

Østrogene effekter i ferskvandsmiljøet

Feminiseringen af hanbækørreder i fynske vandløb er forsvundet i perioden mellem 2004 og 2010 sandsynligvis på grund af en forbedret spildevandsrensning på ukloakerede ejendomme i spredt bebyggelse. Metoderne til at undersøge feminisering er udviklet til fisk, men metoderne er også blevet anvendt under forkerte forudsætninger hos muslinger, og nogle resultater og konklusioner er dermed fejlbehæftede.

JANE EBSEN MORTHORST, HENRIK HOLBECH, KNUD LADEGAARD PEDERSEN & POUL BJERREGAARD

Baggrund

Man har siden begyndelsen af 1990'erne fundet feminiserede hanfisk i vandløb nedstrøms udledninger fra rensningsanlæg i mange lande verden over. Feminiseringen af hanfiskene skyldes i de fleste tilfælde eksponering for enten naturlige hunlige kønshormoner (østrogener) udskilt af mennesker og husdyr eller syntetiske østrogener (f.eks. p-piller) udskilt af mennesker, da disse naturlige og syntetiske østrogener i nogle tilfælde ikke fjernes fra spildevandet under rensningsprocessen. Kun i ganske få tilfælde har man kunnet tilskrive den feminiserende effekt udledning af industrikemikalier med østrogen virkning.

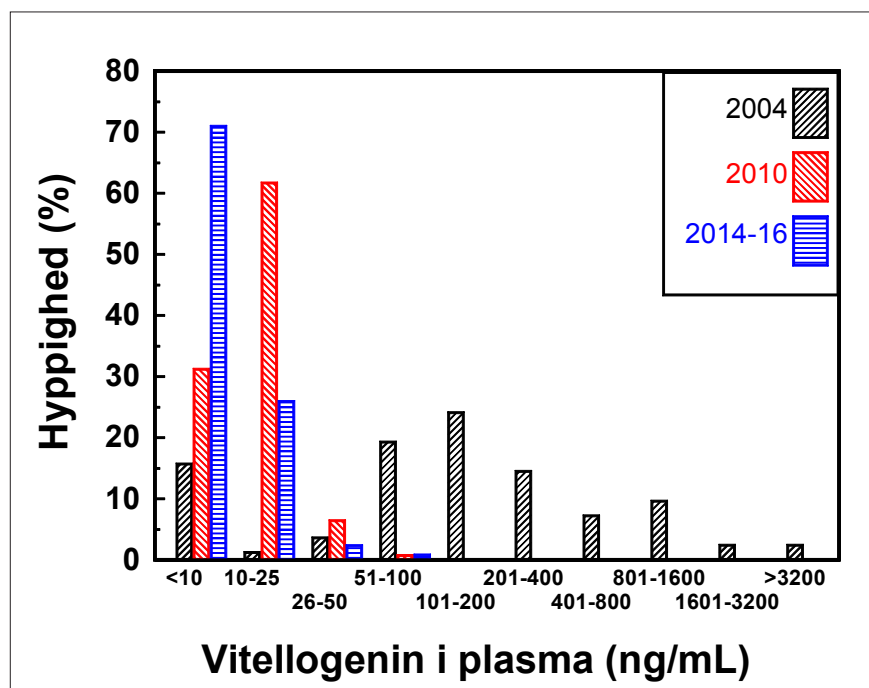
Feminiseringen af hanfiskene kan ytre sig på to forskellige måder, dels ved at hannerne begynder at danne forstadier til æg i testiklerne (intersex), og dels ved at hannerne begynder at danne unaturligt høje mængder af æggeblommeprotein (vitellogenin), som hos hunnerne normalt produceres i leveren med henblik på inkorporering i æggene. Produktionen af vitellogenin foregår under østrogen kontrol, og hanner eller unge, endnu ikke kønsmodne fisk øger produktionen af proteinet, hvis de udsættes for østrogen eller østrogenlignende kemikalier i vandet eller i føden.

Den første Vandmiljøplans indførelse af avanceret tertiær spildevandsrensning på de fleste af de danske centrale rensningsanlæg havde den bonusvirkning – ud over den tilsligtede fjernelse af næringssalte – at den avancerede rensning også fjernede størstedelen af østrogenerne fra spildevandet. En større undersøgelse af udledningen af østrogen aktivitet fra danske rensningsanlæg i 2005 viste, at den østrogene aktivitet langt de fleste steder lå under den koncentration, der er i stand til

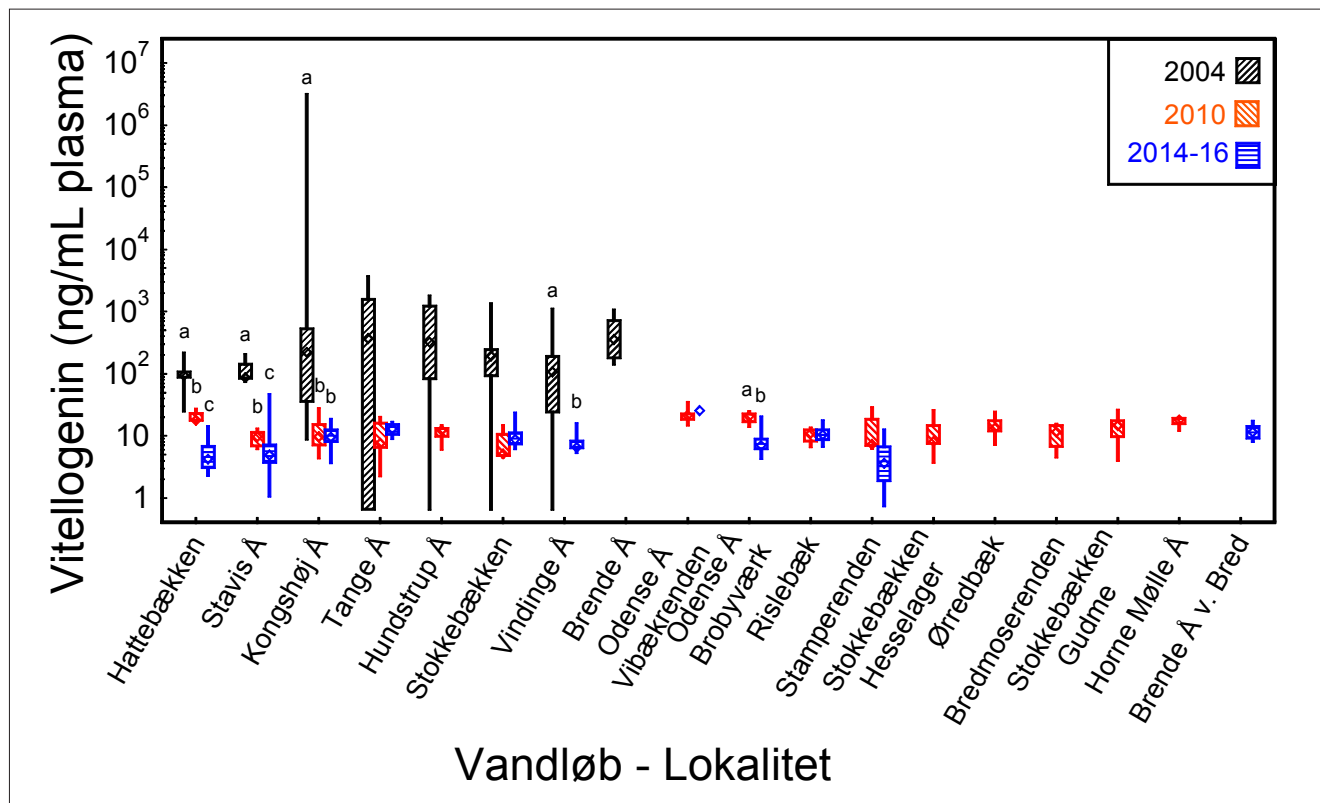
at feminisere hanfisk /1/. I overensstemmelse hermed har vi aldrig været i stand til at påvise betydende forøgelse af vitellogeninkoncentrationer hos hanørreder udsat i netbure i eller nedstrøms udledninger fra rensningsanlæg.

Feminisering hos hanbækørreder

På trods af de centrale danske rensningsanlægs evne til at fjerne østrogener fra spildevandet så vi alligevel feminisering af hanfisk i de danske vandløb omkring årtusindskiftet. Vi så



Figur 1. Fordeling af plasmavitellogeninkoncentrationer hos unge, fynske hanbækørreder i henholdsvis 2004, 2010 og 2014-16. Data fra alle lokaliteter er inddraget. Modificeret efter /5/.



Figur 2. Plasmavitellogeninkoncentrationer hos unge, fynske hanbækørreder i henholdsvis 2004, 2010 og 2014-16. Data fra hver enkelt lokalitet er vist som box-plot, hvor \diamond viser medianen; 25/75- og 10/90-percentiler er vist. Forskellige bogstaver indikerer statistisk signifikant forskel mellem de enkelte år på den enkelte lokalitet. Antallet af fisk på de enkelte stationer og år er forskelligt; figuren bygger på analyser af i alt 359 hanfisk. Modificeret efter /5/

intersex i skaller fra østjyske vandløb /2/ og vi så markant forøgede vitellogeninkoncentrationer i hanbækørreder fra jyske, sjællandske og fynske vandløb /3, 4/.

I de fynske vandløb så vi i undersøgelsen fra 2004 et særegent mønster i vore resultater: Ørrederne blev på hver vandløbslokalitet indfanget inden for en strækning af 50 eller 100 m, og alligevel så vi på nogle lokaliteter vitellogeninkoncentrationer, der strakte sig fra nær baggrundsværdier til stærkt forhøjede (Figur 1). Det tydede altså på, at udsættelsen for østrogen aktivitet var stærkt lokal, snarere end at vandløbet i sin helhed var belastet. Unge bækørreder holder sig til territorier, der kun er nogle få kvadratmeter store, så en stærkt lokal kontaminering kunne altså tænkes at påvirke nogle, men ikke alle ørreder inden for en strækning på 50 m.

Da vi ønskede at blive klogere på, hvad det var, der forårsagede feminiseringen af nogle af de unge hanørreder, samlede vi igen i 2010 fisk ind fra fynske vandløb – nogle af dem fra de samme lokaliteter, som vi havde besøgt i 2004.

Til vores store overraskelse viste det sig, at vitellogeninkoncentrationerne alle steder var faldet markant siden 2004, og vi fandt ikke en eneste hanørred, der havde forhøjede koncentrationer: alle de fundne værdier kunne nu

karakteriseres som baggrundsværdier/5/. Resultaterne bekræftedes ved indsamlinger i 2014-2016: hanørrederne var ikke længere feminiserede (Figur 1 & 2). Ud over denne konstatering var det også vigtigt, at vi nu kunne fastslå det naturlige baggrundsniveau for unge, hanbækørreders vitellogeninkoncentrationer, idet en robust viden om baggrundsværdier er nødvendig ved brug af biomarkører i monitoring af miljøets tilstand.

Vi begyndte at udforske de mulige årsager til feminiseringens ophør. Blandt alle de potentielle årsager (temperatur, nedbør, ændret landbrugspraksis, ørredbestandenes genetiske sammensætning, analyse-tekniske forhold vedrørende bestemmelsen af vitellogenin, m.m.) kunne vi til sidst kun få øje på én ændring, der kunne forklare feminiseringens ophør: I årene før 2010 var der givet en række påbud om regulering af udløb via septiktanke fra spredt bebyggelse i det åbne land. I samarbejde med kommunernes miljøadministrationer kunne vi konstatere, at mange af disse udløb direkte fra septiktanke var fjernet imellem 2004 og 2010.

Septiktanke fjerner stort set ikke potentiel østrogen aktivitet fra spildevandet, og der er i udløb fra septiktanke konstateret østrogen aktivitet /1/, der er rigelig til feminisering af hanbækørreder /4/; en sådan aktivitet vil ned-

strøms hurtigt blive fortyndet til uskadelige niveauer, hvilket er i overensstemmelse med vore observationer fra 2004 og tidligere af både forhøjede værdier og baggrundsværdier inden for den samme strækning på 50 eller 100 m.

Konklusionen om feminiseringens fravær gælder kun tilstandene i de fynske vandløb. I nogle af vore undersøgelser fra omkring årtusindskiftet så vi bl.a. i Usserød på Sjælland og Voel Bæk i Jylland /3/ langt kraftigere feminisering af hanørrederne end vi nogensinde har set i de fynske vandløb, og vi ved ikke, om denne situation har ændret sig.

Kan vi monitere østrogen effekt i muslinger?

Vitellogeninkoncentrationer hos fisk bestemmes i dag typisk ved hjælp af immunokemiske metoder kaldet ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assays), hvor man gør brug af antistoffer, der er udviklet specifikt mod vitellogenin hos f.eks. bækørreder. Indtil for ca. 20 år siden anvendte man imidlertid en indirekte metode til at estimere koncentrationen af vitellogenin. Metoden kaldes alkalilabil-phosphat-metoden (ALP) og bygger på, at fisks vitellogenin er stærkt fosforlyeret, og ved at fraspalte fosfatgrupper og bestemme fosfatkoncentrationen kan man få et estimat

for vitellogeninkoncentrationen.

ALP-metoden er således udviklet til fisk, men det er aldrig blevet undersøgt, om muslingers blommeprotein er lige så kraftigt fosforileret og om proteinets dannelse er reguleret af østrogener, hvilket begge er forudsætninger for ALP-metodens anvendelse som markør for østrogen udsættelse. Alligevel er forhøjede niveauer af ALP hos muslinger gennem mange år blevet tolket som en forhøjet blommeproteinkoncentration og dermed et tegn på feminisering blandt muslinger.

En anden benyttet markør for østrogen påvirkning, intersex, er i visse muslinger en naturlig proces, idet de kan skifte køn imellem to reproduktionsperioder, og man ved ikke, hvilken mekanisme der ligger til grund for hverken dannelsen af intersex eller induktion af blommeprotein. Det har blot været antaget, at vertebratlignende kønshormoner også styrer reproduktionen og blommeproteindannelsen hos muslinger.

Vi udviklede en specifik ELISA mod blommeprotein hos ferskvandsmuslingen tilspidset malermusling (*Unio tumidus*) og eksponerede muslingerne for det naturlige hunlige kønshormon 17β -østradiol, og bestemte blommeproteinkoncentrationen ved hjælp af den specifikke ELISA samtidig med, at vi bestemte ALP.

To konklusioner var helt klare: 1) Der var ingen sammenhæng mellem koncentrationerne af blommeprotein og ALP, hvorfor ALP hos malermuslinger ikke kan anvendes som surrogat for reel bestemmelse af blommeprotein, og 2) udsættelse for 17β -østradiol påvirkede ikke koncentrationen af blommeprotein – og for den sags skyld heller ikke ALP /6/. Vores resultater blev for nyligt bakket op af en anden forskergruppe, som i en anden muslingart kunne påvise, at den blommeproteinkoncentration som estimeres med ALP-metoden ikke kan verificeres med præcis biokemisk identifikation af blommeproteinet (shotgun proteomics) /7/.

Det er også vist, at fosfaten målt ved hjælp af ALP hos muslingen *Mytilus galloprovincialis*

ikke stammer fra blommeprotein, men derimod fra et extrapallial-protein, der intet har med blommeprotein at gøre /8/.

Det ser altså ikke ud til at østrogener styrer dannelsen af blommeprotein hos muslinger og blommeprotein er ikke den primære kilde til det fosfat, som man måler med ALP-metoden. Derfor er nogle af de udviklede metoder hos muslinger anvendt under forkerte forudsætninger, og nogle resultater og konklusioner er dermed fejlbehæftede. Svaret på ovenstående spørgsmål 'kan vi monitere østrogene effekter hos muslinger?' er derfor: Nej, ikke med den nuværende viden og metoder.

Alligevel mener man i adskillige udenlandske undersøgelser, og én dansk, at man vha. ALP-metoden har påvist østrogene effekter hos muslinger i forbindelse med udledninger af rensat spildevand. Det er et godt eksempel på, at man skal være varsom med at overføre metoder fra vertebrater til invertebrater og bruge resultaterne ukritisk uden at have den nødvendige baggrundsviden på plads.

Ferskvandsmuslinger er blandt de mest udrydningstruede organismer, og da muslinger filtrerer store mængder vand og dermed spiller en vigtig rolle for vandkvaliteten, er det væsentligt at undersøge, hvilke årsager der ligger til grund for muslingernes tilbagegang. Muslingernes hormonsystem er generelt ikke særlig velundersøgt, men forståelse for den basale regulering af f.eks. reproduktion er nødvendig for at designe meningsfulde forsøg og fortolke resultaterne korrekt. Forskning i invertebraters basale hormonelle regulering er ikke så sexet, men den er nødvendig for at man kan drage de rigtige konklusioner.

Referencer

- /1/ Stuer-Lauridsen, F., Kjølholt, J., Højbye, L., Hinge-Christensen, S., Ingerslev, F., Hansen, M., Krogh, K.A., Andersen, H.R., Halling-Sørensen, B., Hansen, N., Köppen, B., Bjerregaard, P. og Frost, B. 2005: Survey of estrogenic activity in the Danish aquatic environment. Environmental Project: Copenhagen, Denmark. p. 1-170.
- /2/ Bjerregaard, L.B., Korsgaard, B. og Bjerregaard, P.

2006: Intersex in wild roach (*Rutilus rutilus*) from Danish sewage effluent-receiving streams. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 64, 321-328.

- /3/ Bjerregaard, L.B., Madsen, A.H., Korsgaard, B. og Bjerregaard, P. 2006: Gonad histology and vitellogenin concentrations in brown trout (*Salmo trutta*) from Danish streams impacted by sewage effluent. *Ecotoxicology*. 15, 315-327.
- /4/ Bjerregaard, P., Hansen, P., Larsen, K.J., Erratico, C., Korsgaard, B. og Holbech, H. 2008: Vitellogenin as a biomarker for oestrogenic effects in brown trout, *Salmo trutta*: Laboratory and field investigations. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 27, 2387-2396.
- /5/ Morthorst, J.E., Mathiesen K. K., Holbech, H., Pedersen, K. L., Bjerregaard, P. 2018: Vitellogenin concentrations in feral danish brown trout have decreased: An effect of improved sewage treatment in rural areas? *Environmental Toxicology and Chemistry*. 37, 839-845.
- /6/ Morthorst, J.E., Holbech, H., Jeppesen, M., Kinnberg, K.L.; Pedersen, K.L.; Bjerregaard, P. 2014: Evaluation of yolk protein levels as estrogenic biomarker in bivalves; Comparison of the alkali-labile phosphate method (ALP) and a species-specific immunoassay (ELISA). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 166, 88-95.
- /7/ Sanchez-Marin, P., Fernandez-Gonzalez, L.E., Mantilla-Aldana, L., Diz, A.P. og Beiras, R. 2017: Shotgun Proteomics Analysis Discards Alkali Labile Phosphate as a Reliable Method To Assess Vitellogenin Levels in *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Science & Technology*. 51, 7572-7580.
- /8/ Oliveri, C., Peric, L., Sforzini, S., Banni, M., Viarengo, A., Cavaletto, M. og Marsano, F. 2014: Biochemical and proteomic characterisation of haemolymph serum reveals the origin of the alkali-labile phosphate (ALP) in mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Comparative Biochemistry and Physiology D-Genomics & Proteomics*. 11, 29-36.

JANE E. MORTHORST (jamor@biology.sdu.dk) og HENRIK HOLBECH (hol@biology.sdu.dk) er lektorer og POUL BJERREGAARD (poul@biology.sdu.dk) professor ved Biologisk Institut, Syddansk Universitet. KNUD LADEGAARD PEDERSEN VAR lektor ved Biologisk Institut, nu ansat i Miljøstyrelsen.