis ANOVA. Variabler som ikke oppfylte disse kravene ble \log_{10} transformert og testet igjen. De variabler som nå oppfylte krav om normalfordeling og homogen varians (1-OH-fenantren) ble analysert med toveis ANOVA benyttet på \log_{10} transformert data. Dersom det med toveis ANOVA ble funnet signifikant forskjell mellom både område og kjønn ble analysen ettertestet med Tukeys HSD post hoc test (Tukey 1949) for å undersøke hvilke grupper som var forskjellig. De variabler som ikke oppfylte krav til ANOVA (K, GSI, HSI, 1-OH-pyren, AChE, EROD, samt lengde og vekt for 2 og 3-åringer) ble analysert med den ikke-parametriske Wilcoxon rank-sum test (Wilcoxon 1945). I de tilfeller hvor Wilcoxon rank-sum test ble benyttet ble kjønnene først testet mot hverandre innen hvert område, og dersom det ikke ble funnet signifikante forskjeller mellom kjønnene ble de gruppert sammen og områdene ble testet mot hverandre. Dersom det ble funnet signifikante forskjeller mellom kjønn ble hanner fra indre Oslofjord testet mot hanner fra ytre, og hunner fra indre testet mot hunner fra ytre Oslofjord. Ved alle analyser ble det benyttet signifikansnivå, α , på 0,05.

Mikronukleus og alder ble testet med Pearsons χ^2 -kvadrat test (Pearson 1900). For mikronukleus ble det benyttet en binær variabel som omtalte hvorvidt prøven inneholdt mikronukleus eller ikke.

En PCA (principal component analysis) ble utført med K, GSI, HSI, AChE, ALA-D, 1-OH-fenantren, 1-OH-pyren, EROD, ELISA og MN for å undersøke sammenhenger mellom disse variablene.

3 Resultater

3.1 Alder, lengde og vekt

Torsk fanget fra indre Oslofjord var signifikant eldre enn torsk fanget fra ytre Oslofjord (Pearsons kji-kvadrat test, $p < 0,0001$) (tabell 3.1), det var derimot ingen signifikant aldersforskjell mellom hunn- og hanntorsk innen hvert område (Pearsons kji-kvadrat test, $p = 0,4$).

Tabell 3.1 Alder samt gjennomsnittsvekt og gjennomsnittslengde på torsk for hver aldersgruppe fra indre og ytre Oslofjord.

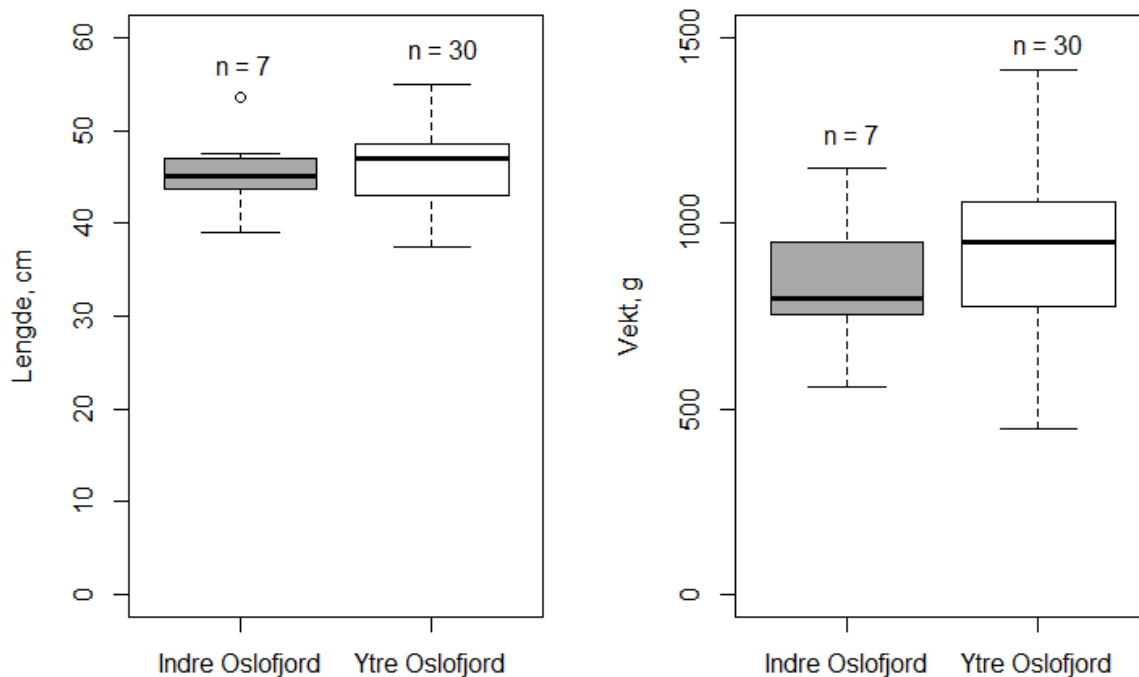
Alder	Indre Oslofjord			Ytre Oslofjord		
	Antall	Gjennomsnittlig lengde, cm	Gjennomsnittlig vekt, gram	Antall	Gjennomsnittlig lengde, cm	Gjennomsnittlig vekt, gram
1	0			3	46,8	764,3
2	7	45,6	844,1	30	46,2	923,3
3	22	44,4	837,5	7	47,0	995,4
4	10	45,5	883,2	0		
5	1	44,0	784,0	0		

Det ble innsamlet 21 hunntorsk og 19 hanntorsk fra både indre og ytre Oslofjord

Lengde og vekt ble sammenliknet kun for aldersgruppene 2 og 3 år, ettersom det ble fanget fisk fra aldersgruppen 1 år kun i ytre Oslofjord og fra aldersgruppene 4 og 5 år kun i indre Oslofjord.

For torsk i aldersgruppen 2 år ble det ikke funnet signifikant forskjell i lengde mellom hunn- og hanntorsk verken i indre Oslofjord (Wilcoxon rank-sum test, $p = 0,9$) eller i ytre Oslofjord (Wilcoxon rank-sum test, $p = 0,7$). Det ble ikke funnet signifikant forskjell i lengde mellom områdene (Wilcoxon rank-sum test, $p = 0,6$).

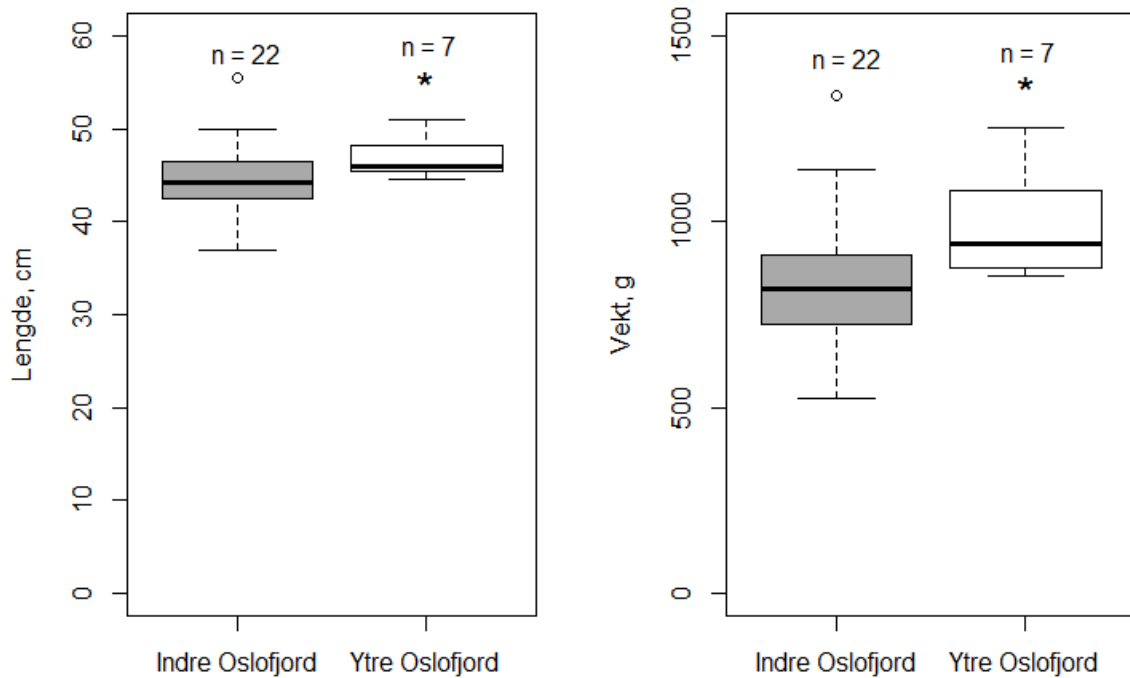
Det ble ikke funnet signifikant forskjell i vekt mellom hunn- og hanntorsk verken i indre Oslofjord (Wilcoxon rank-sum test, $p = 1,00$) eller i ytre Oslofjord (Wilcoxon rank-sum test, $p = 0,6$). Det ble ikke funnet signifikant forskjell i vekt mellom områdene (Wilcoxon rank-sum test, $p = 0,3$) for denne aldersgruppen (figur 3.1).



Figur 3.1 Lengde og vekt oppgitt som henholdsvis centimeter og gram for torsk i aldersgruppen 2 år fra indre og ytre Oslofjord, presentert som boxplot med median, kvartiler, minimum og maksimum verdier innenfor $1,5 \times$ interkvartil området, med verdier som faller utenfor $1,5 \times$ interkvartil området presentert som sirkler.

For aldersgruppen 3 år var det ingen signifikant forskjell i lengde mellom hunn- og hanntorsk, verken i indre Oslofjord (Wilcoxon rank-sum test, $p=0,6$) eller i ytre Oslofjord (Wilcoxon rank-sum test, $p=0,2$). Torsk innsamlet fra ytre Oslofjord var imidlertid signifikant lengre enn torsk fra indre Oslofjord (Wilcoxon rank-sum test, $p=0,04$).

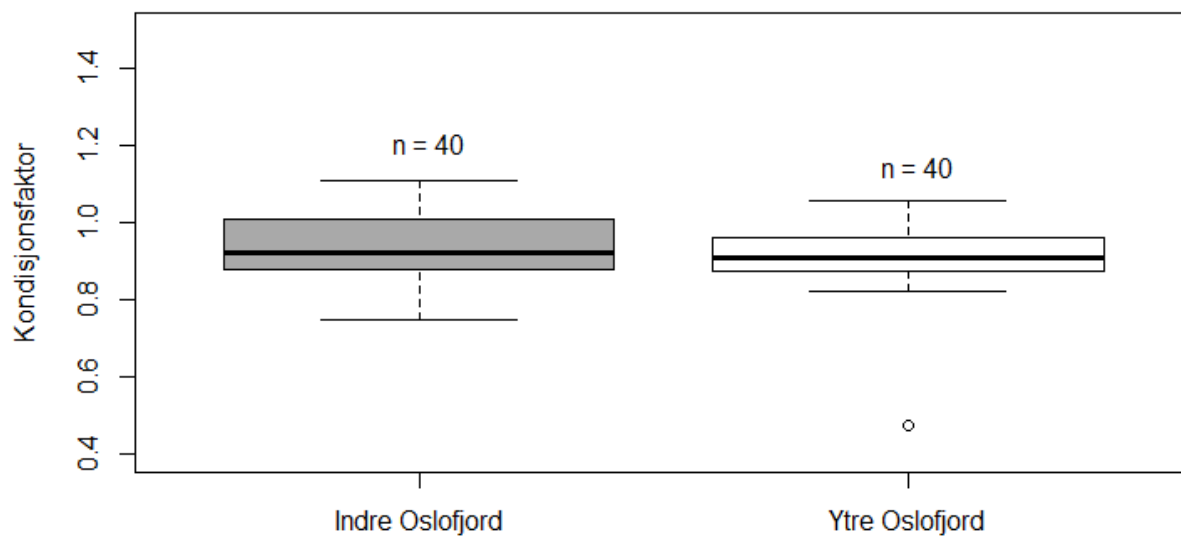
For vekt ble det ble ikke funnet signifikant forskjell mellom hunn- og hanntorsk verken i indre Oslofjord (Wilcoxon rank-sum test, $p=0,6$) eller i ytre Oslofjord (Wilcoxon rank-sum test, $p=0,4$). Torsk fra ytre Oslofjord var derimot signifikant tyngre enn torsk fra indre Oslofjord (Wilcoxon rank-sum test, $p=0,03$) (figur 3.2) for denne aldersgruppen.



Figur 3.2 Lengde og vekt oppgitt som henholdsvis centimeter og gram for torsk i aldersgruppen 3 år fra indre og ytre Oslofjord, presentert som boxplot med median, kvartiler, minimum og maksimum verdier innenfor $1,5 \times$ interkvartil området, med verdier som faller utenfor $1,5 \times$ interkvartil området presentert som sirkler. Stjerne (*) indikerer signifikant høyere verdi innen et område.

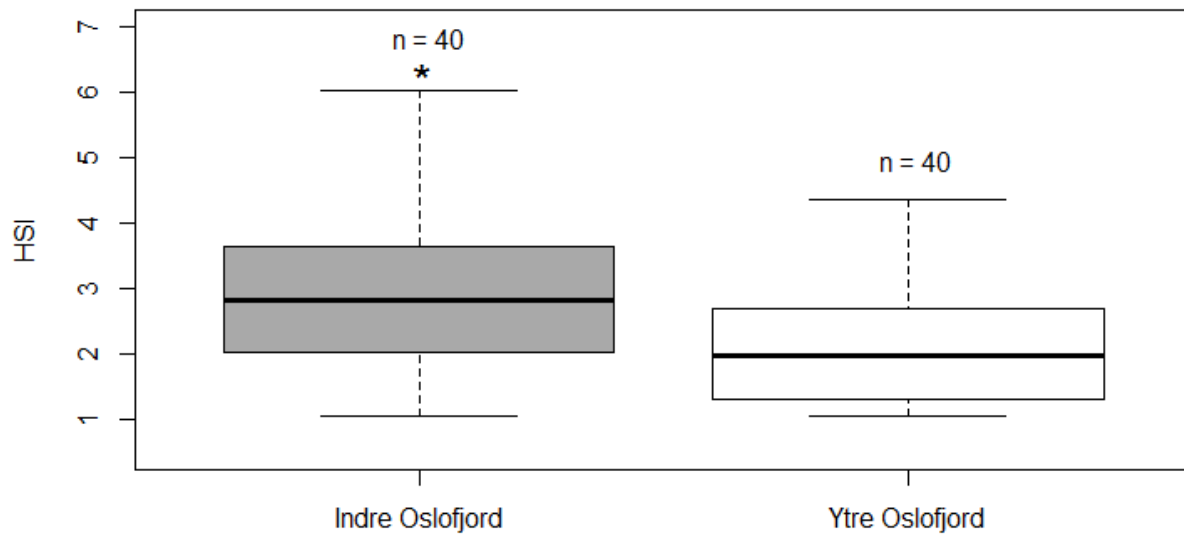
3.2 Kondisjon og vevsindekser

Det ble ikke funnet signifikant forskjell i Fultons kondisjonsfaktor, K, mellom hunn- og hanntorsk verken i indre Oslofjord (Wilcoxon rank-sum test, $p=0,8$) eller i ytre Oslofjord (Wilcoxon rank-sum test, $p=0,2$). Det ble ikke funnet signifikant forskjell i kondisjon mellom indre Oslofjord og ytre Oslofjord (Wilcoxon rank-sum test, $p=0,4$) (figur 3.3).



Figur 3.3 Fultons kondisjonsfaktor for torsk fra indre og ytre Oslofjord, presentert som boxplot med median, kvartiler, minimum og maksimum verdier innenfor $1,5 \times$ interkvartil området, med verdier som faller utenfor $1,5 \times$ interkvartil området presentert som sirkler.

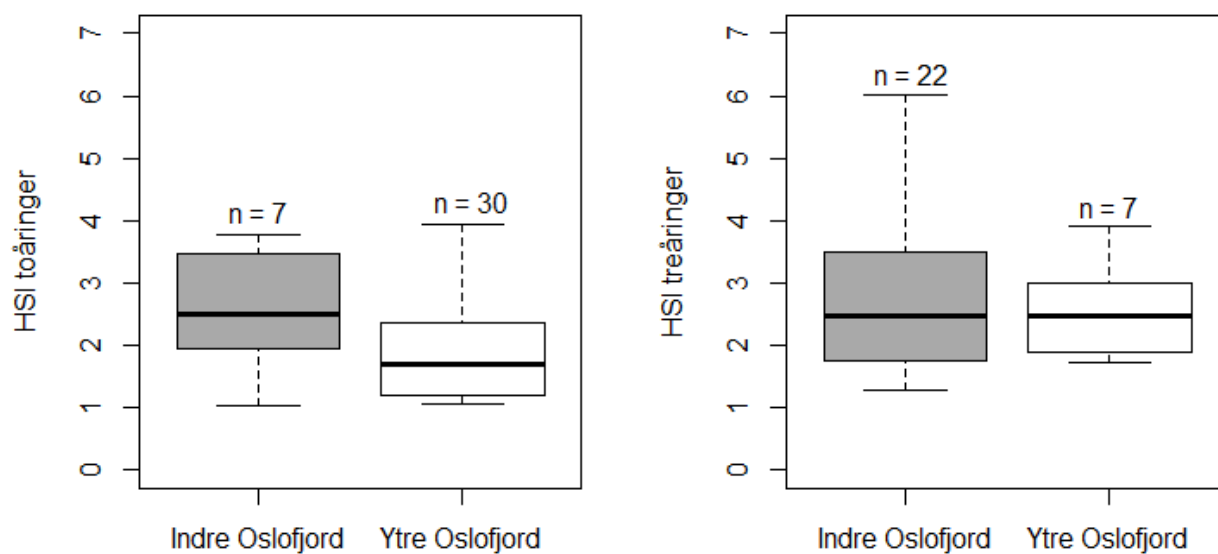
For hepatosomatisk indeks (HSI) ble det ikke funnet signifikante forskjeller mellom hunn- og hanntorsk verken i indre Oslofjord (Wilcoxon rank-sum test, $p=0,7$) eller i ytre Oslofjord (Wilcoxon rank-sum test, $p=0,1$). Det ble derimot funnet signifikant høyere HSI i indre Oslofjord enn i ytre Oslofjord (Wilcoxon rank-sum test, $p=0,002$) (figur 3.4).



Figur 3.4 Hepatosomatisk indeks for torsk fra indre og ytre Oslofjord, presentert som boxplot med median, kvartiler, minimum og maksimum verdier. Stjerne (*) indikerer signifikant høyere verdi innen et område.

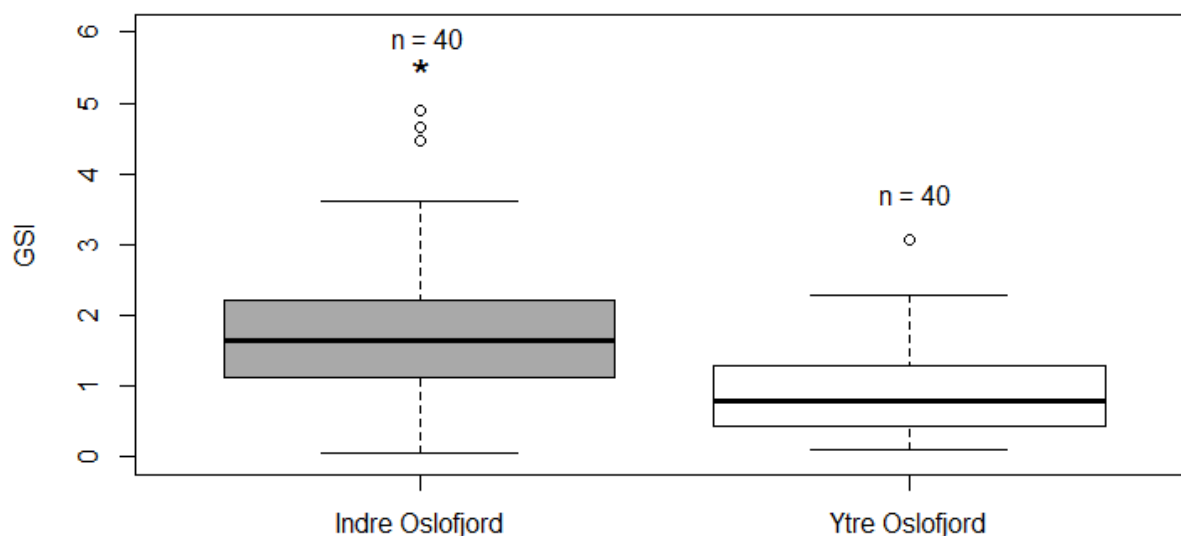
For å undersøke om forskjellene i HSI skyldtes aldersforskjeller ble det utført en separat undersøkelse for torsk i aldersgruppene 2 og 3 år. For torsk i aldersgruppen 2 år ble det ikke funnet signifikante forskjeller mellom hunn- og hanntorsk verken i indre Oslofjord (Wilcoxon rank-sum test, $p=0,4$) eller i ytre Oslofjord (Wilcoxon rank-sum test, $p=0,1$). Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i HSI mellom områdene (Wilcoxon rank-sum test, $p=0,2$) i aldersgruppen 2 år.

For torsk i aldersgruppen 3 år ble det ikke funnet signifikant forskjell mellom hunn- og hanntorsk i indre Oslofjord (Wilcoxon rank-sum test, $p=0,9$) eller i ytre Oslofjord (Wilcoxon rank-sum test, $p=0,9$). Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i HSI mellom områdene (Wilcoxon rank-sum test, $p=1,00$)(figur 3.5) i aldersgruppen 3 år.



Figur 3.5 Hepatosomatisk indeks for torsk i årsklassene 2 og 3 år fra indre og ytre Oslofjord, presentert som boxplot med median, kvartiler, minimum og maksimum verdier.

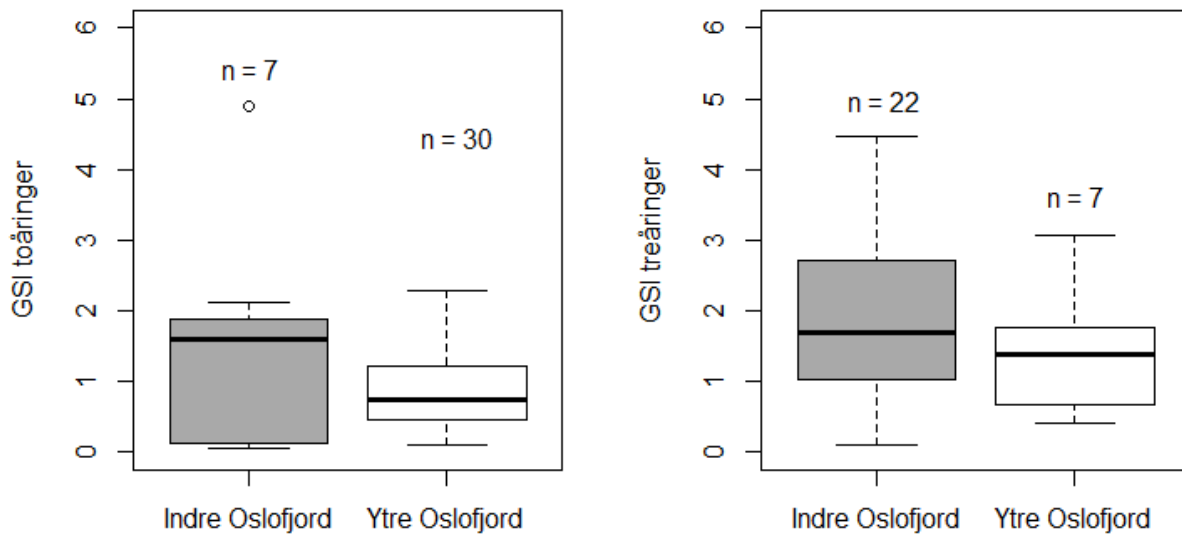
Det ble ikke funnet signifikant forskjell i gonadosomatisk indeks (GSI) mellom hunn- og hanntorsk i verken indre Oslofjord (Wilcoxon rank-sum test, $p=0,4$) eller ytre Oslofjord (Wilcoxon rank-sum test, $p=0,6$). Mellom områdene ble det funnet signifikant forskjell i GSI (Wilcoxon rank-sum test, $p=0,0009$), med høyere verdier i indre Oslofjord (figur 3.6).



Figur 3.6 Gonadosomatisk indeks for torsk fra indre og ytre Oslofjord, presentert som boxplot med median, kvartiler, minimum og maksimum verdier innenfor $1,5 \times$ interkvartil området, med verdier som faller utenfor $1,5 \times$ interkvartil området presentert som sirkler. Stjerne (*) indikerer signifikant høyere verdi innen et område.

For å undersøke om forskjellene i GSI mellom områdene stammet fra aldersforskjellen, ble tilsvarende som for HSI, aldersgruppene 2 og 3 år undersøkt separat. For torsk i aldersgruppen 2 år ble det ikke funnet signifikant forskjell mellom hunn- og hanntorsk verken i indre Oslofjord (Wilcoxon rank-sum test, $p=0,4$), eller i ytre Oslofjord (Wilcoxon rank-sum test, $p=0,7$). Det ble ikke funnet signifikant forskjell i GSI mellom områdene (Wilcoxon rank-sum test, $p=0,7$) for torsk i aldersgruppen 2 år.

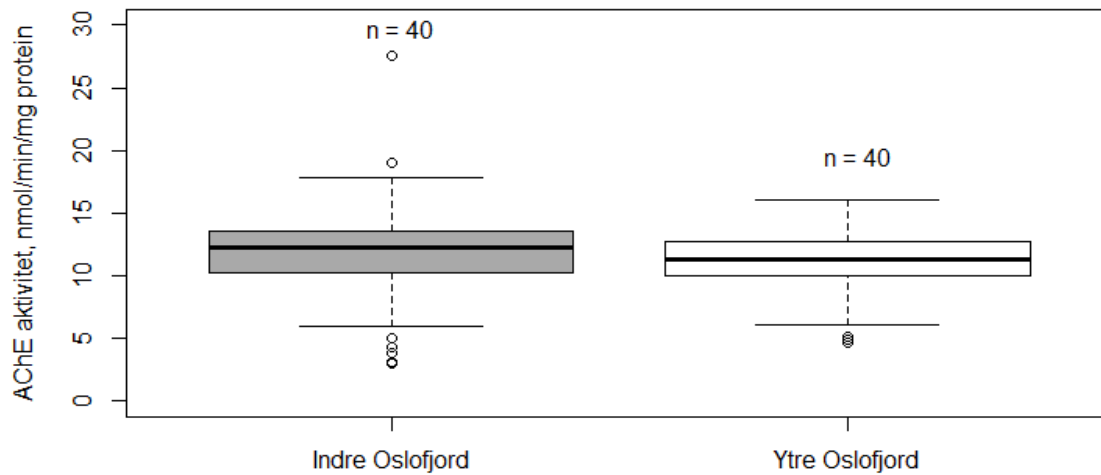
Tilsvarende ble det for treåringer ikke funnet signifikant forskjell mellom hunn- og hanntorsk verken i indre Oslofjord (Wilcoxon rank-sum test, $p=0,8$), eller i ytre Oslofjord (Wilcoxon rank-sum test, $p=0,6$). Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i GSI mellom områdene (Wilcoxon rank-sum test, $p=0,3$) (figur 3.7) for torsk i aldersgruppen 3 år.



Figur 3.7 Gonadosomatisk indeks for torsk i årsklassene 2 og 3 år fra indre og ytre Oslofjord, presentert som boxplot med median, kvartiler, minimum og maksimum verdier innenfor $1,5 \times$ interkvartil området, med verdier som faller utenfor $1,5 \times$ interkvartil området presentert som sirkler.

3.3 Acetylkolinesterase (AChE) aktivitet i muskel

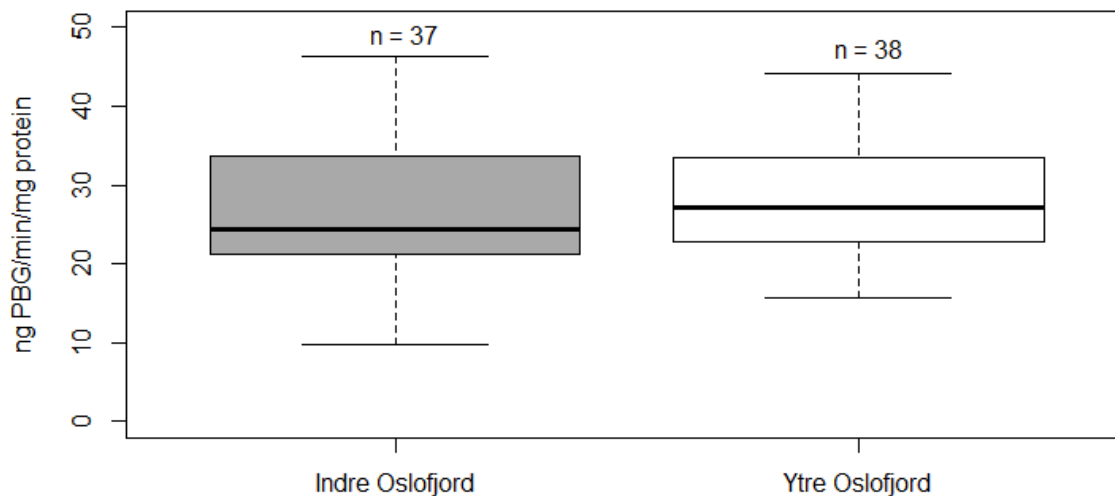
Det ble ikke funnet signifikant forskjell i acetylkolinesterase aktivitet mellom hunn- og hanntorsk verken i indre Oslofjord (Wilcoxon, $p=0,1$) eller i ytre Oslofjord (Wilcoxon, $p=0,4$). Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i aktivitet mellom torsk fra indre og ytre Oslofjord (Wilcoxon, $p=0,2$) (figur 3.8).



Figur 3.8 Acetylkolinesterase aktivitet, uttrykt som nmol 5-thio-2-nitrobenzoesyre/min/mg protein, i muskel hos torsk fra indre og ytre Oslofjord, presentert som boxplot med median, kvartiler, minimum og maksimum verdier innenfor $1,5 \times$ interkvartil området, med verdier som faller utenfor $1,5 \times$ interkvartil området presentert som sirkler.

3.4 δ -aminolevulinsyre dehydratase (ALA-D) aktivitet i erythrocytter

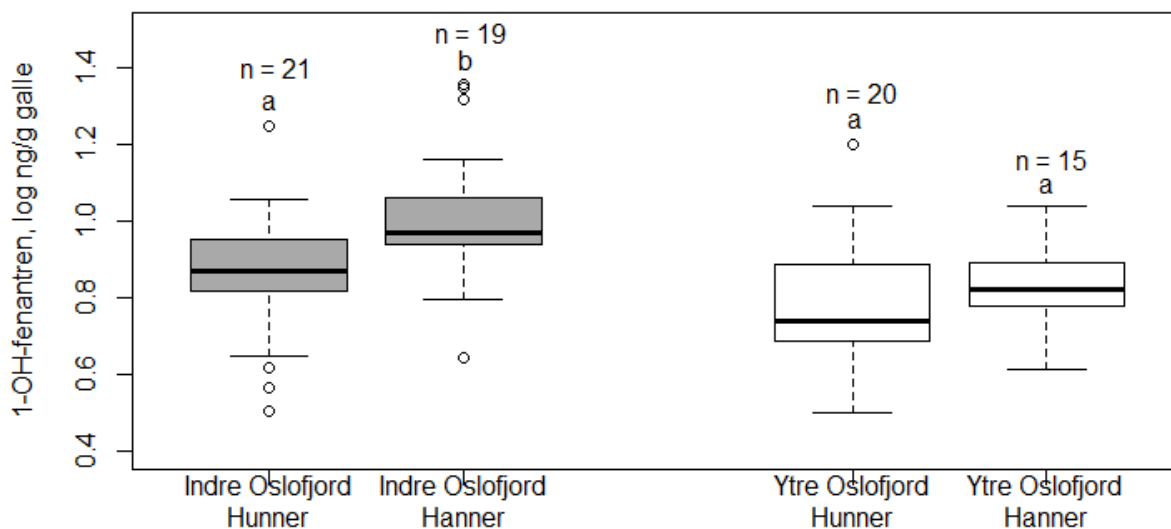
Det ble ikke funnet signifikant forskjell i δ -aminolevulinsyre dehydratase aktivitet mellom hunn- og hanntorsk (to-veis ANOVA, $p=0,2$) eller mellom torsk fra indre og ytre Oslofjord (to-veis ANOVA, $p=0,4$) (figur 3.9). Ingen signifikante interaksjonseffekter ble funnet mellom område og kjønn (to-veis ANOVA, $p=0,2$).



Figur 3.9 δ -aminolevulinsyre dehydratase aktivitet, uttrykt som ng PBG/min/mg protein, i erythrocytter hos torsk fra indre og ytre Oslofjord, presentert som boxplot med median, kvartiler, minimum og maksimum verdier.

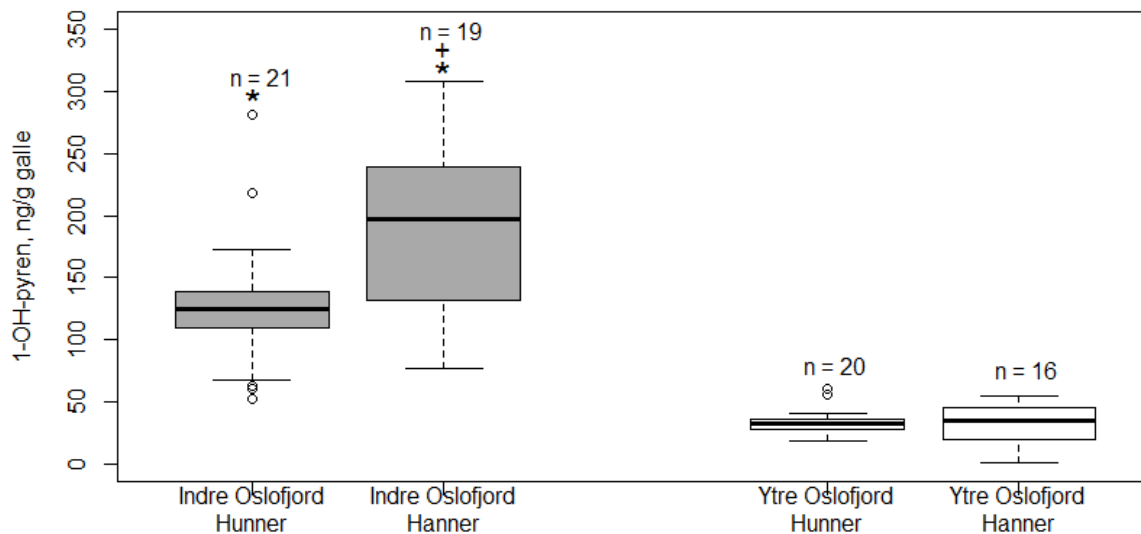
3.5 PAH-metabolitter i galle

Det ble funnet signifikant forskjell i 1-OH-fenantren konsentrasjon i galle mellom både hunn- og hanntorsk (to-veis ANOVA på logtransformerte verdier, $p=0,006$) og område (to-veis ANOVA på logtransformerte verdier, $p=0,003$). Konsentrasjonen var høyere i indre Oslofjord, og hanner hadde høyere konsentrasjoner enn hunner (figur 3.10). Det ble ikke funnet interaksjonseffekter mellom kjønn og område (to-veis ANOVA på logtransformerte verdier, $p=0,1$). Deteksjonsgrensen ble satt til 2 ng/g galle for 1-OH-fenantren, en verdi fra ytre Oslofjord var under denne grensen, og ble ikke inkludert i den statistiske analysen.



Figur 3.10 Konsentrasjon av PAH-metabolitten 1-OH-fenantren, uttrykt som log ng 1-OH-fenantren/g galle, i gallen hos hunn- og hanntorsk fra indre og ytre Oslofjord, presentert som boxplot med median, kvartiler, minimum og maksimum verdier innenfor $1,5 \times$ interkvartil området, med verdier som faller utenfor $1,5 \times$ interkvartil området presentert som sirkler. Forskjellige bokstaver indikerer signifikant forskjell mellom gruppene.

Det ble funnet signifikante forskjeller i 1-OH-pyren konsentrasjon mellom områdene for både hanner (Wilcoxon rank-sum test, $p < 0,0001$) og hunner (Wilcoxon rank-sum test, $p < 0,0001$), hvor indre Oslofjord hadde høyere konsentrasjon enn ytre Oslofjord for begge kjønn (figur 3.11). Hanner hadde signifikant høyere konsentrasjon enn hunner i indre Oslofjord (Wilcoxon rank-sum test, $p = 0,006$), mens det ikke var forskjell mellom kjønn i ytre Oslofjord (Wilcoxon rank-sum test, $p = 0,9$). Deteksjonsgrensen for 1-OH-pyren ble satt til 1 ng/g galle, ingen verdier var under denne grensen.

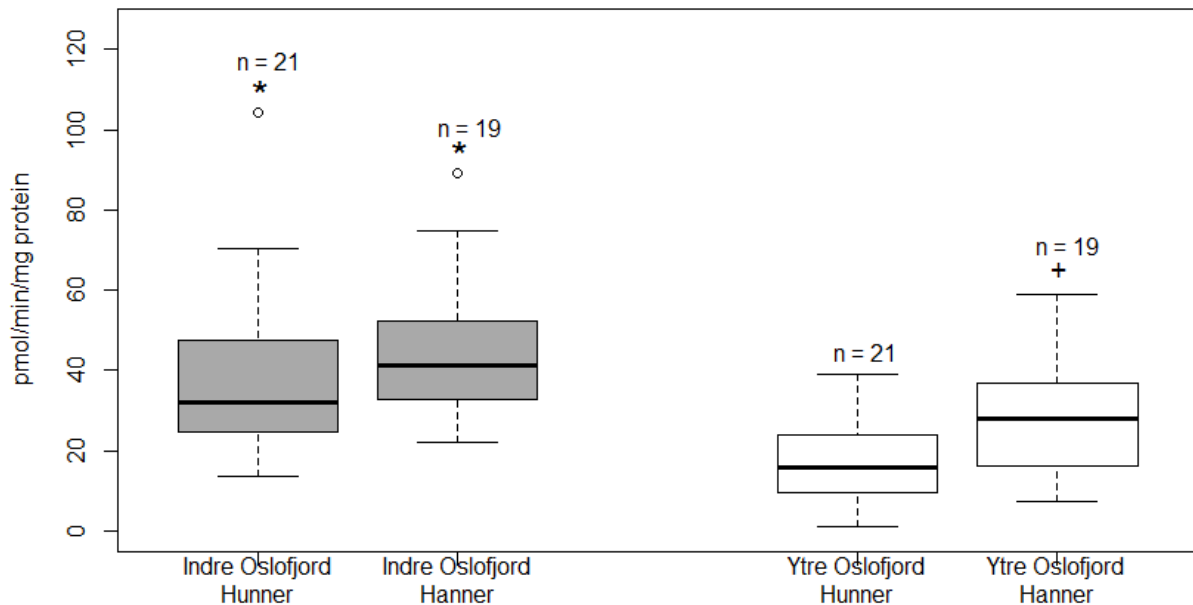


Figur 3.11 Konsentrasjon av PAH-metabolitten 1-OH-pyren, uttrykt som log ng 1-OH-pyren/g galle, i gallen hos hunn- og hanntorsk fra indre og ytre Oslofjord, presentert som boxplot med median, kvartiler, minimum og maksimum verdier innenfor $1,5 \times$ interkvartil området, med verdier som faller utenfor $1,5 \times$ interkvartil området presentert som sirkler. Stjerne (*) indikerer at signifikant høyere verdier innen ett kjønn mellom områdene. Plusstegn (+) indikerer signifikant høyere verdier mellom kjønn innen ett område.

3-OH-benzo[a]pyren ble kun funnet i galle fra et individ, og i dette tilfelle var konsentrasjonen under deteksjonsgrensen på 2 ng/g galle.

3.6 7-etoksyresorufin O-deetylase (EROD) aktivitet i lever

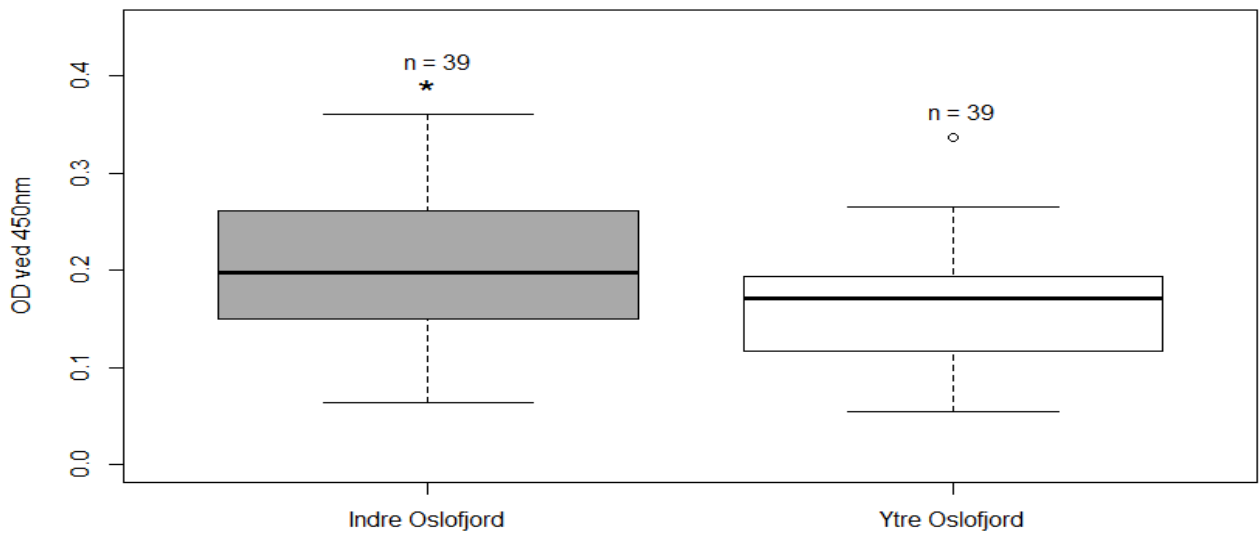
Det ble funnet signifikant høyere EROD aktivitet hos hanntorsk enn hos hunntorsk i ytre Oslofjord (Wilcoxon, $p=0,04$), og ingen forskjell mellom kjønnene i indre Oslofjord (Wilcoxon, $p=0,1$) (figur 3.12). Signifikante forskjeller ble imidlertid observert mellom indre og ytre Oslofjord for både hanntorsk (Wilcoxon, $p=0,002$) og hunntorsk (Wilcoxon, $p<0,0001$), hvor aktiviteten var høyest i indre Oslofjord.



Figur 3.12 7-etoksyresorufin O-deetylase aktivitet, uttrykk som pmol resorufin/min/mg protein, i mikrosomal leverfraksjon hos hunn- og hanntorsk fra indre og ytre Oslofjord, presentert som boxplot med median, kvartiler, minimum og maksimum verdier innenfor $1,5 \times$ interkvartil området, med verdier som faller utenfor $1,5 \times$ interkvartil området presentert som sirkler. Stjerne (*) indikerer at signifikant høyere verdier innen ett kjønn mellom områdene. Plusstegn (+) indikerer signifikant høyere verdier mellom kjønn innen ett område.

3.7 CYP1A konsentrasjon i lever

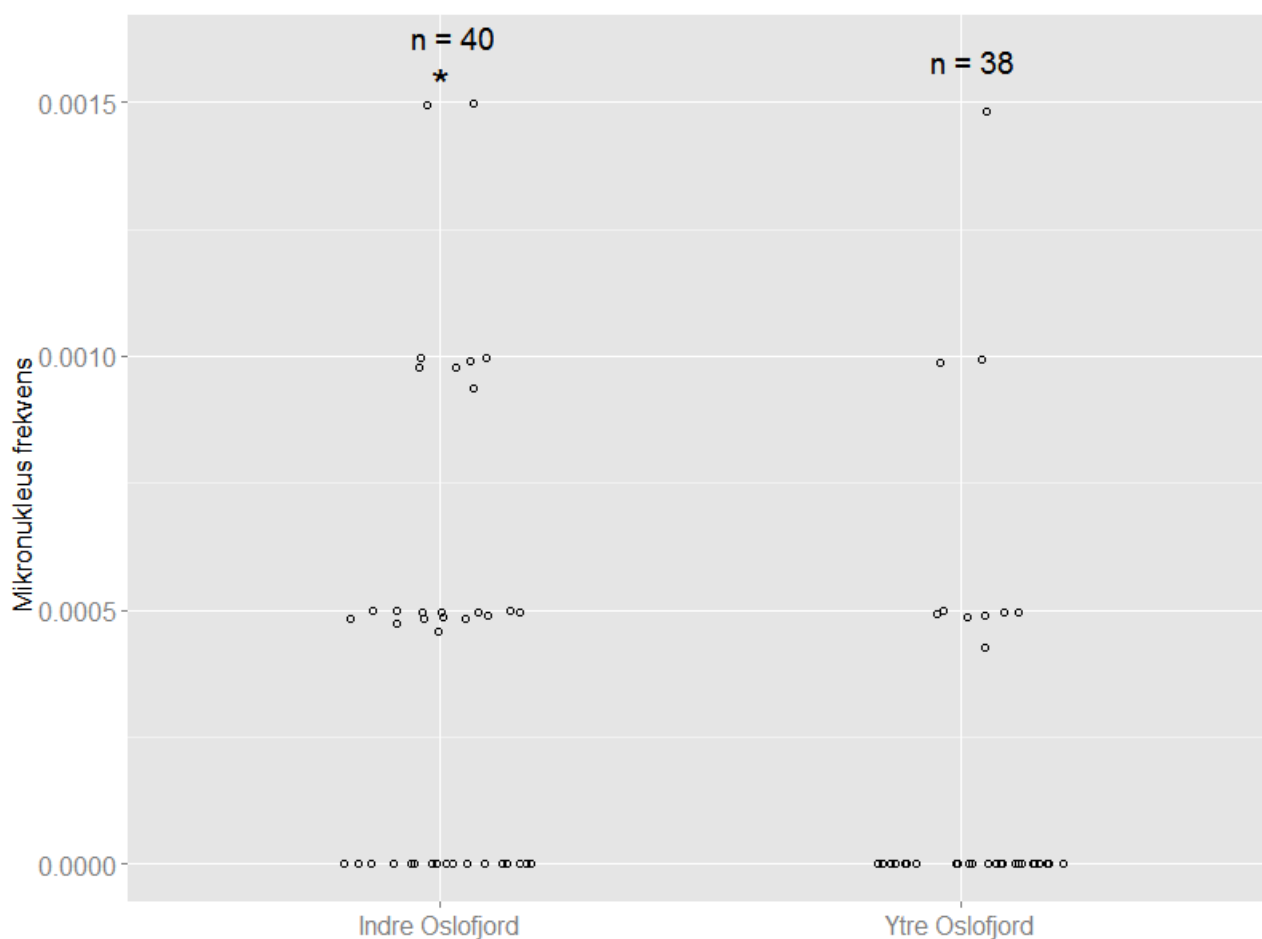
Det ble funnet signifikant forskjell i CYP1A konsentrasjon mellom torsk fra indre og ytre Oslofjord (to-veis ANOVA, $p=0,01$), hvor konsentrasjonen var høyest i indre Oslofjord (figur 3.13). Det ble ikke funnet signifikante forskjeller mellom kjønn (to-veis ANOVA, $p=0,6$), eller interaksjonseffekter mellom kjønn og område (to-veis ANOVA, $p=0,9$).



Figur 3.13 CYP1A konsentrasjon, uttrykt som OD (optical density) ved 450 nm i mikrosomal leverfraksjon hos torsk fra indre og ytre Oslofjord, presentert som boxplot med median, kvartiler, minimum og maksimum verdier. Stjerne (*) indikerer signifikant høyere verdier innen ett område.

3.8 Mikronukleus

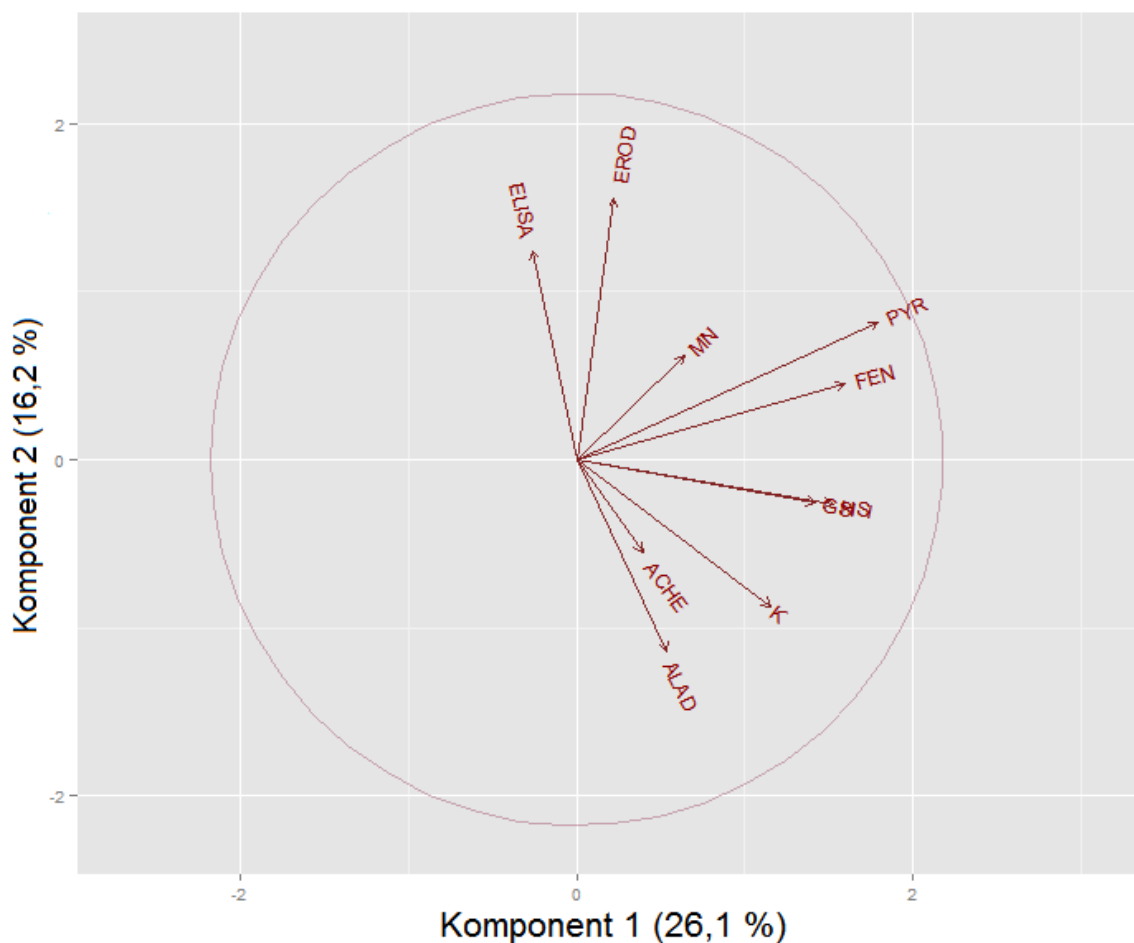
Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i mikronukleus frekvens mellom hunn- og hanntorsk verken i indre Oslofjord (Pearsons kji-kvadrat test, $p=0,1$) eller i ytre Oslofjord (Pearsons kji-kvadrat test, $p=0,5$). For torsk fra Indre Oslofjord ble det observert en signifikant høyere mikronukleus frekvens enn hos torsk fra ytre Oslofjord (Pearsons kji-kvadrat test, $p=0,02$) (figur 3.14).



Figur 3.14 Mikronukleus frekvens, antall mikronuklei per celler telt, i erythrocytter hos torsk fra indre og ytre Oslofjord. Frekvens for hver torsk fremstilt som punkter. Stjerne (*) indikerer at signifikant høyere verdier innen ett område.

3.9 PCA

En PCA (principal component analysis) ble utført og fremstilt grafisk med de to komponentene som forklarte mest av den totale variasjonen i datasettet som akser. Modellen forklarte 42,3 % av den totale variasjonen i datasettet, hvor den første komponenten (x-aksen) forklarte 26,1 % og den andre (y-aksen) forklarte 16,2 % av den totale variasjonen (figur 3.15). Variablene EROD, 1-OH-pyren og 1-OH-fenantren bidro mest til modellen, mens variablene AChE og MN bidrar relativt lite.

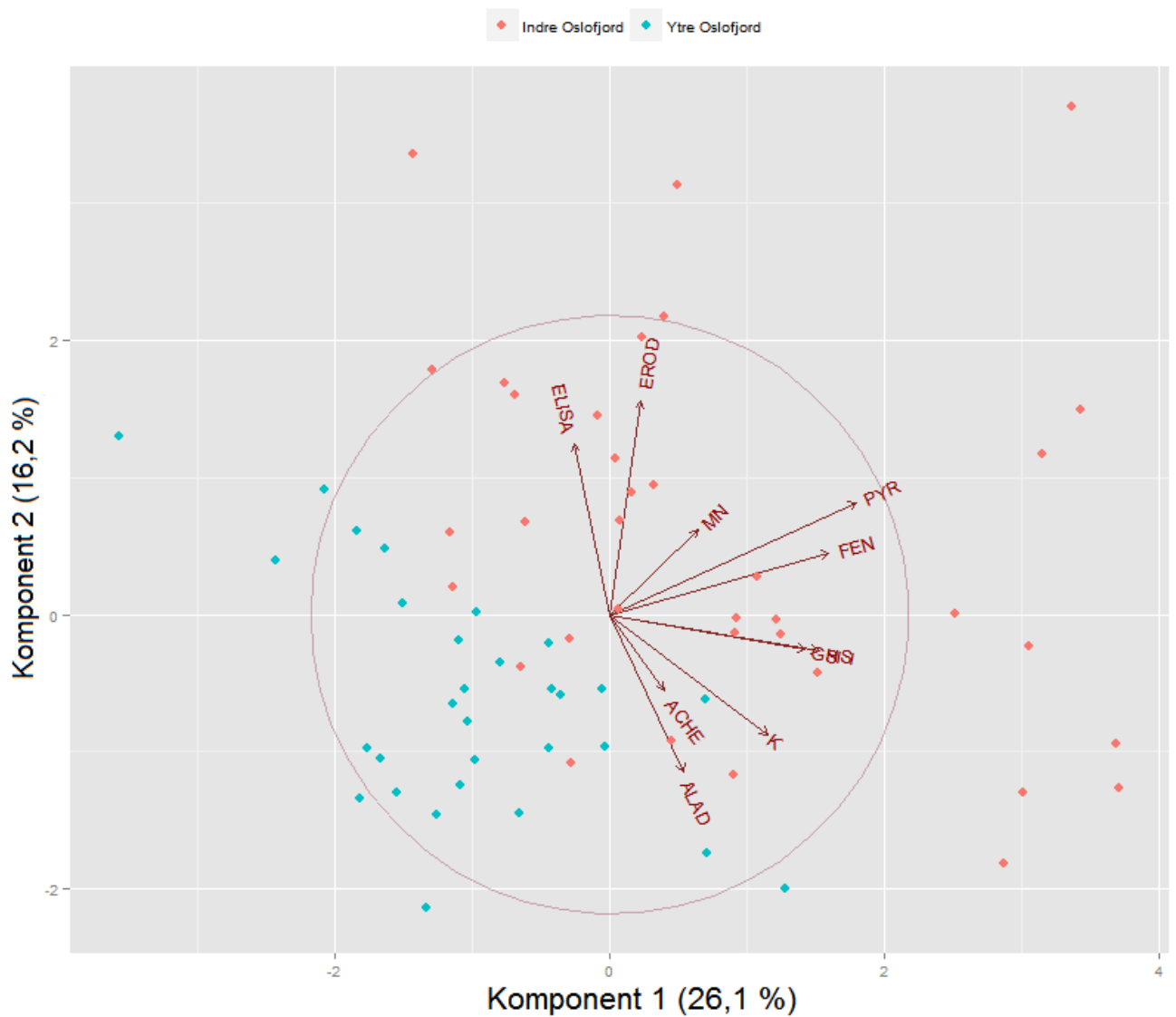


Figur 3.15 De avhengige variablene benyttet i PCAen presentert som vektorer. Lengde angir relativt bidrag til forklaringsmodellen og vinkelen mellom vektorene angir korrelasjon. Variablenes respons øker i den retning vektoren peker.

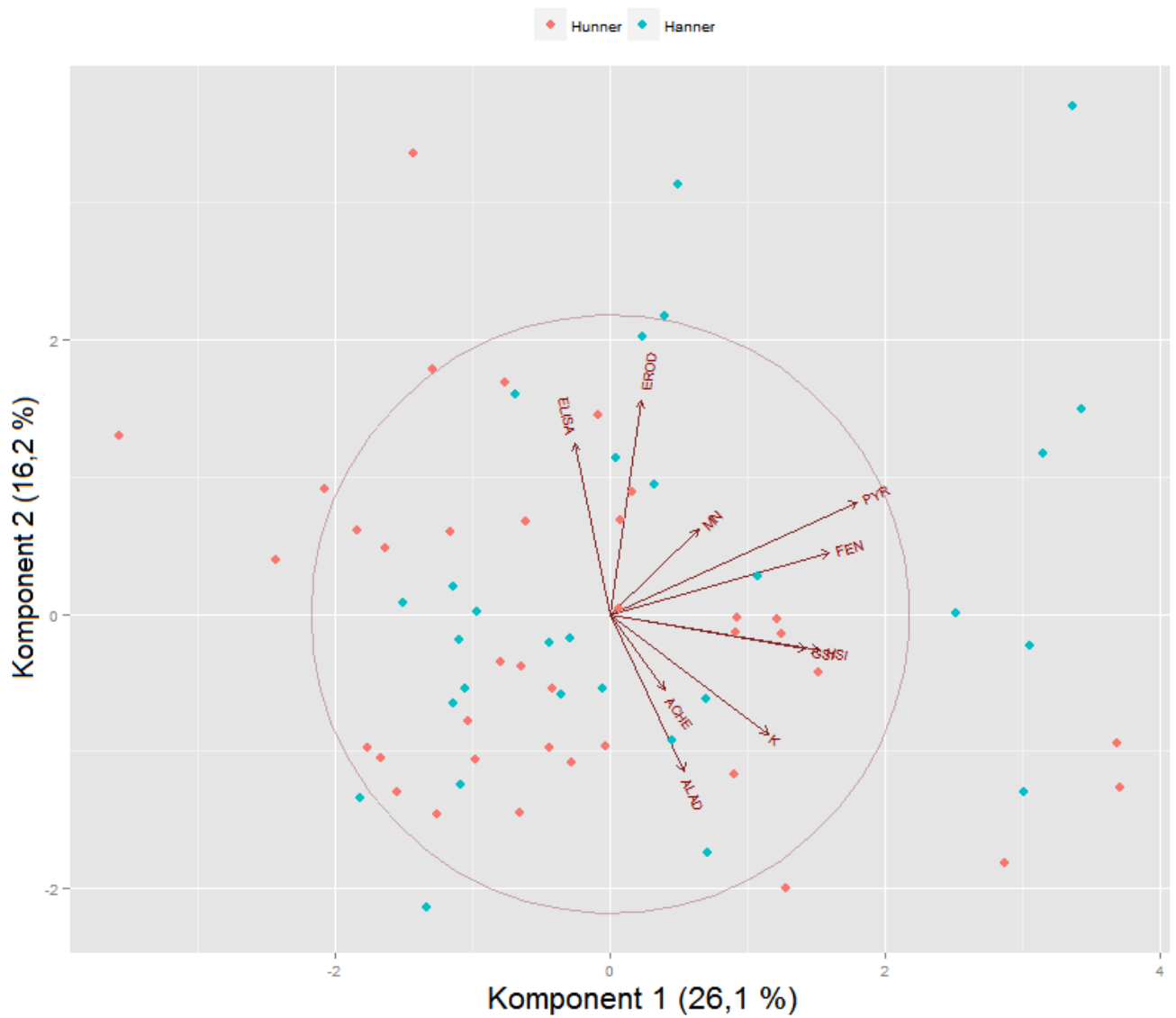
Figur 3.15 indikerer en sterk positiv korrelasjon mellom variablene HSI og GSI, og en god korrelasjon mellom 1-OH-pyren og 1-OH-fenantren.. Modellen viser også positiv korrelasjon mellom EROD og ELISA og mellom ALA-D, AChE og K. Videre viser ELISA negativ korrelasjon med ALA-D og AChE i modellen.

I analysen blir hver rad i datasettet gitt en koordinat for hver av komponentene, og ved å plote disse over vektorene i et biplot observeres det en gruppering basert på område (figur 3.16), hvor punktene fra indre Oslofjord har høyere verdier for begge komponenter, som er korrelert med høyere verdier av variablene EROD, mikronukleus, 1-OH-pyren og 1-OH-

fenantren. Biplottet viser også en større variasjon for fisk fra indre Oslofjord. Det ble ikke funnet gruppering på bakgrunn av kjønn (figur 3.17).



Figur 3. 16 PCA fremstilt som biplot, med verdier fra torsk fra indre Oslofjord fremstilt som røde punkter og verdier fra torsk fra ytre Oslofjord fremstilt som blå punkter.



Figur 3.17 PCA fremstilt som biplot, med verdier fra hunntorsk fremstilt som røde punkter og verdier fra hanntorsk fremstilt som blå punkter.

4 Diskusjon

4.1 Alder, lengde og vekt

Ved innsamling av fisk ble individer med omtrent samme størrelse valgt ut for å ha et bedre sammenligningsgrunnlag. Aldersbestemmelsen viste imidlertid at individer fra indre Oslofjord var signifikant eldre enn individer fra ytre Oslofjord av samme størrelse. Dette tyder på at individer fra ytre Oslofjord har en raskere vekst enn individer fra indre Oslofjord. Ved å sammenligne vekt og lengde mellom individer av samme alder ble det ikke funnet signifikant forskjell mellom 2-åringer, mens fisk på 3 år var signifikant lengre og tyngre i ytre Oslofjord.

Vekst hos fisk er plastisk, og forskjell i vekstrate for samme art mellom områder og innen forskjellige årskull er ikke uvanlig (Wootton 1998). Flere faktorer er kjent for å påvirke vekst hos torsk, blant annet næringstilgang (Jobling et al. 1994, Lambert og Dutil 2001), diett (Sherwood et al. 2007), temperatur (Brander 1995, Björnsson et al. 2001), salinitet (Lambert et al. 1994) og oksygentilgjengelighet (Chabot og Dutil 1999). Torsk fra de to områdene anses som forskjellige populasjoner (Knutsen et al. 2003), hvor livshistorie parametere som vekst er forskjellig mellom områdene (Olsen et al. 2004).

Forskjell i alder mellom torsk fra indre og ytre Oslofjord kan ha hatt en innvirkning på biomarkørene (Thain et al. 2008). Etersom torsk fra indre og ytre Oslofjord har forskjellige vekstrater, hvor torsk av lik alder er både lengre og tyngre i ytre Oslofjord (Olsen et al. 2004), fremstår det ikke som realistisk å oppnå prøvetaking uten forskjeller i verken alder eller størrelse mellom områdene.

Tilsvarende resultater, med signifikant eldre torsk av samme størrelse i indre Oslofjord sammenlignet med torsk fra ytre Oslofjord ble også funnet i 2002, 2010, 2011, 2012 og 2013 (Holth 2004, Bergland 2012, Fredriksen 2013, Bratrud 2014, Erdahl 2014).

4.2 Kondisjon og vevsindekser

Det ble ikke funnet forskjell i kondisjonsfaktor (K) mellom verken indre og ytre Oslofjord eller mellom hunn- og hanntorsk. For hepatosomatisk indeks (HSI) ble det funnet signifikant høyere verdier for fisk i indre Oslofjord i forhold til ytre Oslofjord, og ingen forskjell mellom kjønn innad i hvert område. Ettersom torsk innsamlet fra indre Oslofjord var eldre enn torsk fra ytre Oslofjord er det mulig at en høyere andel fisk i indre Oslofjord var kjønnsmodne ved prøvetaking. Dette vil kunne påvirke både HSI og GSI, ettersom gonadeutvikling vil kreve energi i form av lipider, hvilket vil redusere HSI. På grunn av dette ble forskjeller mellom område og kjønn testet for hver aldersgruppe separat. Disse analysene viste ikke signifikante forskjeller mellom de to områdene for hvert årskull for HSI. Ved å analysere årskullene separat ble det færre individer i analysen (7 individer fra indre Oslofjord og 13 fra ytre Oslofjord i årsklasse 2, og for årsklasse 3 var det 22 individer fra indre Oslofjord og 7 individer fra ytre Oslofjord), men det fremstår fremdeles rimelig å anta at forskjellen skyldes aldersforskjellen mellom områdene.

Både HSI og K vil variere gjennom sesongen hvor energitap i forhold til gyting kan være høy og gi markante utslag (Mello og Rose 2005). Variasjon opptrer også mellom sesongene, hvor næringstilgjengelighet og spesielt tilstedeværelse av fettrik føde som lodde samt temperatur antas å være påvirkende faktorer (Krohn et al. 1997, Yaragina og Marshall 2000). van der Oost et al. (2003) oppsummerte laboratorieforsøk som har undersøkt effekter av organiske miljøgifter på K og HSI i fisk. Ingen av studiene rapporterte signifikante effekter på kondisjon, mens både signifikant økning og reduksjon ble rapportert for HSI. I feltstudier har imidlertid reduksjon i både K og HSI blitt rapportert for torsk eksponert for PAHer (Aas et al. 2001).

En K-verdi på 0,7 og lavere representerer næringsmangel over lengre perioder for torsk, mens verdier på 0,85 og over anses som normalt (Lambert og Dutil 1997b). Medianen for kondisjonsfaktoren lå på 0,92 for indre Oslofjord og 0,91 for ytre Oslofjord uten at det var signifikant forskjell mellom dem. Kun en verdi lå under 0,7 og denne skiller seg klart ut fra de resterende, slik at det ikke er grunn til å anta at torsken i verken indre eller ytre Oslofjord lider av redusert næringstilgang. Ettersom det ikke ble funnet signifikant forskjellig K-verdi mellom torsk fra de to områdene er det ikke sannsynlig at det er store forskjeller i næringstilgangen mellom områdene eller at effekter av miljøgifter har redusert kondisjon hos

torsk fra indre Oslofjord. Tidligere studier på effekter av miljøgift på torsk i indre Oslofjord har funnet høyere kondisjon hos torsk fra indre Oslofjord i 2002 og 2011 (Holth 2004, Fredriksen 2013), høyere kondisjon i ytre Oslofjord i 2013 (Erdahl 2014), mens det i 2008, 2009, 2010 og 2012 (Imrik 2010, Nerland 2011, Bergland 2012, Bratrud 2014) ikke ble funnet signifikant forskjell mellom områdene. Ettersom det i de fleste år, inkludert dette, ikke har blitt funnet forskjell i kondisjon mellom områdene fremstår det som om næringstilgangen stort sett er jevn mellom områdene med enkelte variasjoner fra år til år. I tillegg er det ikke indikasjoner på at miljøgifter har medført en reduksjon i kondisjon i indre Oslofjord ettersom det ikke er en konsekvent lavere kondisjon i dette området. Dersom forskjeller mellom områdene skulle skyldes miljøgifter ville man forventet en klarere trend med lavere kondisjon i indre Oslofjord ettersom mengde miljøgift i indre Oslofjord de siste årene har vært konsekvent høyere i forhold til ytre Oslofjord (Green et al. 2014).

HSI hadde en medianverdi på 2,83 for indre Oslofjord og 1,99 for Ytre Oslofjord, med større variasjon i indre Oslofjord. Jobling (1988) rapporterte at normalverdier av HSI for villtorsk ligger mellom 2 og 6 prosent, for HSI beregnet ut fra kroppsvekt. I dette studiet ble den somatiske kroppsvekten benyttet, og medianene ligger innenfor hva som anses som normalt. Ved tidligere studier på effekter av miljøgift på torsk ble det i 2002, 2008, 2009 og 2012 (Holth 2004, Imrik 2010, Nerland 2011, Bratrud 2014) ikke funnet forskjellig HSI mellom områdene. I 2010 (Bergland 2012) ble det funnet høyere HSI for torsk innsamlet i ytre Oslofjord, og i 2011 og 2013 (Fredriksen 2013, Erdahl 2014) ble det funnet høyere HSI for torsk innsamlet i indre Oslofjord. Resultatene fra disse studiene viser ikke en konsekvent reduksjon av HSI, hvilket tolkes til å bety at torsk fra indre Oslofjord ikke har redusert HSI som resultat av eksponering for miljøgifter. Variasjonen mellom områdene mellom ulike år kan tyde midlertidig forskjell i næring, for eksempel fettrike byttedyr.

Det ble for gonadosomatisk indeks (GSI) funnet signifikant høyere verdier i torsk fra indre Oslofjord i forhold til torsk fra ytre Oslofjord. Det ble ikke funnet forskjeller mellom hunn- og hanntorsk. Dette tyder på at en høyere andel torsk fra indre Oslofjord var kjønnsmodne sammenlignet med torsk fra ytre Oslofjord. Konsekvensene av dette er redusert ved at fisken ble fanget utenfor gytesesongen, hvor påvirkning fra forskjell mellom kjønn og i kjønnsmodning vil være minst. Forskjell i andel kjønnsmodne torsk mellom områdene kan stamme fra både aldersforskjeller, ettersom torsk var eldre i indre Oslofjord, og at torsk fra de to områdene blir kjønnsmodne ved forskjellig alder. Ved å sammenligne GSI for enkelte

årskull separat ble det her, som for HSI, ikke funnet signifikante forskjeller mellom indre og ytre Oslofjord. Dette ble undersøkt kun for aldersgruppe 2 og 3 år ettersom det var for få individer i de øvrige aldersgruppene. Som tidligere nevnt anses disse analysene som mindre pålitelige siden det var relativt få individer i disse årsklassene. Allikevel fremstår det også her som rimelig å anta at det ikke var noen forskjell i GSI mellom indre og ytre Oslofjord, men at forskjellene observert ble introdusert ettersom fisken fanget fra indre Oslofjord var signifikant eldre enn fisken fra ytre Oslofjord.

Resultatene fra tidligere studier har funnet høyere GSI i indre Oslofjord i 2009, 2011, 2012 og 2013 (Nerland 2011, Fredriksen 2013, Bratrud 2014, Erdahl 2014), men i alle disse årene bortsett fra 2009 ble også observert signifikant aldersforskjeller mellom områdene. I 2008 og 2010 (Imrik 2010, Bergland 2012) ble det ikke funnet forskjell i GSI mellom indre og ytre Oslofjord. Det er mulig at disse resultatene kommer av at torsk innsamlet i indre Oslofjord var eldre enn torsk fra ytre Oslofjord. En annen tolkning er at torsk fra indre Oslofjord blir kjønnsmoden ved en tidligere alder enn torsk fra ytre Oslofjord, hvilket har blitt rapportert av Olsen et al. (2004).

PCA analysen viste ikke en sterk assosiasjon mellom GSI og biomarkørene, hvilket indikerer at eventuelle forskjeller i kjønnsmodning ikke har hatt merkbar innvirkning på de øvrige resultatene. GSI var svært sterkt positivt korrelert med HSI, hvilket var overraskende. En negativ korrelasjon mellom GSI og HSI var forventet, ettersom gonadeutvikling vil kreve energi fra lever. Den positive korrelasjonen kan tyde på at fiskene i begge områdene hadde god tilgang til føde, slik at gonadeutvikling ikke har skjedd på bekostning av lever.

Det oppsummeres med at det ikke ble funnet forskjell i kondisjon mellom indre og ytre Oslofjord. Det ble funnet forskjell mellom indre og ytre Oslofjord for HSI og GSI, men det skyldes sannsynligvis aldersforskjeller mellom torsk innsamlet fra de to områdene.

4.3 Acetylkolinesterase (AChE) aktivitet i muskel

Det ble ikke funnet signifikante forskjeller verken mellom indre og ytre Oslofjord eller hann- og hunntorsk for acetylkolinesterase aktivitet i muskel. Tidligere studier har funnet at ytre Oslofjord ikke er et optimalt referanseområde for AChE aktivitet da det i 2008, 2009, 2011 og

2012 ble funnet signifikant hemming av AChE aktivitet i ytre Oslofjord i forhold til indre Oslofjord (Imrik 2010, Nerland 2011, Fredriksen 2013, Bratrud 2014). Fravær av forskjell i enzymaktivitet mellom områdene i denne oppgaven kan tolkes til å stamme fra enten en reduksjon i eksponering i ytre Oslofjord eller en økning av eksponeringen i indre Oslofjord eller begge samtidig. Det ble i dette studiet i tillegg observert en noe høyere variasjon innen hvert område enn hva som har vært vanlig, hvilket kan ha maskert eventuelle forskjeller.

Hemming av acetylkolinesterase aktivitet har i hovedsak blitt knyttet til eksponering for pesticider som organofosfater og karbamater (Galgani og Bocquene 1990, van der Oost et al. 2003). Organofosfaters hemming av acetylkolinesterase er irreversibel og gjenoppretning av aktivitet krever syntese av nye enzymer (Fulton og Key 2001), mens karbamater fører til en reversibel hemming av enzymet (Bhattacharya 2001). Tiden det tar før enzymaktivitet returnerer til kontrollnivåer avhenger av eksponeringsgraden, og varierer fra art til art. Post og Leasure (1974) eksponert tre arter av laksefisk, regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*), bekkerøye (*Salvelinus fontinalis*) og sølvlaks (*Oncorhynchus kisutch*) for malathion, et organofosfat, i doser som reduserte AChE aktivitet til 45 % av aktiviteten i kontrollfisk. Tiden det tok enzymaktiviteten å returnere til samme nivå som kontrollfisk var 25 dager for bekkerøye, 35 for regnbueørret og 42 dager for sølvlaks. Organofosfater og karbamater er imidlertid lite persistente i miljøet (Fulton og Key 2001). Siden torsken i dette studiet ble fanget i slutten av november kan det være at eventuelle effekter på enzymaktivitet allerede har avtatt, ettersom landbruks sesongen i all hovedsak var over når prøvetaking ble utført.

Tidligere forskjeller i aktivitet har blitt foreslått å stamme fra eksponering for elvebårne sprøytemidler fra landbruksområder langs elvene som renner ut i ytre Oslofjord som Glomma og Drammenselva (Imrik 2010, Nerland 2011, Fredriksen 2013, Bratrud 2014). Det er også mulig at de tidligere forskjellene skyldtes andre forbindelser enn organofosfater og karbamater. Payne et al. (1996) fant hemming av AChE aktivitet i områder hvor den forventede eksponeringen av pesticider var lav, og foreslo dermed at andre forbindelser kunne ha ført til den observerte hemmingen av enzymaktivitet. Hemming av AChE var i studiet til Payne et al. (1996) korrelert med induksjon av EROD aktivitet, slik som PCA analysen fra denne studien også viser. Dette kan indikere at EROD-induserende forbindelser har hatt en hemmende effekt på AChE. Hemmende effekter på AChE aktivitet i fisk har blitt demonstrert *in vitro* ved eksponering for PAHer (Kang og Fang 1997). Det ble imidlertid i PCA analysen i dette studiet ikke funnet korrelasjon mellom PAHer og AChE aktivitet, det samme gjelder

mellom EROD aktivitet og PAHer, men det er mulig at andre EROD induserende forbindelser enn PAHer har bidratt til reduksjon av AChE aktiviteten.

PCA analysen viste også en positiv korrelasjon mellom AChE og ALA-D aktivitet. En mulig forklaring på denne sammenhengen kan være at bly kan ha en hemmende effekt på ikke bare ALA-D aktivitet, men også AChE aktivitet. En hemmende effekt av bly på AChE aktivitet har tidligere blitt funnet på akvatiske organismer som kreps (*Procambarus clarkii*) og zebrafisk (*Danio rerio*) (Devi og Fingerman 1995, Labrot 1996). Tilsvarende har karbamatforbindelsen karbosulfan vist seg å hemme både aktiviteten til AChE og ALA-D i regnbueørret erythrocytter (Altinok et al. 2012). Det ble imidlertid ikke funnet noen forskjell mellom områdene når det kom til ALA-D aktivitet, og konsentrasjonen av bly i torsk i Oslofjorden er regnet som innenfor bakgrunnsnivåer (Green et al. 2014). I tillegg var AChE aktivitet den variabelen som bidro minst til forklaringsmodellen, så potensielle bidrag av bly på variasjonen i AChE aktivitet er svært usikkert. I tillegg til bly har flere andre metaller potensiale til å hemme AChE aktivitet i fisk, blant annet kopper, sink, kadmium og kvikksølv (Gill et al. 1990, Garcia et al. 2000, Frasco et al. 2005, Liao et al. 2006, Frasco et al. 2007), hvilket kan ha bidratt til de hemmede nivåer av AChE aktivitet i ytre Oslofjord tidligere år.

I tidligere studier på effekter av miljøgift på torsk ble det ikke funnet signifikante forskjeller i aktivitet mellom områdene i 2010 og 2013 (Bergland 2012, Erdahl 2014), mens det ble som tidligere nevnt i 2008, 2009, 2011 og 2012 funnet lavere AChE aktivitet hos torsk fra ytre Oslofjord enn hos torsk fra indre Oslofjord (Imrik 2010, Nerland 2011, Fredriksen 2013, Bratrud 2014). Det er mulig at dette innebærer en reduksjon i tilførsel av nevrotoksiske forbindelser til ytre Oslofjord de to siste årene.

Det konkluderes med at det ut ifra analysene utført i dette studiet ikke er forskjell i acetylkolinesterase aktivitet mellom indre og ytre Oslofjord eller mellom kjønn, og det er dermed ikke indikasjoner på eksponering fra nevrotoksiske forbindelser.

4.4 δ -aminolevulinsyre dehydratase (ALA-D) aktivitet i erythrocytter

Det ble ikke funnet forskjeller i δ -aminolevulinsyre dehydratase (ALA-D) aktivitet i torsk mellom indre og ytre Oslofjord, eller mellom hunn- og hanntorsk. Dette viser at torsk i indre Oslofjord ikke er eksponert for bly i en høyere grad enn i torsk fra ytre Oslofjord.

ALA-D aktivitet i erythrocytter anses å være en biomarkør med høy spesifisitet overfor bly (Walker et al. 2012). Det er også observert god korrelasjon mellom mengde bly i blod og ALA-D aktivitet (Hodson et al. 1977, Schmitt et al. 2007). Andre metaller ikke kjent for å påvirke ALA-D i en merkverdig grad. Hodson et al. (1977) eksponerte flere fiskearter for høye nivåer av bly, kadmium, kobber, sink og kvikksølv, uten at det ble observert signifikant inhibering av ALA-D for andre metaller enn bly. Etter eksponering i samme studie tok det regnbueørret 8 uker før enzymaktivitet var tilbake til normale nivåer ved eksponering for 120 $\mu\text{g/L}$ bly. Aminolevulinsyre dehydratase i fisk krever imidlertid et sink ion, Zn^{2+} , som kofaktor (Jaffe 2004), og studier har vist at sink også har egenskapen til å reaktivere inhibert ALA-D (Lombardi et al. 2010). Konsentrasjonen av sink i indre Oslofjord er imidlertid lav (Green et al. 2014), og det antas at tilstedeværelse av sink ikke har påvirket resultatene

Det ble i dette studiet funnet noe høyere enzymaktiviteter enn hva som er funnet i tidligere studier. I motsetning til de tidligere studiene ble det i denne ALA-D analysen benyttet en metode uten kvikksølv. Proteinanalysen ble også utført med en særegen protokoll, ettersom det hadde oppstått en felling i blodprøvene. Det er tenkelig at det har gitt en svak underestimering av proteinmengde hvilket har ført til høyere resultater med tanke på enzymaktivitet.

Mengde bly i torskelever fra indre Oslofjord var i 2013 innenfor bakgrunnsnivåer (Green et al. 2014), og det ble funnet en signifikant trend for reduksjon av bly i torskelever i indre Oslofjord, hvilket stemmer godt overens med funnene fra denne analysen. I tidligere studier av effekter av miljøgifter på torsk i Oslofjorden ble det funnet signifikante forskjeller, med inhibert enzymaktivitet i indre Oslofjord i forhold til ytre Oslofjord i 2002, 2008 og 2011 (Holth 2004, Imrik 2010, Fredriksen 2013), mens det ikke ble funnet forskjeller mellom områdene i 2009 (Nerland 2011) og fra 2010 frem til i dag (Bergland 2012, Bratrud 2014, Erdahl 2014). Disse resultatene tyder på en reduksjon i eksponering for bly i torsk i indre

Oslofjord og indikerer at blyforurensing ikke lenger er et problem i Oslofjorden, hvilket stemmer godt med trendene observert av Green et al. (2014).

Resultatene fra denne analysen tyder ikke på at torsk fra indre Oslofjord er utsatt for bly i en høyere grad enn torsk fra ytre Oslofjord.

4.5 PAH-metabolitter i galle

Det ble funnet signifikant høyere konsentrasjon av metabolitten 1-hydroksyfenantren i gallen hos torsk fra indre Oslofjord sammenlignet med torsk fra ytre Oslofjord, og det ble i tillegg funnet signifikante forskjeller mellom kjønnene, hvor hanner hadde høyere konsentrasjon enn hunner i indre Oslofjord. Tilsvarende ble det for 1-hydroksypyren funnet signifikant høyere konsentrasjon i galle hos torsk fra indre Oslofjord sammenlignet med torsk fra ytre Oslofjord, og signifikant høyere konsentrasjon for hanntorsk enn hunntorsk i indre Oslofjord. Derimot ble det for 3-hydroksybenzo[a]pyren ikke for noen av individene funnet verdier over deteksjonsgrensen på 2 ng/g galle. Dette tyder på torsk fra indre Oslofjord er eksponert for PAHer i en høyere grad enn torsk fra indre Oslofjord.

PAH opptrer i det marine økosystemet oftest i komplekse blandinger med flere hundre individuelle komponenter (Neff et al. 2005), slik at metabolittene analysert i denne oppgaven benyttes som markører på total PAH eksponering. Fenantren, pyren og benzo[a]pyren er henholdsvis 3-, 4- og 5-ringede PAHer med log K_{ow} , verdier på 4,57, 5,18 og 6,04 (Hylland 2006). Log K_{ow} verdien angir hvordan forbindelser fordeler seg i et system med vann og oktanol, og er dermed et mål på hvor hydrofob forbindelsen er. Små PAHer med lav log K_{ow} er mer vannløselige og vil dermed være mer tilgjengelig for opptak over gjeller i fisk, i motsetning til større PAHer som er mer hydrofobe, slik som benzo[a]pyren. Store hydrofobe PAHer vil i en høyere grad binde seg til sedimentet og slik være mindre tilgjengelig for opptak (Hylland 2006). Lave konsentrasjonene av 3-hydroksybenzo[a]pyren i gallen til torsk fra både indre og ytre Oslofjord kan skyldes lave konsentrasjoner i miljøet eller lav biotilgjengelighet. I tillegg til opptak over gjellene vil torsk kunne få i seg PAHer gjennom føde (Grung et al. 2009). Bentiske invertebrater som flerbørstemark vil i motsetning til torsk kunne bioakkumulere PAHer grunnet en mindre effektiv metabolisme av disse forbindelsene. Ruus et al. (2005) demonstrerte at *Hediste diversicolor*, en flerbørstemark, bioakkumuler

PAHer, og da spesielt pyren i en høy grad fra kontaminerte sedimenter. Ettersom sedimenter i prøvetakingsområdet i indre Oslofjord har konsentrasjoner av pyren innenfor miljødirektoratets mest alvorlige tilstandsklasse (konsentrasjoner på over 600 µg/kg sediment) (Berge et al. 2013), er dette trolig en viktig eksponeringsvei for pyren hos torsk i indre Oslofjord.

PAHer i miljøet kan stamme fra pyrogene eller petrogene kilder. Pyrogene polysykliske aromatiske hydrokarboner stammer fra ufullstendig forbrenning av organisk materiale og består av tre eller flere aromatiske ringer, mens de petrogene stammer fra fossilt brennstoff som olje og består av to eller tre aromatiske ringer (Neff et al. 2005). Pyren og benzo[a]pyren er PAHer som er assosiert med pyrogene kilder (Aas et al. 2001). Den økte eksponeringen av pyren PAHer i indre Oslofjord i forhold til ytre Oslofjord vil derfor kunne tenkes å stamme fra forbrenningsprosesser som for eksempel motorer i biler og båter. Fyring med ved anses også som en viktig kilde for pyrogene PAHer (Sørensen 2012), og ettersom området rundt indre Oslofjord er tettere befolket vil dette også kunne bidra til økt eksponering i indre Oslofjord i forhold til ytre Oslofjord. Fenantren er i større grad assosiert med petrogene kilder (Page et al. 1999), og høyere nivåer for indre Oslofjord kan skyldes oljesøl fra havner og båter. Båttrafikk er imidlertid kjent for å avgi alle tre forbindelser testet i dette studiet (Koehler og Hardy 1999, Kelly et al. 2005).

En annen mulig forklaring på den økte eksponeringen i indre Oslofjord er redusert vannutskifting i indre Oslofjord. PAHene målt i denne oppgaven er relativt persistente i sedimenter, spesielt pyren og benzo[a]pyren som har halveringstider på over 100 dager (Wilcock et al. 1996). Ettersom utskifting av vannmassene i indre Oslofjord skjer sjeldent, og hovedsakelig om vinteren (Baalsrud og Magnusson 2002), vil PAHer kunne oppkonsentreres i vannmassene og sedimentene. Selv om tilførselen av PAHer hadde vært tilsvarende for de to områdene, vil det være forventet å finne høyere mengde PAHer i indre Oslofjord enn ytre Oslofjord, spesielt sent på høsten.

Etter opptak vil majoriteten av PAHer bli metabolisert av leveren til mer vannløselige metabolitter som sendes til gallen, og derfra forlater organismen i forbindelse med fordøyelse (Aas et al. 2000b). Leveren metaboliserer PAH forbindelser svært effektivt og PAHer i vev og galle forlater raskt eksponert fisk. I en studie hvor torsk ble kontinuerlig eksponert for 1 ppm råolje over 30 dager, tok det ikke mer enn en uke før PAH-konsentrasjonene i leveren returnerte til bakgrunnsnivåer (Aas et al. 2000a). Ettersom gallen tømmes regelmessig i

forbindelse med fordøyelse vil konsentrasjonen av metabolitter funnet i denne oppgaven kun indikere PAHer torsken var eksponert for i dagene før den ble fanget (van der Oost et al. 2003).

Tidligere studier på effekter av miljøgift i torsk fra indre Oslofjord har vist varierende resultater med tanke på 1-hydroksyfenantren, hvor det i 2002 og 2011 (Holth 2004, Fredriksen 2013) ble funnet signifikant høyere verdier i indre Oslofjord sammenlignet med ytre Oslofjord, mens det i 2008 (Imrik 2010) ble funnet signifikant høyere verdier i ytre Oslofjord sammenlignet med indre Oslofjord. I 2009, 2010, 2012 og 2013 (Nerland 2011, Bergland 2012, Bratrud 2014, Erdahl 2014) ble det ikke funnet signifikante forskjeller mellom områdene. Dette tyder på at tilførsel av petrogene PAHer er sporadisk, hvilket fremstår som rimelig ettersom disse forbindelsene i hovedsak vil stamme fra utslipp av fossilt brensel slik som bensin-, diesel- og oljesøl (Neff et al. 2005). Fenantren har også en lavere persistens enn pyren og benzo[a]pyren, slik at eventuelle utslipp raskere vil brytes ned hvilket også kan bidra til å forklare variasjonen i fenantren-metabolitter i galle hos torsk fra år til år. Resultatene fra 1-hydroksypyren samsvarer med de tidligere studiene, hvor det i samtlige år har vært signifikant høyere konsentrasjoner i galle hos torsk fra indre Oslofjord enn fra ytre Oslofjord (Holth 2004, Imrik 2010, Nerland 2011, Bergland 2012, Fredriksen 2013, Bratrud 2014, Erdahl 2014). For 3-hydroksybenzo[a]pyren har verdiene generelt vært lave, og kun i 2009, 2011 og 2012 har det vært nok individer over deteksjonsgrensen til å utføre statistiske analyser. I disse tre årene var det i 2009 ingen signifikant forskjell mellom områdene, mens det i 2011 og 2012 ble funnet signifikant høyere verdier i indre Oslofjord sammenlignet med ytre Oslofjord (Nerland 2011, Fredriksen 2013, Bratrud 2014). Samlet tyder dette på en kontinuerlig høyere eksponering i torsk fra indre Oslofjord enn fra ytre Oslofjord for pyrogene PAHer siden 2002.

Det ble i denne oppgaven funnet høyere konsentrasjoner av PAH-metabolittene 1-hydroksypyren og 1-hydroksyfenantren i hanner enn i hunner i indre Oslofjord, tilsvarende resultater ble funnet i 2011 (Fredriksen 2013), mens det i 2009 ble funnet høyere nivåer i hunner i indre Oslofjord (Nerland 2011). Høyere verdier av PAH-metabolitter i hanner har blitt rapportert for flere arter (Vuorinen et al. 2006). En mulig forklaring på dette er at PAHene metaboliseres av cytokrom P-450 1A systemet som kan hemmes av østrogen som 17 β -østradiol (E2) (Kirby et al. 2007) hvilket vil medføre redusert metabolisme, og dermed lavere konsentrasjon av metabolitter i galle hos hunner. I denne studien ble det funnet

signifikant høyere CYP1A aktivitet, EROD, i hanner sammenlignet med hunner, men dette var imidlertid i ytre Oslofjord. Det kan tenkes at variasjon i datasettet har maskert kjønnsforskjeller i CYP1A aktivitet i indre Oslofjord, ettersom hanner i indre Oslofjord hadde en høyere medianverdi enn hunner selv om dette ikke var signifikant. Dersom kjønnsforskjellene i disse markørene skyldtes hemming av CYP1A aktivitet fra kjønnshormoner ville man imidlertid forventet en korrelasjon mellom GSI og PAH-metabolitter samt EROD. En svak korrelasjon ble observert mellom GSI og 1-hydroksyfenantren, men ingen korrelasjon ble funnet mellom EROD og GSI. Dette kan tyde på at andre faktorer forårsaket kjønnsforskjellene, men hva disse kan ha vært er uklart.

Det ble i PCA analysen funnet sterk korrelasjon mellom de to PAH-metabolittene, hvilket viser at forholdet mellom 1-hydroksyfenantren og 1-hydroksypyren er likt hos torsk. Dette kan tyde på at eksponering for fenantren og pyren stammer fra samme kilde, for eksempel tilstedeværelse av punktkilder langs strekninger som er tungt trafikkert av båter.

Det konkluderes med at torsk fra indre Oslofjord er eksponert for PAHer i en høyere grad enn torsk fra ytre Oslofjord.

4.6 Cytokrom P450 i lever

Det ble funnet høyere verdier for både aktivitet og proteinmengde av cytokrom P450 1A (CYP1A), målt som henholdsvis EROD aktivitet og ved ELOSA, i indre Oslofjord sammenlignet med ytre Oslofjord. Dette indikerer at torsk fra indre Oslofjord er eksponert for CYP1A induserende stoffer i en høyere grad enn torsk fra ytre Oslofjord. I tillegg ble det funnet høyere EROD aktivitet i hanner enn i hunner i ytre Oslofjord.

Induksjon av CYP1A skjer ved at forbindelser, både endogene og eksogene, binder til aryl hydrokarbon reseptoren hvilket oppregulerer genet for CYP1A (Hahn 1998). En rekke planare aromatiske hydrokarboner er kjent for å føre til denne induksjonen. Viktige grupper er oppsummert av Whyte et al. (2000) og inkluderer dioksiner, PAHer, polyklorinerte bifenyler (PCBer), polybrominerte bifenyler (PBber) og polyklorinerte tertfenyler (PCTer).

Det ble ikke funnet korrelasjon mellom PAH-metabolitter i galle og aktivitet og konsentrasjon av CYP1A i PCA analysen. Både *in vivo* og *in vitro* studier på regnbueørret (*Oncorhynchus*

mykiss) har vist at verken fenantren eller pyren i seg selv inducerer EROD aktivitet (Gerhart og Carlson 1978, Bols et al. 1999, Behrens et al. 2001, Billiard et al. 2004). I karpefisken *Cyprinus carpio* medførte imidlertid injeksjon av pyren økning i både konsentrasjon og aktivitet av CYP1A (van der Weiden et al. 1994). Tilsvarende resultater ble funnet i en studie hvor torsk og skrubbe ble plassert i bur langs en fjord med PAH og PCB kontaminert sediment, hvor induksjon av CYP1A i lever var signifikant korrelert med PAH-metabolittene til fenantren, pyren og benzo[a]pyren i gallen i begge artene (Beyer et al. 1996).

Ettersom konsentrasjon av PAH-metabolittene ikke forklarte noe av variasjonen i EROD og ELISA resultatene, er det grunn til å anta tilstedeværelse og påvirkning fra andre CYP1A induserende forbindelser i indre Oslofjord. I overvåkningsstudier har det i indre Oslofjord blitt funnet nivåer av PCB i torskelever definert som markert forurenset (konsentrasjoner på over 40 µg/kg lever) siden 1990 (Green et al. 2014), og det fremstår som rimelig å anta at disse forbindelsene kan være med å forklare den økte aktiviteten og proteinmengden observert i indre Oslofjord. Ettersom PCBer er både persistente og lipofile og vil de kunne akkumuleres opp i næringskjeden. Ruus et al. (2012) demonstrerte bioakkumulering av PCB i torsk fra sedimenter i indre Oslofjord, hvor opptak av PCB forkom både gjennom direkte kontakt med sedimentet og ved at torsk spiste børstemark som hadde levd i kontakt med PCB kontaminert sediment.

Flere faktorer er kjent for å påvirke induksjon av CYP1A. Lyons et al. (2011) fant høyere EROD aktivitet i torsk eksponert for råolje ved lav temperatur (2 °C) enn ved høyere temperaturer (7 °C og 10 °C), mens motstridene resultat har blitt observert i sandflyndrer både i felt og i laboriestudier hvor EROD aktivitet var 3 ganger høyere ved 8 °C enn ved 16 °C (Sleiderink et al. 1995). Sleiderink et al. (1995) observerte også redusert mengde CYP1A protein i sandflyndre i områder med høyere temperatur under feltstudiet, men ikke under laboriestudiet. Det antas at temperatur i denne oppgaven ikke har hatt en vesentlig påvirkning på resultatene, ettersom all fisken ble fanget over fire dager og temperaturen antas å være omtrentlig lik mellom de to områdene grunnet geografisk nærhet. Det er også observert reduksjon i EROD aktivitet i regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) etter perioder med sult (Andersson et al. 1985), men kondisjon og vevsindekser indikerte at torsk fra både indre og ytre Oslofjord hadde god næringstilgang slik at det ikke er sannsynlig at dette har hatt en påvirkning. En ytterligere mulig påvirkende faktor er at fisk fra områder som er belastet med CYP1A induserende forbindelser har vist en resistens overfor disse, demonstrert

ved lavere respons ved eksponering for CYP1A induserende forbindelser på både EROD aktivitet og CYP1A mengde (Wirgin og Waldman 2004).

Det er kjent at kjønnsforskjeller kan påvirke EROD aktivitet i kjønnsmodne individer (Whyte et al. 2000). Dette skjer ved at hormoner som 17β -estradiol har en hemmende effekt på EROD aktivitet (Kirby et al. 2007), hvilket resulterer i lavere enzymaktivitet i hunner. Som for PAH-metabolittene, ville man ha forventet en korrelasjon mellom GSI og EROD om kjønns hormoner hadde hemmet aktiviteten. Mangel på korrelasjon mellom disse kan tyde på at forskjellen mellom kjønn stammer fra andre faktorer.

En ytterligere faktor som kan ha påvirket resultatene er reduksjon av EROD aktivitet ved eksponering for eksogene forbindelser. Dioksiner og PCBer som vanligvis induserer EROD vil også kunne ha en hemmende effekt om de når høye nok konsentrasjoner (Whyte et al. 2000). Green et al. (2014) observerte i 2013 høye konsentrasjoner av polybrominerte difenyl etere i lever hos torsk indre Oslofjord, hvor tetrabromodifenyl eter (BDE47) var den mest fremtredende forbindelsen med konsentrasjon i lever på 45,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ lever. Flere polybrominerte difenyl etere, spesielt BDE47, har vist seg å ha en hemmende effekt på dioksinindusert EROD aktivitet (Kuiper et al. 2004). Analyser av sedimenter i indre Oslofjord har påvist tilstedeværelse av høye konsentrasjoner (over 0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ sediment, klassifiseres innenfor miljødirektoratets mest alvorlig tilstandsklasse) av tributyltinn (TBT) (Berge et al. 2013). Flere studier har påvist at TBT kan modulere effekten av CYP1A induserende forbindelser på både EROD aktivitet og CYP1A mengde, hvor både økt og redusert effekt har blitt observert i fisk (Fent og Bucheli 1994, Brüschweiler et al. 1996, Rice og Roszell 1998).

Bakgrunnsnivå for EROD aktivitet har blitt definert som verdier under 145 pmol/min/mg mikrosomal protein (Hylland et al. 2012), hvilket innebærer at samtlige verdier i dette studiet ligger innenfor bakgrunnsnivå tross høyere verdier for torsk indre Oslofjord sammenlignet med torsk fra ytre Oslofjord.

Tidligere studier på effekter av miljøgifter på torsk i indre Oslofjord har vist høyere verdier av både aktivitet og konsentrasjon av CYP1A i torsk fra indre Oslofjord sammenlignet med torsk fra ytre Oslofjord i årene 2008 og fra 2010 frem til dette studiet (Imrik 2010, Bergland 2012, Fredriksen 2013, Bratrud 2014, Erdahl 2014). I 2002 ble det funnet høyere CYP1A konsentrasjon i indre Oslofjord, men ingen forskjell i EROD aktivitet (Holth 2004). I 2009 ble det funnet forskjell i EROD aktivitet (proteinnivå ble dette året ikke målt) men en signifikant

oppregulering av CYP1A mRNA ble observert hos torsk fra indre Oslofjord i forhold til ytre Oslofjord (Nerland 2011). EROD aktiviteten har ligget innenfor bakgrunnsnivået frem til 2011, men det ble i både 2012 og 2013 funnet verdier i indre Oslofjord på over 145 pmol/min/mg mikrosomal protein (Holth 2004, Imrik 2010, Nerland 2011, Bergland 2012, Fredriksen 2013, Bratrud 2014, Erdahl 2014). De forhøyede EROD verdiene disse to årene reflekteres ikke i høyere nivåer av PCB i torskelever eller 1-hydroksypyren i galle i torsk fra indre Oslofjord (Green et al. 2014), og årsaken er ukjent. Disse resultatene tyder på en kronisk høyere eksponering for CYP1A induerende forbindelser i indre Oslofjord sammenlignet med ytre Oslofjord, noe som trolig skyldes både høyere tilførsel og redusert utskiftning av vannmasser i indre Oslofjord.

Det konkluderes med at høyere konsentrasjon og aktivitet av CYP1A i lever hos torsk viser en høyere eksponering for miljøgifter i indre Oslofjord.

4.7 Mikronukleus i erythrocytter

En signifikant høyere andel torsk fra indre Oslofjord hadde mikronukleus i erythrocytter enn torsk fra ytre Oslofjord, men det ble ikke funnet forskjeller mellom kjønnene. Dette indikerer at torsk i indre Oslofjord er utsatt for gentoksiske forbindelser i en høyere grad enn torsk fra ytre Oslofjord.

I PCA analysen var mikronukleusdannelse i erythrocytter assosiert med konsentrasjonen av PAH-metabolitter i galle og svakt med EROD aktivitet. Dette indikerer at PAH-er kan ha bidratt til den økte mikronukleus dannelsen. Flere studier peker på at PAH eksponering har potensiale til å induere mikronukleus dannelsen. Hylland et al. (2008) plasserte torsk i bur nær oljefeltet Staffjord i Nordsjøen og fant økning i mikronukleusfrekvens i levererythrocytter. Tilsvarende resultat, med økt mikronukleus frekvens i erythrocytter fra nyre, ble funnet av Baršienė et al. (2006) hvor torsk ble eksponert for råolje. I sistnevnte studie ble det imidlertid ikke observert økning i mikronukleus i erythrocytter fra perifert blod hos torsk, men det ble funnet signifikant mikronukleus økning i perifert blod hos piggvar. Holth et al. (2011) fant ingen økning i mikronukleus i erythrocytter fra perifert blod i torsk etter eksponering for produsert vann, men diskuterer at det er mulig at dannelsen av mikronukleus vil forekomme ved eksponering over lengre tid. Hose et al. (1987) spekulerer tilsvarende hvorvidt

mikronukleus er mer egnet til å indikere kronisk enn akutt eksponering. Økt mikronukleusdannelse i erythrocytter i perifert blod etter eksponering for PAHer har allikevel blitt observert både i feltstudier (Çavaş og Ergene-Gözükara 2005) og labstudier (Gravato og Santos 2002) for andre fiskearter.

Green et al. (2014) fant som tidligere nevnt høye nivåer av kvikksølv og tetrabromodifenyl eter i torsk fra indre Oslofjord sammenlignet med referanseområder. Kvikksølv, i både organisk og uorganisk form, har vist seg å være gentoksisk, og har evne til å indusere dannelse av mikronukleus i fisk (Al-Sabti 1994, Sanchez-Galan et al. 2001).

Tetrabromodifenyl eter har også vist seg å kunne indusere dannelse av mikronukleus i eksponeringsstudier (Bolognesi et al. 2006). Disse forbindelsene kan i likhet med PAHer ha bidratt til økt mikronukleus i indre Oslofjord

Flere forbindelser har, i tillegg til de allerede nevnt, evne til å indusere mikronukleus dannelse i fisk. Eksempler er toksiner fra giftige alger (Çavaş og Könen 2008), pesticider (Ateeq et al. 2002, Grisolia 2002, Gökalp et al. 2011), diesel olje (Vanzella et al. 2007), tributyltin (Ferraro et al. 2004) og øvrige metaller som arsenikk, bly, kobber og krom (de Lemos et al. 2001, Yadav og Trivedi 2009).

Tidligere studier på effekter av miljøgift på torsk i indre Oslofjord har undersøkt DNA skade i blodceller ved comet-analyse. Dette ble utført i 2008 på erythrocytter (Imrik 2010) og i 2011 på leukocytt (Fredriksen 2013), i begge tilfellene ble det funnet signifikant høyere nivåer av DNA skade hos torsk fra indre Oslofjord sammenlignet med ytre Oslofjord. Disse resultatene indikerer, i likhet med resultatene fra dette studiet, at fisk fra indre Oslofjord er eksponert for gentoksiske forbindelser.

Det konkluderes med at torsk fra indre Oslofjord er eksponert for høyere nivåer av gentoksiske forbindelser enn torsk fra ytre Oslofjord.

4.8 Konklusjoner

Torsk innsamlet fra indre Oslofjord var signifikant eldre enn torsk fra ytre Oslofjord. Torsk fra ytre Oslofjord var både lengre og tyngre enn torsk på samme alder fra indre Oslofjord. Ingen forskjell ble funnet mellom indre og ytre Oslofjord for kondisjon. Torsk fra indre

Oslofjord hadde høyere HSI og GSI enn torsk fra ytre Oslofjord, men ingen forskjell ble funnet ved å sammenligne aldersgruppene separat. Dette tyder på at de ikke var forskjeller i næringstilgang mellom indre og ytre Oslofjord.

Torsk fra indre Oslofjord hadde ikke forskjell i enzymaktivitet av AChE i muskel eller av ALA-D i erythrocytter i forhold til torsk fra ytre Oslofjord. Dette tyder på at torsk fra indre Oslofjord ikke er påvirket av bly eller pesticider i høyere grad enn torsk fra ytre Oslofjord.

Høyere konsentrasjon av PAH-metabolittene 1-hydroksyfenantren og 1-hydroksyfenantren ble funnet i gallen til torsk fra indre Oslofjord i forhold til ytre Oslofjord. Tilsvarende ble det funnet høyere nivåer CYP1A i lever hos torsk fra indre Oslofjord i forhold til torsk fra ytre Oslofjord, målt som EROD aktivitet og som relativ proteinmengde ved ELISA. Bestemmelse av mikronukleus dannelse i erythrocytter viste høyere grad av DNA skade i torsk fra indre Oslofjord i forhold til ytre Oslofjord.

Det ble funnet kjønnsforskjeller innad i områdene hvor hanner hadde høyere verdier for EROD aktivitet i lever, konsentrasjon av 1-hydroksypyren og 1-hydroksyfenantren i gallen enn hunner.

Resultatene fra dette studiet indikerer en høyere eksponering for organiske og genotoksiske miljøgifter i indre Oslofjord i forhold til ytre Oslofjord, og at hanner er eksponert for organiske miljøgifter i høyere grad enn hunner.

4.9 Fremtidige studier

Torsk fra indre Oslofjord viste i dette studiet høyere CYP1A aktivitet (EROD) og mengde i lever enn torsk fra ytre Oslofjord. EROD aktiviteten var under bakgrunnsnivå, men fisk utsatt for CYP1A induserende forbindelser over lengre perioder har vist en lavere EROD respons enn fisk fra upåvirkede områder (Wirgin og Waldman 2004). Etersom torsk fra indre Oslofjord har vært utsatt for CYP1A induserende forbindelser som PCBer og PAHer over flere tiår (Green et al. 2014), er det mulig at de har utviklet en resistens overfor disse. Dette vil i så fall innebære en underestimert av aktivitet og en mulig feilaktig vurdering av effektene av disse forbindelsene. Hvorvidt torsk fra indre Oslofjord har utviklet en resistens kan undersøkes ved å samle torsk fra indre og ytre Oslofjord, holde dem i rent vann over en

lengre periode, for så å eksponere torskene fra hvert område for en lik dose av en CYP1A induserende forbindelse. EROD aktivitet og CYP1A mengde i disse fiskene vil avsløre om torsk fra indre Oslofjord har lavere respons enn torsk fra ytre Oslofjord etter eksponering for like doser.

5 Referanser

Aas E, Baussant T, Balk L, Liewenborg B og Andersen OK (2000a). "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**: 241-258.

Aas E, Beyer J og Goksoyr A (2000b). "Fixed wavelength fluorescence (FF) of bile as a monitoring tool for polyaromatic hydrocarbon exposure in fish: an evaluation of compound specificity, inner filter effect and signal interpretation." *Biomarkers* **5**: 9-23.

Aas E, Beyer J, Jonsson G, Reichert WL og Andersen OK (2001). "Evidence of uptake, biotransformation and DNA binding of polyaromatic hydrocarbons in Atlantic cod and corkwing wrasse caught in the vicinity of an aluminium works." *Marine Environmental Research* **52**: 213-229.

Al-Sabti K (1994). "Micronuclei induced by selenium, mercury, methylmercury and their mixtures in binucleated blocked fish erythrocyte cells." *Mutation Research/Genetic Toxicology* **320**: 157-163.

Al-Sabti K og Metcalfe CD (1995). "Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water." *Mutation Research/Genetic Toxicology* **343**: 121-135.

Altinok I, Capkin E og Boran H (2012). "Mutagenic, genotoxic and enzyme inhibitory effects of carbosulfan in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*." *Pesticide Biochemistry and Physiology* **102**: 61-67.

Andersson T, Koivusaari U og Förllin L (1985). "Xenobiotic biotransformation in the rainbow trout liver and kidney during starvation." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* **82**: 221-225.

Ateeq B, Farah MA, Niamat AM og Ahmad W (2002). "Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **518**: 135-144.

Baalsrud K og Magnusson J (2002). "Indre Oslofjord: natur og miljø." Oslo, Norge: Fagrådet for vann- og avløpsteknisk samarbeid i indre Oslofjord.

Baršienė J, Dedonytė V, Rybakovas A, Andreikėnaitė L og Andersen OK (2006). "Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil." *Aquatic Toxicology* **78**: S99-S104.

Baršienė J, Lyons B, Rybakovas A, Martínez-Gómez C, Andreikėnaitė L, Brooks S og Maes T (2012). "Background document: micronucleus assay as a tool for assessing cytogenetic/DNA damage in marine organisms." I: "Integrated marine environmental

monitoring of chemicals and their effects." Davies I og Vethaak A (ed). ICES Cooperative Research Report No. 315:88-109

Behrens A, Schirmer K, Bols NC og Segner H (2001). "Polycyclic aromatic hydrocarbons as inducers of cytochrome P4501A enzyme activity in the rainbow trout liver cell line, RTL-W1, and in primary cultures of rainbow trout hepatocytes." *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**: 632-643.

Berge J, Ranneklev S, Selvik J og Steen A (2013). "Indre Oslofjord–Sammenstilling av data om miljøgifttilførsler og forekomst av miljøgifter i sediment." NIVA-rapport 6565-2013

Bergland KG (2012). "Effekter av miljøgifter på torsk (*Gadus morhua*) fra indre Oslofjord." Masteroppgave, Universitetet i Oslo.

Bergstad OA, Jørgensen T, Knutsen JA og Berge JA (2008). "Site fidelity of Atlantic cod *Gadus morhua* L. as deduced from telemetry and stable isotope studies." *Journal of Fish Biology* **72**: 131-142.

Beyer J, Sandvik M, Hylland K, Fjeld E, Egaas E, Aas E, Skåre JU og Goksøyr A (1996). "Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) exposed by caging to polluted sediments in Sørfjorden, Norway." *Aquatic Toxicology* **36**: 75-98.

Bhattacharya S (2001). "Stress response to pesticides and heavy metals in fish and other vertebrates." *Proceedings of the Indian National Science Academy* **67**: 215-246.

Billiard SM, Bols NC og Hodson PV (2004). "*In vitro* and *in vivo* comparisons of fish-specific CYP1A induction relative potency factors for selected polycyclic aromatic hydrocarbons." *Ecotoxicology and Environmental Safety* **59**: 292-299.

Björnsson B, Steinarsson A og Oddgeirsson M (2001). "Optimal temperature for growth and feed conversion of immature cod (*Gadus morhua* L.)." *ICES Journal of Marine Science* **58**: 29-38.

Black D og Love RM (1986). "The sequential mobilisation and restoration of energy reserves in tissues of Atlantic cod during starvation and refeeding." *Journal of Comparative Physiology B* **156**: 469-479.

Bolognesi C og Hayashi M (2011). "Micronucleus assay in aquatic animals." *Mutagenesis* **26**: 205-213.

Bolognesi C, Perrone E, Roggieri P, Pampanin DM og Sciutto A (2006). "Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions." *Aquatic Toxicology* **78**: S93-S98.

Bols NC, Schirmer K, Joyce EM, Dixon DG, Greenberg BM og Whyte JJ (1999). "Ability of polycyclic aromatic hydrocarbons to induce 7-ethoxyresorufin-o-deethylase activity in a trout liver cell line." *Ecotoxicology and Environmental Safety* **44**: 118-128.

Brander KM (1995). "The effect of temperature on growth of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.)." *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.

Brüschweiler BJ, Fent K og Würzler FE (1996). "Inhibition of cytochrome P4501A by organotins in fish hepatoma cells plhc-1." *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**: 728-735.

Burke MD og Mayer RT (1974). "Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene." *Drug Metabolism and Disposition* **2**: 583-588.

Çavaş T og Ergene-Gözükara S (2005). "Micronucleus test in fish cells: A bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment." *Environmental and Molecular Mutagenesis* **46**: 64-70.

Çavaş T og Könen S (2008). "In vivo genotoxicity testing of the amnesic shellfish poison (domoic acid) in piscine erythrocytes using the micronucleus test and the comet assay." *Aquatic Toxicology* **90**: 154-159.

Chabot D og Dutil J-D (1999). "Reduced growth of Atlantic cod in non-lethal hypoxic conditions." *Journal of Fish Biology* **55**: 472-491.

de Lemos CT, Rödel PM, Terra NR og Erdtmann B (2001). "Evaluation of basal micronucleus frequency and hexavalent chromium effects in fish erythrocytes." *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**: 1320-1324.

Devi M og Fingerman M (1995). "Inhibition of acetylcholinesterase activity in the central nervous system of the red swamp crayfish, *procambarus clarkii*, by mercury, cadmium, and lead." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **55**: 746-750.

Dignam JD (1990). "Preparation of extracts from higher eukaryotes." *Methods in Enzymology* **182**: 194-203.

Eggens ML og Galgani F (1992). "Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in flatfish: fast determination with a fluorescence plate-reader." *Marine Environmental Research* **33**: 213-221.

Erdahl ES (2014). "Effekter av miljøgifter på torsk (*Gadus morhua*) fra indre Oslofjord." Masteroppgave, Universitetet i Oslo.

- Fent K og Bucheli TD (1994). "Inhibition of hepatic microsomal monooxygenase system by organotins *in vitro* in freshwater fish." *Aquatic Toxicology* **28**: 107-126.
- Ferraro MVM, Fenocchio AS, Mantovani MS, Ribeiro CDO og Cestari MM (2004). "Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests." *Genetics and Molecular Biology* **27**: 103-107.
- Field A, Miles J og Field Z (2012). "Discovering statistics using R." California, USA: SAGE Publications.
- Frasco MF, Colletier JP, Weik M, Carvalho F, Guilhermino L, Stojan J og Fournier D (2007). "Mechanisms of cholinesterase inhibition by inorganic mercury." *FEBS Journal* **274**: 1849-1861.
- Frasco MF, Fournier D, Carvalho F og Guilhermino L (2005). "Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity." *Biomarkers* **10**: 360-375.
- Fredriksen L (2013). "Effects of environmental contaminants on Atlantic cod (*Gadus morhua*) from the inner Oslofjord." Masteroppgave, Universitetet i Oslo.
- Fulton MH og Key PB (2001). "Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects." *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**: 37-45.
- Galgani F og Bocquene G (1990). "*In vitro* inhibition of acetylcholinesterase from four marine species by organophosphates and carbamates." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **45**: 243-249.
- Garcia LM, Castro B, Ribeiro R og Guilhermino L (2000). "Characterization of cholinesterase from guppy (*Poecilia reticulata*) muscle and its *in vitro* inhibition by environmental contaminants." *Biomarkers* **5**: 274-284.
- Gerhart EH og Carlson RM (1978). "Hepatic mixed-function oxidase activity in rainbow trout exposed to several polycyclic aromatic compounds." *Environmental Research* **17**: 284-295.
- Gill TS, Tewari H og Pande J (1990). "Use of the fish enzyme system in monitoring water quality: effects of mercury on tissue enzymes." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* **97**: 287-292.
- Goksøyr A (1991). "A semi-quantitative cytochrome P4501A1 ELISA: a simple method for studying the monooxygenase induction response in environmental monitoring and ecotoxicological testing of fish." *Science of the Total Environment* **101**: 255-262.

- Goksøyr A, Beyer J, Egaas E, Grøsvik BE, Hylland K, Sandvik M og Skaare JU (1996). "Biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus*) and their use in pollution monitoring." *Marine Pollution Bulletin* **33**: 36-45.
- Gravato C og Santos MA (2002). "Juvenile sea bass liver P450, EROD induction, and erythrocytic genotoxic responses to PAH and PAH-like compounds." *Ecotoxicology and Environmental Safety* **51**: 115-127.
- Green NW, Schøyen M, Øxnevad S, Ruus A, Allan I, Hjermann DØ, Høgåsen T, Beylich B, Håvardstun J og Rogne ÅKG (2014). "Contaminants in coastal waters of Norway 2013." NIVA-rapport M-250/2014
- Grisolia CK (2002). "A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **518**: 145-150.
- Grung M, Holth TF, Jacobsen MR 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**: 254-265.
- Gökalp M, Fulya D og Güner U (2011). "Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes of mosquito fish (*Gambusia affinis*) following exposure to the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **726**: 104-108.
- Hahn ME (1998). "The aryl hydrocarbon receptor: a comparative perspective." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* **121**: 23-53.
- Hahn ME, Woodward BL, Stegeman JJ og Kennedy SW (1996). "Rapid assessment of induced cytochrome P4501 A protein and catalytic activity in fish hepatoma cells grown in multiwell plates: Response to TCDD, TCDF, and two planar PCBs." *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**: 582-591.
- Hodson PV (1976). "δ-amino levulinic acid dehydratase activity of fish blood as an indicator of a harmful exposure to lead." *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **33**: 268-271.
- Hodson PV, Blunt BR, Spry DJ og Austen K (1977). "Evaluation of erythrocyte δ-amino levulinic acid dehydratase activity as a short-term indicator in fish of a harmful exposure to lead." *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **34**: 501-508.
- Holth TF (2004). "Effekter av miljøgifter på torsk og skrubbe fra indre Oslofjord." Masteroppgave, Universitetet i Oslo.

Holth TF, Beylich BA, Camus L, Klobučar GIV og Hylland K (2011). "Repeated sampling of Atlantic cod (*Gadus morhua*) for monitoring of nondestructive parameters during exposure to a synthetic produced water." *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* **74**: 555-568.

Hose JE, Cross JN, Smith SG og Diehl D (1987). "Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites off Southern California." *Marine Environmental Research* **22**: 167-176.

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**: 1-9.

Hylland K (2006). "Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ecotoxicology in marine ecosystems." *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* **69**: 109-123.

Hylland K, Ruus A, Børseth J, Bechmann R, Barsiene J, Grung M, Tollefsen K-E og Myhre L (2006). "Biomarkers in monitoring - a review." NIVA-rapport 5205-2006

Hylland K, Tollefsen K-E, Ruus A, Jonsson G, Sundt RC, Sanni S, Utvik TIR, Johnsen S, Nilssen I og Pinturier L (2008). "Water column monitoring near oil installations in the North Sea 2001–2004." *Marine Pollution Bulletin* **56**: 414-429.

Hylland K, Vethaak D og Davies IM (2012). "Background document: polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in fish bile." I: "Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects." Davies I og Vethaak A (ed). ICES Cooperative Research Report No. 315:26-29

Imrik ECR (2010). "Effekter av miljøgifter på torsk fra Indre Oslofjord." Masteroppgave, Universitetet i Oslo.

Jaffe EK (2004). "The porphobilinogen synthase catalyzed reaction mechanism." *Bioorganic chemistry* **32**: 316-325.

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**: 1-19.

Jobling M, Meløy OH, Dos Santos J og Christiansen B (1994). "The compensatory growth response of the Atlantic cod: effects of nutritional history." *Aquaculture International* **2**: 75-90.

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**: 367-369.

- Kelada SN, Shelton E, Kaufmann RB og Khoury MJ (2001). "δ-Aminolevulinic acid dehydratase genotype and lead toxicity: a HuGE review." *American journal of epidemiology* **154**: 1-13.
- Kelly C, Ayoko G, Brown R og Swaroop C (2005). "Underwater emissions from a two-stroke outboard engine: a comparison between an EAL and an equivalent mineral lubricant." *Materials & design* **26**: 609-617.
- Kirby MF, Morris S, Hurst M, Kirby SJ, Neall P, Tylor T og Fagg A (2000). "The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flesus*) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries." *Marine Pollution Bulletin* **40**: 780-791.
- Kirby MF, Smith AJ, Rooke J, Neall P, Scott AP og Katsiadaki I (2007). "Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and vitellogenin (VTG) in flounder (*Platichthys flesus*): system interaction, crosstalk and implications for monitoring." *Aquatic Toxicology* **81**: 233-244.
- Knutsen H, Jorde P, André C og Stenseth N (2003). "Fine-scaled geographical population structuring in a highly mobile marine species: the Atlantic cod." *Molecular ecology* **12**: 385-394.
- Koehler ME og Hardy JT (1999). "Effects of outboard motor emissions on early development of the killifish *Oryzias latipes*." *Northwest Science* **73**: 277-282.
- Krahn MM, Burrows DG, Ylitalo GM, Brown DW, Wigren CA, Collier TK, Chan SL 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**: 116-126.
- Krohn M, Reidy S og Kerr S (1997). "Bioenergetic analysis of the effects of temperature and prey availability on growth and condition of northern cod (*Gadus morhua*)." *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **54**: 113-121.
- Kuiper RV, Bergman Å, Vos JG og van den Berg M (2004). "Some polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants with wide environmental distribution inhibit TCDD-induced EROD activity in primary cultured carp (*Cyprinus carpio*) hepatocytes." *Aquatic Toxicology* **68**: 129-139.
- Labrot F (1996). "*In vitro* and *in vivo* studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: Lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species." *Biomarkers* **1**: 21-28.
- Lambert Y og Dutil J-D (1997a). "Can simple condition indices be used to monitor and quantify seasonal changes in the energy reserves of cod (*Gadus morhua*)?" *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **54**: 104-112.

Lambert Y og Dutil J-D (1997b). "Condition and energy reserves of Atlantic cod (*Gadus morhua*) during the collapse of the northern Gulf of St. Lawrence stock." *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **54**: 2388-2400.

Lambert Y og Dutil J-D (2001). "Food intake and growth of adult Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) reared under different conditions of stocking density, feeding frequency and size-grading." *Aquaculture* **192**: 233-247.

Lambert Y, Dutil J-D og Munro J (1994). "Effects of intermediate and low salinity conditions on growth rate and food conversion of Atlantic cod (*Gadus morhua*)." *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **51**: 1569-1576.

Levene H (1960). "Robust tests for equality of variances." I: "Contributions to probability and statistics: Essays in honor of Harold Hotelling." Olkin I (ed). California, USA: Stanford University Press: 278-292.

Liao C-Y, Fu J-J, Shi J-B, Zhou Q-F, Yuan C-G og Jiang G-B (2006). "Methylmercury accumulation, histopathology effects, and cholinesterase activity alterations in medaka (*Oryzias latipes*) following sublethal exposure to methylmercury chloride." *Environmental toxicology and pharmacology* **22**: 225-233.

Lombardi PE, Peri SI og Guerrero NRV (2010). "ALA-D and ALA-D reactivated as biomarkers of lead contamination in the fish *Prochilodus lineatus*." *Ecotoxicology and Environmental Safety* **73**: 1704-1711.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL og Randall RJ (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *Journal of Biological Chemistry* **193**: 265-275.

Lyons M, Wong D, Mulder I, Lee K og Burridge L (2011). "The influence of water temperature on induced liver EROD activity in Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to crude oil and oil dispersants." *Ecotoxicology and Environmental Safety* **74**: 904-910.

Mello L og Rose G (2005). "Seasonal cycles in weight and condition in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) in relation to fisheries." *ICES Journal of Marine Science* **62**: 1006-1015.

Molvær J, Knutzen J, Magnusson J, Rygg B, Skei J og Sørensen J (1997). "Klassifisering av miljøkvalitet i fjorder og kystvann - Veiledning." SFT-rapport TA-1467/1997

Nakagawa H, Sato T og Kubo H (1995). "Method not requiring mercuric chloride for the determination of activity of 5-aminolevulinic acid dehydratase in blood of carp *Cyprinus carpio*." *Fisheries science* **61**: 97-99.

Neff JM, Stout SA og Gunster DG (2005). "Ecological risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments: identifying sources and ecological hazard." *Integrated Environmental Assessment and Management* **1**: 22-33.

Nerland IL (2011). "Effects of environmental toxicants in Atlantic cod (*Gadus morhua*) from the Inner Oslofjord." Masteroppgave, Universitetet i Oslo.

Olsen E, Knutsen H, Gjøsæter J, Jorde P, Knutsen J og Stenseth N (2004). "Life-history variation among local populations of Atlantic cod from the Norwegian Skagerrak coast." *Journal of Fish Biology* **64**: 1725-1730.

Page DS, Boehm PD, Douglas GS, Bence AE, Burns WA og Mankiewicz PJ (1999). "Pyrogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments record past human activity: a case study in Prince William Sound, Alaska." *Marine Pollution Bulletin* **38**: 247-260.

Payne J, Mathieu A, Melvin W og Fancey 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**: 225-231.

Peakall DB (1994). "The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction." *Ecotoxicology* **3**: 157-160.

Pearson K (1900). "On the criterion that a given system of deviations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling." *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* **50**: 157-175.

Post G og Leasure R (1974). "Sublethal effect of malathion to three salmonid species." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **12**: 312-319.

R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.

Rice LE og Roszell CD (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**: 197-212.

Ruus A, Daae IA og Hylland K (2012). "Accumulation of polychlorinated biphenyls from contaminated sediment by Atlantic cod (*Gadus morhua*): Direct accumulation from resuspended sediment and dietary accumulation via the polychaete *Nereis virens*." *Environmental Toxicology and Chemistry* **31**: 2472-2481.

Ruus A, Schaanning M, Øxnevad S og Hylland K (2005). "Experimental results on bioaccumulation of metals and organic contaminants from marine sediments." *Aquatic Toxicology* **72**: 273-292.

Safe SH (1994). "Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment." *Critical Reviews in Toxicology* **24**: 87-149.

Sanchez-Galan S, Linde AR, Ayllon F og Garcia-Vazquez E (2001). "Induction of micronuclei in eel (*Anguilla anguilla* L.) by heavy metals." *Ecotoxicology and Environmental Safety* **49**: 139-143.

Sarasquete C og Segner H (2000). "Cytochrome P4501A (CYP1A) in teleostean fishes. A review of immunohistochemical studies." *Science of the Total Environment* **247**: 313-332.

Schmitt CJ, Whyte JJ, Roberts AP, Annis ML, May TW og Tillitt DE (2007). "Biomarkers of metals exposure in fish from lead-zinc mining areas of Southeastern Missouri, USA." *Ecotoxicology and Environmental Safety* **67**: 31-47.

Shapiro SS og Wilk MB (1965). "An analysis of variance test for normality (complete samples)." *Biometrika* **52**: 591-611.

Sherwood GD, Rideout RM, Fudge SB og Rose GA (2007). "Influence of diet on growth, condition and reproductive capacity in Newfoundland and Labrador cod (*Gadus morhua*): Insights from stable carbon isotopes ($\delta^{13}C$)." *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **54**: 2794-2809.

Simons TJ (1995). "The affinity of human erythrocyte porphobilinogen synthase for Zn^{2+} and Pb^{2+} ." *European Journal of Biochemistry* **234**: 178-183.

Sleiderink HM, Beyer J, Scholtens E, Goksøyr A, Nieuwenhuize J, Van Liere JM, Everaarts JM og Boon JP (1995). "Influence of temperature and polyaromatic contaminants on CYP1A levels in North Sea dab (*Limanda limanda*)." *Aquatic Toxicology* **32**: 189-209.

Sørensen P (2012). "Prioriterte miljøgifter: Nasjonale utslipp—status 2010." KLIF-rapport TA-2981/2012

Thain JE, Vethaak AD og Hylland K (2008). "Contaminants in marine ecosystems: developing an integrated indicator framework using biological-effect techniques." *ICES Journal of Marine Science* **65**: 1508-1514.

Thaulow H og Faafeng B (2014). "Indre Oslofjord 2013—status, trusler og tiltak." NIVA-rapport 6593-2013

Tukey JW (1949). "Comparing individual means in the analysis of variance." *Biometrics* **5**: 99-114.

van der Oost R, Beyer J og Vermeulen NP (2003). "Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review." *Environmental toxicology and pharmacology* **13**: 57-149.

van der Weiden MEJ, Hanegraaf FHM, Seinen W, van den Berg M, Eggens ML og Celander M (1994). "Temporal induction of cytochrome P450 1A in the mirror carp (*Cyprinus carpio*)

after administration of several polycyclic aromatic hydrocarbons." *Environmental Toxicology and Chemistry* **13**: 797-802.

Vanzella TP, Martinez CBR og Cólus IMS (2007). "Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **631**: 36-43.

Vuorinen PJ, Keinänen M, Vuontisjärvi H, Baršienė J, Broeg K, Förlin L, Gercken J, Kopecka J, Köhler A og Parkkonen J (2006). "Use of biliary PAH metabolites as a biomarker of pollution in fish from the Baltic Sea." *Marine Pollution Bulletin* **53**: 479-487.

Walker CH, Sibly R, Hopkin S og Peakall DB (2012). "Principles of ecotoxicology." Florida, USA: CRC Press.

Wania F (1999). "On the origin of elevated levels of persistent chemicals in the environment." *Environmental Science and Pollution Research* **6**: 11-19.

Whyte JJ, Jung RE, Schmitt CJ og Tillitt DE (2000). "Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure." *Critical Reviews in Toxicology* **30**: 347-570.

Wilcock RJ, Corban GA, Northcott GL, Wilkins AL og Langdon AG (1996). "Persistence of polycyclic aromatic compounds of different molecular size and water solubility in surficial sediment of an intertidal sandflat." *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**: 670-676.

Wilcoxon F (1945). "Individual Comparisons by Ranking Methods." *Biometrics Bulletin* **1**: 80-83.

Williams T og Bedford BC (1974). "The use of otoliths for age determination." I: "The Proceedings of an international symposium on the ageing of fish." Bagenal TB (ed). Old Woking, England, Unwin Brothers Ltd.: 114-123.

Wirgin I og Waldman JR (2004). "Resistance to contaminants in North American fish populations." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **552**: 73-100.

Wootton RJ (1998). "Ecology of Teleost Fishes." Dordrecht, Nederland: Kluwer Academic Publishers.

Yadav KK og Trivedi SP (2009). "Sublethal exposure of heavy metals induces micronuclei in fish, *Channa punctata*." *Chemosphere* **77**: 1495-1500.

Yaragina NA og Marshall CT (2000). "Trophic influences on interannual and seasonal variation in the liver condition index of Northeast Arctic cod (*Gadus morhua*)." *ICES Journal of Marine Science* **57**: 42-55.

6 Vedlegg

Kjemikalieliste

Tabell 6.1 Liste over kjemikalier brukt i analysene med produsent og produktnummer.

Kjemikalie	Produsent	Produktnummer
Acetyltiokolinjodid	Sigma-Aldrich	A5751
Askorbinsyre	Sigma-Aldrich	255564
BisBenzimide 33258 (Hoechst)	Sigma-Aldrich	B1155
Bovint serum albumin	Sigma-Aldrich	A7030
Dimetyl sulfoksid (DMSO)	Alfa Aesar	36480
Ditiobisnitrobenzosyre	Sigma-Aldrich	D8130
Ditiotreitotol	Fluka	43819
Eddiksyre	Sigma-Aldrich	33209
EDTA	VWR Chemicals	20302
Geit anti-kanin IgG konjugert med HRO	Sigma-Aldrich	A0545
Glyceraldehyd	Sigma-Aldrich	G6257
Glyserol	Sigma-Aldrich	G5516
Heparin	Sigma-Aldrich	H3393
Kaliumfosfat, dibasisk	Sigma-Aldrich	221317
Kaliumfosfat, monobasisk	Sigma-Aldrich	P5655
Kaliumklorid	Merck	1.04936
Kanin anti-fisk CYP antistoff	Biosense Laboratories	C02401201
Karbonat-bikarbonat buffer	Sigma-Aldrich	C3041
Metanol	Sigma-Aldrich	32213N
Natriumbikarbonat	Biochrom	L1703
Natriumfosfat, dibasisk	AppliChem	A2943
Natriumfosfat, monobasisk	Sigma-Aldrich	71504
Natriumhydroksid	AnalaR NORMAPUR	28244
Natriumklorid	Sigma-Aldrich	31434
Perklorsyre	Prolabo	589.293
Porfobilinogen	Sigma-Aldrich	P1134
Protein assay reagent A	Bio-Rad	500-0113
Protein assay reagent B	Bio-Rad	500-0114
Resorofin etyl eter	Sigma-Aldrich	E3763
Resorufin natrium salt	Sigma-Aldrich	R3257
Saltsyre	Sigma-Aldrich	30721
Sitronsyre	Sigma-Aldrich	251275
Svovelsyre	MERCK	100731
TMP Plus 2	Kem-En-Tech	4395
Trifenylamin	Sigma-Aldrich	T81604
Trikloroeddiksyre	MERCK	1.00807

Triton X-100	Sigma-Aldrich	X-100
Trizma Base	Sigma-Aldrich	T1503
Trizma Hydroklorid	Sigma-Aldrich	T3253
Tween-20	Sigma-Aldrich	P1379
β -NADPH	Sigma-Aldrich	N1630
δ -Aminolevulinsyre	Sigma-Aldrich	A3785
ρ -Dimetylaminobenzaldehyd	Sigma-Aldrich	D2004
β -Glukuronidase/Aryl sulfatase	MERCK	1.04114

Rådata

Tabell 6.2 Opprinnelse, kjønn, alder, lengde, vekt, kondisjon og vevsindekser for torsk.

Løpenummer	Opprinnelse	Kjønn	Alder	Lengde, cm	Vekt, gram	Somatisk vekt, gram	Levervekt, gram	Gonadevekt, gram
1	Ytre Oslofjord	M	3	47	941	827	32,4	11,5
2	Ytre Oslofjord	F	1	37	488	446,2	19,5	1
3	Ytre Oslofjord	M	2	43	702	619,5	7,7	5,6
4	Ytre Oslofjord	F	2	50	1084	962	22,7	7,5
5	Ytre Oslofjord	M	2	52,5	1391	1231,5	40	13
6	Ytre Oslofjord	M	2	44,5	806	733,5	18,6	2,1
7	Ytre Oslofjord	M	2	48,5	990	876	18,5	13,7
8	Ytre Oslofjord	F	2	44	776	699	14	8,9
9	Ytre Oslofjord	F	2	47,5	957	820	13,7	5,6
10	Ytre Oslofjord	M	3	51	1252	1100	31,8	16,1
11	Ytre Oslofjord	M	2	41	672	584	16,8	5,4
12	Ytre Oslofjord	F	3	46	941	791	13,7	7
13	Ytre Oslofjord	F	2	40,5	567	513	6,1	3,5
14	Ytre Oslofjord	F	1	56,5	856	774	11,8	3,2
15	Ytre Oslofjord	F	2	43	781	707	7,5	2,3
16	Ytre Oslofjord	F	2	50,5	1090	1013	11,6	5,6
17	Ytre Oslofjord	M	3	49,5	1226	1019	25,1	20,9
18	Ytre Oslofjord	M	2	47,5	939	798	18	4,1
19	Ytre Oslofjord	F	1	47	949	830	17,9	9,5
20	Ytre Oslofjord	M	2	46	945	830	11,6	0,8
21	Ytre Oslofjord	F	3	44,5	855	705	21,8	21,7
22	Ytre Oslofjord	F	2	38,5	515	475	7,6	2,1
23	Ytre Oslofjord	F	2	37,5	445	396	8,3	9,1
24	Ytre Oslofjord	M	3	45	869	774	14,2	3,2
25	Ytre Oslofjord	F	2	48	990	928	10,5	3,6
26	Ytre Oslofjord	M	3	46	884	791	15,6	3,6

27	Ytre Oslofjord	F	2	46,5	1065	959	11,7	5,4
28	Ytre Oslofjord	M	2	48	1009	932	13	9,3
29	Ytre Oslofjord	F	2	53	1348	1198	14,1	9,6
30	Ytre Oslofjord	F	2	49	971	894	10,7	4,9
31	Ytre Oslofjord	M	2	50	1193	1032	30,9	14,7
32	Ytre Oslofjord	M	2	41,5	603	534	6	0,6
33	Ytre Oslofjord	F	2	46	856	766	13,1	3,5
34	Ytre Oslofjord	M	2	43	710	624	7,1	1,2
35	Ytre Oslofjord	M	2	43	818	732	28,9	15,2
36	Ytre Oslofjord	M	2	46,5	924	801	16,3	10,6
37	Ytre Oslofjord	M	2	48	1056	900	19,3	10,8
38	Ytre Oslofjord	F	2	47,5	1028	896	13,3	15,4
39	Ytre Oslofjord	F	2	47,5	1053	947	34	11,5
40	Ytre Oslofjord	F	2	55	1414	1209	35	8,6
41	Indre Oslofjord	F	2	45	796	710	17,7	11,4
42	Indre Oslofjord	F	2	45	771	677	21,8	14,4
43	Indre Oslofjord	F	2	47,5	918	853	31,5	13,8
44	Indre Oslofjord	M	3	46,5	903	812	30	13,1
45	Indre Oslofjord	F	3	45,5	823	746	22	20,3
46	Indre Oslofjord	M	3	44	754	672	18,9	15,6
47	Indre Oslofjord	F	4	45,5	792	712	15,2	8,6
48	Indre Oslofjord	F	3	55,5	1340	1178	16,3	5,6
49	Indre Oslofjord	F	3	43,5	875	723	37	26,2
50	Indre Oslofjord	F	3	44,5	812	734	15,7	7,3
51	Indre Oslofjord	F	4	43,5	863	698	25,5	8,6
52	Indre Oslofjord	F	3	43	723	655	15	11,2
53	Indre Oslofjord	F	3	44,5	725	642	10,9	9,5
54	Indre Oslofjord	F	4	49	1102	961	40	19,8
55	Indre Oslofjord	M	4	48	938	816	34,1	12,8
56	Indre Oslofjord	M	2	53,5	1149	1034	19,4	1,6
57	Indre Oslofjord	M	2	46,5	979	880	17,9	0,9
58	Indre Oslofjord	F	3	39,5	579	491	9,9	13,6
59	Indre Oslofjord	M	4	45,5	836	732	27,8	17,1
60	Indre Oslofjord	M	4	43,5	767	678	21,8	9,3
61	Indre Oslofjord	M	5	44	784	706	25,2	11,6
62	Indre Oslofjord	M	3	40	711	611,5	22,2	18,7
63	Indre Oslofjord	M	3	46,5	909	817	10,4	0,8
64	Indre Oslofjord	F	3	48	1138	979,5	59	17,6
65	Indre Oslofjord	M	4	44,5	820	718	20,5	33,5
66	Indre Oslofjord	F	3	42,5	828	722	31,8	23
67	Indre Oslofjord	F	3	43,5	805	712	15,2	12
68	Indre Oslofjord	M	3	46	998	865	22,8	11,5
69	Indre Oslofjord	F	3	50	1126	993	21,8	16,4
70	Indre Oslofjord	F	3	44,5	878	770	22,1	14,4
71	Indre Oslofjord	F	4	48	1006	918	25,2	17,8
72	Indre Oslofjord	M	2	42,5	736	634	24	31,1

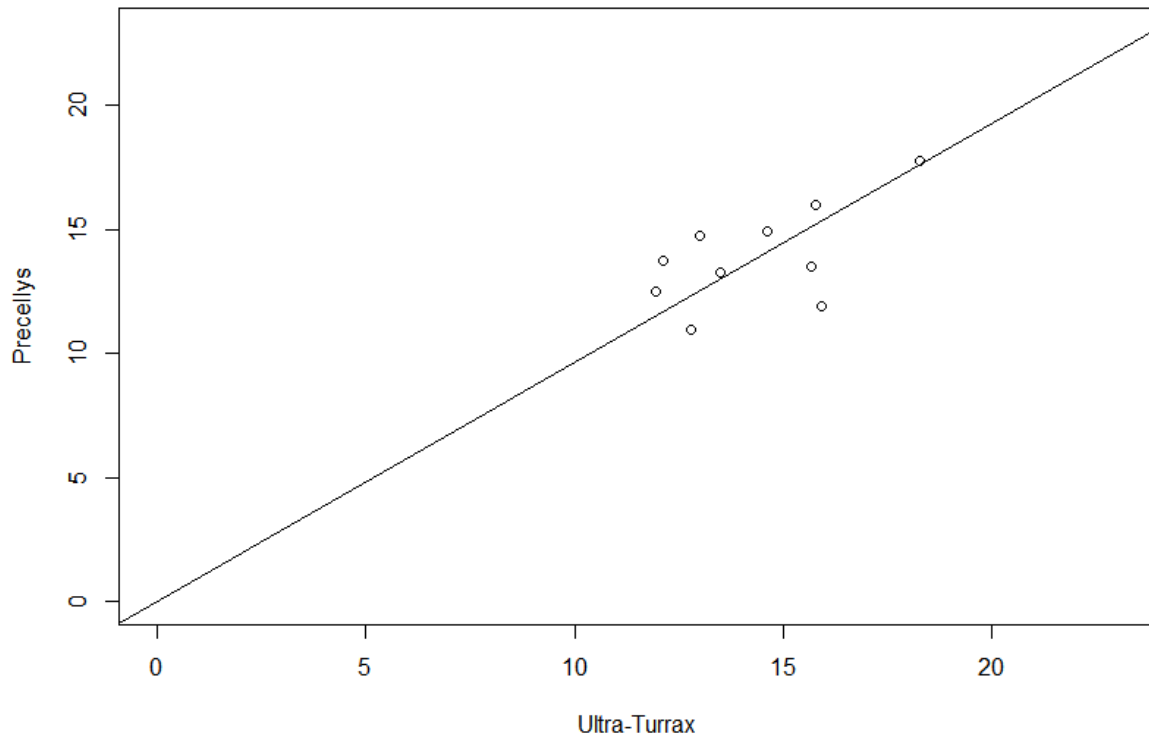
73	Indre Oslofjord	F	3	40,5	612	542	8,1	1,8
74	Indre Oslofjord	F	4	44	888	763	27,8	15,7
75	Indre Oslofjord	M	4	43	820	740	12,1	5,3
76	Indre Oslofjord	M	3	37	526	56	13,5	20,4
77	Indre Oslofjord	M	3	47	940	809	14,2	6,2
78	Indre Oslofjord	M	3	40	558	491	8,3	5,1
79	Indre Oslofjord	M	3	42,5	785	688	24,1	14,6
80	Indre Oslofjord	M	2	39	560	510	5,3	0,3

Tabell 6.3 Kondisjon, vevsindeks og biomarkør-respons for torsk fra analysene

Løpenu mmer	K	HSI	GSI	AchE, nmol/mi n/mg protein	ALA-D, ng PBG/min /mg protein	1-OH- fenantre n, ng/g galle	1-OH- pyren, ng/g galle	EROD, pmol/mi n/mg protein	ELISA	MN Frekvens (MN per celler tellet)
1	0,91	3,92	1,39	9,96	28,24	10,98	1,74	20,58	0,231	0,000000
2	0,96	4,37	0,22	15,90	37,31	15,85	59,81	19,64	0,077	0,000000
3	0,88	1,24	0,90	16,00	29,87	6,68	50,60	43,94	0,101	0,000000
4	0,87	2,36	0,78	8,39	18,99	3,19	22,93	38,63	0,162	0,000493
5	0,96	3,25	1,06	10,79	33,40	8,33	40,68	17,17	NA	0,000000
6	0,91	2,54	0,29	9,87	28,56	6,37	44,53	38,90	0,173	0,000000
7	0,87	2,11	1,56	11,72	30,44	NA	NA	31,67	0,151	0,000000
8	0,91	2,00	1,27	10,66	26,81	4,99	18,44	34,99	0,101	0,000993
9	0,89	1,67	0,68	4,93	20,60	4,17	22,99	13,89	0,337	0,000499
10	0,94	2,89	1,46	10,99	25,35	6,51	41,93	18,17	0,196	0,000427
11	0,98	2,88	0,92	4,71	33,87	NA	NA	28,54	0,179	0,000000
12	0,97	1,73	0,88	9,08	17,38	4,15	26,52	8,02	0,141	0,000000
13	0,85	1,19	0,68	12,86	26,60	NA	NA	9,49	0,163	0,000489
14	0,47	1,52	0,41	11,90	15,72	5,09	26,86	17,48	0,191	0,000000
15	0,98	1,06	0,33	14,76	23,74	5,61	31,12	1,09	0,171	0,001481
16	0,85	1,15	0,55	12,67	NA	6,28	30,83	5,22	0,112	0,000000
17	1,01	2,46	2,05	12,04	41,75	10,04	52,56	58,93	0,178	0,000000
18	0,88	2,26	0,51	13,06	21,72	5,69	29,81	34,85	0,200	0,000000
19	0,91	2,16	1,14	9,97	31,65	7,26	28,56	14,25	0,190	0,000000
20	0,97	1,40	0,10	15,87	26,04	4,11	15,73	13,54	0,185	0,000000
21	0,97	3,09	3,08	9,28	24,52	10,02	55,89	9,64	0,056	NA
22	0,90	1,60	0,44	13,53	27,58	4,91	36,73	22,51	0,091	0,000000
23	0,84	2,10	2,30	10,90	31,63	7,64	38,43	24,05	0,157	0,000487
24	0,95	1,83	0,41	6,08	31,60	7,13	28,75	10,41	0,112	0,000495
25	0,90	1,13	0,39	5,18	29,06	6,75	34,95	24,33	0,055	0,000000
26	0,91	1,97	0,46	13,93	22,90	NA	NA	28,10	0,216	0,000000
27	1,06	1,22	0,56	11,52	35,38	4,85	32,87	9,67	0,265	0,000000
28	0,91	1,39	1,00	12,52	22,84	9,23	44,95	41,70	0,142	0,000000
29	0,91	1,18	0,80	13,29	33,48	4,19	33,50	12,44	0,180	NA
30	0,83	1,20	0,55	10,50	18,50	5,15	27,59	15,71	0,260	0,000000
31	0,95	2,99	1,42	11,21	26,71	6,51	27,52	43,43	0,197	0,000000
32	0,84	1,12	0,11	15,99	43,93	7,36	54,02	15,46	0,071	0,000000
33	0,88	1,71	0,46	11,23	18,90	5,42	34,29	39,25	0,219	0,000000
34	0,89	1,14	0,19	12,26	NA	4,19	22,96	7,20	0,183	0,000987
35	1,03	3,95	2,08	10,09	42,93	6,97	40,15	19,23	0,244	0,000000
36	0,92	2,03	1,32	11,33	26,36	5,61	1,11	28,77	0,158	0,000495
37	0,95	2,14	1,20	12,18	39,04	NA	11,82	13,15	0,120	0,000000

38	0,96	1,48	1,72	11,18	21,07	9,63	34,17	7,09	0,091	0,000000
39	0,98	3,59	1,21	11,41	24,72	7,77	40,16	23,39	0,165	0,000000
40	0,85	2,89	0,71	7,57	44,18	11,04	30,65	24,91	0,173	0,000000
41	0,87	2,49	1,61	12,98	29,20	7,51	115,24	70,32	0,261	0,000000
42	0,85	3,22	2,13	19,02	35,90	7,11	163,89	59,47	0,153	0,000000
43	0,86	3,69	1,62	15,27	15,87	7,42	114,26	38,15	0,216	0,000000
44	0,90	3,69	1,61	11,28	23,31	20,87	286,27	45,63	0,080	0,000487
45	0,87	2,95	2,72	8,72	22,68	10,48	148,53	19,33	0,064	0,000991
46	0,89	2,81	2,32	11,63	21,87	9,00	231,44	33,97	0,123	0,000000
47	0,84	2,13	1,21	5,98	18,35	4,48	66,78	104,34	0,276	0,000000
48	0,78	1,38	0,48	11,92	22,41	8,96	136,48	31,96	0,144	0,000000
49	1,06	5,12	3,62	11,96	36,15	9,76	218,71	13,58	0,162	0,000979
50	0,92	2,14	0,99	13,38	20,55	8,83	124,86	24,63	NA	0,000459
51	1,05	3,65	1,23	27,51	29,26	17,82	281,35	30,70	0,095	0,000499
52	0,91	2,29	1,71	12,53	31,73	6,62	109,24	37,89	0,194	0,000498
53	0,82	1,70	1,48	14,04	18,79	3,71	51,91	47,46	0,291	0,000977
54	0,94	4,16	2,06	12,60	24,03	8,44	138,32	23,02	0,212	0,000498
55	0,85	4,18	1,57	11,56	23,89	6,28	114,75	41,43	0,316	0,000000
56	0,75	1,88	0,15	12,53	19,55	14,59	226,00	41,24	0,260	0,001496
57	0,97	2,03	0,10	12,62	46,35	9,29	172,60	46,12	0,115	0,000000
58	0,94	2,02	2,77	17,09	9,76	4,16	62,54	19,35	0,191	0,000000
59	0,89	3,80	2,34	3,16	NA	7,61	148,09	49,03	0,194	0,000498
60	0,93	3,22	1,37	8,57	21,28	22,77	308,29	74,66	0,250	0,000996
61	0,92	3,57	1,64	13,08	NA	9,36	143,99	33,08	0,245	0,000491
62	1,11	3,63	3,06	14,93	NA	10,78	197,56	89,00	0,286	0,000483
63	0,90	1,27	0,10	9,96	35,05	12,14	113,35	32,64	0,115	0,000473
64	1,03	6,02	1,80	4,28	24,33	6,75	124,73	29,31	0,188	0,000000
65	0,93	2,86	4,67	14,97	24,50	9,02	247,01	27,84	0,165	0,000495
66	1,08	4,40	3,19	13,74	35,50	11,46	172,38	19,21	0,146	0,000000
67	0,98	2,13	1,69	13,51	45,29	9,24	127,12	27,64	0,175	0,000497
68	1,03	2,64	1,33	3,00	25,32	7,45	89,11	55,48	0,159	0,000900
69	0,90	2,20	1,65	11,75	23,75	5,51	88,44	55,31	0,361	0,000000
70	1,00	2,87	1,87	12,09	33,73	3,21	59,77	25,37	0,239	0,000000
71	0,91	2,75	1,94	3,79	33,20	7,31	115,64	41,16	0,258	0,000484
72	0,96	3,79	4,91	8,83	39,54	10,96	201,03	30,56	0,230	0,000498
73	0,92	1,49	0,33	13,53	32,35	7,80	137,51	48,52	0,254	0,000000
74	1,04	3,64	2,06	12,37	22,63	6,88	115,02	44,23	0,198	0,000000
75	1,03	1,64	0,72	5,00	19,87	9,21	136,80	38,36	0,285	0,001493
76	1,04	2,96	4,47	13,25	32,88	9,44	198,01	22,10	0,078	0,000996
77	0,91	1,76	0,77	10,44	11,24	8,51	127,23	64,07	0,132	0,000000
78	0,87	1,69	1,04	17,78	34,74	4,43	76,14	38,14	0,325	0,000000
79	1,02	3,50	2,12	12,23	18,87	22,40	299,30	28,69	0,289	0,000000
80	0,94	1,04	0,06	11,17	35,85	10,72	247,95	64,01	0,307	0,000485

Metodesammenlikning



Figur 6.1 Acetylkolinesterase aktivitet, uttrykt som nmol 5-thio-2-nitrobenzoylamin/min/mg protein, i muskel fra prøver homogenisert med Precellys og Ultra-Turrax plottet mot hverandre.