

63

Reg. i Fønis
Kopi NSD - sendes.

HAVFORSKNINGSINSTITUTTET[®]
INSTITUTE OF MARINE RESEARCH

Torhild Dokken Liseter
Forskningsrådet
Divisjon for store satsinger
Pb. 2700 St. Hanshaugen
N-0131 Oslo

21. 03. 05.

Deres ref.:
Your ref.:


Vår ref.:
Our ref.:

Bergen, 16. mars, 2005

Sluttrapport fra prosjekt 152232/s40-Hormonforstyrrende effekter av miljøgifter i produksjonsvann fra oljeinstallasjoner

Refererer til sluttrapport sendt på mail 06.03.05. Vedlagt finnes utfylt skjema med oversikt over faktiske kostnader med mer, faglig rapport & 2 publikasjonsskjema.

Med vennlig hilsen


Asbjørn Svardal

64

Prosjektnr.: 152232/S40
 Saksbehandler: Nina Hedlund, divisjon for store satsinger
 Budsjettår: 2005
 Prosjektperiode: 1.4.2002 - 1.4.2005
 Program/aktivitet: Langtidsvirkn. av utslipp til
 Prosjekttype: Prosjektstøtte
 Fagkode: 489 - Økotoksikologi

Sluttrapport

Returneres ved prosjektslutt til Norges

forskningsråd sammen med eventuelle vedlegg

Vennligst kontroller at alle forhåndsutfylte opplysninger stemmer. Ved feil og nye opplysninger krysser man av i korrekt boks og skriver inn den oppdaterte informasjonen enten på egne ark eller ved å fylle ut sluttrapportskjemaet som ligger på Forskningsrådets hjemmeside på Internett. Dette delvis forhåndsutfylte skjemaet skal altså returneres til Forskningsrådet sammen med eventuelle vedlegg.

A Grunnlagsopplysninger

Dersom navn på prosjektmedarbeidere (dvs. faglige medarbeidere på prosjektet som helt eller delvis er finansiert av Forskningsrådet) ikke framgår av grunnlagsopplysningene nedenfor, fylles opplysningene ut slik:

- Prosjektmedarbeidere: *Navn, stilling, arbeidssted, finansieringsandel fra Forskningsrådet.* Oppgi i tillegg om den ansatte er registrert som doktorgradsstudent.

Det er ingen endringer i grunnlagsopplysningene (kryss av)

Endringer og nye opplysninger er lagt ved på eget ark (kryss av)

Prosjektopplysninger:

Prosjektansvarlig institusjon: Havforskningsinstituttet, Senter for marint miljø
 Adm. ansvarlig: Forskningsdirektør Ole Arve Misund
 Prosjektleder (faglig ansvarlig): Forsker Asbjørn Svardal
 Prosjektmedarbeider(e):
 Veileder:
 Prosjektittel: Hormonforstyrrende effekter av miljøgifter i produksjonsvann fra oljeinstallasjoner

Finansieringsplan:

	2002	2003	2004	2005
Bevilgning/tilsagn fra	1,000,000	666,666		333,334

65

Forskningsrådet:				
Egne midler				
Andre offentlige midler				
Andre private midler				
EU-midler				

Kostnader: (Fyll ut faktiske kostnader)

	2002	2003	2004	2005	Sum
Personal og indirekte kostnader	234.000,-	964.000,-			1.198.000,-
Innkjøp av FOU-tjenester	350.000,-	300.000,-			650.000,-
Utstyr	0,-	0,-			0,-
Andre driftskostnader	416.000,-	110.000,-			526.000,-
Sum samlet	1.000.000,-	1.374.000,-			2.374.000,-

Følgende mål er avtalt for prosjektet:

Hovedmål:

Utvikle og etablere metoder for å undersøke hvordan alkylfenoler i produksjonsvann virker på kjønnsutvikling og kjønshormonsystemet i fisk.

Delmål:

1. Utvikle metode for bestemmelse av alkylfenoler i sjøvann, plasma og vev
2. Etablere nødvendige metoder og undersøke normal kjønnsdifferensiering hos torsk
3. Etablere bestemmelse av enzymaktivitet for P450 aromatase
4. Undersøke opptak av alkylfenoler og PAH fra produksjonsvann i zooplankton og torskøyngel
5. Effekter av alkylfenoler på aromataseaktivitet i fiskeceller i kultur og i vev fra torskelarver

B Prosjektsammendrag

Prosjektsammendraget skal kunne brukes i prosjektkataloger/-registre og som grunnlag for annen informasjon fra Forskningsrådet. Nytt prosjektsammendrag utarbeides ved endringer i prosjektets mål/delmål, som medfører at tidligere prosjektsammendrag ikke kan benyttes.

Mindre endringer kan rettes direkte i teksten under. Dersom det utarbeides nytt prosjektsammendrag krysser man av i korrekt boks nedenfor og skriver inn det oppdaterte sammendraget som forklart øverst på side 1.

Sammendraget skal inneholde informasjon om følgende elementer: *Bakgrunn for prosjektet, problemstilling og betydning av forskningen*. Sammendraget skal være på maksimalt 200 ord.

Prosjektsammendrag

Nåværende prosjektsammendrag for prosjektet:

Prosjektet fokuserer på langtidseffekter av alkylfenoler som forekommer i produksjonsvann fra oljeplattformer på fisk og følger dermed opp nylig gjennomførte undersøkelser på torsk ved Havforskningsinstituttet. Første del av prosjektet omfatter videreutvikling av metoder for analyse av alkylfenoler i sjøvann og biota, histologiske undersøkelser for å finne målbare kriterier for normal kjønnsutvikling hos torsk, og etablering av biokjemiske metoder for å studere mekanismer bak effektene alkylfenoler har på fisk. Metodene benyttes til å studere virkningsmekanismer i fiskeceller in vitro, og til undersøkelser av kjønnsutvikling og kjønnsormonmetabolisme hos torskeyngel som eksponeres for alkylfenoler i et eksperimentelt oppsett. Dette kan gi indikasjoner på tidskritiske vinduer der torsken er mer sårbar for påvirkning av kjemisk forurensning som kan forstyrre kjønnsutviklingen og dermed reproduksjonen. Metodene vil senere kunne anvendes for å gi detaljkunnskap om kjønnsutvikling og mekanismer og dermed et bedre grunnlag for å evaluere langtidseffekter av kjemisk forurensning på fisk.

Det er ingen endringer i prosjektsammendraget

(kryss

av)

Nytt prosjektsammendrag er lagt ved på eget ark

(kryss

av)

C Faglig rapport

Den faglige rapporten skal skrives inn på egne ark merket "Faglig rapport" som returneres sammen med dette skjemaet, se veiledning øverst på side 1. Merk at det spørres etter periodiserte opplysninger i tiden fra siste framdriftsrapportering. Merk også at tabellene under punkt 2 og 3 SKAL fylles ut på skjemaet.

1 Oppnådde faglige resultater

Beskriv prosjektets oppnådde resultater i forhold til hovedmål, delmål og milepæler som er fastsatt i kontrakt og arbeidsplaner. Beskrivelsen skal også inneholde en samlet konklusjon/egen vurdering av prosjektgjennomføring og ressursbruk. Videre ønskes en vurdering av forholdet til Forskningsrådet i prosjektperioden.

Gi i tillegg en kort *populærvitenskapelig framstilling* av de viktigste FoU-resultatene (dvs nye funn, nye problemstillinger, ny kunnskap) som er oppnådd i prosjektperioden, og gi en vurdering av resultatenes nyhetsverdi. Framstillingen vil blant annet bli benyttet som underlag for Forskningsrådets årsrapportering til departementene, eksempelsamlinger på internett mv.

2 Vitenskapelige utgivelser og annen publisering

Gjør rede for vitenskapelige utgivelser og annen publisering (som er akseptert) fra prosjektet for hele prosjektperioden i en *publikasjonsliste* inndelt etter publikasjonstypene i tabellen nedenfor. De som har mottatt eget publikasjonsskjema fra NSD må fylle ut dette i tillegg. Følgende opplysninger bes oppgitt i listen:

For bøker/artikler i bøker/rapporter: *Forfatter(e), arbeidets tittel, tittel på bok/artikkelsamling, forlag/utgiver, redaktør, flerbindsverk/serie, sidenr., nr./bind/år, ISSN/ISBN, sted*

For artikler: *Forfatter(e), arbeidets tittel, tidsskrift/avis, sidenr., nr./vol./år, ISSN*

For foredrag, presentasjoner og lignende: *Forfatter(e), tittel, arrangement/dato/sted*

Oppgi antall utgivelser etter publiseringstype i tabellen nedenfor.

Publikasjonstyper:	Antall siden forrige rapp.	Antall hele prosjekt-perioden	Antall planlagt etter prosj.slutt
Artikler i vitenskapelige tidsskrifter med referee	2	2	3
Artikler i andre vitenskapelige tidsskrifter og antologier			
Bøker (monografier, lærebøker, antologier (red.))			
Publiserte foredrag fra internasjonale faglige møter/kongresser			
Andre rapporter, samt foredrag og presentasjoner fra vitenskapelige/faglige møter			

3 Annen forskningsformidling

Gjør rede for andre formidlingstiltak enn publiseringsevirsomhet (dvs. deltakelse i vitenskapelige og allmennrettede/brukerrettede konferanser og møter, høringer, utstillinger og lignende) for hele prosjektperioden i en *liste* som skal inneholde følgende opplysninger:

For deltakelse i arrangementer: *Arrangement, arrangør og arrangementsdato*

Innslag om prosjektet i massemedia: *Mediets navn, type innslag og dato*

Oppgi antall formidlingstiltak etter tiltakstypene i tabellen nedenfor.

Andre forskningsformidlingstiltak:	Antall siden forrige rapport	Antall hele prosjekt-perioden	Antall planlagt etter prosj.slutt
Allmennrettede formidlingstiltak (populærvitenskapelige artikler/høringer/utstillinger)			
Brukerrettede formidlingstiltak (møter/seminarer i dep., næringsliv, organisasjoner)			
Oppslag vedrørende prosjektet i massemedia			

4 Andre resultater

Gi en kort beskrivelse av andre resultater i prosjektperioden som:

- Veiledning, kurs, undervisning
- Forskernettverk
- Brukernytte, patenter
- Annet

5 Prosjektmedarbeidere finansiert av Forskningsrådet

5.1 Doktorgrads- og postdoktorstipendiaters virksomhet

Gi opplysninger om *avbrudd, permisjoner og fratredelser*. Oppgi også tidspunkt for disputas for doktorgradsstipendiater.

5.2 Utenlandsopphold

Oppgi utenlandsopphold av mer enn tre måneders varighet siden forrige rapportering. Angi *navn på prosjektmedarbeideren, perioden, utenlandsk institusjon og land*. Det skal i tillegg redegjøres særskilt for utbyttet av oppholdet.

Prosjektleder (faglig ansvarlig):

For prosjektansvarlig institusjon (adm. ansvarlig):

Sted: Bergen Dato: 16/3-05

Sted: Bergen Dato: 18/3-05

Underskrift: Asbjørn Svardal

Underskrift: Ole Arve Misund

Forsker Asbjørn Svardal

Havforskningsinstituttet
Senter for marint miljø
Forskningsdirektør Ole Arve Misund

Faglig rapport fra prosjekt 152232/720: Hormonforstyrrende effekter av miljøgifter i produksjonsvann fra oljeinstallasjoner

Prosjektets hovedmål var å utvikle metoder for å undersøke hvordan alkylfenoler i produksjonsvann virker på kjønnsutvikling og kjønnehormonsystemet i fisk. Prosjektet var delt inn i følgende delmål:

1. Utvikle metode for bestemmelse av alkylfenoler i sjøvann, plasma og vev
2. Etablere nødvendige metoder og undersøke normal kjønnsdifferensiering hos torsk
3. Etablere metode for bestemmelse av enzymaktivitet for P450 aromatase
4. Undersøke opptak av alkylfenoler og PAH fra produksjonsvann i zooplankton og torskkeyngel
5. Undersøke effekter av alkylfenoler på aromataseaktivitet i fiskeceller i kultur og i vev fra torskelarver

Formålet med prosjektet

Prosjektet fokuserer på langtidseffekter av alkylfenoler som forekommer i produksjonsvann fra oljeplattformen og følger dermed opp nylig gjennomførte undersøkelser på torsk ved Havforskningsinstituttet. Disse viste at alkylfenoler kan påvirke reproduksjonen hos torsk selv ved meget lave konsentrasjoner. Første del av prosjektet omfatter videreutvikling av metoder for analyse av alkylfenoler i sjøvann og biota, histologiske undersøkelser for å finne målbare kriterier for normal kjønnsutvikling hos torsk, og etablering av biokjemiske metoder for å studere mekanismer bak effektene alkylfenoler har på fisk. Metodene benyttes til å studere virkningsmekanismer i fiskeceller in vitro, og til undersøkelser av kjønnsutvikling og kjønnehormonmetabolisme hos torskkeyngel som eksponeres for alkylfenoler i et eksperimentelt oppsett. Dette kan gi indikasjoner på tidskritiske vinduer der torsken er mer sårbar for påvirkning av kjemisk forurensning som kan forstyrre kjønnsutviklingen og dermed reproduksjonen. Metodene vil senere kunne anvendes for å gi detaljkunnskap om kjønnsutvikling og mekanismer og dermed et bedre grunnlag for å evaluere langtidseffekter av kjemisk forurensning på fisk.

Resultater

Ad pkt 1.

To metodepapers er publisert:

Boitsov, S., Meier, S., Klungsøyr, J., Svardal, A. 2004. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of alkylphenols in produced water from offshore oil installations as pentafluorobenzoate derivatives. *J. Chromatogr. A*, 1059: 131-141.

Meier, S., Klungsøyr, J., Boitsov, S., Eide, T., Svardal, A. 2005. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of alkylphenols in cod (*Gadus morhua*) tissues as pentafluorobenzoate derivatives. *J. Chromatogr. A*, 1062: 255-268.

Første paper beskriver en meget selektiv og følsom metode for å bestemme 14 representative alkylfenoler, fra fenol (C₀) til nonylfenol (C₉) i produsert vann. For å ekstrahere alkylfenolene fra det produserte vannet ble det nyttet fast fase ekstraksjon med en anionbytter. Prøvene ble så derivatisert med pentafluorbenzoylchlorid og analysert på GC-MS (negativ ion kjemisk

ionisasjon, NCI). Derivatiseringsprosedyren er blitt evaluert ved hjelp av *two-level factorial design* (2^{7-4}) eksperimenter. Kvantitering ble utført ved bruk av isotopfortynning av fem interne standarder med ulik alkylkjedelengde. Deteksjonsgrensen er ved lave ng/l nivåer. Sammenligning med GC-MS analyse av ikke derivatiserte alkylfenoler viste at det er en fordel å derivatisere prøvene som nevnt over.

Andre arbeid beskriver en meget selektiv og sensitiv metode for å bestemme 30 *meta*- og *para*-substituerte alkylfenoler, fra fenol (C_0) til nonylfenol (C_9) i biota. Diklormetaneekstrakter av spiket torskelerver og torskemuskel ble rensert opp ved bruk av gelpermeasjonskromatografi. Prøvene ble så derivatisert med pentafluorbenzoylchlorid og analysert på GC-MS med negativ-ion kjemisk ionisasjon. Kvantitering ble gjort ved bruk av fem interne standarder med ulik kjedelengde. Deteksjonsgrensen er ved lave $\mu\text{g}/\text{kg}$ nivåer. Bestemmelse av 4-nonylfenol var meget vanskelig på grunn av høye bakgrunnsnivåer av denne forbindelsen. 4-Nonylfenol isomerer ble funnet i en mengde plastikk- og gummiprodukter brukt på laboratoriet.

Å måle alkylfenoler i sjøvann er vanskelig på grunn av lave nivåer og at en derfor må bruke store volumer sjøvann med påfølgende ekstraksjon og oppkonsentrering. Likevel er en nå i ferd med å klare dette med metoder basert på ovenstående arbeider. Pkt 1 må således betraktes som oppfylt.

Ad pkt. 2.

Prosjektet har i betydelig grad vært med på etablere metoder for å bestemme tidsvinduet for torskens kjønnsdifferensiering (tidspunktet i utviklingen der kjønnet blir bestemt). Utrolig nok er dette ikke kjent hos torsk. Det er grunn til å tro at torsk (og andre organismer) er spesielt utsatt for forurensningseffekter i dette tidsvinduet da fisken er inne i en livsfase med intensiv celledeling og celledifferensiering (spesialisering). Metodene er basert på mikroskopiske og histologiske undersøkelser. Det er lagt ned et omfattende arbeid for å utarbeide gode nok metoder for å nå dette målet og arbeidet pågår fremdeles.

Kvalitative analyser

Disseksjoner ned til ca. 55 mm er utført. Ved denne størrelsen er det ikke mulig å avgjøre kjønn makroskopisk (anatomisk). Ved 120 mm er kjønnet makroskopisk identifiserbart, mens det er vanskelig å bestemme omkring 75 mm.

47 individer er støpt inn og delvis snittet (de må snittes videre for kvantitative analyser). Dette vil bli komplettert med omkring 30 individer rundt differensieringstidspunktet. Ved drøye 70 mm størrelse ser kjønnet ut til å være histologisk bestemt. Det er oppstått lumen i ovariet, og det er tydelig forskjell på celletyper og størrelser. Foreløpig ser det ut til at dette ikke er tilfelle ved 60-65 mm. Dette kan imidlertid skyldes et lavt antall individer, og vil bli kontrollert nærmere. Ett individ på 45 med mer ser ut til å være en hann. Det er på denne bakgrunn trolig at det er en overgangsfase der det er vanskelig å skille kjønnene kvalitativt. De kvantitative analysene fokuserer rundt dette intervallet, kanskje enda lenger ned i størrelse.

Kvantitative analyser

Analyser av ett år gammel torsk. Prøver av ett år gammel torsk er innstøpt og snittet. Et sett snitt er farget i toluidinblått, og vil bli benyttet til kvantitative analyser i nærmeste framtid. For kjernemorfologi vil et nytt sett snitt farges i en polykrom farge for enklere identifikasjon. Forventes ferdigstilt i april-mai då.

Som det fremgår av ovenstående er dette et stort, utfordrende og ressurskrevende prosjekt. Det gir både fundamental basiskunnskap om torskens reproduksjon og innsikt i et tidsvindu da torsken kan påregnes å være spesielt utsatt for forurensningseffekter. På grunn av sin viktighet vil dette prosjektet videreføres i flere år ennå av midler fra NFR og HI.

Ad pkt. 3 & 5.

Mekanismer for effekten av alkylfenoler - studier på gonadeceller fra regnbueørret (RTG-2)

Metoden for bestemmelse av aromataseaktivitet skulle etter planen vært etablert som en foreløpig metodikk i 2003 men den ble først etablert i 2004. Forsinkelsen skyldes flere forhold. For det første har vi sett det foreliggende prosjektet i sammenheng med NFR-p.nr. 153692/720 "Hormone disruption and possible DNA damage on fish of alkylphenols in produced water from offshore oil installations" som ble startet i 2003. Heri inngår videreutvikling/verifisering av metode for aromatasebestemmelse og etablering av metode for måling av DNA-brudd (Comet assay). Både fordi vi holdt på med en annen teknikk for undersøkelse av DNA-nedbrytning ifm apoptose (styrt celledød) og fordi etablering av aromatasemetoden tok tid mens undersøkelsene av aktuelle radioaktive substrater ble foretatt (se nedenfor), valgte vi å forsere etableringen av Comet assayet og heller ta utviklingen av aromatasebestemmelsen over noe lengre tid. Det betyr at vi i forhold til NFR-p.nr. 153692/720 ved utgangen av 2003 var kommet lenger enn forventet vedr. Comet assay, mens vi var kommet mindre enn forventet vedr. måling av aromatase i forhold til p. nr. 152232/720.

Comet assayet er en teknikk som måler enkelttrådige brudd i DNA. I motsetning til andre teknikker som måler DNA nedbrytning i isolerte fragmenter av DNA, måler Comet assayet DNA nedbrytning i intakt genom i hele enkeltceller. Etter eksponering støpes hele celler inn i et tynt lag agarose på et objektglass, cellene lyseres deretter inne i gelen. Under påfølgende elektroforese vil DNA fragmenter bevege seg ut av cellekjernen, mens celler med intakt genom ikke vil gi migrasjon under disse betingelsene. DNA farges deretter med fluorescerende fargestoff (f.eks. etidium bromid) og observeres i fluorescensmikroskop. Celler med stor DNA nedbrytning får gjerne en lang hale med fragmenter ut fra kjernen, det ligner på en komet (derav navnet).

Comet assayet er nå godt etablert og testet ut med både gonadeceller fra regnbueørret (RTG-2) og humane, hvite blodceller. Doserrespons-forsøk med CdCl_2 og H_2O_2 (positive kontroller) viser at metoden nå fungerer tilfredsstillende. Scoring av resultater gjøres foreløpig ved visuell bedømmelse i fluorescensmikroskop, men vi vurderer innkjøp av utstyr for fotografering og databehandling ved bruk av en spesialtilpasset programpakke. Metoden kan nå brukes til å måle DNA-skader i cellekulturer og blodceller fra fisk og andre organismer. Dersom den skal brukes til vevsprøver må dette først dissosieres til en enkeltcellesuspensjon, en prosess som krever noe utprøving først.

Det har i tillegg vært nødvendig å bruke noe tid på å tilpasse en metodikk for måling av metabolsk aktivitet ved bestemmelse av akutt toksisitet. Denne teknikken har vi tidligere benyttet på en rekke cellesystemer, herunder celler fra laks. Det viste seg imidlertid at

gonadecellene fra regnbueørret som vi bruker i det foreliggende prosjektet har vesentlig lavere basal metabolsk aktivitet enn andre celler vi har undersøkt tidligere, noe som gjorde at metodikken måtte optimaliseres mhp disse cellene. Denne teknikken er viktig for å kunne bestemme doserespons for akutt toksisitet av alkylfenolene på RTG-2 cellene. Undersøkelser av eventuelle DNA-skader (som kan gi langtidseffekter) og effekter på aromatase må gjøres etter eksponering for subletale doser av alkylfenoler.

Iht prosjektbeskrivelsen er det fire alkylfenoler som skal undersøkes, og arbeidet i 2003 ble utført med to av disse. 4-n-Pentylfenol ble undersøkt mhp metabolsk aktivitet og flere doserespons forsøk ble utført. Resultatene fra disse ga en gjennomsnittlig EC_{50} på $40 \mu\text{M}$ (EC_{50} er den konsentrasjonen som gir 50 % hemming av metabolsk aktivitet i forhold til kontroll). Resultater fra et representativt forsøk er vist i Fig. 1. Tilsvarende ble det utført forsøk med 4-tert-butylfenol, som ser ut til å være mindre akutt-toksisk enn pentylfenol.

På bakgrunn av EC_{50} bestemmelsen ble RTG-2 cellene eksponert for opp til $60 \mu\text{M}$ 4-n-pentylfenol for å undersøke evt. DNA enkelttrådig brudd vha Comet assay. Her er ble det utført to forsøk som begge viste mye DNA-brudd ved $60 \mu\text{M}$. Et representativt forsøk er vist i Fig. 2. DNA-brudd (SSB) er gitt som total kategoriscore pr. 100 celler. (Cellene klassifiseres i kategorier fra 0-4 med tilhørende tallverdi avhengig av DNA-migrasjon ut av kjernen; 0 tilsvarer ingen migrasjon, 4 tilsvarer migrasjon av alt DNA ut av kjernen, dvs. minimal score for kontroll er null, mask. er 400 pr. 100 celler. Normalt observeres 60-120 celler). Andre Comet forsøk med pentylfenol antyder at SSB opptrer ved noe lavere konsentrasjoner enn dette, noe som kan indikere at 4-n-pentylfenol induserer brudd i DNA ved konsentrasjoner som gir liten akutt toksisk effekt.

Som nevnt ovenfor ble metoden for bestemmelse av aromataseaktivitet utsatt til 2004, bl.a. fordi det var nødvendig å bruke mer tid enn forutsatt for å fremskaffe de ønskede radioaktive substrater. To forskjellige metoder er beskrevet i litteraturen. I den ene måles avspaltning av tritiert vann fra tritiummerket substrat. Denne metoden er den enkleste å utføre, men kan gi noe uspesifikke resultater pga isotoputskiftning med vann. Den andre benytter radioaktiv merking av substratet i posisjoner som gir radioaktivt merket estradiol eller estron som sluttprodukter. Disse skilles fra substratet og hverandre vha tynnsjikt kromatografi. Basert på data i litteraturen ønsket vi å kunne utføre begge metodene for å verifisere at vi fikk de reaksjonsproduktene vi forventet å få. Tritiummerket substrat for den første metoden er kjøpt inn, men substrat merket i andre posisjoner og med tilstrekkelig spesifikk aktivitet har vist seg vanskelig å få tak i. For en del år siden var dette kommersielt tilgjengelig, men disse produktene har nå gått ut av produksjon. Vi har derfor måttet undersøke andre alternativer, og det ser ut som eneste mulighet er kundespesifikk syntese av substratet hos anerkjente leverandører av radioaktive kjemikalier. Vi har innhentet tilbud hos en leverandør, og vi avventer tilbud fra en annen. Det blir imidlertid vesentlig dyrere enn det vi hadde forutsatt opprinnelig. Det ble derfor satset på å etablere den første teknikken. Dette ble påbegynt i 2003 men mesteparten er utført i 2004. I Fig. 3 og 4 er det vist eksempler med bestemmelse av aromataseaktivitet i hjerneekstrakt fra torsk. Fig. 3 viser at enzymaktiviteten er linjær med

tiden under de gitte betingelsene, og Fig. 4 at enzymaktiviteten er proporsjonal med mengde enzym tilsatt. Resultatene illustrerer at metoden fungerer svært bra og den er nå klar til å måle aromataseaktivitet både i fiskeceller og i vev.

Videre undersøkelser av DNA-brudd og aromataseaktivitet utføres iht plan i NFR-p.nr. 153692/720.

74

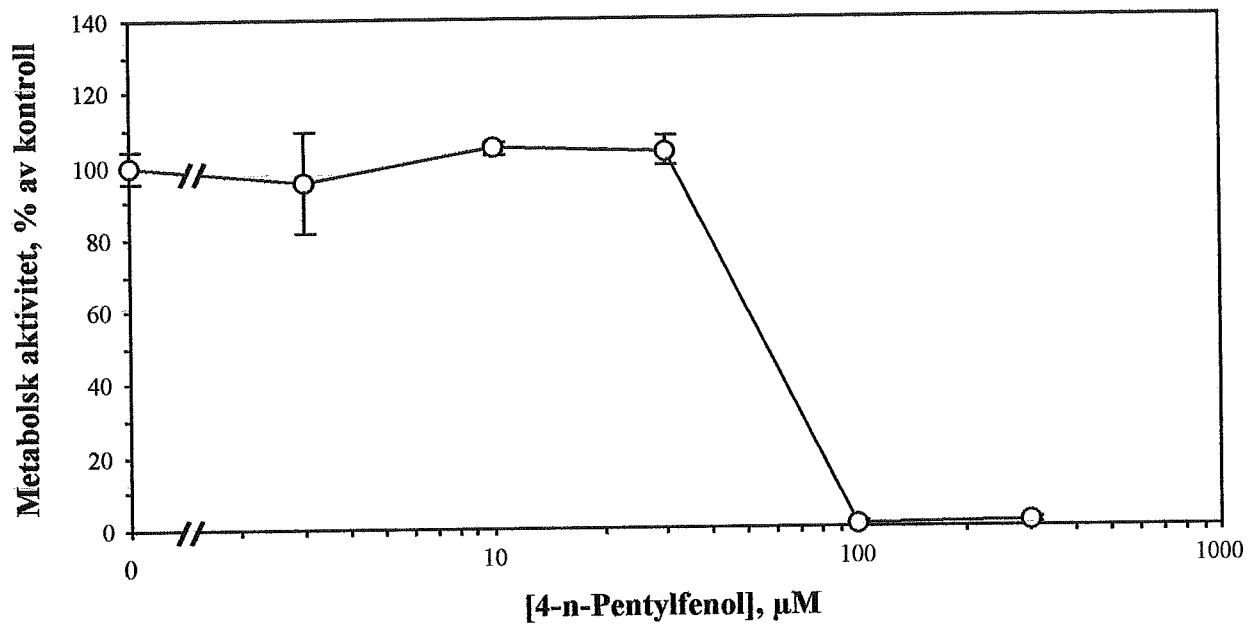


Fig. 1. Toksisitet 4-n-pentylfenol på RTG-2 celler (24 t eksponering).

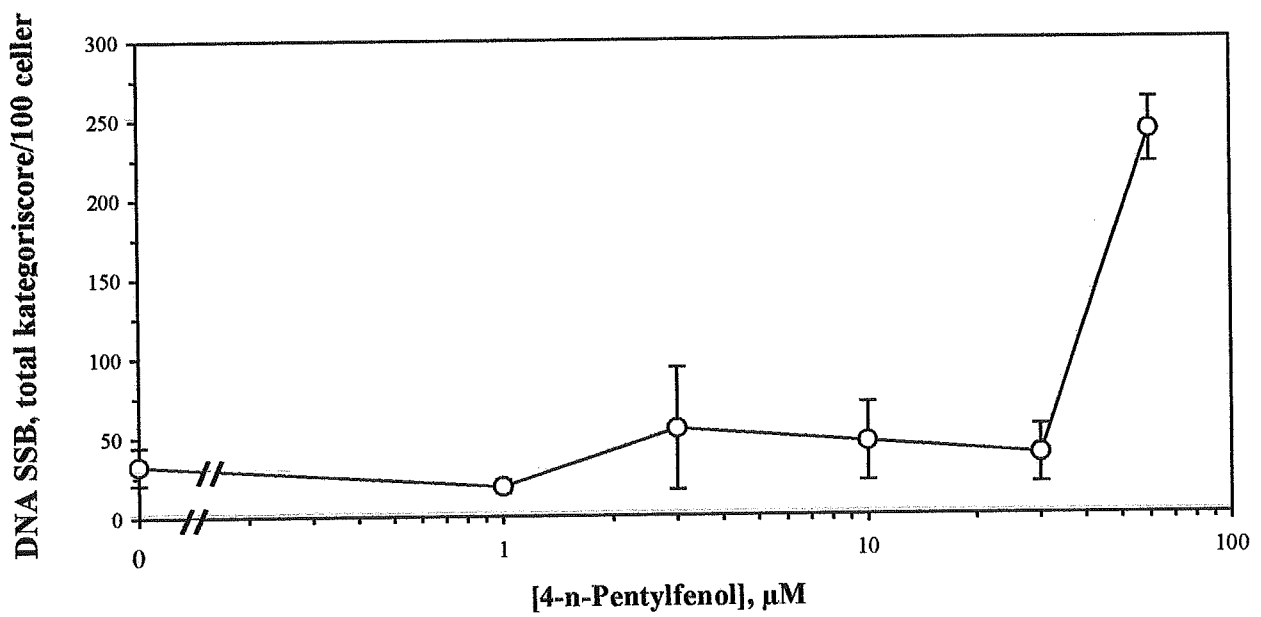


Fig. 2. DNA brudd (SSB) i RTG-2 eksponert for 4-n-pentylfenol i 24 t.

75

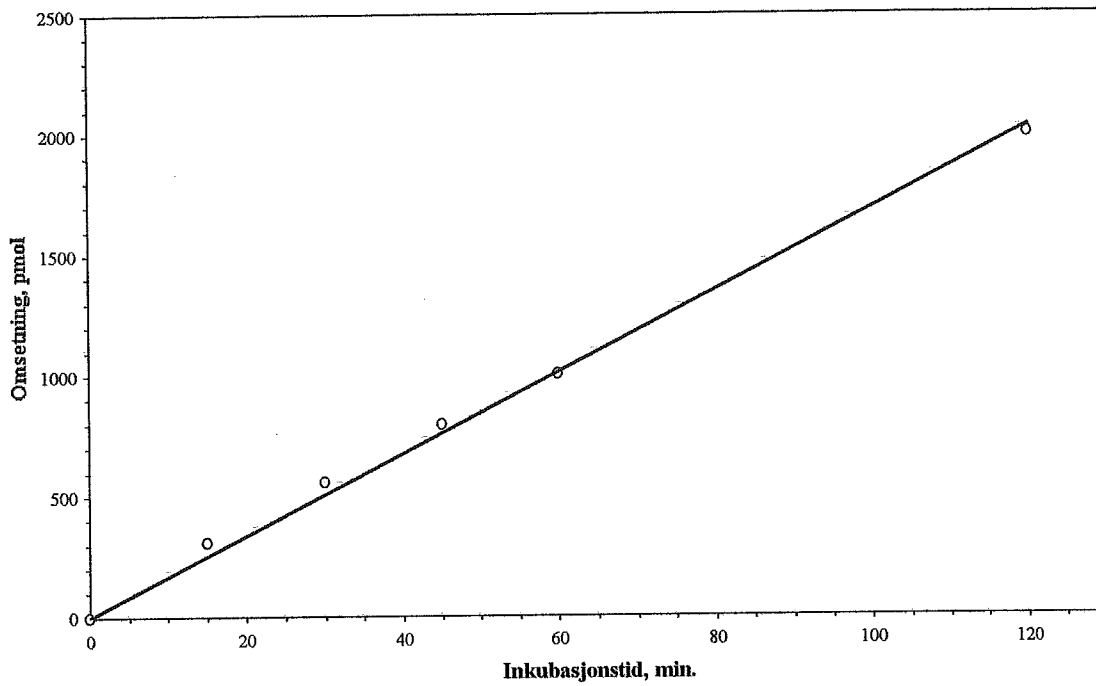


Fig. 3. Aktivitet av P450 aromatase i hjerneekstrakt (mikrosomalfraksjon) fra torsk som funksjon av inkubasjonstiden. 0,47 mg protein pr. prøve inkubert ved 22 °C.

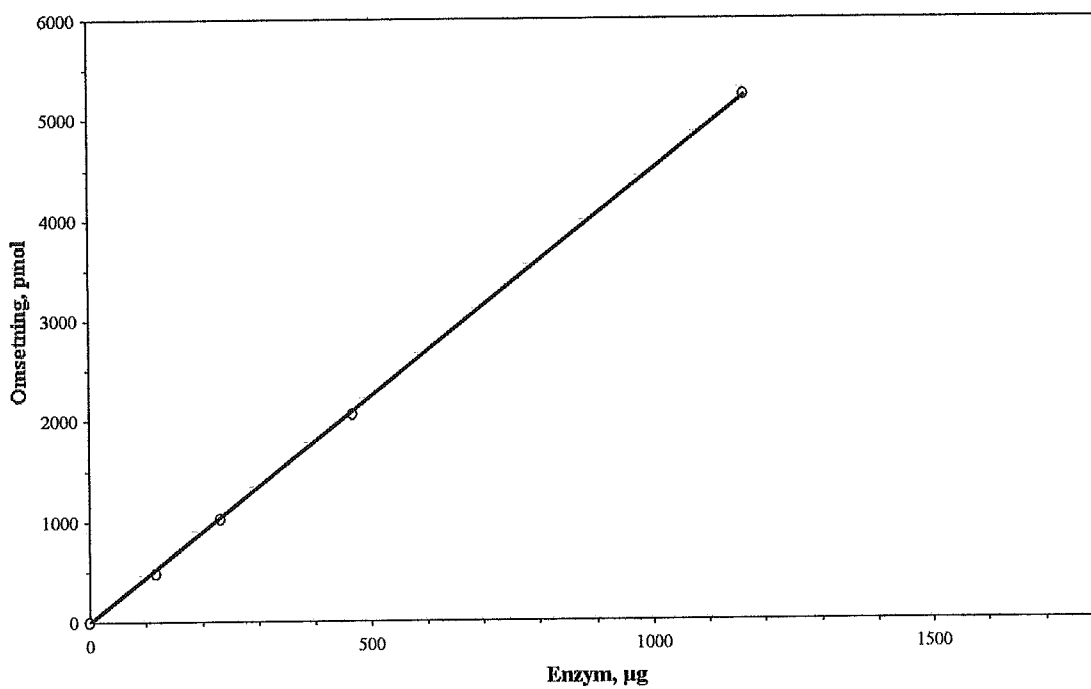


Fig. 4. Aktivitet av P450 aromatase i hjerneekstrakt (mikrosomalfraksjon) fra torsk som funksjon av mengde enzym ved inkubasjonen. Prøvene ble inkubert i 120 min ved 22 °C.

Ad pkt. 4.

Kvantitativ bestemmelse av alkylfenoler

Vi ønsket å komplettere forsøkene våre fra effektstudiene i NFR-prosjektet 141213/720 ved å gjøre opptaksforsøk for å undersøke biokonsentrering av alkylfenoler og PAH i torskelarver. Den kvantitative bestemmelsen er basert på metodikken som er utviklet for å bestemme alkylfenoler i sjøvann og biota (pkt. 1). Arbeidet er noe begrenset i forhold til det som først var planlagt. Vi hadde problemer med å få tak i produksjonsvann tidlig i sesongen og det ble derfor kun gjennomført ett eksponeringsforsøk med 1 måned gamle torskelarver.

Tabell 1. Oversikt over eksponeringene med produksjonsvann våren 2003. Alder er gitt i dager etter 50 % klekking. SL er standardlengde (mm), TV er tørrvekt (mg). Torskelarvene kommer fra stamfisk (skrei) fanget vest for Sørøya og i Tanafjorden i Finnmark.

Eksposering	Startdato/larvealder	Gjennomsnittlig SL ved start (±SD)	Gjennomsnittlig TV ved start (±SD)	Larver i hvert kar (n)
1 døgn	21. mai/dag 25	9,40 (±1,79)	0,97 (±0,57)	60

Forsøket ble gjort i samme 5L akvarier som ble brukt i NFR-prosjektet 141213/720 som var et statistisk oppsett hvor ca. 3 g torskelarver (ca. 60 stk) eksponeres i 24 timer for sjøvann som har fått innblandet henholdsvis 1 % og 5 % produksjonsvann.

Produksjonsvann ble tappet 19. mai på Oseberg C (Hydro). En prøve (bare til kjemisk analyse) ble konserveret (tilsatt 5 ml kons. HCl) like etter tapping, mens vannet til det biologiske forsøket ble "luftet" (m/ akvariepumpe) i 10 min før prøvene ble transportert til land med helikopter.

Det ble gjort analyser av alkylfenoler i både "ferskt" og "luftet" produksjonsvann, samt av sjøvann fra akvariene med henholdsvis 5 % og 1 % produksjonsvann. Prøve fra akvariene ble tatt 2 timer etter at forsøket ble startet.

Torskelarver ble etter 24 timer eksponering avlivet med en overdose bedøvelse og 2 paralleller fra hvert akvarium ble ekstrahert og analysert for alkylfenoler.

Bioakkumuleringsfaktorene er utregnet fra den målte konsentrasjonen i akvariene (K_{vann}) og i fisken (K_{vev}). Denne formelen forutsetter at opptak og eliminasjon av komponenter er i likevekt:

$$1) \quad BCF = K_{\text{vev}} / K_{\text{vann}}$$

Resultater.

Tabell 2 viser analyseresultatene fra produksjonsvann og torskelarver. Vi ser at det kun er små forskjeller i alkylfenolinnholdet i "ferskt" og luftet produksjonsvann. Konsentrasjonene av de fleste av de målte komponentene alkylfenoler i det luftete produksjonsvannet ligger på over 90 % sammenlignet med "ferskt" produksjonsvann. Dette viser at transporten og luftingen ikke medførte vesentlige forandringer i sammensetningen av alkylfenoler.

De målte verdier i akvariet varierer i forhold til den nominelle konsentrasjonen for de forskjellige alkylfenoler. Der er en klar konsentrasjonsgradient mellom "1 %" og "5%", men

de målte verdier er hovedsaklig lavere enn nominelle verdier. For de kortkjedete alkylfenolene ligger de målte verdier på omkring 60-70 % av de nominelle konsentrasjonene, men for de langkjedete alkylfenolene (C5 og oppover) ligger de målte verdier ned på 30-40 % av nominell konsentrasjon. Målingene i akvariene er gjort 2 timer etter forsøkstart. Nedgangen i alkylfenol konsentrasjonen kan dermed både skyldes fordampning, absorpsjon til glassoverflaten samt opptak i fisken. Alkylfenoler er kjent for å absorbere lett til overflater og denne affinitet er kraftig økende med økende kjedelengde. Dette kan kanskje forklare hvorfor tapet av langkjedete alkylfenoler er høyere enn for de kortkjedete. En annen viktig faktor er at konsentrasjonen av de langkjedete alkylfenolene etter fortynningen er helt nede i lave ng/L nivåer og dermed øker måleusikkerheten betydelig.

Vevsanalysene viser at torskelarvene opptar alkylfenoler i kroppen. Fenol og cresol utgjør ca. 70 % av den totale mengden alkylfenol som finnes i fisken. Disse komponentene biokonsentreres ikke, vevskonsentrasjonene er her mindre enn de tilsvarende vannkonsentrasjonene. For C₂-fenoler og oppover er det en netto oppkonsentrering i vevet, men bioakkumuleringsfaktoren er lav, BCF <10 helt opp til C₅-fenol. For de langkjedete alkylfenoler måles kun meget lave nivåer, som ligger under den validerte kvantifiseringsgrensen, (> 1 ng/g våt vekt). De beregnete BCF for disse komponentene er dermed forbundet med stor usikkerhet. Generelt ligger BCF-verdiene vi finner betydelig under de verdier som før er rapportert (Sundt & Baussant, 2003). Dette opptaksforsøket er gjort med statisk eksponering og måling av alkylfenoler 2 timer etter forsøkstart; et tidspunkt hvor alkylfenolkonsentrasjonen viser seg å endre seg relativt hurtig. Derfor er det sannsynlig at fiskelarvene gjennom deler av forsøket er blitt eksponert for lavere konsentrasjoner enn de som ligger til grunn for utregningene av BCF. Dermed er fiskelarvene ikke i en "steady state" situasjon når prøvene ble tatt og dette kan forklare at det ble funnet et lavere opptak enn forventet.

I forbindelse med effektstudiene (prosjektnr. 141213/720) er det brukt et gjennomstrømningssystem. Dermed tilføres det hele tiden nytt produksjonsvann til akvariene og dette vil i høy grad kompensere for de tap som er av alkylfenoler i forbindelse med fordampning og absorpsjon til overflatene og dermed gi en mer stabil dosering.

Tabell 2. Alkyfenoler i produksjonsvann/akvarier og i torskelarver

	AP i produksjonsvann (PW) og biotestakvarier ($\mu\text{g/L}$)				AP i torskelarver (ng/g våt vekt)		
	"Ferskt" PW	Luftet PW	Nominell 5 % PW	Nominell 1 % PW	Kontroll (30 larver)	Nominell 5 % PW N=2 (30 larver)	Nominell 1 % PW N=2 (30 larver)
	N=2		N=2	N=2			
Fenol	3979 ± 81	3727,9	125,9 ± 9,6	40,4 ± 10,8	8,3	106,4 ± 4,1	32,2 ± 0,1
o-Cresol	3071 ± 88	2923,5	50,1 ± 2,5	18,4 ± 2,3	2,4	44,4 ± 0,7	12,4 ± 0,0
m-Cresol	1370 ± 0	1317,0	26,7 ± 1,1	15,2 ± 1,1	1,9	25,7 ± 0,2	7,7 ± 0,0
p-Cresol	847 ± 5	820,3	125,9 ± 9,6	40,4 ± 10,8	8,3	106,4 ± 4,1	32,2 ± 0,1
Sum Cresol	6288	5061	203	74	12,6	176,5	52,4
2-Etylfenol	96,5 ± 2,2	94,4	3,01 ± 0,16	0,49 ± 0,23	0,06	4,60 ± 0,40	1,08 ± 0,01
2,6-Dimetylphenol	432,3 ± 41,9	452,8	7,80 ± 4,25	0,69 ± 0,05	0,08	9,03 ± 1,26	1,55 ± 0,10
2,5-Dimetylphenol	232,9 ± 8,4	229,4	5,13 ± 0,44	1,17 ± 0,06	0,11	7,56 ± 0,81	1,60 ± 0,05
2,4-Dimetylphenol	314,0 ± 10,9	314,3	3,74 ± 0,32	0,86 ± 0,05	0,22	10,16 ± 1,15	2,32 ± 0,21
3-Etylphenol	183,2 ± 3,8	178,2	3,88 ± 0,04	1,29 ± 0,37	0,17	9,76 ± 1,13	2,12 ± 0,02
3,5-Dimethylphenol	290,8 ± 5,7	284,7	6,70 ± 0,09	0,93 ± 0,13	0,28	18,03 ± 1,79	4,25 ± 0,02
4-Etylphenol	60,9 ± 6,1	53,0	4,65 ± 0,11	1,59 ± 0,51	0,10	4,09 ± 0,39	1,05 ± 0,05
2,3-Dimetylphenol	99,1 ± 10,2	92,4	3,99 ± 0,12	1,38 ± 0,44	0,05	4,12 ± 0,38	0,93 ± 0,02
3,4-Dimetylphenol	127,4 ± 2,1	124,4	2,94 ± 0,20	0,30 ± 0,20	0,15	6,45 ± 0,80	1,43 ± 0,04
Sum C2 fenol	1837	1824	41,8	8,7	1,2	73,8	16,3
2-iso-Propylfenol	10,8 ± 1,1	9,7	1,43 ± 0,07	0,18 ± 0,11	0,08	5,70 ± 0,15	1,45 ± 0,01
2n-Propylfenol	13,7 ± 1,0	12,6	0,48 ± 0,06	0,06 ± 0,03	0,01	1,79 ± 0,16	0,43 ± 0,01
3-iso-Propylfenol	28,1 ± 1,7	25,9	1,53 ± 0,01	0,45 ± 0,08	0,08	4,65 ± 0,72	0,92 ± 0,00
2,4,6-Trimetylphenol	20,4 ± 6,4	22,6	1,29 ± 0,16	0,20 ± 0,10	0,01	0,57 ± 0,03	0,09 ± 0,01
4iso-Propylfenol	47,5 ± 2,6	43,9	4,19 ± 0,10	1,24 ± 0,21	0,24	14,10 ± 1,56	3,75 ± 0,18
3-Etyl4-metylphenol	170,7 ± 11,6	157,4	10,30 ± 0,04	1,98 ± 0,52	0,68	42,06 ± 6,95	8,92 ± 0,21
2,3,6-Trimetylphenol	12,4 ± 2,5	12,6	0,18 ± 0,03	0,04 ± 0,01	0,01	0,67 ± 0,03	0,12 ± 0,00
2,3,5 Trimetylphenol	18,2 ± 1,5	17,2	0,41 ± 0,05	0,20 ± 0,05	0,03	2,38 ± 0,40	0,45 ± 0,05
4n-Propylfenol	10,4 ± 0,4	9,8	0,44 ± 0,02	0,15 ± 0,03	0,03	1,78 ± 0,23	0,46 ± 0,02
Sum C3 fenol	332,1	311,8	20,25	4,50	1,2	73,71	16,60
2tert-Butylfenol	4,26 ± 1,01	4,11	0,05 ± 0,03	0,00 ± 0,01	0,00	0,14 ± 0,03	0,02 ± 0,00
3tert-Butylfenol	0,61 ± 0,01	0,59	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01	0,09 ± 0,04	0,01 ± 0,00
5iso-Propyl3-metylphenol	18,48 ± 0,99	17,80	0,54 ± 0,01	0,16 ± 0,05	0,05	3,35 ± 0,53	0,72 ± 0,02
4tert-Butylfenol	1,44 ± 0,03	1,43	0,07 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,08	0,46 ± 0,09	0,12 ± 0,00
4sec-Butylfenol	16,74 ± 0,60	15,96	0,72 ± 0,00	0,24 ± 0,07	0,07	5,38 ± 0,78	1,65 ± 0,39
4iso-Propyl3-Metylphenol	4,61 ± 0,37	6,40	0,08 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,01	0,70 ± 0,11	0,17 ± 0,00
4n-Butylfenol	2,92 ± 0,02	2,95	0,06 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,02	0,90 ± 0,12	0,22 ± 0,01
Sum C4 fenol	49,05	49,24	1,54	0,52	0,24	11,02	2,91
4tert-Butyl2-Metylphenol	3,18 ± 0,48	2,60	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00	0,07 ± 0,02	0,02 ± 0,00
4(1,1 Dimetylpropyl)fenol	1,12 ± 0,00	1,13	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,01	0,59 ± 0,08	0,16 ± 0,00
4n-Pentylfenol	0,51 ± 0,00	0,52	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,07	0,10 ± 0,05	0,06 ± 0,00
Sum C5 fenol	4,81	4,25	0,03	0,03	0,09	0,76	0,24
2,5 Diisopropylfenol	3,50 ± 0,34	3,05	0,05 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,03	0,82 ± 0,09	0,17 ± 0,00
2tert-Butyl4-etylphenol	0,54 ± 0,08	0,51	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00
4-(1-etyl-1-metylpropyl)fenol	0,07 ± 0,01	0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00
4n-Heksylfenol	0,18 ± 0,03	0,11	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,26	1,43 ± 0,02	0,23 ± 0,05
Sum C6 fenol	4,29	3,69	0,06	0,01	0,28	2,30	0,44
4n-Heptylfenol	0,06 ± 0,01	0,05	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,07	0,17 ± 0,00	0,14 ± 0,06
Sum C7 fenol	0,06	0,05	0,00	0,00	0,07	0,12	0,14

Tabell 3. Bioakkumuleringsfaktor (BCF) utregnet fra henholdsvis "5 %" og "1 %" eksponeringsdoser.

	BCF "5%" PW	BCF "1%" PW	Snitt	SD	RSD
Fenol	1,03	0,54	0,8	0,3	43,9
o-Cresol	0,84	0,80	0,8	0,0	4,0
m-Cresol	0,89	0,67	0,8	0,1	19,2
p-Cresol	0,96	0,51	0,7	0,3	44,2
2-Etylfenol	1,53	2,22	1,9	0,5	26,0
2,6-Dimetylfenol	1,16	2,26	1,7	0,8	45,5
2,5-Dimetylfenol	1,47	1,37	1,4	0,1	5,2
2,4-Dimetylfenol	2,72	2,71	2,7	0,0	0,2
3-Etylfenol	2,51	1,64	2,1	0,6	29,9
3,5-Dimetylfenol	2,69	4,58	3,6	1,3	36,7
4-Etylfenol	0,88	0,66	0,8	0,2	20,2
2,3-Dimetylfenol	1,03	0,68	0,9	0,3	29,3
3,4-Dimetylfenol	2,19	4,80	3,5	1,8	52,8
2-iso-Propylfenol	3,99	8,08	6,0	2,9	47,8
2n-Propylfenol	3,73	7,47	5,6	2,6	47,2
3-iso-Propylfenol	3,05	2,03	2,5	0,7	28,4
2,4,6-Trimetylfenol	0,44	0,45	0,4	0,0	1,6
4iso-Propylfenol	3,37	3,03	3,2	0,2	7,5
3-Etyl4-Metylfenol	4,08	4,50	4,3	0,3	6,9
2,3,6-Trimetylfenol	3,68	2,70	3,2	0,7	21,6
2,3,5 Trimetylfenol	5,77	2,29	4,0	2,5	60,9
4n-Propylfenol	4,08	3,12	3,6	0,7	18,9
2tert-Butylfenol	3,10	4,42	3,8	0,9	24,9
3tert-Butylfenol	5,13	1,60	3,4	2,5	74,3
5iso-Propyl3-Metylfenol	6,23	4,64	5,4	1,1	20,6
4tert-Butylfenol	6,56	1,90	4,2	3,3	77,9
4sec-Butylfenol	7,45	6,75	7,1	0,5	6,9
4iso-Propyl3-Metylfenol	8,47	8,54	8,5	0,1	0,6
4n-butylfenol	14,95	7,85	11,4	5,0	44,0
2tert-Butyl6-metylfenol	94,37	28,49	61,4	46,6	75,8
4tert-Butyl2-Metylfenol	20,51	1,75	11,1	13,3	119,2
4(1,1 Dimetylpropyl)fenol ("4 tert-Pentylfenol")	27,98	8,75	18,4	13,6	74,1
4n-Pentylfenol	18,47	40,73	29,6	15,7	53,2
2,5 Diisopropylfenol	15,13	27,64	21,4	8,8	41,3
2tert-Butyl4-Etylfenol	27,29	6,08	16,7	15,0	89,9
4-(1-ethyl-1-methylpropyl)fenol ("4 tert-heksylfenol")	62,95	29,44	46,2	23,7	51,3
4n-Heksyfenol	257,94	216,63	237,3	29,2	12,3
4n-Heptylfenol	161,32	165,55	163,4	3,0	1,8


Populærvitenskapelig framstilling

Oljeutvinningen i norske havområder medfører betydelige utslipp av forskjelligartede kjemikalier og oljeholdig produsert vann. Hvilke effekter dette har på det marine miljø, ikke minst langtidseffektene, vet man lite om. Ved Havforskningsinstituttet har en spesielt interessert seg for reproduksjonseffekter på torsk av alkylfenoler, en naturlig tilstedeværende stoffgruppe i det produserte vannet. Laboratorieforsøk på førstegangsgytende torsk har vist at alkylfenoler påvirker hormonstatus i både hann- og hunntorsk ved at henholdsvis testosteron- og østrogennivå går ned. Utviklingen av rogn og melke ble også betydelig forsinket, selv ved meget lave konsentrasjoner. Påvisning av disse alvorlige effektene på torskens reproduksjon har initiert flere oppfølgende prosjekter.

I dette prosjektet har en studert om det finnes tidskritiske vinduer i torskens kjønnsutvikling/differensiering der torsken er mer sårbar for påvirkning av kjemisk forurensning enn ellers. Grunntanken for dette er at celler fra dyr/mennesker som er under differensiering (spesialisering) ofte er mer utsatt for ytre påvirkning enn mer modne celler. Dette er en meget utfordrende oppgave da en hos torsk ikke vet tidspunktet for når kjønnen blir bestemt. En tar her i bruk spesielle elektronmikroskopiske målemetoder og så langt har en kommet fram til at torskens kjønn blir bestemt før den blir 70 mm lang. En mer presis størrelse/aldersangivelse vil fremkomme senere.

Prosjektet har også resultert i to publiserte arbeider på metoder for bestemmelse av alkylfenoler i produsert vann og biologisk vev fra torsk. Slike metoder er nødvendige å ha for å bestemme hvor mye av disse stoffene som blir overført fra produsert vann til fisk og for videre å studere forholdet mellom mengde alkylfenoler tatt opp i ulike vev og de biologiske effektene av dette. Noen av langtidseffektene har vi klarlagt som nevnt i det ovenstående, men mye arbeid gjenstår før en har tilstrekkelig kjennskap til langtidseffektene av produsert vann. Dette prosjektet har også frembrakt biokjemiske metoder for å studere disse.

Bergen, 06.03.05


Asbjørn Svardal
Prosjektleder