

NOVANA

Teknisk anvisning for marin overvågning

6.3 Biologisk effektmonitoring - fisk

Jakob Strand
Ingela Dahllöf
Afdeling for Marin Økologi

Miljøministeriet
Danmarks Miljøundersøgelser

Indhold

6.3 Biologisk effektmonitoring – fisk	
Reproduktiv succes og enzymaktivitet hos	
ålekvabbe	6.3-3
6.3.1 Formål	6.3-3
6.3.2 Baggrund	6.3-3
6.3.3 Principper	6.3-3
6.3.4 Prøvetagning	6.3-4
6.3.5 Analysemetoder	6.3-5
6.3.5.1 Håndtering og dissektion af friske ålekvabber	6.3-5
6.3.5.2 Dissekering af nedfrosset fisk	6.3-6
6.3.5.3 Parameterberegning	6.3-7
6.3.5.4 Analyse af enzymaktivitet	6.3-8
6.3.6 Kvalitetssikring	6.3-8
6.3.7 Dataindberetning	6.3-8
6.3.7.1 Stationsbeskrivelse	6.3-8
6.3.7.2 Beskrivelse på individniveau	6.3-9
6.3.7.3 Beskrivelser på stationsniveau	6.3-9
6.3.8 Rapportering	6.3-9
6.3.9 Forslag til supplerende undersøgelser	6.3-10
6.3.10 Referencer	6.3-11
Bilag 6.3.1 Dissekering af ålekvabbe	6.3-13
Bilag 6.3.2 Typeklassifikation af kuld og abnormiteter hos yngel af ålekvabbe	6.3-14
Bilag 6.3.3 Typer af deformiteter hos ålekvabbens yngel	6.3-16
Bilag 6.3.4 Eksempler på ydre sygdomme hos voksne ålekvabber	6.3-17
Bilag 6.3.5 Eksempler på EROD- og proteinanalyse	6.3-18
Bilag 6.3.6 Anvisning til undersøgelse af årringe i otoliter fra ålekvabbe	6.3-21
Bilag 6.3.7 Supplement - Anvisning til undersøgelse af kønsratio i yngel fra ålekvabbe	6.3-22

6.3 Biologisk effektmonitoring – fisk

Reproduktiv succes og enzymaktivitet hos ålekvabbe

6.3.1 Formål

Formålet med den biologiske effektovervågning af ålekvabbe er at vurdere i hvilken grad, der forekommer effekter i miljøet som følge af ydre stressfaktorer, primært miljøfarlige stoffer, på ålekvabbe (*Zoarces viviparus*) i kystnære områder.

6.3.2 Baggrund

Ålekvabben er en velegnet monitoringsorganisme, da den anses som en stationær fisk, udbredt i danske kystnære områder og fjorde og kan let indsamles. Yderligere er den levendefødende, hvor hunnen bærer hele kuld bestående af 20 - 300 unger. Hermed kan eventuelle effekter på dens reproduktion, herunder skader på ynglen, let undersøges (Neuman *et al.* 1999).

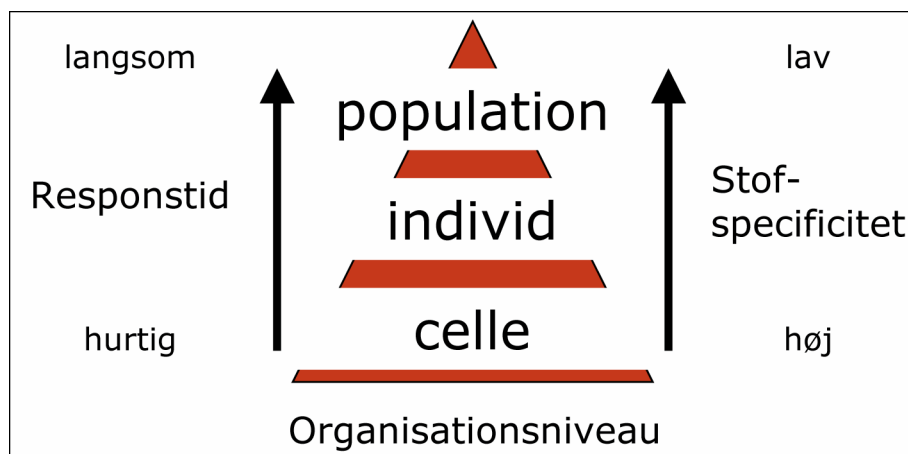
Teratogene effekter så som deformiteter af ålekvabbens yngel kan skyldes ydre stresspåvirkninger, fx pga. belastningen med miljøfarlige stoffer som PAH, klorerede organiske forbindelser, tungmetaller og stoffer med hormonlignende effekter (Bodammer 1993), men også andre stresssituationer fra fx iltsvind kan påvirke yngel gennem tidlig dødelighed (Strand *et al.* 2004).

Tabel 6.3.1 Udvikling af ålekvabbens yngel i perioden august – februar.

	Befrugtning af æg	Embryo-udvikling	Blommesæk forsvundet		Yngel forlader moderen
Måned	august	1. september	15. oktober	1. december	1. februar
Længde	~6 mm		~25 mm	~35 mm	~50 mm

6.3.3 Principper

Ved samtidige undersøgelser af både reproduktiv succes og aktivitet af afgiftningsevenzymer, er der mulighed for at beskrive effekter af lang- og korttidspåvirkninger, effekter af det samlede pres af miljøfarlige stoffer og mere specifikke effekter af enkelte stoffer eller stofgrupper (Figur 6.3.1).



Figur 6.3.1 Sammenhæng mellem organisationsniveau og effekter.

Effekter på ålekvabens reproduktion afspejler langtidseffekter og integrerer effekter af mange forskellige stoffer og blandinger. Den reproduktive succes kan sammenlignes mellem områder og med ubelastede referenceområder mere generelt. Svenske undersøgelser har vist, at kun 0 - 5% af hunner indsamlet i referenceområder har mere end 5% abnormt yngel (Vetemaa et al. 1997, Svedäng & Förlin 1997).

EROD-aktivitet i lever fra ålekvabbe er et mål for aktiviteten af afgiftningenszymer, der er ansvarlig for eliminering af organiske miljøgifte, fx PAHer og PCBer (Stagg & McIntosh 1998). Aktiviteten afspejler derved kortidseffekter fra denne type af stoffer. Enzymaktivitet kan også bruges ved trendanalyser inden for et område, og det anbefales, at EROD-aktiviteten måles i forhold til en kendt/referenceprøve. Direkte sammenligning af områder, fx et belastet og et referenceområdet, bør kun gøres, hvis analyserne er udført af det samme laboratorium og sammenlignes i forhold til den samme referenceprøve.

Vær opmærksom på, at betydelige sæsonvariationer i EROD-aktivitet kan forekomme (Ronisz et al. 1999), så undersøgelser, der sammenlignes, bør udføres på den samme tid af året.

Oplysninger om forekomst af synlige ydre sygdomme og parasitinfectioner kan bidrage som supplerende parametre ved beskrivelse af fiskenes sundhed i et område. Karakterisering af sygdomme bør ske ifølge ICES's guideline (Bucke et al. 1996), se også Bilag 6.3.4.

6.3.4 Prøvetagning

Tidspunkt: 15. oktober – 1. december. Prøvetagningen bør ske inden for en uge. Hvis dette ikke lykkedes, kan indsamlingen også ske i senere uger. I så fald skal data dog rapporteres særskilt ind i MADS som uafhængige observationer.

Hvis muligt bør områderne, der dækkes af allerede eksisterede muslingestationer, vælges, så belastningsniveauet af miljøfarlige stoffer er kendt. Alternativt kan belastningsniveauet vurderes gennem måling af miljøfarlige stoffer i lever og galde hos ålekvabben.

Noter stationskoordinater, indsamlingsperiode, saltholdighed og temperatur samt antal fangstforsøg (beregnet evt. CPUE-værdier).

Fra hvert område skal der optimalt indsamles 50 drægtige hunner. Eventuel transport af levende fisk skal foregå i friskt, afkølet vand fra indsamlingsstedet med god lufttilførsel fra luftpumper.

Det anbefales, at fiskene holdes gående levende fra fangsttidspunktet og indtil undersøgelsen foregår (maks. 7 dage) – fx i en vandret liggende ruse eller i et hyttefad placeret i indsamlingsområdet. De må ikke opbevares i en samlet klynge som ål ellers ofte bliver. Ved opbevaring skal der sørges for, at vandet er rent, vel iltet og at der er plads til bevægelse.

Vær opmærksom på, at de 10 fisk, der skal undersøges for EROD-aktivitet (10 stk. fra hvert område), skal dissekeres lige efter indsamlingstidspunktet. Dissektionen skal ske hurtigt efter aflivningen, hvorpå leverprøverne fryses ned ved -80°C i en fryser eller i flydende N_2 (-196°C) indtil analyse. Nedfrosset lever skal analyseres hurtigst muligt, alternativt kan en prøveopbevaring laves på leveren direkte, hvilken har længere holdbarhed ved -80° end hel lever. Opbevaring af prøver i tøris (-78°C) kan anvendes under transport.

Det anbefales også, at reproduktiv succes undersøges på levende fisk. Som nødløsning: Ved undersøgelser af deformiteter samt eventuelle målinger af miljøfarlige stoffer kan fiskene fryses ned levende og først dissekeres ved en senere lejlighed. Dog risikerer man at miste information om visse typer af rygradslæsioner, der kan forekomme i ynglen.

Husk, da ålekvabben er fredet i dens drægtighedsperiode, at der behøves dispensation fra Fiskeridirektoratet. Ansøgning bør fremsendes min. 2 mdr. før indsamlingen.

6.3.5 Analysemetoder

6.3.5.1 Håndtering og dissektion af friske ålekvabber

1. Fiskens totalvægt registreres (0,1 g).
2. De voksne fisk slås ihjel med en slag i hovedet, hvorpå også nakkehvirvlerne skæres over.
3. Notere eventuelle ydre skader/sygdomme (*Bilag 6.3.4*).
4. Bugen klippes op fra gat til strube.

5. Kønnen bestemmes.
6. Hos hanner vejes testiklerne.
7. Hos hunner: Ovariet med yngel punkteres og ynglen presses forsigtigt over i sigte. Ynglen overføres derpå i en forudvejet bakke, der efterfølgende vejes (totalvægt af kuld, 0,1 g).
8. Derpå fyldes bakken op med mineralvand med kulsyre, hvorpå ynglen hurtigt bedøves, og ynglen kan undersøges jf. punkt 13. - 15.
9. Lever og galde dissekeres fra. Undgå punktering af galdesækken og spild på leveren.
10. Leveren vejes (0,01 g).
11. Leveren overføres til kryorør og nedfryses i flydende nitrogen (eller tøris) til brug for enzymaktivitetsmålinger. Alternativt laves et S9 præparat som nedfryses til -80°C . Til eventuelt kemisk analyse overføres venstre leverhalvdel til syrerensede og udglødede dramglas og galde til Eppendorfrør og begge nedfryses til -20°C .
12. De resterende indvolde tages ud af fisken, hvorpå fisken vejes igen (somatisk vægt, 0,1 g).
13. Totallængden af fisken måles (0,5 cm)
14. Dødt og levende yngel adskilles og tælles. Det normale yngel inddeles i størrelsesfraktioner på 2,5 mm. Dette laves nemmest ved at lægge dem på mm-papir, hvor størrelsesfraktionerne er tegnet ind. Tælling kan foregå direkte eller gennem billedanalyse på et senere tidspunkt.
15. Antallet af abnormt yngel klassificeres (0, A-I) jf. *Bilag 6.3.2*.
16. Noter den voksnes huns reproduktive status, jf. *Bilag 6.3.2*.

6.3.5.2 Dissekering af nedfrossen fisk

1. Fisken tões langsomt op.
2. Fiskens totalvægt registreres (0,1 g).
3. Bugen klippes op fra gat til strube.
4. Ungesækken punkteres og ynglen presses forsigtigt over i sigte. Ynglen overføres derpå over i en forudvejet bakke, der efterfølgende vejes (totalvægt af kuld, 0,1 g).
5. Lever og galde dissekeres fra. Undgå punktering af galdesækken. Leveren vejes (0,01 g).

6. Leveren deles i to halvdele. Til eventuelt kemisk analyse overføres venstre leverhalvdel til syrerensede og udglødede dramglas og galde til Eppendorfrør og begge nedfryses til -20°C .
7. De resterende indvolde tages ud af fisken, hvorpå fisken vejes igen (somatisk vægt, 0,1 g).
8. Totallængden af fisken måles (0,5 cm).
9. Yngel indeles i størrelsesfraktioner på 2,5 mm og tælles. Dette gøres nemmest ved at lægge dem på mm-papir, hvor størrelsesfraktionerne er tegnet ind. Tælling kan foregå direkte eller gennem billedanalyse på senere tidspunkt.
10. Antallet af abnormt yngel klassificeres (0, A-I) ifølge *Bilag 6.3.2* og *Bilag 6.3.3*.

Bemærk: Punkt 5 er kun nødvendig, hvis der skal måles for miljøfarlige stoffer.

6.3.5.3 Parameterberegning

Følgende parametre beregnes:

- Konditionsindeks (KI) = $100\% \cdot (\text{somatisk vægt (g)} / \text{længde (cm)})^3$
- Lever-somatisk indeks (LSI) = $100\% \cdot \text{levervægt} / \text{hunnens somatiske vægt}$
- Gonade-somatisk indeks (GSI) for hunner: = $100\% \cdot \text{totalvægt af kuld} / \text{hunnens somatiske vægt}$
- Reproduktiv kapacitet (RK): $\text{antal normalt yngel} / \text{hunnens totalvægt}$

Desuden beregnes for hvert kuld:

- Andel af hunner med $>5\%$ sent dødt yngel i kuld (type A)
- Andel af hunner med $>5\%$ tidligt dødt yngel i kuld (type 0)
- %-vis fordeling af deformiteter (type)
- længdefordeling af normalt yngel (2,5 mm klasser)

Hvis voksne hanner undersøges, anbefales følgende parametre:

- Konditionsindeks (KI) = $\text{somatisk vægt (g)} / \text{længde}^3 \text{ (cm)}$
- Lever-somatisk indeks (LSI %) = $\text{levervægt} / \text{hunnens somatiske vægt} \cdot 100$
- Gonade-somatisk indeks (GSI) for hanner: $\text{vægt af testis} / \text{hannens somatiske vægt} \cdot 100$

6.3.5.4 Analyse af enzymaktivitet

EROD-aktivitet kan bestemmes med forskellige metoder, men man skal være opmærksom på, at forskellige metoder sjældent giver de samme absolutte værdier, men forholdet mellem prøverne bør blive tilnærmelsesvis ens. Dette skyldes enzymernes følsomhed over for prøvebehandling og faktorer såsom temperatur og pH. Metoderne er forskellige med hensyn til buffer, reaktionstid, standardsubstans samt renhed af standarden. Det anbefales, at den samme metode bliver brugt fra år til år for at kunne sammenligne resultater, og at en intern referenceprøve bruges som kalibrering mellem år. Et eksempel på præparering, opbevaring og analyse findes i *Bilag 6.3.5* og følger den af ICES's anbefalede metode (*Stagg & McIntosh 1998*).

Alle metoder bygger på den samme princip. Hvis der er EROD-enzym (ethoxy-1-resorufin-O-deethylase) til stede, kan disse enzymer deetoxilere reagentet 7-ethoxyresorufin. Dannelsen af produktet resosufin måles spektrofluorometrisk. Aktiviteten af enzymet angives ved hastigheden, hvormed resorufin produceres pr. mg protein. Mængden af protein bestemmes separat fx spektrofotometrisk efter en Bradford-reaktion, hvor Bovin serum albumin (BSA) bruges som proteinstandard. Alle resultater skal angives som pmol (dannet resosufin)/min/mg protein.

6.3.6 Kvalitetssikring

For at ensarte observationerne skal de angivne metoder for reproduktiv succes i denne vejledning anvendes.

For EROD-analyser skal metoden være veldokumenteret, specielt med hensyn til kvantificering af resosufin og brug af intern reference.

Deltagelse i nationale eller internationale workshops anbefales for at harmonisere og kvalitetssikre undersøgelserne, fx via BEQUALM. Billeder af deformiteter, udveksling og eventuel interkalibrering af EROD-målinger og diskussion er væsentlige elementer i workshoppen. Ved rapportering af data til databaser bør der henvises til deltagelse i sådanne workshops.

6.3.7 Dataindberetning

Dataindberetning til databaser omfatter ud over stationsoplysninger også oplysninger om de undersøgte parametre, hhv. på individniveau og stationsniveau.

6.3.7.1 Stationsbeskrivelse

Følgende observationer noteres for hver station:

- Dato for indsamlingsperiode
- Antal fangstforsøg
- Position
- Dybde

- Fangstmetode
- Det totale antal af fangne ålekvabber (hanner og hunner).

6.3.7.2 Beskrivelse på individniveau

Længde, vægt, somatisk vægt og levervægt samt observationer af ydre skader/sydomme på de voksne fisk. De beregnede parametre:

- Konditionsindeks (KI)
- Lever-somatisk indeks (LSI %)
- Reproduktiv kapacitet (RK)
- Gonade-somatisk indeks (GSI %)
- Antal normalt yngel
- Længde af normalt yngel (mm), middel og standardafvigelse
- Antal deformt yngel i kuld, totalt (type B-G)
- Antal sent dødt yngel i kuld (type A)
- Antal tidligt dødt yngel i kuld (type 0)
- Andel yngel med reduceret vækst (svensk standard: mindre end de 3 største størrelsesklasser i kuld)
- %-vis fordeling af alle deformiteter (type)
- EROD-aktivitet (pmol/(mg protein x min))

6.3.7.3 Beskrivelser på stationsniveau

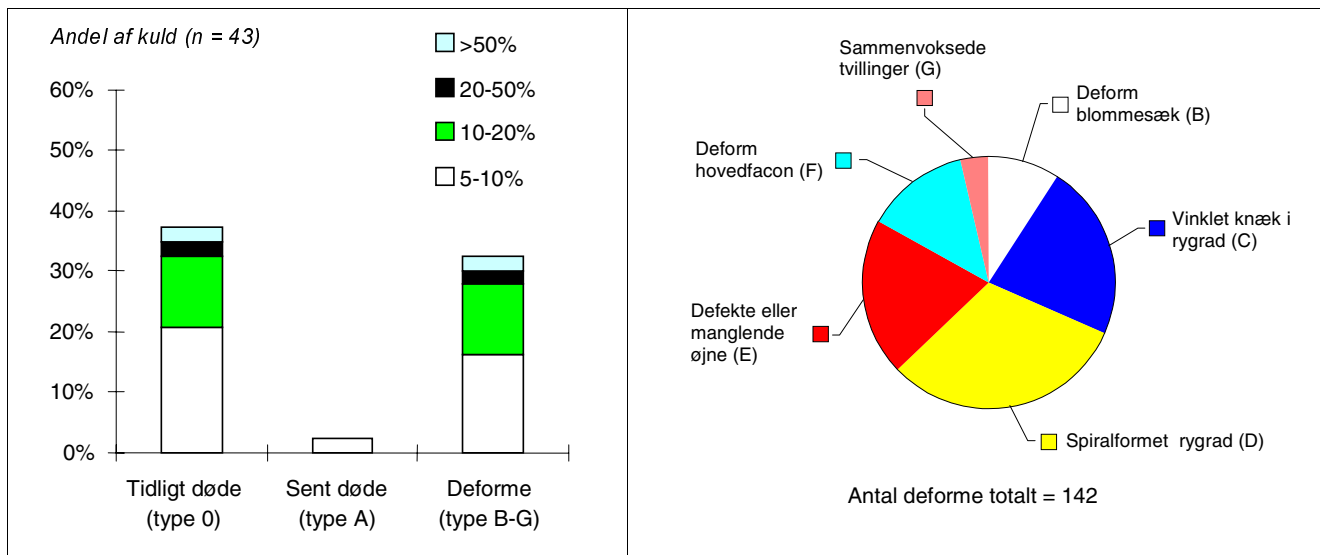
På stationsniveau angives følgende parametre som middelværdi inkl. standardafvigelse:

- Konditionsindeks (KI), middelværdi inkl. standardafvigelse
- Lever-somatisk indeks (LSI %), middelværdi inkl. standardafvigelse
- Reproduktiv kapacitet (%), middelværdi inkl. standardafvigelse
- Gonade-somatisk indeks (GSI %), middelværdi inkl. standardafvigelse
- Længde af normalt yngel (mm), middelværdi inkl. standardafvigelse
- Andel af hunner med >5% deformt yngel i kuld (type B-G)
- Andel af hunner med >5% sent dødt yngel i kuld (type A)
- Andel af hunner med >5% tidligt dødt yngel i kuld (type 0)
- %-vis fordeling af alle deformiteter (type)
- EROD-aktivitet, middelværdi inkl. standardafvigelse

Data skal indrapporteres til databasen MADS som STANDAT-fil. Hvis indsamlingen forløber over flere forskellige uger, skal data dog rapporteres særskilt for hver uge som uafhængige observationer. Data for abnormt yngel kan dog kombineres igen under dataanalyser. I så fald skal der gøres opmærksomt på, at data fra forskellige indsamlingsuger er blevet anvendt.

6.3.8 Rapportering

Det foreslås, at præsentation af data fx i rapporter omfatter følgende oplysninger, som angivet på figur 6.3.2 og 6.3.3.



Figur 6.3.2 Andel af kuld med forhøjet forekomst af hhv. tidligt døde, sent døde og deformt yngel i Nakskov Fjord 2002.

Figur 6.3.3 %-vis fordeling af forskellige typer af deformiteter (B-G) i Nakskov Fjord 2002.

Resultater for ålekvabbers reproduktion bør for hver station angives ved den procentvise andel af kuldene, der har en forhøjet niveau (dvs. >5%) fejludviklet yngel delt op på hhv. tidligt døde (type 0), sent døde (type A) og deforme (type B-G). Derudover kan den procentvise fordeling mellem de forskellige typer angives –se figurer.

Derudover bør også den reproduktive kapacitet angives.

Referencetilstanden for forekomst af fejludviklet yngel kan ud fra nuværende viden sættes til, at maksimalt 5% af kuldene bør have:

- >5% andel sent dødt yngel (type A)
- og >5% andel fejludviklet yngel (type B-G).

Mht. til tidligt dødt yngel (type 0), så har vi p.t. ikke kendskab til referencetilstand.

Referencetilstand for forekomst af fejludviklet yngel hos ålekvabbe er dog p.t. under revurdering.

6.3.9 Forslag til supplerende undersøgelser

- Kemiske analyser for indholdet af forskellige miljøfarlige stoffer i fiskene – fx i lever eller muskel. Dette kan omfatte målinger af bl.a. PCB, PAH, organometaller som TBT, tungmetaller, m.fl.
- PAH metabolitter i galde. Simple fluorescensmålinger på galdeprøver som mål for eksponering til PAH, hvor koncentrationen er normaliseret til 1-hydroxypyren og/eller benzo(a)pyren. Et relevant supplement til EROD-aktivitet. PAH-metabolitter kan også kvantificeres vha. HPLC. (Ariese et al. 2005).

- Kønsfordeling i fiskeyngel. Skæve kønsfordelinger i kuldene kan være forårsaget af alvorlige hormonforstyrrelser, hvilke bl.a. er observeret i områder belastet med spildevand (se *Bilag 6.3.7*).
- Vitellogenin i blod og histologi på gonader. Undersøgelser på hanfisk kan udtrykke, om fiskene er udsat for hormonforstyrrelser (*Gercken & Sordyl 2002; Rasmussen et al. 2002*).
- Populationsundersøgelser af ålekvabbe, fx aldersfordeling (bestemmelse ud fra otoliter, se *Bilag 6.3.6*) eller brug af kvantitative fangstdata (CPUE).

6.3.10 Referencer

Ariese, F., Beyer, J., Jonsson, G., Visa, C.P. & Krahn, M.M. 2005: Review of analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic compounds (PACs) in fish bile. – ICES Techniques in Marine Environmental Sciences No. 39, 41 pp.

Bodammer, J., 1993: The teratological and pathological effects of contaminants on embryonic and larval fishes exposed as embryos: a brief review. – American Fisheries Society Symposium 14: 77-84.

Bucke, D., Vethaak, D., Lang, T., and Mellergaard, S., 1996: Common diseases and parasites of fish in the North Atlantic: training guide for identification. – ICES Techniques in Marine Environmental Sciences No. 19, 27 pp.

Gercken, J. & Sordyl, H., 2002: Intersex in feral marine and freshwater fish from northeastern Germany. – Marine Environmental Research 54 (3-5): 651-655.

Larsson, D.G.J., Hallman, H. & Forlin, L., 2000: More male fish embryos near a pulp mill. – Environmental Toxicology and Chemistry 19 (12): 2911-2917.

Neuman, E., Sandström, O. & Thoresson, G. 1999: Guidelines for coastal fish monitoring. National Board of Fisheries, Institute of Coastal Research, Öregrund, Sweden, 44 p.

Rasmussen, T.H., Andreassen, T.K., Pedersen, S.N., Van der Ven, L.T.M., Bjerregaard, P. & Korsgaard, B. 2002: Effects of waterborne exposure of octylphenol and oestrogen on pregnant viviparous eelpout (*Zoarces viviparus*) and her embryos in ovario. – Journal of Experimental Biology 205 (24): 3857-3876.

Ronisz, D., Larsson, D.G.J. & Förlin, L. 1999: Seasonal variations in the activities of selected hepatic biotransformation and antioxidant enzymes in eelpout (*Zoarces viviparus*). – Comparative Biochemistry and Physiology 124C, 271-279.

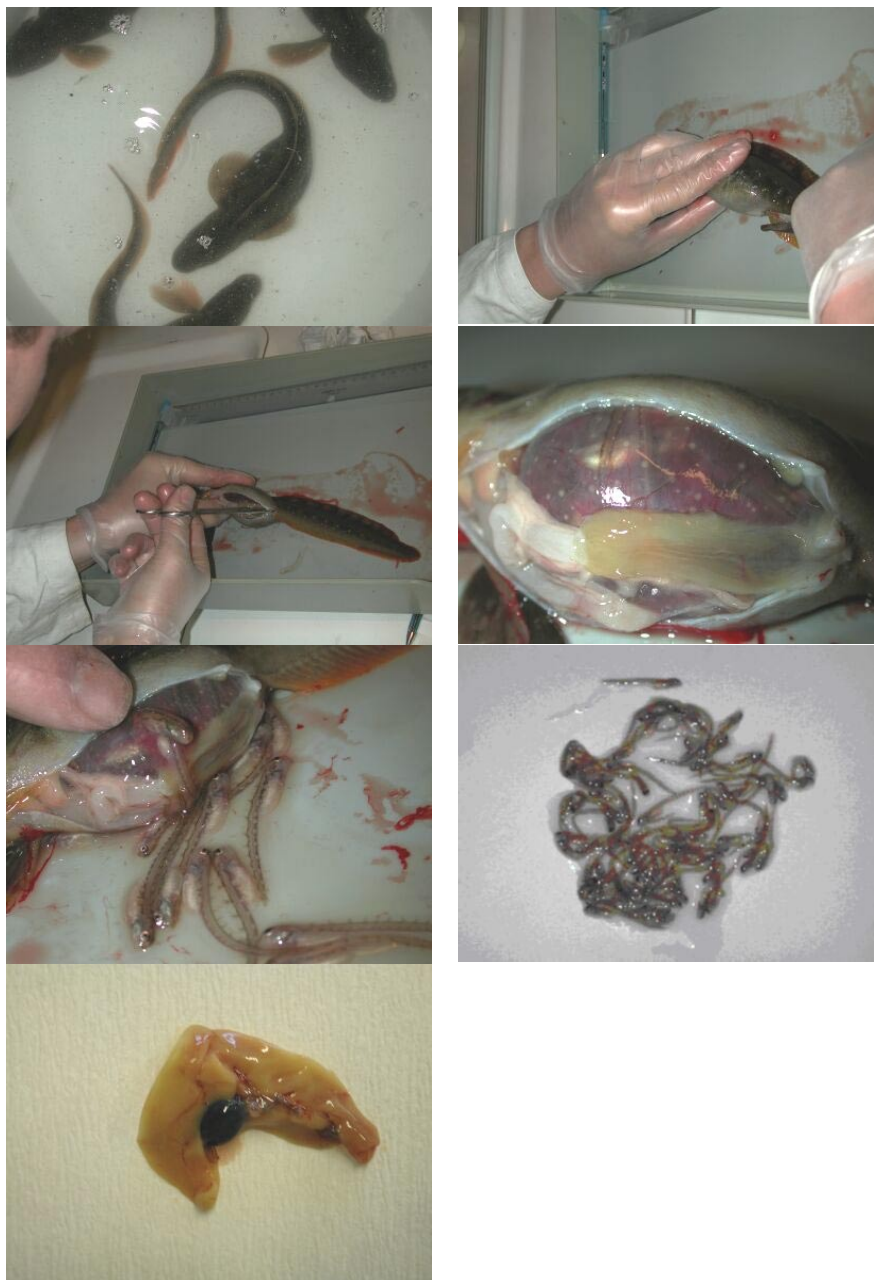
Stagg, R. & McIntosh, A., 1998: Biological effects of contaminants: Determination of CYP1A-dependent mono-oxygenase activity in dab by fluorimetric measurement of EROD activity. – ICES Techniques in Marine Environmental Sciences No. 23, 16 pp.

Strand, J., Andersen, L., Dahllöf, I. & Korsgaard, B. 2004: Impaired larval development in broods of eelpout (*Zoarces viviparus*) in Danish coastal waters. – Fish Physiology and Biochemistry 30: 37-46.

Svedäng, H. & Förlin, L. 1997: Fiskekologi och fiskfysiologi. – Bottniska viken 1997, pp. 16-17. Umeå Marina Forskningscentrum.

Vetemaa, M., Förlin, L. and Sandström, O., 1997: Chemical industry effluent impacts on reproduction and biochemistry in a North Sea population of viviparous blenny (*Zoarces viviparus*). – Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery 6: 33-41.

Bilag 6.3.1 Dissekering af ålekvambe



Bilag 6.3.2

Typeklassifikation af kuld og abnormiteter hos yngel af ålekvabbe

Tabel 6.3.2.1 Reproductiv status af voksne og kuld.

1A. Kuld med mere end 20 stk. frit yngel >10mm under tilvækst.
1B. Kuld med mindre end 20 stk. frit yngel >10mm
2. Kun befrugtede æg med embryoner (synlige øjne), før klækning
3. Kun ubefrugtede æg (uden øjne)
4. Yngel bedømmes sluppet fri (født)
5. Flere yngel sammenfiltret i en klynge
6. Forekomst af kalcificeret yngel fra tidligere års kuld
7. Juvenil eller ikke udviklet gonade, begge køn
8. Gonade under tilvækst, begge køn

Tabel 6.3.2.2 Karakterisering af fejludviklet yngel, individer.

0. Befrugtede æg eller embryo, der lige er klækket (<10mm)
A. Dødt yngel uden misdannelser, >10 mm
B. Yngel med misdannelser i blommesæk eller indvolde
C. Yngel med "vinkelknæk" på rygrad eller hale
D. Yngel med spiralformet rygrad
E. Yngel med defekt på øjne eller helt manglende øjne
F. Yngel med misdannelser i hovedet
G. To sammenvoksede yngel, evt. som siamesisk tvilling
H. Andre abnormiteter evt. som kalcificeret yngel eller sammenfiltrede klynger
I. Signifikant mindre yngel, "dværgvækst"

Ved forekomst af flere abnormiteter på samme individ angives begge.

Skema til undersøgelse af ålekvabbers reproduktion

PRØVE ID: _____

Station: _____ Indsamlingsdato: _____ Undersøgesdato: _____

Voksne: Køn: _____ Længde: _____ cm Testis vægt: _____ g

Total vægt: _____ g Somatisk vægt: _____ g Lever vægt: _____ g

Synlige sygdomme på voksne: Skin ulcers: _____ Lever knuder: _____

Andet: _____

Yngel: Kuld vægt, total: _____ Reproduktiv status af voksne og kuld (1-10): _____

Normalt yngel: Antal normalt yngel: _____

Længde-fordeling:

længde (mm)	<10	10 - 12.5	12.5 - 15	15 - 17.5	17.5 - 20	20 - 22.5	22.5 - 25	25 - 27.5	27.5 - 30	30 - 32.5	32.5 - 35	35 - 37.5	37.5 - 40	40 - 42.5	42.5 - 45	45 - 47.5	47.5 - 50
antal																	

Deformt eller dødt yngel (Type 0 - I):

Typer, antal		0	A	B	C	D	E	F	G	H	I	Antal yngel med 2 typer deformitet
antal levende, abnorme	antal DØDE total	tidlig død < 10 mm	tidlig død > 10 mm	deform blomme	knæk i ryg	spiral	øjens-kade	hoved deformt	siam. tvilling	andet	dværg	

Vævsprøver til analyse:

Lever til enzymassay: _____ Lever til kemisk analyse: _____ Galde: _____ ml

Yngel fikseret i Bouinsvæske: _____ Andet: _____

Bilag 6.3.3 Typer af deformiteter hos ålekvabbers yngel



0) Tidligt dødt yngel < 10 mm



A) Sent død unge



B) Deform næringsblomme



C) Vinklet knæk i ryggrad



D) Spiralryg



E) Øjenskade i nr. 2 fra oven, nederste unge mangler øjne



F) Hoveddeformationer, normal unge nederst til højre



G) Siamesiske tvillinger

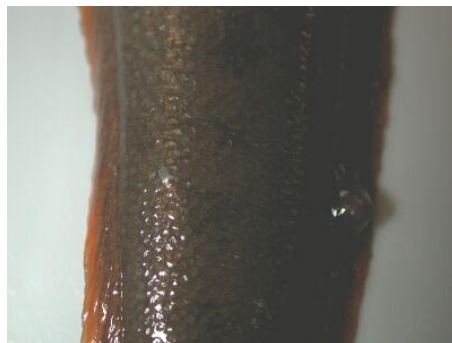
Bilag 6.3.4

Eksempler på ydre sygdomme hos voksne ålekvabber

Karakteriseret efter bl.a. *Bucke et al. (1996)* og ICES TIMES No. 19.



Skin ulcers, væskende infektioner/sår



Skin tumor formation



Lever-knuder



Øjenskader, fx øjet dækket af hvidlig hinde

Bilag 6.3.5

Eksempler på EROD- og proteinanalyse

Aktiviteten af P450 (CYP1A) enzymesystemer måles som EROD-aktivitet for omdannelsen af ethoxyresorufin (substrat) til resorufin (produkt). Vha. fluorescensmålinger kan hastigheden måles, hvorved resorufin dannes (pg/(mg protein min)).

Den nedenstående beskrivelse følger ICES's guideline med kun mindre modifikationer (*Stagg & McIntosh 1998*).

Prøveopbejldning

Mens prøverne er under behandling, opbevares de altid afkølet i et isbad.

1. 1-2 g friskt væv + 4*vægten af buffer (0,1 M NaHPO₃, pH = 8,0 samt 0,15 M KCl). pH = 8 er optimalt for EROD-aktivitet i ål-kvabbe (*Förlin, pers. komm.*).
2. Homogenisere med teflon-pestil, 400 rpm.
3. Prøven overføres til centrifugerør og centrifugeres ved 4°C, 9000 g = S9 fraktion.
4. S9-fraktion dekanteres over i et reagensglas og glycerol tilsættes, 10-20% af volumen.
5. Prøven blandes forsigtigt med en pasteur pipette.
6. Prøven deles op på mindst 2 cryo-rør, så at replikater haves.
7. Prøven kan herpå nedfryses til -80°C eller analyseres direkte.

Reagenser til EROD analyse

Buffer, pH = 8,0:

100 mM NaHPO₄, pH = 8,0

150 mM KCl

1 mM dithiothreitol

HCl til pH-justering

0,4 mM Resorufin (opbevares mørkt ved 5°C)

4,82 mg 7-ethoxyresorufin

50 ml Methanol

100 mM NADPH (reaktionsstartere, laves frisk hver dag)

41,67 mg NADPH

0,5 ml destilleret vand

Reaktionsblanding (2ml/prøve, laves frisk hver dag)

- 1,96 ml buffer, pH = 7,4, til et 2-ml Eppendorf-rør
- 10 µl 0,4 mM 7-ethoxyresorufin
- 10 µl 100 mM NADPH

EROD-analyse

- præ-inkubér reaktionsblandingen i Eppendorf-røret i 5 min. ved 20°C i et vandbad eller termoholder
- tilsæt 20 µl S9-prøve
- vortex
- inkubering i 5 min. ved 20°C
- stop reaktion med 200 µl KOLD acetone
- centrifugering i 5 min. ved 6000x g
- mål en blindprøve, hvor S9-fraktionen erstattes med ren buffer.

Mål fluorescensen ved ex.535nm/em.585nm.

Rhodamin standard

- stamopløsning: 2 mM i DMSO (opbevares mørkt ved 5°C)
- arbejdsopløsning: 20 nM, 100 x fortynding af stamopløsning, fortyndes med buffer
- fortyndingsrække; 0, 0,5, 1, 2, 6, 8, 10 µl arbejdsopløsning i Eppendorf-rør
- tilsæt 200 µl KOLD acetone + 100 µl reaktions blanding
- centrifugering i 5 min. ved 6000 x g

Mål fluorescensen ved ex.535nm/em.585nm.

Bemærk: Rhodamin er mere holdbar end resosufin standard, men det er nødvendigt at bestemme en konverteringsfaktor fra rhodamin til resosufin for den enkelte metode. Dette kan laves en gang pr. år, hvorefter rhodamin bruges som standard. Resosufin kan bruges som standard direkte, men holdbarheden er kort og renheden meget skiftende mellem batcher.

Proteinbestemmelse vha. Bradford metode

Indholdet af protein i prøven anvendes som normaliseringsfaktor for enzymaktiviteten.

Proteinindholdet bestemmes spektrofotometrisk vha. af en farveraktion med Bradford reagens.

Lineært koncentrationsområde: 0,1-1,4 mg protein/ml. Opbevar Bradford arbejdsopløsning i mørke.

Udførsel:

- fortynd S9-fraktion 50 ganger med dest. vand
- fortynd Bradford reagens 6 gange med dest. vand
- tilsæt 20 µl fort. S9 + 180 µl dest. vand + 560 µl fort. Bradford reagens
- vortex prøven

- reaktionstid: fra 5-45 min.
- overfør prøven til 1 ml kuvette
- mål absorbansen ved 595 nm.

Mål en blindprøve, hvor S9-fraktionen erstattes med ren buffer.

Proteinbestemmelse kan som et alternativt foretages vha. Lowry-metoden.

BSA standard, intern og ekstern kalibrering

Stamopløsning: 1mg BSA/ml.

Arbejdsopløsning: 0,1mg BSA/ml (dvs. 10x fortynding).

Fortyndingsrække: X = 0, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200 µl + (200-X) µl vand + 560 µl fort. Bradford reagens.

Som kontrol tilsættes BSA fortyndingsrække til en prøve (1:1) som intern kalibrering, standardaddition.

96 plade metode

BSA standarder: 0,1 – 1,4 mg/ml

- tilsæt 5 µl af S9 fraktionen eller BSA standarder til hver brønd; som blank tilsæt 5 µl buffer.
- tilsæt 250 µl Bradford reagens og ryst i 30 sekunder
- lad prøven inkubere mellem 5 og 45 min. (protein-farvekompleks er stabil i op til 1 time)
- mål absorbansen ved 595 nm

Bilag 6.3.6

Anvisning til undersøgelse af årringe i otoliter fra ålekvabbe

1. Hovedet skæres op på midten i to adskilte halvdele med en rent snit ved brug af en skalpel.
2. Hjernemassen tages bort med en pincet. Vær opmærksom på at otoliterne godt kan sidde gemt i hjernemassen.
3. De 2 hvide otoliter (længde: 2-4 mm) sidder gemt i hver sin halvdel i en lille fordybning i den bagerste del af hjernehulen. De graves frem med pincetten. Man kan godt risikere – pga. et urent snit – at begge otoliter befinder sig i samme halvdel af hovedet.
4. Otoliterne tørres forsigtigt af på en klud, da der godt kan sidde en mindre hinde omkring dem, der siden hen kan vanskeliggøre undersøgelsen.
5. Årringene i begge otoliter tælles under en stereolup. De brede hvide områder udgør sommer-tilvæksten.

Bilag 6.3.7

Supplement - Anvisning til undersøgelse af kønsratio i yngel fra ålekvabbe

Formål

At bestemme kønsratio blandt yngel af den levendefødende ålekvabbe (*Zoarces viviparus*). En skæv kønsfordeling kan tyde på, at kønsudviklingen er påvirket af hormonforstyrrende stoffer.

Baggrund

For at kunne vurdere i hvilket omfang, der forekommer biologiske effekter af miljøfarlige stoffer i miljøet, behøves forskellige metoder til at kunne vurdere typen af den pågældende forurening, der ønskes undersøgt. Kønsratio er en sådan relevant parameter, der vil kunne bidrage til at opnå en viden, om der forekommer effekter på reproduktion og rekruttering af fisk i et område.

Metoden er inspireret af undersøgelser af ålekvabbens yngel, der har vist en overrepræsentation af hanner på 60% i ynglen indsamlet i kystnære områder med udledninger fra industri. Dette tyder på effekter af hormonforstyrrende stoffer, idet den normale kønsratio vurderes at være 50:50 (Larsson *et al.* 2000; Larsson & Förlin 2002). Tilsvarende må tilfælde, hvor hunner er overrepræsenteret, tages som et tegn på påvirkninger af østrogene stoffer.

Materialer

Det anbefales, at ynglen har en længde på min. 25 mm, dvs. indsamlet efter 15. oktober, for at kønskaraktererne fremstår tydeligt ved analyse, men selv i mindre yngel er det muligt at bestemme køn. Kun yngel, der er levende ved tidspunktet for fiksering, indgår i undersøgelsen.

15 kuld bestående af min. 50 stk. yngel anbefales pr. station.

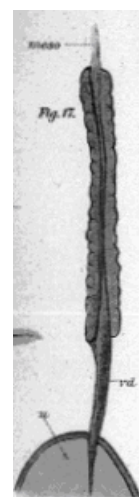
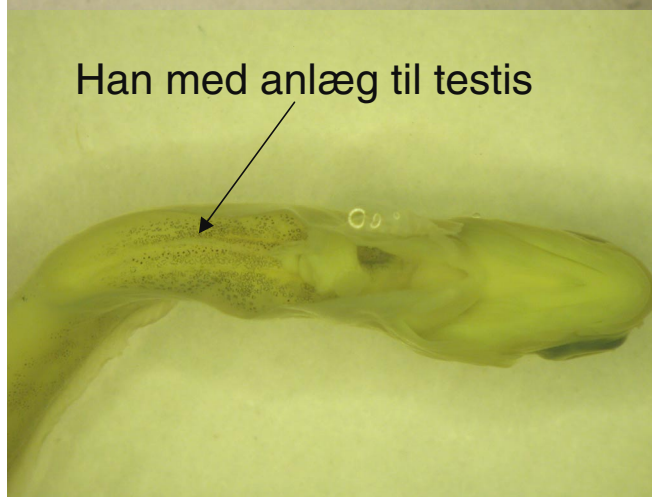
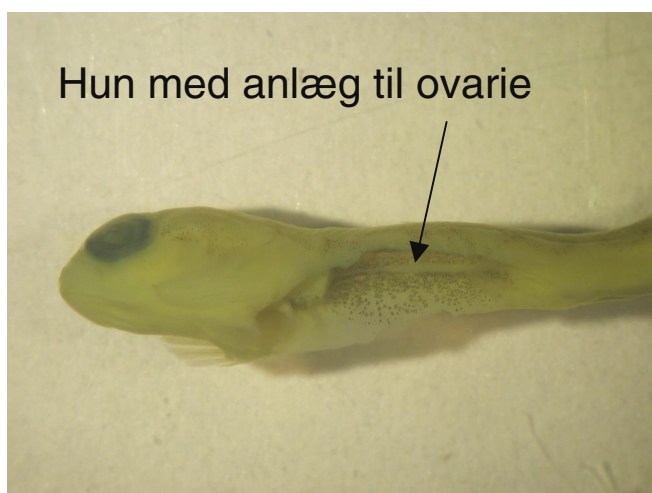
Kemikalier og udstyr

- Bouins fikseringsvæske (75% mættet opløsning af picric acid, 20% formalin, 5% eddikesyre, pH 1,0)
- 70% ethanol
- stereolup.

Fremgangsmåde

1. Ynglen konserveres i Bouins fikseringsvæske umiddelbart efter, at ynglen er dissekeret ud af moderen og undersøgt for andre relevante parametre, dvs. længde, deformationer, død/levende og totalvægt af kuld. Fikseringen bør vare i min. 30 min., men yngel kan på denne måde opbevares i årevis. Volumen af fikseringsvæsken bør være ca. 10 gange volumen af væv.

2. Før analyse udskiftes fikseringsvæsken med 70% ethanol. For at udvaske fikseringsvæsken bør ethanolen skiftes 3 gange, fx 3 min. i hvert bad.
3. Kropshulen åbnes ved at klippe to snit på hver side af blommesækken – fortil og på langs – med en spids saks. Hvis man er forsigtig, kan blommesækken klippes helt af.
4. Blommesækken løftes til side med en pincet. Man skal være opmærksom på, at gonade-strengen godt kan være hæftet på inder-siden af mavesækken, og at den derved kan risikere at gå i stykker ved for voldsom håndtering.
5. Bestemmelsen af køn foretages ved brug af en stereolup med 10x - 40x forstørrelse. Hunner har anlæg til et ovarie, der fremstår som en tydelig hvidlig bred fortykning midt på strengen, der løber langs med ryghvirvlen i den højre siden af kropshulen. Hanners anlæg til testis fremstår derimod som en tynd samlet streng, der i større yngel kan være opsplittet i to parallelle tynde strenger.



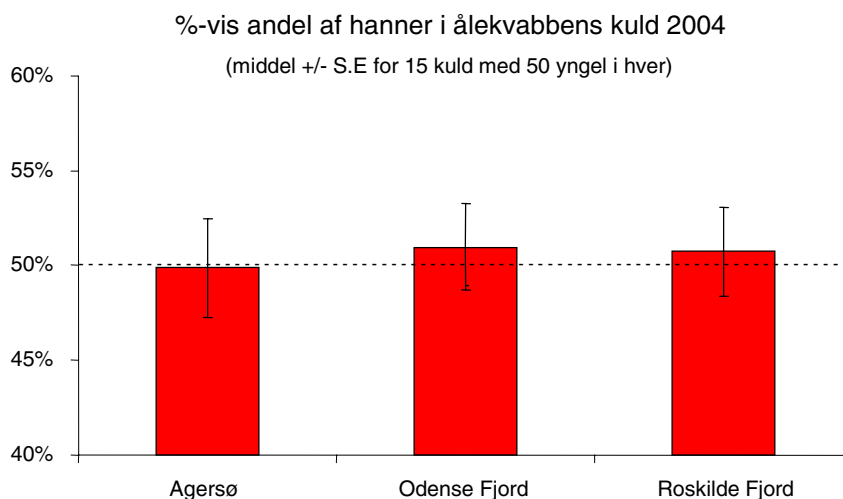
Kønsbestemmelsen af ynglen foregår ved at studere de begyndende anlæg til gonade, hhv. ovarie i hunner og testis i hanner, her fra 15. oktober. Disse køns karakterer bliver synlige, når blommesækken forsigtigt fjernes fra yngel, der har været fikseret i Bouins væske. Foto: J. Strand.

Til sammenligning en tegning af *Jungersen (1889)* af hannens testis i yngel indsamlet sidst i oktober.

6. Det anbefales til brug for den statistiske databearbejdning, at der pr. station undersøges 15 kuld. Disse kuld skal optimalt set være relativt store kuld, idet det anbefales at undersøge 50 stk. yngel pr.

kuld. Yngel fra alle kuld indgår i beregningen af den midlede kønsratio. Variation mellem kuld angives som middel \pm S.E.

7. Statistiske sammenligninger af kønsratio i 2 områder foretages vha. student t-test. I tilfælde af at residual-analysen ikke opfylder forudsætningerne for parametriske tests, kan "randomization analyses without replacements" foretages (Larsson & Förlin 2002).



Undersøgelsen af kønsratio i ålekvabbens kuld i tre danske kystområder i 2004 viste ingen signifikante forskelle i fordelingen mellem hanner og hunner. En lige fordeling mellem hanner og hunner blev fundet i kuld fra alle områder.

Dette betyder dog ikke, at kønsratio i andre områder ikke kan være en relevant markør at inddrage i undersøgelser af effekter af hormonforstyrrende stoffer i havmiljøet. Det ser dog ud til, at sådanne undersøgelser kun er relevante i områder, der ligger tæt på væsentlige kilder som fx spildevandsudløb fra byer og industri.

Relevant litteratur

Larsson, D.G.J., Hallman, H. & Förlin, L., 2000: More male fish embryos near a pulp mill. – *Environmental Toxicology and Chemistry* 19 (12): 2911-2917.

Larsson, D.G.J. & Förlin, L. 2002: Male-biased sex ratios of fish embryos near a pulp mill: Temporary recovery after short-term shutdown. – *Environ. Health Perspect.* 110(8): 739-742.

Jungersen, H.F.E. 1889: Kjønsorganernes udvikling hos benfiskene. Ph.D. thesis from Copenhagen University, Wilhelm Priors Hofboghhandel, København, Denmark, 139 pp.