



UNDERSØGELSE AF HORMONFORSTYRRENDE KEMIKALIER I VANDLØB

Videnskabelig rapport fra DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi

nr. 85

2014



AARHUS
UNIVERSITET

DCE – NATIONALT CENTER FOR MILJØ OG ENERGI

[Tom side]

UNDERSØGELSE AF HORMONFORSTYRRENDE KEMIKAlier I VANDLØB

Videnskabelig rapport fra DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi

nr. 85

2014

Pia Lassen¹
Jakob Strand²
Ingela Dählöf⁴
Martin M. Larsen²
Rossana Bossi¹
Peter Wiberg-Larsen²
Manhai Long³
Tanja Krüger³
Eva Cecilie Bonefeld-Jørgensen³

¹ Aarhus Universitet, Institut for Miljøvidenskab

² Aarhus Universitet, Institut for Bioscience

³ Aarhus Universitet, Institut for Folkesundhed

⁴ Göteborgs Universitet, Institutionen för Biologi og Miljövitenskap



AARHUS
UNIVERSITET

DCE – NATIONALT CENTER FOR MILJØ OG ENERGI

Datablad

Serietitel og nummer:	Videnskabelig rapport fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi nr. 85
Titel:	Undersøgelse af hormonforstyrrende kemikalier i vandløb
Forfattere:	Pia Lassen ¹ , Jakob Strand ² , Ingela Dählöf ⁴ , Martin M. Larsen ² , Rossana Bossi ¹ , Peter Wiberg-Larsen ² , Manhui Long ³ , Tanja Krüger ³ og Eva Cecilie Bonefeld-Jørgensen ³
Institutioner:	Aarhus Universitet: ¹ Institut for Miljøvidenskab, ² Institut for Bioscience og ³ Institut for Folkesundhed. ⁴ Göteborgs Universitet, Institutionen för Biologi og Miljövetenskap
Udgiver:	Aarhus Universitet, DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi ©
URL:	http://dce.au.dk
Udgivelsesår:	Januar 2014
Redaktion afsluttet:	December 2013
Faglig kommentering:	Dec 2013
Finansiel støtte:	Center for hormonforstyrrende stoffer, Miljøstyrelsen
Bedes citeret:	Lassen, P., Strand, J., Dählöf, I., Larsen, M.M., Bossi, R., Wiberg-Larsen, P., Long, M., Krüger, T. & Bonefeld-Jørgensen, E.C. 2014. Undersøgelse af hormonforstyrrende kemikalier i vandløb. Aarhus Universitet, DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi, 70 s. - Videnskabelig rapport fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi nr. 85 http://dce2.au.dk/pub/SR85.pdf
	Gengivelse tilladt med tydelig kildeangivelse
Sammenfatning:	I dette pilotprojekt er undersøgt forekomst og effekt af hormonforstyrrende stoffer i det danske vandmiljø, herunder belastningen fra renseanlæg. Projektet kombinerer analyse vha. passive opsamlere af hormonforstyrrende stoffer i vandløb med stoffernes effekter på dels reproduktionssystemet hos malermuslinger, og dels med hormonforstyrrelser i mammale cellekulturer i form af <i>in vitro</i> bioanalyser. Resultaterne viste ikke overraskende en forhøjet belastning med hormonforstyrrende stoffer og øgede biologiske effekter nedstrøms renseanlæg i forhold til opstrøms. Endvidere blev der fundet hormonforstyrrende stoffer selv i vandområder, som formodes at være relativt ubelastede. Der blev fundet en sammenhæng mellem <i>in vivo</i> og <i>in vitro</i> målingerne, hvilket ikke tidligere er blevet dokumenteret. Projektet viser, at der er en relevans i at kombinere biologiske effektmålinger med koncentrationsmålinger, når den økologiske tilstand skal vurderes.
Emneord:	Vandløb, hormonforstyrrende stoffer, passive opsamlere, <i>in vitro</i> effekt, <i>in vivo</i> effekt, malermuslinger, biomarkører
Layout:	Grafisk Værksted, AU Silkeborg
Foto forside:	Martin M. Larsen
ISBN:	978-87-7156-052-7
ISSN (elektronisk):	2244-9981
Sideantal:	70
Internetversion:	Rapporten er tilgængelig i elektronisk format (pdf) som http://dce2.au.dk/pub/SR85.pdf

Indhold

Forord	5
Sammenfatning	6
Summary	8
1 Introduktion	10
2 Projektets overordnede struktur	14
3 Indledende undersøgelser	16
3.1 Valg af testorganisme	16
3.2 Valg af undersøgelseslokaliteter	17
3.3 Valg af stoffer	18
3.4 Metodeudvikling, kalibrering og valg af Performance Reference Compounds (PRC)	21
4 Metoder	23
4.1 Feltforsøg	23
4.2 Kemiske analyser	24
4.3 Effektmålinger på <i>in vitro</i> bio-assays	26
4.4 Effektmålinger på muslinger	27
5 Resultater, diskussion	28
5.1 Forekomst af udvalgte stoffer i vandløb	28
5.2 Samlet vurdering af de kemiske data	34
5.3 Effektmålinger ved <i>in vitro</i> bio-assays	38
5.4 Effektmålinger på muslinger	46
5.5 Sammenhæng mellem <i>in vivo</i> og <i>in vitro</i> biomarkører	49
5.6 Sammenhæng mellem <i>in vitro</i> og <i>in vivo</i> markører og stoffer i membraner	51
6 Konklusioner og anbefalinger	52
7 Referencer	55
Bilag 1 Stationsoplysninger	63
Bilag 2 Metode data	67

[Tom side]

Forord

Denne rapport omhandler et indledende pilotprojekt, som har til mål at udvikle alternative metoder til bestemmelse af forekomst og effekter af hormonforstyrrende stoffer i det danske vandmiljø, herunder belastningen fra rensningsanlæg. Projektet kombinerer forekomst af hormonforstyrrende stoffer i vandløb sammen med stoffernes effekter på dels reproduktionssystemet hos store muslinger, dels hormonforstyrrelser i mammale cellekulturer i form af *in vitro* bioanalyser.

Projektet var finansieret af Miljøstyrelsen og administreret under Center for Hormonforstyrrende Stoffer.

En række personer har bidraget til projektet. Fra DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi/Institut for Miljøvidenskab/Institut for Bioscience, Aarhus Universitet (tidligere DMU, AU) har laboranterne Charlotte Dahl Schiødt, Christel Christoffersen, Inga Jensen og Dorete W. Jensen udført de kemiske analyser og laborant Peter Koefoed har bidraget under feltarbejdet med indsamling samt kønsbestemmelse og effekter på muslinger. Laborant Dorte Olsson fra Institut for Folkesundhed, AU, har bidraget med ekstraktion af POCIS-membraner til *in vitro* bioassay samt målinger af østrogen og AhR-aktivitet.

Sammenfatning

Der har gennem de seneste årtier været et stigende fokus på, at hormonforstyrrende stoffer har afgørende betydning for forskellige dyrearters evne til at formere sig. Spildevand er en vigtig kilde til tilførsel af hormonforstyrrende stoffer i vandmiljøet, men også andre kilder såsom udvaskning fra marker har betydning. Både forekomst og biologiske effekter er undersøgt i forskellige sammenhænge i Danmark, men der savnes en direkte kobling af forekomst og koncentrationer af hormonforstyrrende stoffer i vandmiljøet med deres mulige biologiske effekter under danske forhold.

Dette er et indledende pilotprojekt, som kobler screening af hormonforstyrrende stoffer i vandløb sammen med undersøgelser af stoffernes effekter på dels reproduktionssystemet hos store muslinger, dels hormonforstyrrelser i mammale cellekulturer i form af *in vitro* bioanalyser til påvisning af effekter på hormonrelaterede receptorer, herunder østrogen, androgen- og Ah-receptor aktivitet.

Princippet i projektet var, at passive prøveopsamlere og muslinger blev eksponeret samtidig ved en række lokaliteter, både med og uden tilførsel af spildevand. Ekstrakter fra opsamlerne blev anvendt til måling af en række hormonforstyrrende stoffer samt bestemmelse af hormonforstyrrende effekter på receptor aktiviteter i mammale cellekulturer. Muslingerne blev undersøgt for biomarkører for hormonforstyrrende effekter på hanmuslingers kønsudvikling dels ved niveauet af vitellogenin-lignende proteiner (målt som alkali-labilt phosphat, ALP), dvs. blødderproteiner som indgår i dannelse af æg (oocytter) i normale hunner, dels for tegn på intersex, dvs. en forekomst af æg-lignende celler i hanners gonader, kaldet testis.

Der blev benyttet passive opsamlere i stedet for traditionelle vandprøver for at opnå optimal information om forekomsten af stofferne, herunder bla. at kunne vurdere belastningen af stofferne for hele den periode, hvor muslingerne var udsat. Der blev anvendt to typer passive opsamlere: Polar Organic Chemical Integrative Samplers (POCIS) til opsamling af polære og semipolære stoffer og silikonemembraner (SM) til opsamling af upolære stoffer. På basis af Performance Reference Compounds (PRC), som blev spiket i membranerne før udsætning, kunne det beregnes, hvor stor en vandmængde, der havde passeret membranerne; dermed kunne en gennemsnitskoncentration i vandfasen for de enkelte stoffer fastlægges.

Resultaterne af de kemiske analyser viste en ikke overraskende tendens til, at koncentrationerne af en lang række stoffer var højere nedstrøms for renseanlæg i forhold til opstrøms og andre lokaliteter. Imidlertid viste resultaterne også, at andre kilder kan forekomme, idet en række stoffer blev fundet ved de andre lokaliteter, specielt organotin, PFAS og visse pesticider, som således må have andre og mere diffuse kilder.

Metoden med anvendelse af passive opsamlere til de kemiske analyser viste sig generelt robust med forholdsvis lav spredning ved dobbeltbestemmelser og betydelig lavere detektionsgrænser i forhold til traditionelle vandanalyser. Membranerne viser potentiale til at optage selv meget små koncentrationer af stoffer, og specielt POCIS-membraner vurderes velegnede til

screening for stoffer, med henblik på en vurdering af om de efterfølgende bør indgå i monitoringsprogrammer.

I overensstemmelse med de kemiske data viste analyser for receptor effekter i cellekulturer overordnet størst effekt nedstrøms for renseanlæg. Der blev observeret en øget østrogen-, androgen- og Ah-receptoraktivitet ved nedstrøms prøver. Dog viste analyserne, at også stoffer, som hæmmer receptor aktiviteterne, er til stede i disse nedstrøms prøver. Der kan derfor konkluderes, at der frigives hormonforstyrrende stoffer via det tilledte spildevand. Endvidere viser resultaterne, at også vandløb, som ikke umiddelbart burde være særligt belastede af spildevand, indeholdt hormonforstyrrende stoffer i koncentrationer, som var i stand til at aktivere alle tre testede receptorer. Det er imidlertid svært præcist at vurdere, hvor store effekter der reelt vil forekomme i miljøet på basis af resultaterne, men resultaterne kan betragtes som en biomarkør.

Undersøgelsen af de udsatte malermuslinger (*Unio tumidus*) viser, at alkalilabilt phosphat (ALP) i hæmolymfe (blodvæske) fra hanner generelt var højere nedstrøms for renseanlæg, og at de derved udviste tegn på hormonforstyrrelser. ALP er en biomarkør for udvikling af vitellogenin-lignende (blomme-) proteiner i hanner og indikerer derved, om de har været udsat for en østrogenlignende påvirkning. Dette understøttes af, at der i forbindelse med kønsbestemmelsen af muslingerne blev konstateret en overraskende høj andel af hanner med tegn på intersex i form af æg-lignende celler i gonadevæskens. Dette var ikke forventet, da denne form for intersex tidligere kun er dokumenteret for marine muslinger og ikke for ferskvandsmuslinger. Mere detaljerede histologiske undersøgelser af gonaderne vil være nødvendig for at få disse indikationer på intersex endeligt bekræftet.

Sammenkobling af resultaterne viste, at der var en klar statistisk sammenhæng mellem de biologisk bestemte toksiske dioxinækvivalenter (AhR-TEQ) og hyppigheden af ALP/intersex i hanmuslinger. Det er første gang, at denne sammenhæng er blevet undersøgt og dokumenteret i miljøet.

Det var sværere statistisk at korrelere målingerne af de enkelte kemiske stoffer med de biologiske effekter. Dette skyldes primært, at datamaterialet var for lille (dvs. antallet af stationer) i forhold til de mange parametre, der måles, samt at effekterne ikke er relateret til enkelte stoffer, men er en netto effekt af den samlede stofblanding, "cocktail effekt". Imidlertid sås der en klar tendens til, at koncentrationerne for visse hormonforstyrrende stoffer er væsentligt forhøjet i vandløb nedstrøms for udløb fra kommunale renseanlæg, og *in vivo* undersøgelserne med biomarkører i malermuslinger samt resultaterne fra *in vitro* receptoreffektstudierne viste, at disse forhøjede koncentrationer har potentiale til en påvirkning af de tilstedeværende organismer.

Undersøgelsen viste, at der også forekommer hormonforstyrrende stoffer og biologiske effekter i vandområder, som må formodes at være relativt lidt belastede med disse stoffer. Dette bekræfter, at det er vanskeligt at finde områder i Danmark, som er upåvirkede af menneskets aktiviteter.

Projektet viser, at det er relevant at kombinere biologiske effektmålinger med koncentrationsmålinger, når den økologiske tilstand af vandmiljøet skal vurderes. Der blev således påvist biologiske effekter på alle lokaliteter, til trods for generelt lave koncentrationer. Derved viser projektet, at effekterne efter al sandsynlighed kan skyldes udsættelse for en kombination af mange stoffer, dvs. cocktaileffekter.

Summary

In the last decades there has been an increasing focus on how endocrine disrupting compounds affect different animal species' ability to reproduce. Effluent is an important source for endocrine disrupting compounds in the water environment but there are also contributions from other sources such as run-off from agricultural fields. The occurrence of endocrine disrupting compounds as well as their biological effects has been investigated in different studies in Denmark. But there are missing investigations on the direct correlations between the concentrations of endocrine disrupting compounds in the water environment and their possible biological effect under Danish environmental conditions.

This is a preliminary pilot project which correlates screening of endocrine disrupting compounds in streams with investigations of the effects of the compounds on the reproduction system in large mussels as well as endocrine disrupting effects on mammal cell cultures by *in vitro* bio analysis for detection of effects on hormone related receptors, comprising oestrogen-, androgen- and Ah-receptor activity.

In the project passive samplers and mussels were exposed simultaneously at different locations in streams, which included sites both with and without sewage effluent admission. The extracts from the samplers were used for analysis of endocrine disrupting compounds as well as for determination of endocrine effects on receptor activity in mammal cell cultures. The mussels were investigated for endocrine effects on male mussels' sexual development by determining the levels of vitellogenin-like proteins (measured as alkali-labile phosphate, ALP). Vitellogenin-like proteins are egg-yolk proteins which take part in the formation of eggs (oocyter) in normal females. Furthermore, the mussels were investigated for signs of intersex by the formation of egg-like cells in the males' testis.

Passive samplers were used in this project instead of traditionally water samples in order to obtain optimal information on the presence of the compounds. Two types of passive samplers were used: Polar Organic Chemical Integrative Samplers (POCIS) for sampling polar and semi polar compounds and silicone membranes (SM) for sampling of nonpolar compounds. Based on Performance Reference Compounds (PRC), which were spiked into the membranes before exposure, the amount of water that passed the membranes could be calculated and from these values an average water concentration of the single compounds could be determined.

The results from the chemical analysis showed, not surprisingly, that a range of compounds had higher concentrations downstream for the water treatment plants compared to upstream and other localities. The results also showed that there are other sources as compounds were found at the other localities, especially organotin, PFAS and certain pesticides indicating more diffuse sources. The use of passive samplers as a method for the chemical analysis proved in general to be robust with relative low deviations for duplicate determinations and significant lower detection limits compared to traditionally water analysis. Especially the POCIS-membranes can be regarded suitable for screening of pollutants, which then later on can be included in monitoring programs based to the produced data.

The analyses of the receptor effects in cell cultures were in general highest downstream for the water treatment plants similar to the chemical data. There was observed an increased oestrogen-, androgen- and Ah-receptor activity in the downstream samples. However, the analysis also showed that compounds which inhibit the receptor activities also were present in the same samples. It can therefore be concluded that endocrine disrupting compounds are released from sewage effluents. Furthermore, the results showed that streams which were expected to be relatively unpolluted also contained endocrine disrupting compounds in concentrations that were able to activate all three tested receptor systems. However, it can be difficult to exactly estimate the effects in the environment on the basis of the results. The Results should be considered as biomarkers.

Investigations on the transplanted river mussels (*Unio tumidus*) showed that alkali-labile phosphate (ALP) in hemolymph (blood fluid) from males in general was higher downstream for water treatment plants and that the mussels showed signs of endocrine disrupting effects. ALP is used as a biomarker for development of vitellogenin-like (egg-yolk) proteins in males and thereby indicating that the mussels have been subjected to an estrogenic exposure. This is supported by a surprisingly high percentage of males which showed intersex in the form of egg-like cells in the gonad fluid which were found under the determination of the gender. These results were not expected as this type of intersex only has been documented for marine mussels and not for fresh water mussels. More detailed histological investigations are needed in order to finally verify these indications on intersex.

Comparison of results showed a clear statistic correlation between the biologically determined toxic dioxin equivalents (AhR-TEQ) and the frequency of ALP/intersex in male mussels. It is the first time that this correlation ever has been investigated and documented in the environment.

It was more difficult statistically to correlate the measurements of the single chemical compounds with the biological effects. The main reason for this is that the data material is too small (the number of locations) in relation to the number parameters which are measures and that the effects are not related to single compounds but is a net effect from the combined compound mixture, "cocktail effect". However, there was a clear tendency that the concentrations of certain endocrine disrupting compounds were significant elevated in streams downstream of the water treatment plants and the *in vivo* investigations of the river mussels as well as the results from the *in vitro* receptor studies showed that these elevated concentrations will lead to an effect on the organisms present in the environment.

The investigation showed that there also are endocrine disrupting compounds as well as biological effects in water areas which were expected to be relatively unpolluted with these compounds. This confirms that it is difficult to find areas in Denmark which are unaffected by human activities.

The project shows that it has great significance to combine biological effect measurements with measurements of concentrations when the ecological state of the water environment is evaluated. There was found biological effects at all localities even though the concentrations in general were low. The project shows that it is likely that the effects are caused by a combination of many compounds, which are cocktail effects.

1 Introduktion

Der har gennem de seneste årtier været et stigende fokus på, at visse stoffer er i stand til at forstyrre de hormonsystemer, som er af afgørende betydning for forskellige dyrearters evne til at formere sig. Disse såkaldt hormonforstyrrende stoffer har altså samme virkning som de hormoner, som organismerne selv producerer, idet stofferne indvirker på det endokrine system. Det gælder såvel for mennesket som for en række dyrearter, herunder også sådanne som forekommer i vandigt miljø. Der kan i alvorlige tilfælde være tale om væsentligt nedsat formeringsevne, hvilket på længere sigt kan få betydning for arternes overlevelse lokalt, hvor påvirkningen finder sted. En væsentlig del af de hormonforstyrrende stoffer udledes med spildevand, og især erkendelsen af, at disse stoffer kan virke østrogen på fisk (Purdom et al. 1994), har sat gang i en omfattende forskning. Som eksempler på fundne effekter i forbindelse med spildevandsudledninger kan nævnes forekomst af intersex og/eller høje indhold af blommeprotein (vitellogenin) hos hanner af en række fiskearter som skalle (Jobling et al. 1998, Christiansen & Plesner 2001), døbel (Flammarion et al. 2000), brasen (Hecker et al. 2002), grundling (van Aerle et al. 2001), ørred (Christiansen & Plesner 2001, Bjerregaard et al. 2006b, 2008) og skrubbe (Lye et al. 1997, Bjerregaard upubliceret) og ålekvarbe (Strand et al. 2009) som alle forekommer i ferskvand og/eller kystnære marine områder. Udenlandske undersøgelser har desuden også fundet tegn på hormonforstyrrelser i bl.a. muslinger fra spildevandsbelastede områder (fx. Gagne et al. 2006, Chesman & Langston 2006).

Mens der i Danmark er foretaget ret omfattende undersøgelser af den østrogene aktivitet i såvel ferskvandsområder som afløb fra forskellige typer af renseanlæg (Stuer-Lauridsen et al. 2005), foreligger der kun relativt få undersøgelser af andre hormonforstyrrende aktiviteter så som androgen- og dioxinlignende aktiviteter. Endvidere er der behov for en bedre indsigt i forekomst og koncentrationer af de enkelte hormonforstyrrende stoffer, som potentielt kan optræde i fx spildevand eller vandløbsvand. Sådanne undersøgelser er derfor ønskelige, ligesom der er behov for at sammenkæde de fundne stoffer med deres mulige biologiske effekter.

Som nævnt ovenfor er spildevand en vigtig kilde til tilførsel af hormonforstyrrende stoffer i vandmiljøet. Stofferne udledes således dels via offentlige renseanlæg (Stuer-Lauridsen et al. 2005, Boutrup et al. 2006), dels via spredt liggende ejendomme i det åbne land, der ikke er tilknyttet det offentlige kloaknet, men i stedet udleder via septiktank eller et mere avanceret minirensesanlæg (Stuer-Lauridsen et al. 2005, Kjølholt et al. 2006). Desuden kan der forekomme udvaskning af stoffer med hormonforstyrrende virkning, når der tilføres husdyrgødning på de dyrkede marker (Stuer-Lauridsen et al. 2005, Kjølholt et al. 2006, Boutrup et al. 2006).

Dette er et indledende pilotprojekt, hvori der foretages en første screening (måling) af forekomst og koncentrationer af hormonforstyrrende stoffer i vandløb samt en kobling af disse data til potentielle biologiske effekter.

De overordnede delformål med projektet er at:

- Udvikle alternative metoder til bestemmelse af forekomst og effekter af hormonforstyrrende stoffer i det vandige miljø
- Foretage en første screening (måling) af forekomst og koncentrationer af hormonforstyrrende stoffer i vandløb samt foretage en første vurdering af betydningen af mulige kilder
- Vurdere de biologiske effekter af hormonforstyrrende stoffer i vandløb baseret på *in vivo* undersøgelser i muslinger og *in vitro* målinger på mammale cellekulturer.

Der er primært fokuseret på målinger i vandløb, som modtager disse stoffer via enten spildevandsudledninger fra offentlige rensesanlæg eller som diffuse tilførsler fra det åbne land (hhv. dyrkede marker og spildevand fra spredt liggende ejendomme). Til sammenligning er desuden undersøgt et vandløb, som formodes kun i mindre omfang at være belastet med stofferne. Der er altså tale om en første vurdering af betydningen af mulige kilder til udledningen af disse stoffer. Denne dokumentation af forekomsten af stofferne har været primær, men styrket ved at sammenkæde fund og koncentrationer af stofferne med forekomst af hormonforstyrrende effekter i såvel muslinger som mammale cellekulturer. Målinger af effekter af blandinger af hormonforstyrrende stoffer – som ved denne undersøgelser – er særlig interessante, fordi en cocktail af stoffer kan have større virkning end stofferne hver for sig. Det er dog også ønsket at identificere de stoffer, som formodes at være særlig problematiske. Udgangspunktet for undersøgelsen har i den forbindelse været EU's liste over stoffer med dokumenteret hormonforstyrrende effekt. Et yderligere formål med undersøgelsen er desuden at udvikle og optimere metoder til påvisning og screening af stofferne.

Som nævnt er der dokumenteret effekter af hormonforstyrrende stoffer på fisk. Mange fisk er imidlertid forholdsvis mobile, hvilket gør dem mindre egnede til at afspejle forskelle i stofbelastning hhv. opstrøms og nedstrøms for en given kilde til tilførsel af stofferne. Til nærværende undersøgelse er derfor i stedet valgt store muslinger, som er langt mere stationære. Flere udenlandske undersøgelser har således vist, at spildevand fra rensningsanlæg kan øge niveauet af blommeproteiner i form af vitellogenin- og vitellin-lignende proteiner i ferskvandsmuslinger (de Lafontaine 2000, Quinn et al. 2004, 2006, Gagne et al. 2006). Og ligesom hos fisk formodes det, at reguleringen af blommeproteinet i muslingerne styres af østrogener. De vitellogenin-lignende proteiner transporteres via blodbanen til gonaderne, hvor de omdannes til vitellin, der indgår i opbygningen af æg. Forekomsten af blommeprotein hos hanmuslinger kan derfor anvendes som markør for hormonforstyrrelser, hvor dyrene har været udsat for en østrogenlignende påvirkning.

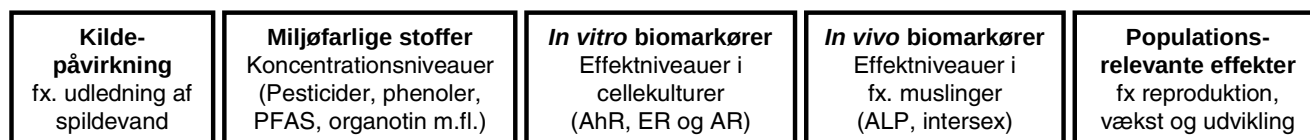
Ud over muslingerne blev der ved nærværende undersøgelse anvendt yderligere indikatorer for hormonforstyrrende effekter, nemlig mammale cellekulturer, der *in vitro* blev eksponeret for de potentielle stoffer. Mammale cellekulturer er således velegnede til at påvise effekter, som kan henføres til østrogen receptor (ER), androgen receptor (AR) og Aryl-hydrocarbonreceptor (AhR) (dioxin-lignende) aktiverende stoffer. Dette er påvist ved tidligere studier af spildevand fra danske rensesanlæg, både før og efter rensning; dog blev der fundet lavere effekt efter rensesanlægget (Kusk et al. 2010).

Måling af forekomst og koncentrationer af hormonforstyrrende stoffer i fx vandløb frembyder betydelige udfordringer. Ønskes der målt på udtagne vandprøver, som kun giver et øjebliksbillede, bør antallet af prøveudtagning

ger ideelt set være relativt stort for at opnå et repræsentativt billede af miljøbelastningen, herunder i hvilke maksimumkoncentrationer stofferne optræder. Det vil i sagens natur være dyrt, fordi de enkelte analyser er vanskelige og tidskrævende. Samtidig må mange hormonforstyrrende stoffer forventes at forekomme i lave koncentrationer, hvorfor de er vanskelige at påvise. Dette er et problem, fordi selv lave koncentrationer af visse stoffer kan udløse biologiske effekter ved gentagne/vedvarende eksponeringer. Eksempelvis kan relativt lave koncentrationer af organotin-forbindelser forårsage imposex hos marine snegle (Strand 2009).

Som alternativ til indsamling af vandprøver er det imidlertid muligt at anvende de såkaldte passive opsamlere. Disse opsuger over en given tid de stoffer, som ønskes målt, fra det omgivende vand. Princippet er, at opløste stoffer i vandet diffunderer ind i en membran og derved opkoncentreres, fordi membranen har højere affinitet for stofferne end det omgivende vand. Ved samtidig at præparere opsamleren med såkaldte "referencestoffer" før udsætning kan det volumen af vand, som stofferne er opkoncentreret fra, bestemmes. Referencestofferne vil nemlig diffundere ud af opsamleren med en hastighed, som er afhængig af det vandvolumen, som passerer forbi membranen. På baggrund af koncentrationen af stoffet i membranen og det estimerede vandvolumen kan den gennemsnitlige stofkoncentration i vandet på prøvestedet beregnes for den aktuelle måleperiode. En særlig fordel ved de passive opsamlere er, at det er muligt at måle lavere koncentrationer (lavere detektionsgrænse) end hvis der er tale om vandprøver. Med de passive opsamlere opnås således en tidsintegreret middelværdi, der indeholder kortvarige pulse af stofferne fra fx udvaskning af stofferne fra marker i forbindelse med kraftige regnbyger. Til gengæld er det ikke muligt at måle/beregne maksimum koncentrationer af stofferne, fx under en af de før nævnte pulse. Teknikken ved brug af passive opsamlere er vel afprøvet (Vrana et al. 2005) og kan anvendes til flere forskellige stofgrupper. Eksempelvis kan silikonemembraner (SM) anvendes til upolære organiske stoffer, især for hydrofobe stoffer med $K_{ow} > 3$ (Rusina et al. 2007). Metoden er testet i et projekt under havkonventionerne OSPAR/ICES, hvor bl.a. Danmarks Miljøundersøgelser deltog med finansiering fra Nordisk Ministerråd (Larsen et al. 2009). Der er også udviklet passive opsamlere til polære og semipolære stoffer. Denne POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampling) er således anvendt i undersøgelser af pesticider, østrogener og lægemidler (Mazzella et al. 2007, Matthiessen et al. 2006, Zhang et al. 2008, Macleod et al. 2007). POCIS for polære organiske stoffer er desuden afprøvet og kalibreret for en række pesticider og lægemidler af United States Geological Survey (USGS) og metoden er for tiden ved at blive akkrediteret i England. Den er bl.a. blevet brugt i danske vandløb (Stuer-Lauridsen et al. 2004) og i Nissum Fjord (Dahllöf et al. 2008).

Projektet vurderes at være yderst relevant for forvaltningen af det danske vandmiljø. I EU's vandrammedirektiv stilles der således krav til monitoring og vurdering af forekomsten af en række hormonforstyrrende stoffer i det vandige miljø, ligesom det forventes at brug af passive prøveopsamlere vil få en vigtig rolle i overvågningen af polære organiske stoffer i Nordsøen (OSPAR 2008). Monitoring af forekomst af effekter af hormonforstyrrende stoffer i det danske ferskvandsmiljø indgår pt. ikke i Det Nationale program for Overvågning af Vandmiljøet og Naturen (NOVANA), hvorfor vor viden om de generelle niveauer og effekter er yderst mangelfuld. Det foreslåede projekt kan derfor understøtte en vurdering af hormonforstyrrende stoffers indflydelse på miljøkvaliteten i danske vandløb, ligesom det forhåbentlig kan give input til arbejdet med fastsættelse af kvalitetskrav.



Stigende økologisk relevans

Mere og mere vanskeligt at etablere kausale årsag-respons sammenhænge i miljøet

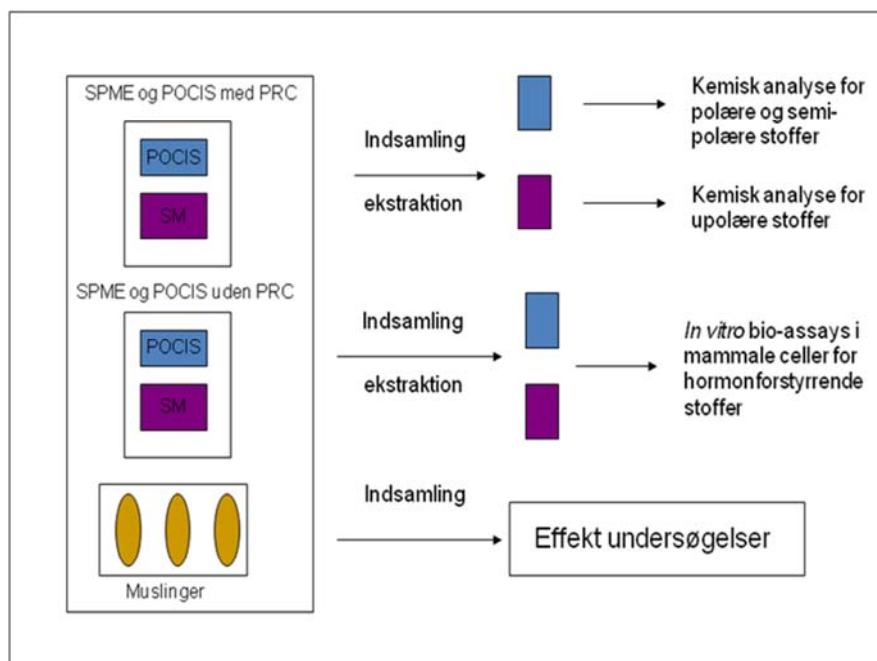
Figur 1.1. Sammenhæng mellem forskellige delelementer fra kildepåvirkning til forekomst af specifikke miljøfarlige stoffer i vandløb og effektundersøgelser bestående af hhv. *in vitro* og *in vivo* biomarkører som eksempler på forskellige organisationsniveauer, hvor effekter af hormonforstyrrende stoffer kan forekomme.

Illustrationen i figur 1.1 skitserer sammenhængen mellem forskellige delelementer i dette projekt, der omfatter identifikation af spildevandsudledninger som en kildepåvirkning, til forekomst af specifikke miljøfarlige stoffer i vandløb og forskellige effektundersøgelser bestående af hhv. *in vitro* og *in vivo* biomarkører som eksempler på forskellige organisationsniveauer, hvor effekter af hormonforstyrrende stoffer kan forekomme. Der inddrages i denne undersøgelse dog ikke direkte populationsrelevante end points såsom reproduktiv succes, vækst, udvikling eller bestandstætheder af dyrelivet, som fx muslinger. Det er dog som oftest sådan, at jo højere økologisk relevans, des vanskeligere kan det være at etablere kausale sammenhænge mellem årsag og de observerede effekter. Risikoen for uønskede effekter på populationer kan dog også vurderes ved at sammenholde de målte koncentrationsniveauer af miljøfarlige stoffer med fx EU's miljøkvalitetskrav (EQS) for enkeltstoffer i vandmiljøet (EU 2013), som er fastsat som koncentrationsniveauer, hvor populationsrelevante effekter synes mindre sandsynlige (svarende til "Predicted No Effect Concentrations", PNEC). *In vitro* og *in vivo* biomarkørerne har dog den fordel, at de integrerer effekter skabt af de aktuelle og komplekse blandinger af de forskellige stoffer, som er til stede i vandmiljøet, eftersom disse effekter ikke kun kan forårsages af enkeltstoffer.

2 Projektets overordnede struktur

Projektet kobler målinger af koncentrationer af hormonforstyrrende stoffer i vandløb sammen med undersøgelser af stoffernes effekt på dels reproduktionssystemet hos store muslinger, dels hormonforstyrrelser i mammaie cellekulturer i form af *in vitro* bioanalyser til påvisning af effekter på østrogen receptor (ER), androgen receptor (AR) og Ah-receptor (AhR) aktivitet. Projektets overordnede struktur fremgår af figur 2.1.

Projektet omfatter eksponering af muslinger og passive opsamlere ved 9 lokaliteter i alt 6 vandløb, samt ekstraktion og analyse af de indsamlede stoffer, analyse af påvirkningen på muslingernes reproduktive system, samt hormonforstyrrende effekt af ekstrakt fra opsamlerne på mammaie cellekulturer i *in vitro* bio-assays.



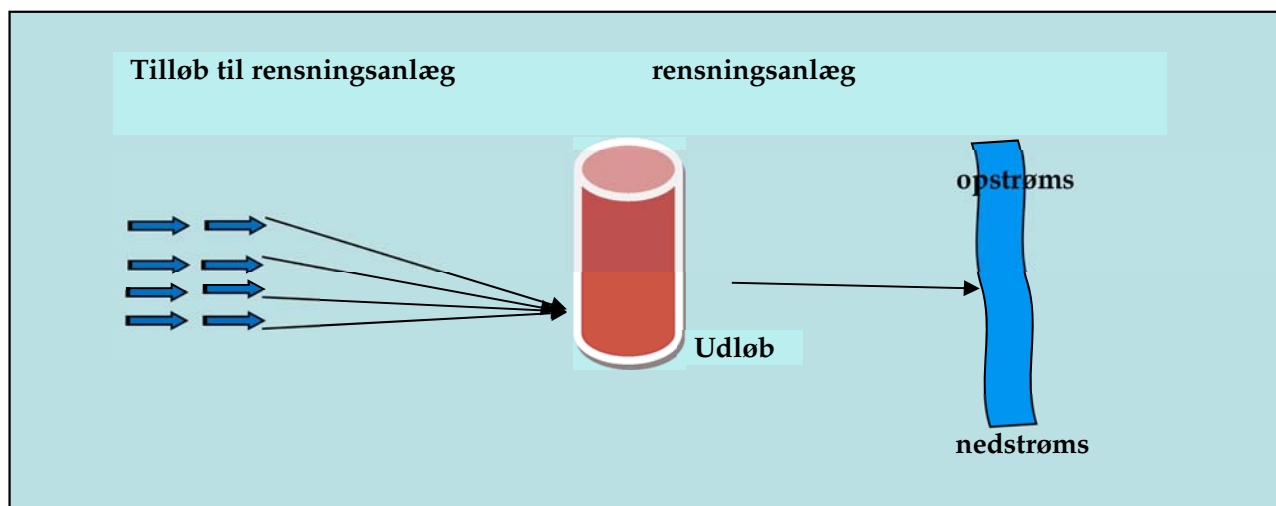
Figur 2.1. Oversigt over den overordnede struktur i projektet.

Der benyttes passive opsamlere i stedet for traditionelle vandprøver for at opnå optimal information om forekomsten af stofferne. Der anvendes to typer passive opsamlere: Polar Organic Chemical Integrative Samplers (POCIS) til opsamling af polære og semipolære stoffer og silikonemembraner (SM) til opsamling af upolære stoffer. Til samtlige membraner i de udlagte passive opsamlere tilsættes såkaldte Performance Reference Compounds (PRC). Disse stoffer afgives til det omgivende vand i forhold til den vandmængde, der passerer igennem membranerne. Hastigheden for afgivelsen af PRC formodes at svare til optagelsen af hormonforstyrrende stoffer i membranerne. Ud fra afgivelsen kan det således beregnes, hvor stor en vandmængde, der har passeret membranerne, og med kendskab til de opsamlede stofmængder kan der beregnes en gennemsnits-koncentration for de enkelte stoffer.

Der foretages med denne teknik måling (screening) af indholdet af hormonforstyrrende stoffer i tre typer af vandløb: (1) vandløb der fungerer som recipient for spildevandsudledninger fra kommunale rensesanlæg, (2) vandløb

med diffuse kilder til tilførsel af hormonforstyrrende stoffer i form af afløb fra husdyrgødskede marker og udløb fra spredtliggende ejendomme, samt (3) vandløb der formodes at være uden væsentlige tilførsler af hormonforstyrrende stoffer fra punkt- eller diffuse kilder.

De passive opsamlere placeres i de udvalgte vandløb i en given periode. For vandløb, der fungerer som recipient for spildevandsudledninger, placeres opsamlerne både opstrøms og nedstrøms for renseanlægget (Figur 2.2). Den periode, der er valgt for nærværende projekt, svarer til perioden, hvor de udvalgte muslinger vides at opbygge deres æg og sæd forud for gydeperioden. I denne periode udsættes på hver vandløbslokalitet bure indeholdende muslinger indsamlet fra en "referencelokalitet", som formodes at være relativt upåvirket af tilførsler af og påvirkning fra hormonforstyrrende stoffer. Stofferne fra de passive opsamlere ekstraheres og analyseres kemisk, ligesom en del af ekstraktet fra POCIS anvendes til analyse af kemikalieblandingens integrerede effekt på østrogen (ER)-, androgen (AR)- og Ah-receptor (AhR) ved anvendelse af *in vitro* bio-assays i mammale cellekulturer. Effekter på AhR kan afspejle tilstedeværelse af dioxin-lignende kemikalier i vandløbene, som har potentialet til at interferere med funktionen af ER og AR (Matthews et al. 2006, Bonefeld-Jørgensen, 2010, Pocar et al. 2005).



Figur 2.2. Oversigt over flow i forbindelse med belastning fra renseanlæg.

3 Indledende undersøgelser

Projektet har tidsmæssigt været styret af, at det skulle gennemføres umiddelbart forud fra de anvendte test-muslingers gydeperiode. Der har derfor ikke været mulighed for at lave forsøget om, hvis noget gik galt. Det var derfor ekstra nødvendigt at foretage en række grundige forundersøgelser. Disse omfattede dels valg af egnede muslinger, egnede indsamlingslokaliteter for muslingerne, valg af egnede undersøgelseslokaliteter, valg af de hormonforstyrrende stoffer, der skulle analyseres for, samt udvikling/afprøvning af metoderne til opsamling af stofferne.

3.1 Valg af testorganisme

Det blev som nævnt i introduktionen valgt at anvende store muslinger som testorganismer i stedet for fisk, fordi først nævnte er langt mere stationsnære, samt lettere at indsamle og transplantere til forsøgslokaliteterne end fisk. Desuden er de særkønnede, således at det er muligt at påvise forandringer i deres reproduktion, fx produktion af blommeprotein hos hannerne. Der findes i Danmark i alt 8 arter af store muslinger fordelt på slægterne *Unio*, *Anodonta*, *Pseudanodonta*, *Margaritifera* og *Dreissena*. For at skulle kunne anvendes som forsøgsdyr skulle den valgte art være talrigt forekommende på en lokalitet, hvorfra det skulle være muligt at indsamle den i et passende stort antal. Desuden skulle den være let håndterbar og robust, nem at kønsbestemme og udtage prøver fra, ligesom dens biologi skulle være vel beskrevet.



Figur 3.1. Spids malermusling (*Unio tumidus*) er en almindelig ferskvandsmusling, der lever nedgravet i sediment og forekommer i mange søer og større vandløb i Danmark. De bliver som oftest 5 – 8 cm lange, men kan i sjældne tilfælde nå en længde på mere end 10 cm.

For at undersøge de store muslingers robusthed i forhold til håndtering, transport og egnethed til udsætning i eksponeringskasser på undersøgelseslokaliteterne blev der den 4. marts 2009 indsamlet 15 individer af *Anodonta anatina* fra Lystrup Å. Det var egentlig meningen at indsamle *Unio tumidus*, men antallet af disse viste sig desværre at være meget lille. Muslingerne blev placeret i plastposer med rigelig mængde fugtig luft, men uden vand, og anbragt i kølekasse. Herefter blev dyrene transporteret til Silkeborg Langsø og placeret i en plastkasse fyldt halvt med et substrat bestående af sand, fint og groft grus. Kassen blev overdækket med trådnæt for at sikre mod, at muslingerne kravlede ud af kassen. Kassen blev herefter placeret på ½ m's dybde. Den 31. marts 2009 blev kassen taget op og muslingernes almene tilstand vurderet. Det viste sig, at kun én musling var død, mens de øvrige 14 så ud til at være i fin form.

Det var muligt fra Lystrup Å at indsamle 5 individer af *U. tumidus*, som blev transporteret (som oven for beskrevet) i 5-6 timer, inden de blev placeret i et akvarium med gennembobling af luft. Her blev de efterfølgende med held holdt i 14 dage.

Der blev derudover foretaget indledende forsøg med prøvetagning fra gonader og hæmolymfe på individer af *Anodonta cygnea* og *Unio tumidus*, også indsamlet i Lystrup Å. Gonaderne blev undersøgt under stereolup. Det var let at adskille hanner fra hunner, hvis hhv. testis og ovarier var under opbygning. Desuden kunne der let udtages en tilstrækkelig mængde (1-2 ml) hæmolymfe fra lukkemusklerne til alkali-labilt-phosphat (ALP) analyse. Det kunne endelig konstateres, at individerne af begge arter var i fuld gang med opbygning af deres gonader.

Det lykkedes at finde en egnet lokalitet, Thorsø (ved Virklund, sydvest for Silkeborg) hvorfra der med et minimalt forbrug af tid kunne indsamles det nødvendige antal individer af *Unio tumidus* til brug ved eksponeringen ved de valgte undersøgelseslokaliteter. Thorsø har klart og rent vand og modtager ingen betydende tilførsler af spildevand, ligesom oplandet til søen overvejende består af udyrkede arealer/skov.

På baggrund af de indledende undersøgelser blev *Unio tumidus* (Figur 3.1) valgt som testorganisme. De voksne muslinger lever nedgravet i sedimentet, primært på sandet bund, idet spidsen med åndingsåbningerne rager op over sedimentoverfladen. De filtrerer organiske partikler fra vandfasen, som de udnytter som føde. Arten er som nævnt særkønnet. Gydningen af æg og sæd foregår direkte til vandfasen i to omgange i perioden maj – juni. Æggene/glochiderne (muslingelarverne) opbevares i rørformede strukturer i gællerne før gydningen, og glochidierne gydes i form af op til 15 cm lange slimtråde.

3.2 Valg af undersøgelseslokaliteter

Der blev i alt udvalgt 9 undersøgelseslokaliteter beliggende i 6 forskellige vandløbssystemer med geografisk beliggenhed i Jylland, på Fyn og på Sjælland, se tabel 3.1 og bilag 1. Af disse var 6 lokaliteter placeret hhv. opstrøms og nedstrøms for udløbet fra et kommunalt renseanlæg, 2 lokaliteter var placeret i vandløb med påvirkning primært fra spredt bebyggelse og landbrugsdrift, og endelig var 1 lokalitet placeret i et vandløb, (den oven for nævnte Lystrup Å), som afvander en klarvandet sø (Kulsø, nær Bryrup) med et opland uden væsentlig påvirkning fra hverken spredtliggende ejendomme eller landbrugsdrift.

Lokaliteterne i forbindelse med de tre kommunale renseanlæg blev udvalgt, fordi der i tilløb til og afløb fra de pågældende renseanlæg allerede forelå målinger af potentielt hormonforstyrrende stoffer. Det ene renseanlæg, Søholt, udleder direkte til Silkeborg Langsø, hvorfor det var nødvendigt at placere den opstrøms station i Gudenå umiddelbart før indløbet i søen, mens den nedstrøms station måtte placeres i afløbet fra søen.

Tabel 3.1. Oversigt over lokaliteter, hvorfra der ved hjælp af passive opsamlere blev indsamlet prøver til analyse for hormonforstyrrende stoffer, samt samtidig eksponeret individer af spids malermusling

Stationskode	Vandløb	Lokalitet	Bemærkninger
Silkeborg opstrøms	Gudenå (Jylland)	Ca. 500 m før indløb i Silkeborg Langsø	<i>Unio tumidus</i> findes i forvejen i Gudenå og Silkeborg Langsø
Silkeborg nedstrøms	Silkeborg Langsø	Ved afløbet fra Silkeborg Langsø (under Østre Ringvej)	Der foreligger målinger under NOVANA af potentielt hormonforstyrrende stoffer fra Søholt Renseanlæg, der udleder til Silkeborg Langsø.
Lystrup Å	Lystrup Å (Jylland)	Ca. 500 m nedstrøms for Kulsø	<i>Unio tumidus</i> findes i forvejen i vandløbet. Referencelokalitet
Odense opstrøms	Odense Å (Fyn)	Umiddelbart opstrøms Ejby Mølle Renseanlæg	Malermuslinger (<i>Unio spp.</i>) findes allerede i vandløbet
Odense nedstrøms	Odense Å	Umiddelbart nedstrøms Ejby Mølle Renseanlæg	Der foreligger målinger under NOVANA af potentielt hormonforstyrrende stoffer for renseanlægget.
Åmose Å	Halleby Å (Sjælland)	Bromølle	
Ringsted opstrøms	Hørn Lilleå (Sjælland)	Umiddelbart opstrøms Ringsted Renseanlæg	Der findes med sikkerhed ikke <i>Unio spp.</i> i vandløbet
Ringsted nedstrøms	Hørn Lilleå	Umiddelbart nedstrøms Ringsted Renseanlæg	Der foreligger målinger under NOVANA af potentielt hormonforstyrrende stoffer for renseanlægget
Suså	Suså (Sjælland)	Umiddelbart opstrøms for Veterslev Bro	Malermuslinger (<i>Unio spp.</i>) findes allerede i vandløbet

3.3 Valg af stoffer

Udgangspunktet for valget af stoffer var EU's kandidatliste over anerkendte og mistænkte hormonforstyrrende stoffer. Ved valget af stoffer blev der lagt vægt på produktionsmængder og effekter (stofferne skal være mistænkt eller anerkendt hormonforstyrrende) samt på graden af vandopløselighed. I alt 6 stofgrupper blev undersøgt: phthalater, phenoler, organotinforbindelser, udvalgte pesticider, PFAS (perfluoroalkylerede stoffer) og østrogener. De enkelte stoffer ses i tabel 3.2. Det var på forhånd ikke muligt at vurdere hvilke koncentrationsniveauer, der forventes at give effekter. Dels er viden for de fleste stoffer begrænset, og dels forventes eksponeringen være et udtryk for en kombination af flere stoffer. For enkelte af stofferne foreligger der EQS værdier (miljøkvalitetskrav) for ferskvand, se tabel 5.8.

Tabel 3.2. Liste over stoffer, som indgår i undersøgelsen.

Navn	Cas. nr.	Navn	Cas. nr.	Navn	Cas. nr.
Phenoler		PFAS		Pesticider	
Bisphenol A	80-05-7	Perfluorooctane sulfonic acid (PFOS)	1763-23-1	Atrazine	1912-24-9
4-tert-octylphenol	140-66-9	Perfluorooctane sulfonamide (PFOSA)	754-91-6	Linuron	330-55-2
Phenol, 4-octyl-	1806-26-4	Perfluorohexane sulfonic acid (PFHxS)	432-50-7	Prochloraz	67747-09-5
Octylphenol	27193-28-8	Perfluoroheptanoic acid (PFHpA)	375-85-9	Diuron	330-54-1
Phenol, nonyl-	25154-52-3	Perfluorooctanoic acid (PFOA)	335-67-1	Dimethoate	60-51-5
4-tert-Butylphenol	98-54-4	Perfluorononanoic acid (PFNA)	375-95-1	Malathion	121-75-5
4-nonylphenol (4-NP)	104-40-5	Perfluorodecanoic acid (PFDA)	335-76-2	Simazine	122-34-9
4-chloro-3-methylphenol	59-50-7	Perfluoroundecanoic acid (PFUnA)	2058-94-8	Carbofuran	1563-66-2
2,4 Dichlorophenol	120-83-2	Perfluorododecanoic acid (PFDoA)	307-55-1	Fluazifop butyl	69806-50-4
Pentachlorophenol	87-86-5	Perfluorotridecanoic acid (PFTra)	72629-94-8	Pendimethalin	40487-42-1
Phthalater		Organotin		Bromoxynil	1689-84-5
				Ioxynil	1689-83-4
				Difenoconazole	119446-68-3
				Propiconazole	60207-90-1
				Tebuconazole	107534-96-3
Butylbenzylphthalat (BBP)	85-68-7	Tributyltin	688-73-3		
DBP Di-n-butylphthalat	84-74-2	Dibutyltin	1002-53-5		
Diisononyl phthalat (DINP)	28553-12-0	Monobutyltin	1118-46-3		
Di-n-octylphthalat	117-84-0	Triphenyltin	639-58-7		
Diethyl phthalat (DEP)	84-66-2				
DEHP Di-(2-ethylhexyl)phthalat		Østrogener			
		Østron (E1)	53-16-7		
		17β-østradiol (E2)	50-28-2		
		17α-ethinyløstradiol (EE2)	57-63-6		

3.3.1 Pesticider

Blandt de pesticider der er på EU liste over for hormonforstyrrende stoffer, blev der primært analyseret for pesticider, som er godkendt i Danmark (MST, 2008). Imidlertid har undersøgelser vist, at selv visse forbudte pesticider stadig findes i miljøet (Dahllöf et al. 2008), hvorfor en række af disse ligeledes blev medtaget.

3.3.2 PFAS

Perfluorerede forbindelser (PFAS) dækker over en gruppe af forskellige stoffer, der kemisk set er karakteriseret ved, at den ene ende af molekylet består af en alkylkæde, hvor alle hydrogenatomer er erstattet af fluoratomer. Denne perfluoralkyl "hale" kan være kortere eller længere, men de stærke C-F bindinger gør, at halen i alle tilfælde stort set er ikke-nedbrydelig, ligesom hos de mere kendte CFC forbindelser. PFAS-forbindelser anvendes primært i produkttyper som: imprægneringsmidler til tekstiler, læder og papir, voks og anden polish, maling, lak og trykfarver samt rengøringsmidler (både almindelige rengøringsmidler og midler til rengøring af metaloverflader eller tæpper). Viden om de biologiske effekter af PFAS er relativt begrænset. Den akutte giftighed af stofferne er moderat, og giftigheden af de beslægtede stoffer vides at vokse med kædelængden. Dyreforsøg har vist, at stofferne udviser hormonforstyrrende effekter (Lau, 2007). PFAS er persistente stoffer, der bioakkumuleres gennem fødekæden (Tomy et al. 2004). Meget høje koncentrationer af PFOS er især fundet i marine pattedyr bl.a. fra Østersøen (Kannan et al. 2002) og Nordsøen (Van de Vijver et al. 2004). Undersøgelser har vist at PFAS forekommer både i spildevand, ferskvand og i det marine miljø i Danmark (Bossi et al. 2008, Strand et al. 2007). Kommunale rensningsanlæg eller særskilte udledninger fra visse industrivirksomheder betragtes som de vigtigste kilder.

3.3.3 Organotin

Tributyltin (TBT) er et stærkt toksisk, relativt persistent og bioakkumulerbart biocid, som påvirker organismer på mange forskellige måder. Mest velkendt er dets negative påvirkninger i det marine miljø, herunder reproduktive effekter på østers (Alzieu 1982), og kønsforandringer i marine snegle (Strand & Jacobsen, 2002, Strand 2009). Derimod har DBT (dibutyltin) og MBT (monobutyltin) en meget lavere toksicitet. TBT har også været flittigt brugt i antibegroningsmidler til skibe og installationer i det akvatiske miljø, men er nu blevet forbudt i de fleste lande (International Marine Organization (IMO landene)). Ligeledes er brugen af TBT til træimprægnering blevet forbudt. De mindre toksiske organotinforbindelser, dibutyltin (DBT) og monobutyltin (MBT), bruges derimod stadig, bl.a. som stabilisator i PVC og som katalysatorer i mange polymerisationsreaktioner ved f.eks. produktion af silikone og polyurethan. TBT kan dog utilsigtet forekomme som urenheder i disse produkter (Dobson et al. 2006). MBT bruges især til at hærde glasoverflader, men også til at polymerisere overfladebelægninger. Andre typer af organotinforbindelser kan omfatte di- og mono-octyltin samt triphenyltin. I EU er brug af organotin-forbindelser i overfladebelægninger i produkter som bruges til mad og personlig hygiejne ikke længere tilladt, men stofferne indgår stadig i andre typer af produkter, herunder i en del PVC-produkter.

3.3.4 Phenoler

En lang række phenoler har enten en dokumenteret hormonforstyrrende effekt eller er mistænkt for at have det. Blandt disse er chlorphenoler lav til moderat persistente i vandigt miljø og er bioakkumulerbare (Czaplicka 2004). Toksiciteten varierer afhængig af struktur og antallet af chloratomer (Yen et al. 2002). Chlorphenoler anvendes dels som pesticider, dels i produktion af pesticider, træimprægneringsmidler og antiseptiske produkter. En anden gruppe, alkylphenoler, har generelt lav persistens i det vandige miljø (Ying et al. 2002). Flere af disse stoffer har, udover hormonforstyrrende effekter, en betydelig akut giftighed over for akvatiske organismer (Glezer 2003, Servos 1999, Mihaich et al. 2009). Alkylphenoler anvendes primært i industrien til produktion af alkylphenol-ethoxylater samt indgår i plastprodukter eller anvendes som antioxidant. Alkylphenol-ethoxylaterne er non-ioniske overfladeaktive stoffer og indgår i en række produkter som detergenter, emulsioner osv. En del af de alkylphenoler, som findes i miljøet, er fremkommet ved nedbrydning af alkylphenol-ethoxylater (Ying et al. 2002).

3.3.5 Østrogener

Østrogener, både de kunstige som anvendes i p-piller (eks. 17 α -ethinyløstradiol (EE2)), men også de naturlige såsom Østron (E1) og 17 β -østradiol (E2), har i sagens natur betydelige hormonforstyrrende egenskaber. Tidligere undersøgelser har vist, at de ikke overraskende forekommer i renseanlæg (Stuer-Lauridsen et al. 2005), hvor der blev konstateret effekt-koncentrationer i *in vitro* bioassays ned til ca. 0,05 ng E2 ækvilanter pr liter. Det blev derfor vurderet oplagt at medtage dem i denne undersøgelse.

3.3.6 Phthalater

Phthalater er en af de stofgrupper, som har de bedst dokumenterede hormonforstyrrende effekter på både akvatiske (Carnevali et al. 2010, Zhou et al. 2010) og terrestriske dyr (Magnusson 2005), herunder pattedyr (Latini et al. 2004) og pattedyrsceller (Krüger et al. 2008, Ghisari & Bonefeld-Jørgensen, 2009). Bortset fra de hormonforstyrrende effekter er den akutte toksicitet overfor akvatiske organismer dog generelt lav (Stables et al. 1997a). Stoffer-

ne er ikke til moderat persistente i det vandige miljø (Stable et al. 1997b). Phthalater anvendes som blødgørere i en lang række forbrugerprodukter (eksempelvis neglelak og hårspray) og plastprodukter. Bla. anvendes en række phthalater i produktionen af PVC.

3.4 Metodeudvikling, kalibrering og valg af Performance Reference Compounds (PRC)

3.4.1 Udvikling af ekstraktionsmetode

Eftersom der skulle foretages mange forskellige analyser specielt på de samme POCIS-membraner, var det nødvendigt at foretage en metodeudvikling for ekstraktion af stofferne fra membranerne for at sikre, at alle udvalgte stofgrupper blev ekstraheret i tilstrækkeligt omfang. Optimeringen blev primært rettet mod PRC-stoffer, pesticider og PFAS, phenoler og phthalater, og i mindre grad mod organotin, da der ikke findes et passende referencestof til denne gruppe, som ikke også forekommer i miljøet, eller bliver brugt som internt referencestof i selve analysen. Ideelt set kunne isotopmærkede organotin stoffer have været brugt, men dette var hverken teknisk og økonomisk muligt i forbindelse med dette projekt.

De indledende forsøg viste, at stort set alle stofgrupper effektivt blev bundet til POCIS materialet, også stoffer med K_{ow} højere end 3. Imidlertid stillede netop den effektive binding relativt høje krav til ekstraktionen af stofferne. Der blev derfor udviklet en effektiv metode, hvor POCIS-materialet blev overført til en søjle, hvor der først blev elueret med acetone og dernæst med en blanding af dichlormethan:methanol:toluen (i forholdet 8:1:1) (Se afsnit 4.2.1).

En tilsvarende metodeudvikling var ikke nødvendig for silikonemembranerne, da der er større erfaring med ekstraktion og analyse af de stoffer, som opsamles på disse (Booij et al. 2002, Smedes 2007, Larsen et al. 2009).

3.4.2 Udvalgelse af referencestoffer (PRC, Performance Reference Compounds)

For at kunne bestemme den vandmængde, hvorfra membranerne optog stofferne, blev der tilsat referencestoffer (PRC, Performance Reference Compounds) til membranerne før de blev lagt ud på undersøgelseslokaliteterne. Princippet er, at PRC diffunderer ud i det forbipasserende vand med en diffusionshastighed, som er afhængig af det vandvolumen, som passerer membranen. Ved at måle mængden af PRC som er tilbage ved feltforsøgets afslutning, kan de passerede vandmængder beregnes, og den gennemsnitlige koncentration af de opsamlede stoffer kan derved bestemmes. Den passerede vandmængde er således den mængde vand, der har været i tilstrækkelig tæt kontakt med membranerne til at stoffer i vandet kan optages i membranen. Det er ikke et udtryk for det totale flow i vandløbet. Denne teknik er velafprøvet for silikonemembranerne (Larsen et al. 2009), mens der er mindre erfaring med POCIS-membranerne.

For at fastlægge hvilke PRC, der var mest relevante at anvende, samt hvilket koncentrationsniveau af PRC, der skulle tilsættes membranerne, blev der foretaget et indledende kalibreringsforsøg i felten. Membranerne blev derved "loaded" med udvalgte PRC og udlagt i et testvandløb (Hove Å) i 2 uger og restindholdet i membranerne dernæst målt.

For POCIS var det forventet, at stoffernes kemiske egenskaber udover deres hydrofobicitet (baseret på K_{ow}) havde betydning for deres evne at fungere som referencestoffer. Derfor blev der udvalgt en række deuterium-mærkede PRC indenfor de relevante stofgrupper i projektet. For POCIS foretog leverandøren denne spikning af membranerne. Selve spikningen med PRC af silikonemembranerne blev derimod foretaget ved det daværende DMU (nu DCE/Institut for Bioscience, Aarhus Universitet).

Til det indledende forsøg blev udvalgt følgende PRC til POCIS-membranerne: 2,4-dichlorophenol-d3, pentachlorophenol-13C6, simazine-d5, linuron-d6, propiconazole-d5, fluazifop butyl-d9, 13C-PFHxS, 13C-PFNA, diethylphthalat (DEP)-d4, butylbenzylphthalate (BBP)-d4 og østron-d2.

Resultaterne viste, at sandsynligvis kun stoffer med lav K_{ow} ($K_{ow} < 3$) kan anvendes som PRC for POCIS-membranerne, da PRC stofferne ikke blev frigjort fra membranerne under det indledende feltforsøg. Listen over de oprindeligt udvalgte PRC blev derfor revideret og stofferne blev brugt ved de efterfølgende målinger på de 9 undersøgelseslokaliteter. For silikonemembranerne var der som PRC udvalgt en række deuterium-mærkede PAH'er med stigende K_{ow} . Disse var blevet testet i en række tidligere projekter og deres kinetik og anvendelighed derfor veldokumenteret (Larsen et al. 2009). Silikonemembranerne blev tilpasset og placeret i de samme holdere som POCIS-membranerne, således at afgivelsen af de deuterium-mærkede PAH'er fra silikonemembranerne også kunne anvendes som udtryk for vandmængden, der passerede POCIS-membranerne.

Følgende PRC-stoffer blev herefter anvendt:

POCIS-membraner: 4-nitrophenol-d4, DNOC-d5, mechlorprop-d3, desethylatrazine-d6, simazine-d5. Stofferne blev udvalgt ud fra K_{ow} mindre end 3.

Silikonemembraner: Acenaphthen-d10, flouren-d10, antracen-d10, fluoranthen-d10, benz(k)fluoranthren-d12, benz(e)pyren-d12, dibenz(a,h)antracen-d14 og benzo(ghi)perylene-d12 (herudover er membranerne spiket med PCB204, som ikke er blevet målt). Stofferne blev udvalgt ud at skulle dække K_{ow} 4 - 8 (Larsen et al. 2009).

4 Metoder

4.1 Feltforsøg

Der blev 16. april 2009 indsamlet ca. 270 individer af spids malermusling (*Unio tumidus*) fra Thorsø ved Virklund. Det foregik ved at trække en langskaftet rive med tætsiddende, lange tænder gennem det øverste af sedimentet på ½-1 m's dybde nær søens sydvestlige bred. De indsamlede individer var 55-85 mm lange. Muslingerne blev straks på stedet pakket i plastposer med ca. 15 individer i hver og placeret i kølekasser. Poserne var derudover fyldt med fugtig luft.

Ved hver af de 9 lokaliteter blev der efterfølgende (den 16.-17. april 2009) udsat 2 kasser indeholdende hver 15 levende muslinger. Hver kasse blev fyldt ca. halvt med sand/grus fra lokaliteten og muslinger anbragt oven på dette. Herefter blev kassen aflukket foroven med trådnæt. Kasserne blev anbragt på op til ½ m dybt vand, hvor strømmen var moderat. Kasserne blev forankret i bunden med jernspyd. Der blev anvendt plastik-fiskekasser med dimensionerne 60 x 40 x 20 cm (se Figur 4.1).



Figur 4.1. Fiskekasser, som blev anvendt til muslingerne, efter 3 ugers eksponering i vandløb.

Det er ikke muligt "udefra" at kønsbestemme spids malermusling (eller andre store muslinger). Antages det imidlertid, at kønsratio hos muslingerne i Thorsø var 1:1, hvilket er fundet i flere studier i udlandet (Tudorancea 1972, Aldridge 1999), skulle der således fra hver lokalitet være min. 10 hanner til rådighed for analyse.

Parallelt med udsætningen af eksponeringskasserne med muslinger blev der ved hver lokalitet opsat to ens passive opsamlere. Hver opsamler indeholdt 2 POCIS-membraner og 1 silikonemembran. Den ene POCIS-membran var ikke præpareret med PRC, da stofferne fra membranekstraktet skulle anvendes til *in vitro* cellekultur forsøgene. Membranerne var indkapslet i en stålboks forsynet med huller, således at det omgivende vandløbsvand uhin-

dret kunne strømme ind og ud (se Figur 4.2). Hver passiv opsamler placeredes umiddelbart over vandløbsbunden, understøttet af en lille flise, og desuden fastgjort med to jernspyd, der blev nedbanket i bunden. Opsamlerne blev ligesom eksponeringskasserne placeret, hvor strømmen var moderat.



Figur 4.2. Holder til membranerne.

Eksposteringskasserne og de passive opsamlere blev optaget igen den 12.-14. maj 2009. De passive opsamlere blev hjembragt umiddelbart herefter til forbehandling og analyser i laboratoriet. Muslingerne blev taget op af kasserne og analyseret på stedet i et mobilt laboratorium. De passive opsamlere i Gudenå opstrøms for Silkeborg Langsø (Silkeborg opstrøms) var desværre forsvundet, formodentlig pga. hærværk.



Figur 4.3. TH: De passive prøveopsamlere udsat i vandløb her i Odense Å, opstrøms for Ejby Mølle Renseanlæg, TV: Spildevand fra Ringsted Renseanlæg, der ledes ud i vandløb.

4.2 Kemiske analyser

Stoffer opsamlet på POCIS-membranerne (polære og semi-polære stoffer) blev ekstraheret med organisk solvent i henhold til protokollen (se afsnit 4.2.1). Stoffer fra silikonemembranerne (SM) blev ekstraheret med metanol. Stofferne blev analyseret separat i stofgrupper ved væskkromatografi-masse-spektrometri (LC-MS-MS), gaskromatografi-massespektrometri (GC-MS) og gaskromatografi-pulsed-flame-photometric detektion (GC-PFPD).

Kvantificering af mærkede PRC-standarder foregik ved GC-MS og LC-MS-MS. Se bilag 2 og afsnit 4.2.2.

4.2.1 Ekstraktion af stoffer

Den enkelte POCIS-membran blev skilt ad og pakkematerialet blev overført til en lille kolonne og spiket med en blanding af interne standarder repræsentative for de enkelte stofgrupper. Kolonnen blev elueret med først 50 ml acetone. Dette ekstrakt blev delt og den ene del blev anvendt til analyse for PFAS, pesticider og PRC. Kolonnen blev dernæst elueret med yderligere 50 ml dichlormethan:methanol:toluen (i forholdet 8:1:1). Dette eluat og halvdelen af første eluat blev kombineret i forholdet 1:1 og anvendt til analyse for phenoler, østrogener og phthalater og organotin. To blindprøver inkluderedes, en feltblind, som er en membran, der har været transporteret med ud i felten men ikke eksponeret i vandløbene, og en laboratorieblind, således at man kunne separere evt. blindværdier fremkommet ved transport i felten fra evt. blindværdier fremkommet under selve ekstraktionen i laboratoriet.

Membraner uden PRC-stoffer anvendt til *in vitro* bioassays blev ekstraheret tilsvarende med de to kombinationer af solventer. Ekstrakterne blev kombineret, inddampet til tørhed og genopløst i DMSO.

Silikonemembranerne ekstraheredes i 50 ml metanol på rystebord i 12 timer efter tilsætning af interne standarder. Ekstraktet blev delt i to, hvoraf denne ene halvdel blev anvendt til analyse for organotin og den anden til analyse for PRC-stoffer og phthalater.

De endelige ekstrakter blev inddampet og analyseret efter de respektive metoder for de enkelte stofgrupper.

4.2.2 Kemiske analyser

For PFAS og pesticider blev POCIS-ekstraktet analyseret ved væskechromatografi koblet til dobbelt massespektrometri (LC-MS-MS) med electrospray ionisering (ESI). Indhold af stofferne blev kvantificeret ved ekstern kalibrering. Der blev korrigeret for genfinding med interne standarder, se Bilag 2.

For phenoler og østrogener blev POCIS-ekstraktet overført til en GC-vial og silaniseret med BSTFA (N,O-bis(trimetylsilyl)trifluoroacetamid-trimethylchlorosilan), som binder silan til OH-grupperne på stofferne, hvilket forbedrer detektionen på GC-MS. Identificering og kvantificering foregik ved GC-MS. Der blev korrigeret for genfinding af mærkede standarder.

For phthalater blev både POCIS- og silikoneekstraktet analyseret. Identificering og kvantificering foregik ved GC-MS. Der blev korrigeret for genfinding af mærkede standarder.

For organotin blev både POCIS- og silikoneekstraktet derivatiseret med ethylborate ifølge den akkrediterede instruks for organotinanalyser i biota. Identificering og kvantificering af organotin forbindelser (TBT, DBT og MBT) foregik ved GC-PFDP.

PRC-stofferne fra silikonemembranerne blev identificeret og kvantificeret ved GC-MS. PRC-stofferne fra POCIS-membranerne blev identificeret og kvantificeret ved LC-MS-MS.

4.3 Effektmålinger på *in vitro* bio-assays

Visse miljøfarlige stoffer kan binde til receptorer, som påvirker hormon-funktioner i celler. Til disse receptorer hører østrogen (ER)-, androgen (AR)- og Arylhydrocarbon (AhR)- receptorerne. Ah-receptoren påvirkes af stoffer med en specifik kemisk struktur, hvoraf de mest kendte er dioxiner. Derfor betegnes disse stoffers effekt som dioxin-lignende, men også andre stoffer kan have samme effekt. Når disse hormonforstyrrende stoffer bindes til receptorerne, kan de have enten en aktiverende (agonistisk) eller en hæmmende (antagonistisk) effekt.

Da ekstrakterne fra POCIS-membranerne indeholder en række forskellige stoffer i blanding, er det denne "cocktail", som giver en samlet effekt i *in vitro* receptorforsøgene. Denne samlede "cocktail" effekt af stoffer fra POCIS-membraner blev analyseret *in vitro* ved, at forskellige vertebra / humane cellekulturer blev eksponerede til en fortyndingsrække af POCIS-membran ekstraktet. Cellekulturforsøgene er specialdesignede til at detektere såvel hæmning som aktivering af henholdsvis ER, AR og AhR.

For bestemmelse af effekter på ER-aktivitet anvendtes MVLN-celler (Bonefeld-Jørgensen et al. 2007). Til AR anvendtes CHO-K1-celler (Krüger et al. 2008) og til AhR anvendtes Hepa1.12cR-celler (Long et al. 2006). Der blev foretaget 5 fortyndinger: for ER og AhR 400, 1000, 2500, 6240 og 15.640 gange og for AR 400, 800, 1600, 4000 og 10.000 gange. Fortyndingsrækkerne blev anvendt til fastlæggelse af dosis-reponskurver for de enkelte ekstrakter. Disse receptoreffekter blev målt ved brug af de såkaldte receptor-reporter gen analyser, hvor ændringer i receptoraktivitet måles ved en proportional ændring i udsendelse af en specifik lysintensitet, som styres af reportergenets luciferase (Bonefeld-Jørgensen et al. 2007).

Videre undersøgte ekstrakternes evne til at forstærke eller hæmme effekter af dels det naturlige østrogene hormon (17 β -østradiol) for ER, og dels de potente receptorligander som det syntetiske androgen R1881 for AR og det højpotente dioxin (TCDD) for AhR. R1881 er en syntetisk ligand for AR, idet det naturlige hormon nedbrydes i de anvendte celler. Disse undersøgelser af membranekstrakter for tilstedeværelse af potente receptorligander, der kan forstyrre normale receptor ligander, er medtaget for at efterligne den fysiologiske *in vivo* tilstand og dermed vurdere effekterne af de hormonforstyrrende stoffer. Disse undersøgelser er foretaget i henhold til internationale standard analyser.

Målinger blev foretaget på ekstrakter fra de membraner, hvor til der ikke var tilsat PRC. Desuden blev de vigtigste af de kemisk identificerede enkeltstoffer testet i de samme *in vitro* cellekulturer forsøg for deres ER-, AR- og AhR-aktiviteter, som beskrevet ovenfor for membranekstrakterne.

For at kunne sammenligne effektniveauer af de forskellige assays mellem de enkelte lokaliteter beregnedes såkaldte bio-ækvivalenter for hhv. ER-, AR-, og AhR aktivitet (ER-EEQ, AR-AEQ, og AhR-TEQ), normaliseret til henholdsvis 17 β -estradiol for ER, det syntetiske androgen, R1881, for AR og dioxinet TCDD for AhR (se Tabel 5.9) og (Kusk et al. 2010). Disse data blev korigeret i henhold til det vandvolumen, der havde været i kontakt med de passive opsamlere på de enkelte lokaliteter.

4.4 Effektmålinger på muslinger

Muslingerne fra hver lokalitet blev indledningsvis kønsbestemt ved mikroskopi ud fra udvikling af enten oocytter eller spermatozoer i gonaderne. Prøver af hæmolymfe (blodvæske) til analyse af alkali-labilt-phosphat (ALP) som biomarkør for dannelsen af blommeproteiner blev udtaget fra både hanner og hunner i de udvalgte vandområder. Metoden benytter sig af, at blommeproteiner som vitellogenin og vitellin er betydeligt mere fosforholdige sammenlignet med andre proteiner. ALP skal derfor betragtes som et overordnet mål og ikke en specifik identifikation af de pågældende blommeproteiner.

ALP-metoden blev udført i henhold til Gagné & Blaise (2000), hvor ALP måles spektrofotometrisk vha. et farvereagens (Biovision Phosphate Colorimetric Assay Kit, Catalog nr. K410-500). Farveintensiteten kalibreres mod en standarddrække for phosphat. Detektionsgrænse for ALP i hæmolymfe var på 10µM. Afsluttende normaliseredes ALP-målingerne mod proteinniveauet i hæmolymfen bestemt vha. Bradford-metoden og kalibreret mod BSA. ALP blev analyseret i 8 hanner og 3 hunner fra hver station.



Figur 4.4. Bløddele i individer af spidse malermuslinger. Tv. ses han med spermatozoer i gonaderne (testis) og th. hun, hvor æggene opbevares både i gonaderne (ovariet), hvor de udvikles, og i rør i gællerne. Hos hannerne forekommer spermatozoer kun i gonaderne.

Endvidere blev der ved nogle af stationerne undersøgt for udvikling af intersex, dvs. forekomst af enkeltliggende æg-lignende celler i gonaderne (testes) hos samtlige hanner. Forekomsten af intersex blev systematisk undersøgt vha. stereomikroskopi af gonadevæske fordelt på 3 mikroskopglas. Denne metode til karakterisering af forekomsten af æg-lignende celler i gonadevæsken skal dog betragtes som en screeningsmetode, hvor identifikationen af de æg-lignende celler er behæftet med visse usikkerheder. Mere detaljerede histologiske undersøgelser af gonaderne vil være nødvendig for at få disse indikationer på intersex endeligt bekræftet, men det ligger desværre uden for dette projekts rammer.

5 Resultater, diskussion

5.1 Forekomst af udvalgte stoffer i vandløb

5.1.1 Beregning af vandvolumener

På grund af POCIS-membranernes evne til effektivt at binde PRC blev disse stoffer stort set ikke frigivet til det omgivende vand. Det var derfor ikke muligt at beregne de passerende vandvolumener (se afsnit 3.4.2) på basis af disse membraner, hvorfor silikone membraner er anvendt. Skal POCIS-membranerne anvendes til PRC stoffer, bør der foretages yderligere metodeudvikling og afprøvning af andre stoffer som PRC stoffer.

For silikonemembranerne er metoden til beregning af de passerende vandmængder velafprøvet. Da der både var placeret silikone- og POCIS-membraner i samme prøveopsamler og med samme geometri, forventes de bestemte vandvolumener fra silikonemembranerne også at kunne anvendes for POCIS-membranerne (Larsen et al, 2009). Endvidere tyder de indledende resultater med PRC stofferne på, at for de i projektet undersøgte stofgrupper, fungerer POCIS-membranerne ikke som ligevægtsmembraner tilsvarende silikonemembranerne, da stoffer bundet til membranerne ikke frigives til de omgivende vandmasser igen. Usikkerheden mellem POCIS og silikone membraner er ikke kvantificeret men forventes at være mindre end usikkerheden på vandmængde bestemmelsen.

Tabel 5.1. Vandvolumener som har passeret de enkelte prøveopsamlere i udsættelsesperioden. Volumener er beregnet på basis af PRC i silikonemembraner og anvendt til at beregne vandkoncentrationer af stofferne ud fra koncentrationerne i membranerne.

Station	Antal dage	Liter vand i alt
Silkeborg nedstrøms	26	15
Lystrup Å (reference)	26	29
Odense opstrøms	26	11
Odense nedstrøms	25	41
Åmose Å	26	11
Ringsted opstrøms	26	24
Ringsted nedstrøms	26	24
Suså	26	19

De mindste vandvolumener forekom primært ved lokaliteter (afløbet fra Silkeborg Langsø og Åmose Å), hvor strømhastigheden generelt var relativt lille. Der blev også beregnet en lille vandmængde for Odense Å opstrøms for Ejby Mølle Renseanlæg, hvilket skyldes at opsamlere her var opstillet på et sted hvor strømhastigheden lokalt var relativt lav.

Det faktum at strømhastigheden forbi membranerne kan variere så meget indenfor den samme lokalitet viser, hvor vigtigt det er - via tabet af PRC - at kunne beregne den aktuelle eksponering (dvs. den passerende vandmængde) af de enkelte opsamlere på en given lokalitet.

5.1.2 Pesticider

Resultaterne for koncentrationer af pesticider i POCIS-membraner fremgår af tabel 5.2 og 5.3. Der blev fundet 12 pesticider ud af de 15, der blev analyseret for. De 3 stoffer, der ikke blev fundet, var difenoconazole, fluazifop butyl og pendimethalin. Carbofuran blev kun detekteret men under detektionsgrænse i en enkelt station (Odense, nedstrøms) og prochloraz blev detekteret ved 4 stationer (Silkeborg nedstrøms, Odense opstrøms og nedstrøms samt Lystrup Å). For tre stoffer, diuron, linuron og simazine, blev der generelt fundet væsentligt højere koncentrationer nedstrøms end opstrøms for renseanlæggene, (Odense og Ringsted), med undtagelse af Diuron som var højere opstrøms for Odense. Overordnet tyder det dog på, at anlæggene kan være en kilde for disse pesticider men at der også forekommer andre kilder. Flere af de fundne pesticider er ikke længere tilladt i Danmark, men det er ikke ukendt, at stofferne alligevel optræder, når der analyseres for dem. Forklaring på forekomsterne kan være flere. Det er muligt, at de stammer fra atmosfærisk deposition via nedbør muligvis fra lande hvor stofferne stadig er tilladte men ulovlig brug af stofferne kan heller ikke udelukkes. Endvidere kan forbudte pesticider forekomme på udenlandsk frugt og derved introduceres via husholdningsspildevand. En nøjere analyse af dette spørgsmål ligger imidlertid uden for rammerne af dette projekt.

For flere af pesticiderne blev der fundet højere koncentrationer nedstrøms renseanlæg, hvilket indikerer at spildevand kan være en kilde til spredning i vandmiljøet.

Tabel 5.2. Koncentrationer af pesticider (ng/l) i vandfasen (beregnet på basis af mængden af pesticider fundet i POCIS-membranerne og det PRC-vurderede vandvolumen for silikonemembranerne).

Lokalitet	ATR	CAR	DIM	DIU	LIN	MAL
Silkeborg, nedstrøms	0,13	nd	0,03	0,75	1,15	0,06
Lystrup Å	0,24	nd	0,01	0,19	0,03	nd
Odense, opstrøms	0,47	nd	0,09	15,00	2,30	0,40
Odense, nedstrøms	0,10	0,02	0,01	10,10	6,87	0,03
Åmose Å	0,80	nd	0,05	1,75	5,52	0,10
Ringsted, opstrøms	0,57	nd	0,01	0,68	0,32	0,83
Ringsted, nedstrøms	0,32	nd	0,01	4,07	27,80	0,14
Suså	0,17	nd	0,01	1,19	4,11	0,05

Forkortelser: ATR = Atrazin, CAR = Carbofuran, DIM = Dimethoate, DIU = Diuron, LIN = Linuron, MAL = Malathion

nd: ikke detekteret. Kursiv angiver under detektionsgrænsen, se Bilag 2.

Tabel 5.3. Koncentrationer af pesticider (ng/l) i vandfasen (beregnet på basis af mængden af pesticider fundet i POCIS-membranerne og det PRC-vurderede vandvolumen for silikonemembranerne)

Lokalitet	PRO	PROP	SIM	TEB	IOX	BROM
Silkeborg, nedstrøms	0,05	0,53	0,21	0,57	0,08	nd
Lystrup Å	0,03	0,22	0,18	0,36	0,03	nd
Odense, opstrøms	0,09	1,15	1,49	2,18	0,35	0,31
Odense, nedstrøms	0,04	1,40	1,74	2,63	0,03	0,01
Åmose Å	nd	1,29	0,73	0,51	0,28	0,18
Ringsted, opstrøms	nd	2,15	0,26	3,09	0,22	0,25
Ringsted, nedstrøms	nd	2,12	0,81	2,18	0,05	nd
Suså	nd	0,67	0,41	0,96	0,13	0,10

Forkortelser: PRO = Prochloraz, PROP = Propiconazole, SIM = Simazine, TEB = Tebucnazole, IOX = Ioxynil, BROM = Bromoxynil

nd: ikke detekteret. Kursiv angiver under detektionsgrænsen, se Bilag 2.

5.1.3 PFAS

Resultater for analyse af PFAS fremgår af tabel 5.4. Der blev ikke fundet perfluorocarboxylater med $C>10$ (PFUnA, PFDoA og PFTrA) og PFOSA (Forkortelser: se under tabel 5.4), men disse stoffer er også mest fundet i biologiske matricer. Der blev fundet højere koncentrationer af PFOA og PFOS nedstrøms end opstrøms rensningsanlæg (Odense og Ringsted). PFOA og PFOS er meget stabile nedbrydningsprodukter af andre stoffer som f.eks. fluorotelomer alkoholer (FTOH), som findes i forbrugerprodukter (f.eks. imprægneringsmidler). Koncentrationerne af de andre PFAS varierede mindre mellem lokaliteterne, hvilket kunne tyde på, at der snarere er tale om et diffust baggrundsniveau end specifikke kilder.

Højere koncentrationer af PFOA og PFOS nedstrøms rensningsanlæg indikerer, at spildevand er en kilde til spredning i miljøet, mens kilderne for andre PFAS tilsyneladende er mere diffuse.

Tabel 5.4. Koncentrationer af PFAS (ng/l) i vandfasen (beregnet på basis af mængden af PFAS fundet i POCIS-membranerne og det PRC-vurderede vandvolumen for silikone-membranerne)

Lokalitet	PFHxS	PFOS	PFHpA	PFOA	PFNA	PFDA
Silkeborg, nedstrøms	nd	0,07	nd	0,15	0,04	0,02
Lystrup Å	nd	0,04	nd	0,08	0,01	0,01
Odense, opstrøms	nd	0,08	nd	0,17	0,04	0,02
Odense, nedstrøms	0,01	0,36	0,03	0,31	0,06	0,14
Åmose Å	nd	0,14	nd	0,17	nd	0,01
Ringsted, opstrøms	nd	0,06	nd	0,08	nd	0,02
Ringsted, nedstrøms	nd	0,10	0,04	0,31	0,08	0,05
Suså	0,10	1,66	nd	0,15	nd	0,01

Forkortelser: PFHxS = Perfluorohexane sulfonic acid, PFOS = Perfluorooctane sulfonic acid, PFOSA = Perfluorooctane sulfonamide, PFHpA = Perfluoroheptanoic acid, PFOA = Perfluorooctanoic acid, PFNA = Perfluorononanoic acid, PFDA = Perfluorodecanoic acid, PFUnA = Perfluoroundecanoic acid, PFDoA = Perfluorododecanoic acid, PFTrA = Perfluorotridecanoic acid

nd: ikke detekteret. Kursiv angiver under detektionsgrænsen, se Bilag 2

5.1.4 Organotin

Organotin blev fundet i ekstrakterne fra silikonemembranerne på samtlige lokaliteter (Tabel 5.5). TBT blev fundet i højest koncentration nedstrøms for Søholt Renseanlæg (Silkeborg nedstrøms), DBT i højest koncentration samme sted og nedstrøms Ringsted renseanlæg, mens de højeste værdier af MBT blev fundet i Åmose Å og nedstrøms Ringsted renseanlæg. Til gengæld blev alle tre stoffer fundet i laveste koncentrationer i Lystrup Å (referencelokalitet).

Tabel 5.5. Koncentrationer af organotin (ng/l) i vandfasen (beregnet på basis af mængden af organotin fundet i silikonemembranerne, korigeret for blindværdier, og det PRC-vurderede vandvolumen for silikonemembranerne)

Lokalitet	TBT	DBT	MBT
Silkeborg, nedstrøms	0,251	0,070	0,032
Lystrup Å	0,002	0,001	0,002
Odense, opstrøms	0,024	0,006	0,028
Odense, nedstrøms	0,007	0,008	0,010
Åmose Å	0,079	0,183	0,265
Ringsted, opstrøms	0,013	0,012	0,020
Ringsted, nedstrøms	0,039	0,015	0,217
Suså	0,012	0,031	0,035

Forkortelser: TBT = Tributyltin, DBT = Dibutyltin, MBT = Monobutyltin

Kursiv angiver under detektionsgrænsen, se Bilag 2.

De fundne TBT-koncentrationer var lavere end de koncentrationer, som tidligere er fundet i tilløb og afløb fra danske rensningsanlæg (Strand et al. 2007). Resultaterne kan dog ikke direkte sammenlignes med den tidligere undersøgelse, hvor der blev målt på rene spildevandsprøver opsamlet ved

traditionel prøveudtagning, mens prøveopsamlerne i dette projekt var placeret i selve vandløbene, hvor der er sket en fortynding af spildevandet.

Forholdet mellem de tre organotinforbindelser varierede betydeligt mellem lokaliteterne, mest markant mellem Silkeborg, Åmose Å og Ringsted. Det højere indhold af TBT i afløbet fra Silkeborg Langsø (Silkeborg nedstrøms) skyldes sandsynligvis brug af antibegroningsmidler ved lystbådehavnen, som ligger opstrøms for søen. Dette understøttes af, at der i Silkeborg Langsø er fundet meget høje indhold af TBT i ål (Strand et al. 2007); værdierne er på niveau med, hvad der er fundet i ål fra marine områder, hvor TBT i antibegroningsmidler er den primære kilde. Forholdet mellem organotinforbindelserne i Silkeborg tyder også på, at der ikke er tale om gammel forurening, da indholdet af nedbrydningsprodukterne er væsentlig lavere end indholdet af TBT. I Ringsted nedstrøms og Åmose Å var indholdet og andelen af nedbrydningsprodukterne langt større. I først nævnte var MBT således dominerende, mens der i Åmose Å var høje koncentrationer af både MBT og DBT. I disse tilfælde kan det ikke afgøres om dette kun skyldes nedbrydning af TBT, da der også kan være andre kilder til DBT og MBT.

Detektionsgrænsen for organotin er meget lavere (100-1000x) ved brug af passive opsamlere i denne undersøgelse, end når man analyserer direkte på vandprøver. Detektionsgrænsen for selve instrumentet er den samme, men fordi man opkoncentrerer fra et langt større volumen, end når man analyserer en vandprøve, bliver detektionsgrænserne lavere. Dog er det også afhængigt af instrumentets kvalitet, som kan variere over tid, men det er rimeligt at forvente som minimum en 10-100 x lavere detektionsgrænse ved brug af passive opsamlere.

Triphenyltin blev ikke fundet i denne undersøgelse. Da organotin kemisk set afviger fra de andre målte stoffer, bør der også afprøves et PRC, som svarer bedre til organotin for endeligt at verificere optagelseskinetikken for passive prøvetagere til organotinanalyser, da denne muligvis kan være anderledes end for de øvrige stoffer. Dette lå imidlertid udenfor projektet tidsmæssige og økonomiske rammer.

Organotin kunne ikke detekteres i ekstrakterne fra POCIS. Årsagerne til dette er ikke klarlagt, men det kunne skyldes, at organotin ikke binder til POCIS, at elueringsmetoden ikke var tilstrækkelig hensigtsmæssig til organotin, eller at prøvemængden var for lille, idet eluatet blev opdelt til mange forskellige analyser.

5.1.5 Chlorphenoler og alkylphenoler

Chlorphenolerne forekom typisk tæt ved detektionsgrænsen (Tabel 5.6). Der blev dog fundet en forhøjet koncentration af 4-chlor-3-methylphenol ved en enkelt station (Odense nedstrøms renseanlægget). Bisphenol A blev til gengæld fundet alle steder, dog med en værdi tæt ved detektionsgrænsen i Lystrup Å (formodentlig ubelastet). For både Odense og Ringsted nedstrøms renseanlæg forekom klart forhøjede værdier i forhold til opstrøms herfor. Også 4-tert-butylphenol blev fundet i kraftigt forhøjede koncentrationer nedstrøms for de pågældende renseanlæg. En yderligere evaluering af disse resultater viste imidlertid forhøjede blindværdier i referencemembranerne for både dette stof og 4-n-nonylphenol, hvilket kunne tyde på en kontaminering i selve POCIS-membranen. Dette kan understøttes af Kojima et al. (2004), som har fundet, at det adsorptionsmateriale, som er i POCIS-membranerne, Oasis, kan være kontamineret med nonylphenol. Data for disse to stoffer er

derfor ikke medtaget. Materialet bruges også i fastfasekolonner, hvor det er muligt at rense kolonnerne før anvendelse og fjerne kontamineringen. Det tilsvarende er mere problematisk for membranerne. POCIS-membranerne er derfor ikke umiddelbart egnet til måling af nonylphenoler og muligvis heller ikke 4-tert-butylphenol. 4-octylphenol og pentachlorphenol blev ikke fundet i værdier over detektionsgrænsen.

Ikke overraskende blev phenolerne primært fundet nedstrøms renseanlæg, hvilket indikerer, at phenolerne primært stammer fra spildevand, men noget kan også tyde på forekomsten af diffuse kilder.

5.1.6 Østrogener

Østrogenerne forekom generelt i lave koncentrationer tæt ved detektionsgrænserne (Tabel 5.6). Dog var der forhøjede koncentrationer af østron (E1) nedstrøms i forhold til opstrøms for renseanlæggene ved Odense og Ringsted og tilsvarende for 17 β -østradiol (E2) ved Ringsted. 17 α -ethinyløstradiol (EE2) blev ikke fundet i værdier over detektionsgrænsen.

Ved tidligere studier er det konkluderet, at østrogener generelt ikke forekommer i høje koncentrationer i vandløb (Plesner 2003, Stuer-Lauridsen et al. 2005).

Tabel 5.6. Koncentrationer af phenoler og østrogener (ng/l) i vandfasen (beregnet på basis af mængden af phenoler og østrogener fundet i POCIS-membranerne, korregeret for blindværdier, og det PRC-vurderede vandvolumen for silikonemembranerne)

Lokalitet	4-Cl-3-						
	MePh	4-t-Oc-Ph	PCI-Ph	BPA	E1	E2	EE2
Silkeborg,							
nedstrøms	0,11	0,43	nd	0,38	0,38	0,06	1,96
Lystrup Å	0,30	0,03	nd	0,09	0,21	0,03	0,56
Odense,							
opstrøms	1,42	0,91	0,08	1,92	0,25	0,06	2,24
Odense,							
nedstrøms	2,46	106,50	0,23	3,10	0,28	0,02	0,91
Åmose Å	0,41	8,77	0,19	0,52	0,27	0,11	3,19
Ringsted,							
opstrøms	0,81	0,68	0,06	0,42	0,24	0,08	1,04
Ringsted,							
nedstrøms	0,50	42,57	0,06	8,81	2,52	0,32	2,53
Suså	0,50	0,64	0,8	0,48	0,28	0,08	2,47

Forkortelser: 4-Cl-3-MetPh = 4-chlor-3-methylphenol, 4-t-Oc-Ph = 4-tert-octylphenol, 4-Oc-Ph = 4-octylphenol, PCI-Ph = Pentachlorphenol, BPA = Bisphenol A, E1 = Østron, E2 = 17- β -østradiol, EE2: 17- α -ethinyløstradiol

nd: ikke detekteret. Kursiv angiver under detektionsgrænsen, se Bilag 2

5.1.7 Phthalater

Der blev analyseret for phthalater i både POCIS- og silikonemembranerne. De indledende forsøg havde vist, at POCIS-membranerne havde høj affinitet for phthalater og derfor var forventet at være velegnede til opsamling af phthalater til trods for deres høje K_{ow} -værdier. Imidlertid blev der fundet høje værdier i resultaterne fra POCIS for de fleste phthalater for feltblind og laboratorieblind og hvilket gav stor spredning indenfor de parallelle prøver. Silikonemembranerne (SM) viste det samme mønster som POCIS, bortset fra

DEHP som må være til stede i selve silikonemembranerne og dermed var yderligere forhøjet i alle prøver.

Eftersom laboratorieblinden var i samme størrelsesorden som feltblinden tyder det på, at selve håndteringen i felten generelt ikke giver anledning til kontaminering. Laboratoriet ser således ud til at have et problem med håndtering af membranerne, som erfaringsmæssigt ikke er set ved analyse af phthalater i andre miljøprøver. Prøver, som skal analyseres for phthalater, er generelt følsomme overfor kontaminering, og membranerne ser ud til at være særlig følsomme pga. den høje affinitet for phthalater. Membranerne til de kemiske analyser havde været igennem større antal procestrin end normalt og har derfor ikke kunne følge laboratoriets generelle procedurer for analyse af phthalater, og dette kan have en betydning. De tilsvarende problemer blev ikke fundet i de indledende forsøg, hvor stofgruppen blev testet alene.

Såvel prøverne som blindprøverne lå med få undtagelser indenfor den samme størrelsesorden og der sås ikke den forskel i koncentrationer mellem de enkelte stationer, tilsvarende den som blev fundet for de fleste andre målte stoffer. Det var derfor svært at vurdere forskelle i koncentrationer for de forskellige lokaliteter med enkelte undtagelser. For diethylhexylphthalat (DEHP) og di-n-butylphthalat (DBP) var Ringsted nedstrøms højere end de andre målte prøver. For Di-n-octylphthalat (DnOP) lå alle værdier under detektionsgrænsen, både i blind og prøver. Data er ikke opgivet her pga. stor usikkerhed.

På baggrund af resultaterne vurderes det, at der ikke er fundet signifikante koncentrationer af phthalater i prøverne, måske med undtagelse af Ringsted nedstrøms, med den pågældende opsamlingsmetode, men de høje blindværdier begrænser muligheden for at vurdere de præcise koncentrationer.

De høje blindværdier i POCIS er vurderet overfor resultaterne for *in vitro* bioeffekt analyserne. Imidlertid er membranerne til de biologiske prøver håndteret i et andet laboratorium og de har været igennem en mindre og mere samlet håndteringsproces. Generelt var blindværdierne for *in vitro* bioeffekt analyserne meget lave, hvilket kan tyde på, at de samme kontamineringsproblemer ikke forekommer for disse.

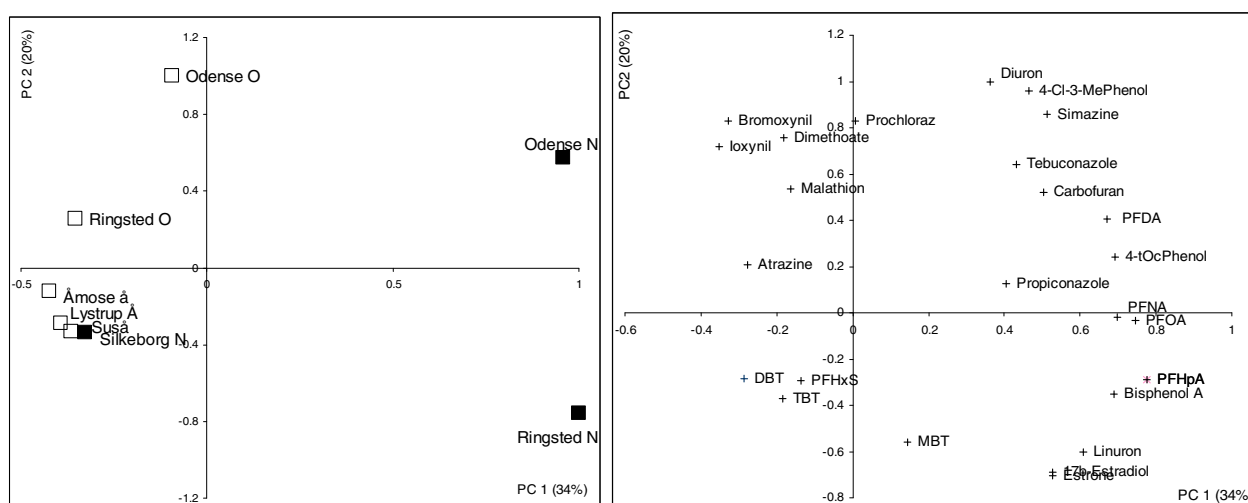
Skal membranerne anvendes til phthalater, vil det være nødvendigt med en nøje gennemgang af risici for kontaminering samt mindst mulig håndtering af prøverne.

5.2 Samlet vurdering af de kemiske data

5.2.1 Vurdering af lokaliteternes stofsammensætning

Forskelle mellem lokaliteterne i sammensætning af stoffer blev vurderet med en multivariat analysemetode, Principal Component Analysis (PCA) (Wold 1995). Derved vurderes i hvilken grad lokaliteterne ligner hinanden, når man ser på alle stoffer samtidigt, og ikke kun et stof ad gangen. For at kunne lave denne sammenligning normaliseres stofmængderne, så forskelle i koncentrationsniveauer mellem stoffer udlignes, men proportionerne mellem stofferne i hver lokalitet bibeholdes. Normaliseringen er foretaget ved at dividere med middelværdierne for hver stofgruppe, og efterfølgende er data vægtet ved at multiplicere værdierne med 1/standardafvigelsen. Vægtning laves for at give alle stofgrupper den samme indflydelse på analysen, uanset forskelle i varians (Wold et al 1987). Da dette ikke er et monitoringsprojekt,

er alle detekterede stoffer medtaget, også de der er målt til en værdi under detektionsgrænsen.



Figur 5.1. Forhold mellem lokaliteter som følge af relativ stofsammensætning (A). Årsagen til fordelingen af lokaliteter skyldes forskellig sammensætning af stoffer, hvilket er illustreret i B. Forskel i punkttyper i A er rent grafisk.

Sammensætningen af hormonforstyrrende stoffer ved Odense Å, nedstrøms for renseanlægget, og nedstrøms for Ringsted renseanlæg (Høm Lilleå), adskilte sig markant fra den sammensætning, som blev fundet ved de øvrige lokaliteter (Figur 5.1). Således var specielt koncentrationerne for pesticider og stoffer, der relaterer sig til forbrugerprodukter markant højere. Ligeledes forekom kun PFHpA ved disse to lokaliteter. Carbofuran og pentachlorophenol blev kun fundet i Odense nedstrøms, mens 17 β -østradiol (E2) kun kunne detekteres i Ringsted nedstrøms. Endelig var indholdet af fluorerede stoffer, bisphenol A og enkelte af pesticiderne højere i de to vandløb nedstrøms for de respektive renseanlæg – og i særdeleshed højere end opstrøms for disse.

I afløbet fra Silkeborg Langsø, dvs. nedstrøms for Søholt renseanlæg (Silkeborg nedstrøms), var koncentrationerne af de oven for nævnte stoffer generelt langt lavere og lå mere på niveau med, hvad der blev fundet ved de øvrige lokaliteter. Desværre mangler der data for Silkeborg opstrøms (Gudenåen), fordi prøveopsamlerne her gik tabt.

Lystrup Å, Åmose Å, Suså og Silkeborg nedstrøms havde en relativ dominans af nogle af de fluorerede stoffer, organotin og pesticidet atrazin. Opstrøms for renseanlæggene, Odense opstrøms (Odense Å) og Ringsted opstrøms (Høm Lilleå), var mere karakteriseret af andre pesticider

5.2.2 Vurdering af metode og fundne koncentrationer

Resultaterne fra undersøgelsen viste generelt, at kemiske analyser fra de passive opsamlere var forholdsvis robuste. Der var således generelt god overensstemmelse mellem data for de to parallelle prøveopsamlere, der var blevet eksponeret ved hver lokalitet. Dette tyder således på, at der er en god repeterbarhed af optagelsen af stofferne i membraner og spredningen lå i størrelsesordenen 0-35 % (Bilag 2) for koncentrationer over detektionsgrænsen. Medianen på spredning mellem dobbeltbestemmelserne lå for pesticiderne på 8 %, PFAS på 11 % og phenoler og østrogener 20 %. Den sidstnævnte skyldes primært et meget stort antal data under detektionsgrænsen.

Usikkerheden på bestemmelse af analyseparametre og PRC i silikonegummi er blevet estimeret i forbindelse med et tidligere OSPAR/ICES projekt (Smedes et al. 2007). For stofgrupperne PAH og PCB ligger den analytiske variation på 20-40 % på bestemmelsen i vand ved hjælp af silikone membraner, og usikkerheden på opsamling af stoffer (samplingsraten R_s) i membranerne blev vurderet til 30 %.

R_s afhænger bla. af K_{ow} for analyseparametrene, men dette er der ikke taget direkte hensyn til i denne rapport, da der er anvendt en middelværdi for op-taget for typiske log K_{ow} værdier på 3,9-5,2, som dækker de fleste af de målte stoffer.

De to indledende testudlægninger var på kun 14 dage og er derfor ikke medtaget i beregning af R_s , da der ikke var forsvundet tilstrækkeligt af PRC'erne. For de udlagte samplere fandtes i de spikede membraner, at der var 14-48 % tilbage af acenaphthen PRC (K_{ow} 3,9), og 60-100 % af benzo(ghi)perylene PRC (K_{ow} 6,1). For at indgå i beregning af R_s skal der være mindst 5 % tilbage og maksimalt 90 %. Ved at beregne R_s for hver af de PRC'er der opfylder dette, er en middel R_s beregnet, og variationskoefficienten på denne findes til 36-89 %, lidt højere end forventet fra OSPAR/ICES. Dette kan skyldes, at for OSPAR/ICES interkalibreringen lå samplerne ude i længere tid, og der var medtaget flere PRC'ere (både PCB og PAH'ere).

Der er mulighed for videre optimering af både analysekvalitet samt valg af flere PRC'er for at opnå bedre dækning af K_{ow} -området, men for en udlægningsperiode på 26 dage er de valgte PRC-komponenter generelt dækkende, hvorimod der ved udlægning et lavere antal dage bør være PRC'er med lavere K_{ow} inkluderet. For beregning af vandkoncentrationer for POCIS på basis af den gennemsnitlige R_s estimeret fra silikonemembranerne, er det antaget, at vandudvekslingen er sammenlignelig mellem POCIS og silikone-membranerne pga. samme geometri i opsamlingsenheden. Der er en dog usikkerhed på optagsmetoden, da POCIS-membranerne ikke er ligevægts-membraner, og de fleste målte stoffer ikke er upolære med $K_{ow} > 4$, som silikonemembranerne er optimale for. Denne usikkerhed er ikke kvantificeret i dette projekt.

For at kunne omregne de målte indhold i membranerne til vandkoncentrationer var det nødvendigt - på basis af PRC - at kunne estimere de vandmængder, der havde passeret membranerne. Resultaterne viste, at anvendelse af PRC i POCIS stadig kræver en del metodeudvikling, fordi de valgte stoffer kun vanskeligt blev afgivet til det omgivende vand. Der er udviklet metoder med anvendelse af PRC til POCIS, eksempelvis deuteriummærket atrazine-desisopropyl (DIA-d5) til måling af triaziner (Mazella et al. 2010). Imidlertid viser resultaterne, at PRC skal kalibreres og valideres for de enkelte stoffer, der skal analyseres for. Da fastlæggelse af det passerende vandvolumen er veldokumenteret vha. silikone membranerne (Smedes et al. 2007), kan man sandsynligvis undgå megen metodeudvikling ved at anvende vandmængder beregnet på basis af PRC for silikonemembraner, når disse er placeret i den samme holder som POCIS-membranerne.

Ved traditionelle vandanalyser ligger detektionsgrænsen for en række af de aktuelle stoffer, fx. pesticider, på 10 ng/l. I forbindelse med de nationale overvågningsprogrammer (NOVA 1998-2003 og NOVANA 2004-2009) er der foretaget analyser på et meget stort antal vandprøver fra udvalgte danske vandløb (Tabel 5.7). For en række pesticider blev der herved kun fundet værdier over detektionsgrænsen i op til 10 % af de udtagne prøver, for et

enkelt stof dog op til 22 % af disse. Vores analyser tyder på, at det er muligt at måle med en væsentlig lavere detektionsgrænse ved anvendelse af passive opsamlere. Dette skyldes bl.a., at der for de passive opsamlere ligger en betydelig større vandmængde til grund for analyserne (i dette projekt mellem 10-40 liter), end hvad der har været tilfældet i overvågningsprogrammet. Endvidere er der for en række af stofferne langt mindre matriceeffekt og lav spredning på dobbeltbestemmelserne i forhold til almindelige vandprøver, hvilket yderligere kan reducere detektionsgrænserne. De lave detektionsgrænser betød, at alle stofgrupper blev fundet på alle lokaliteterne. De fundne værdier i prøverne fra NOVA og NOVANA er imidlertid langt højere, end hvad der fundet ved vores undersøgelse. Dette skyldes formodentlig, at der ved brug af de passive opsamlere - som nævnt i kapitel 1 - kun kan beregnes vægtede gennemsnit for en given periode og ikke forhøjede øjebliksværdier. Sådanne optræder for en række pesticider fx i forbindelse med store afstrømninger, hvorved der udvaskes relativt store mængder pesticid fra dyrkede marker (fx. Styzcen et al. 2003).

Tabel 5.7. Fund af stoffer i danske vandløb, ng/l. Data fra målinger fra NOVA og NOVANA, fra perioden 1998-2008 er sammenlignet med fundværdier i dette projekt. * BEMÆRK at median og middelværdier kun er beregnet for værdier over detektionsgrænsen (typisk 10 ng/l).

Stof	Antal målinger over detektionsgrænsen	Fund%	Max	Median*	Middel*	Antal målinger	Fundværdier i dette projekt
Atrazin	61	6	330	15	36	1083	0,1-0,8
Diuron	241	22	316	26	53	1082	0,19-10,1
Simazin	161	15	2500	20	70	1083	0,12-1,74
Bromoxynil	44	5	2880	26	185	901	0,01-0,31
Carbofuran	0	0				901	0,02
Dimethoat	19	2	206	51	57	902	0,01-0,09
Pendimethalin	71	8	580	20	42	903	Ikke fundet
Ioxynil	35	4	2300	25	119	901	0,08-0,35
Trifluralin	4	0	690	110	250	887	ikke analyseret
Propiconazol	54	6	1400	22	74	901	0,22-2,15
Malathion	0	0				232	0,05-0,83
Nonylphenoler	5	11	120	60	78	44	Ikke analyseret

For udvalgte af de målte stoffer eksisterer der EQS-værdier i ferskvand. EQS (Environmental Quality Standard eller på dansk: miljøkvalitetskrav) er den koncentration af et bestemt forurenende stof, som ikke må overskrides af hensyn til menneskers sundhed og miljøet (EU 2013). Dvs. EQS-værdier anvendes bl.a. til vurdering af god økologisk tilstand i vandmiljøet (Miljøministeriets Bekendtgørelse nr. 1022 af den 25/08/2010) (Tabel 5.8). EQS værdierne er fastsat som årlige gennemsnitskoncentrationer, og da samplerne kun har været udsat i tre uger, kan man kun vejledende sammenligne værdierne.

Tabel 5.8. EQS-værdier i ng/l sammenlignet med fundværdier i dette projekt

stofnavn	EQS i ferskvand (ng/l)	Fundværdier (ng/l)
Atrazin	600	0,1-0,8
Simazine	1000	0,21-1,74
Diuron	200	0,19-15,0
Tributyltin	0,2	0,002-0,251
Nonylphenol	300	nd
Bisphenol A	100	0,09-8,81
Pentachlorphenol	400	0,23
17beta-østradiol	0,1	0,32

I nærværende undersøgelse overskred kun to stoffer EQS-værdierne, hhv. tributyltin i Silkeborg nedstrøms (Silkeborg Langsø) og 17β -østradiol i Ringsted nedstrøms (Høm Lilleå), se også Tabel 5.2-5.6. Overskridelserne er dog forholdsvis små og medtages måleusikkerheden samt det faktum at det ikke er årlige gennemsnit er det sandsynligt, at der ikke er tale om reelle overskridelser. For begge stoffer er EQS-værdierne meget lave fordi de har meget kraftige hormonforstyrrende effekter sammenlignet med de øvrige stoffer. Der blev fundet 17β -østradiol i andre prøver, men disse lå under detektionsgrænsen. Man skal i øvrigt være opmærksom på, at brugen af passive prøvetagere, som nævnt, afspejler en gennemsnitskoncentration over en længere periode, og det kan ikke udelukkes, at koncentrationerne til visse tidspunkter har været væsentlig højere i løbet af perioden.

5.3 Effektmålinger ved *in vitro* bio-assays

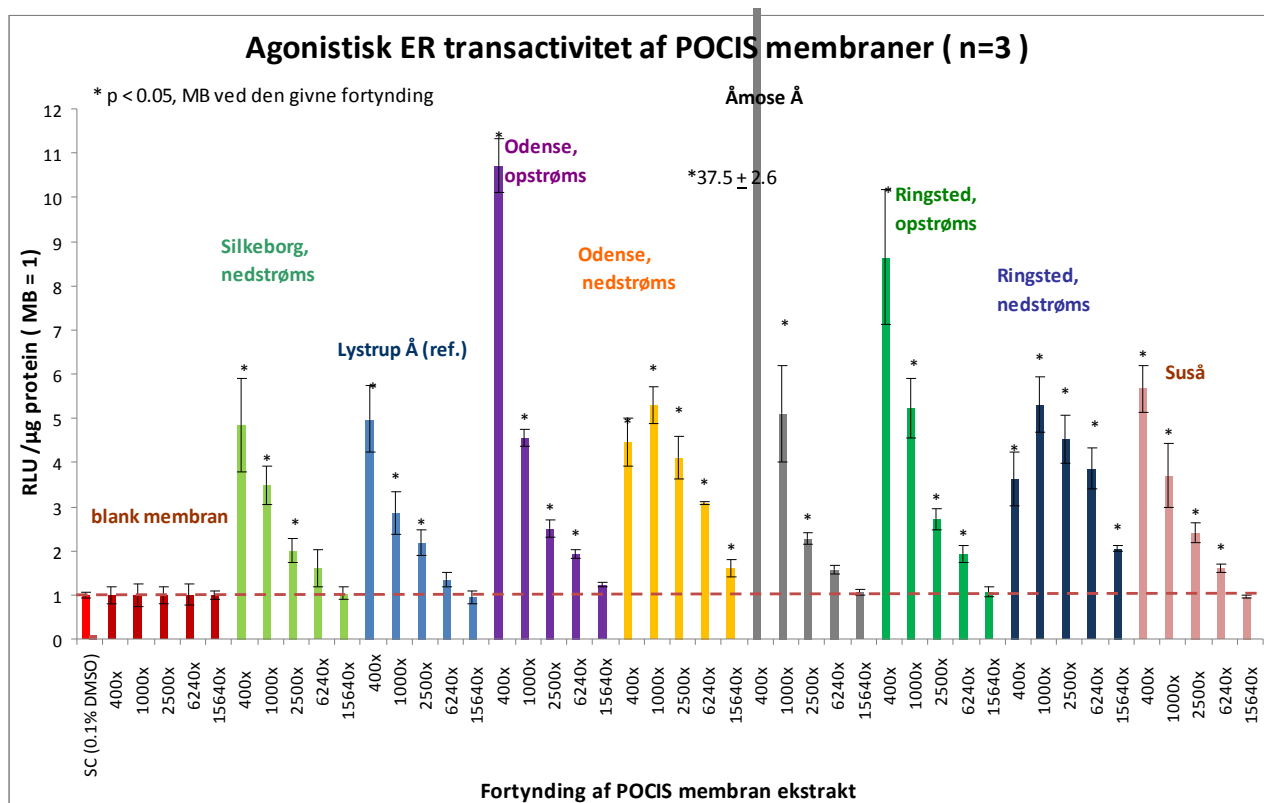
Den samlede cocktail af stoffer fra POCIS-membraner (uden referencestoffer) blev analyseret for effekter på funktionen af ER, AR og AhR (AhR aktivitet ofte betegnet som dioxin-lignende aktivitet).

5.3.1 Østrogenaktivitet (ER)

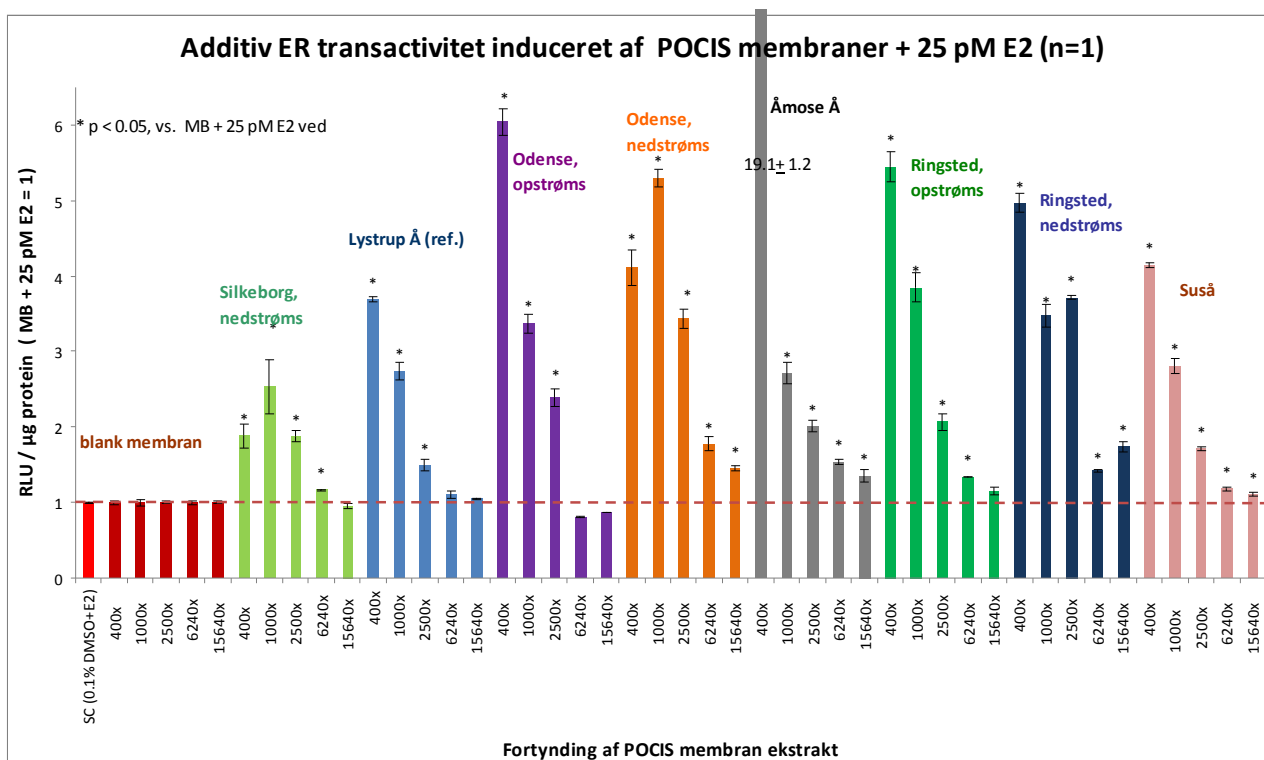
Alle membranekstrakter aktiverede ER-aktiviteten (Figur 5.2). Aktiviteten var signifikant højere nedstrøms for Odense og Ringsted Renseanlæg end opstrøms renseanlæggene. Tilsvarende var aktiviteten lavere for Lystrup Å, Silkeborg nedstrøms og Suså ved en fortynding af 1000-15.640 gange. Den højeste fortynding (15640x) svarer til mellem 3 og 11 gange højere koncentrationer i ekstrakterne i forhold til de vandkoncentrationer, der blev bestemt i vandløbene. Resultaterne tyder på, at der var højere mængde af østrogenaktiverende stoffer (ER agonister) til stede i det udledte spildevand fra Odense og Ringsted Renseanlæg. Imidlertid antyder den relativt høje aktivitet i Åmose Å, at der også kan være andre kilder end spildevand. Der foregår dog spildevandsudledninger også til dette vandløb, men relativt langt opstrøms for undersøgelseslokaliteten.

Ved Odense og Ringsted nedstrøms var aktiviteten lavere ved den laveste fortynding (400x) i forhold til den efterfølgende fortynding (Figur 5.2). Dette betyder, at der er stoffer til stede, som hæmmer aktiviteten ved den laveste fortynding, og hvis effekt kan fortyndes væk. Således forsvinder hæmningen ved yderligere fortynding, og man kan fastlægge østrogenaktiviteten ud fra dosis-responskurven for disse. Det tilsvarende ses ikke ved de respektive opstrøms lokaliteter, hvilket kunne tyde på, at østrogenagonister dominerer i disse prøver, hvorimod østrogenhæmmende stoffer (ER antagonist) dominerer i det udledte spildevand.

Ekstrakter fra alle lokaliteter havde også evne til at forstærke østrogenaktiviteten (additiv effekt), når ekstrakterne blev analyseret sammen med det naturlige østrogen (17β -østradiol) i fysiologisk relevant koncentration (Figur 5.3) for at vurdere hvordan miljøfaktorer kan påvirke funktionen af fysiologisk naturlige hormoner. Det betyder, at effekterne ligeledes var målbare ved tilstedeværelse af naturlige hormoner.



Figur 5.2. Bestemmelse af østrogenaktiviteten i POCIS-membranerne. Fortyndingsrække fra 400x til 15640x. SC: solvent kontrol (0,1% DMSO). MB: Membran Blind. Den stiplede linje repræsenterer referencelinjen, hvor MB = 1 ved den givne fortynding. Data er præsenteret som middel RLU(relative luciferase enheder) / µg protein ± SD af 3 uafhængige forsøg (udført ved trippelbestemmelser) og udtrykt i forhold til MB ved den givne fortynding. Lystrup Å er en referencelokalitet.

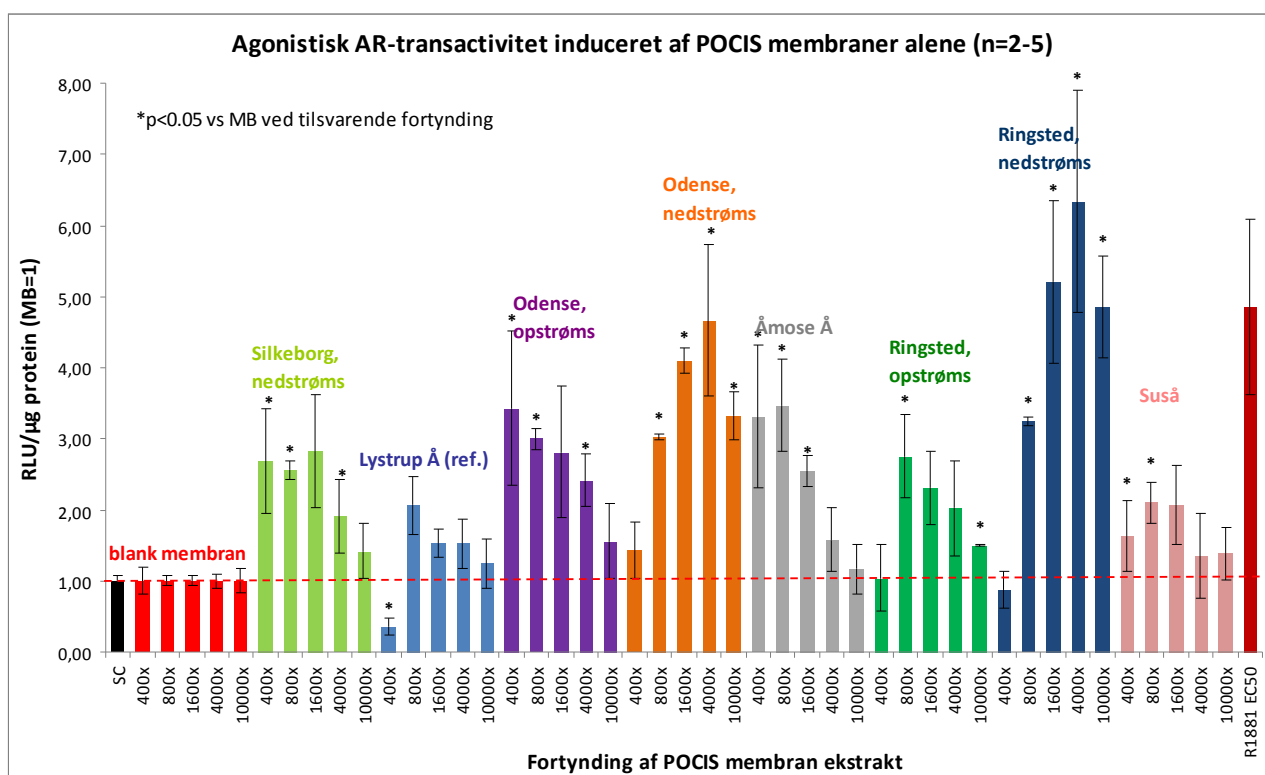


Figur 5.3. Bestemmelse af den additive østrogenaktivitet i POCIS-membranerne i forhold til 17β-østradiol. Fortyndingsrække fra 400x til 15640x. SC: solvent kontrol (0,1% DMSO + 25 pM E2). MB: Membran Blind. E2: 17β-østradiol. Den stiplede linje repræsenterer referencelinjen, hvor MB + 25 pM E2 = 1 ved den givne fortynding. Data er præsenteret som middel RLU(relative luciferase enheder) / µg protein ± SD af triplikat i et uafhængigt forsøg og udtrykt i forhold til MB + 25 pM E2 ved den givne fortynding. Lystrup Å er en referencelokalitet.

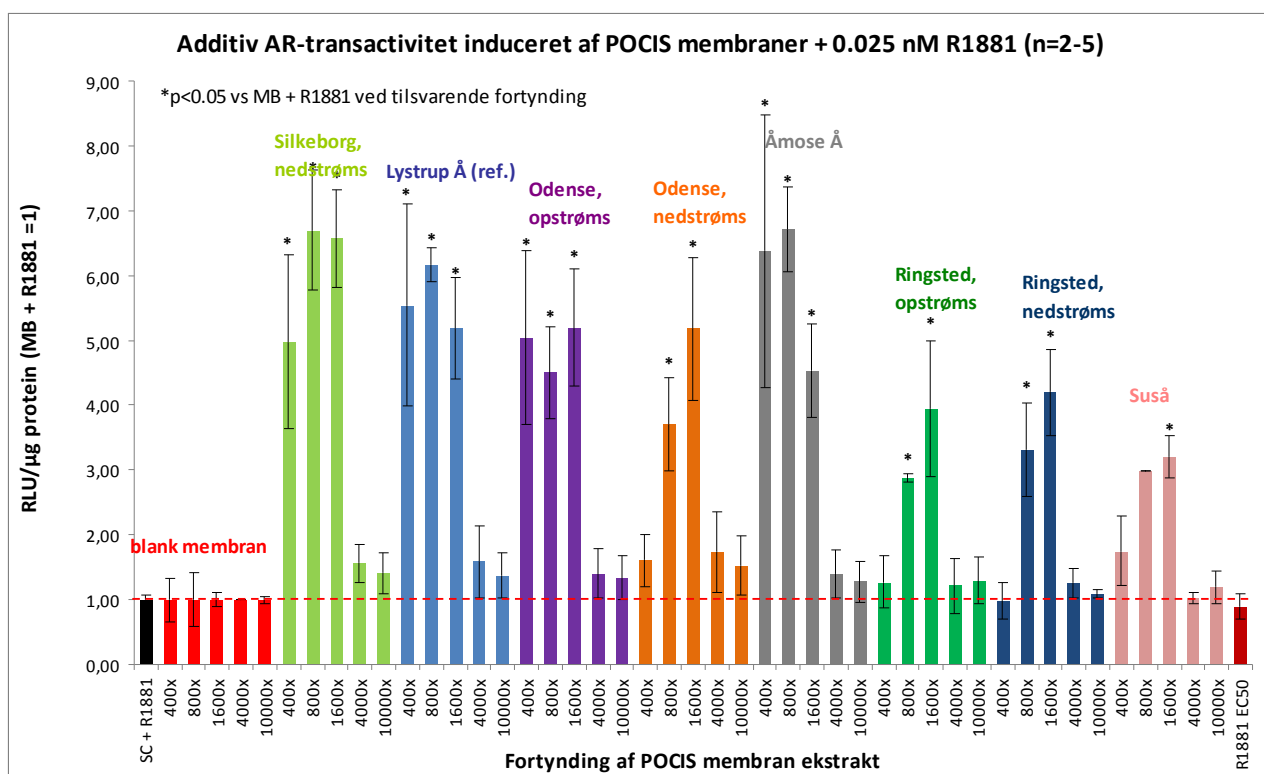
5.3.2 Androgenaktivitet (AR)

Ekstrakter fra alle lokaliteter, undtaget Lystrup Å, aktiverede signifikant androgenreceptoren (Figur 5.4). De højeste androgene aktiviteter ved de høje fortyndinger (4000-10000x) blev fundet ved Odense og Ringsted nedstrøms, men der var ikke statistisk signifikante forskelle i forhold til opstrøms herfor (Figur 5.4). Som for ER sås der også en hæmning af AR (dvs. responset var lavere ved de laveste fortyndinger) i Lystrup Å, Odense nedstrøms, Ringsted opstrøms og nedstrøms, hvilket indikerer tilstedeværelse af AR-hæmmende stoffer.

For de fleste lokaliteter blev der observeret en additiv effekt også for AR-aktiviteten (som for ER-aktiviteten), når membran ekstrakterne blev testet sammen med det syntetiske androgen R1881 (Figur 5.5). Det vil sige cocktail blandingen af stoffer fra membranerne kan forstærke den androgene effekt ved tilstedeværelse af naturlige hormoner, idet det syntetiske androgen R1881 har en tilsvarende effekt som de naturlige androgener.



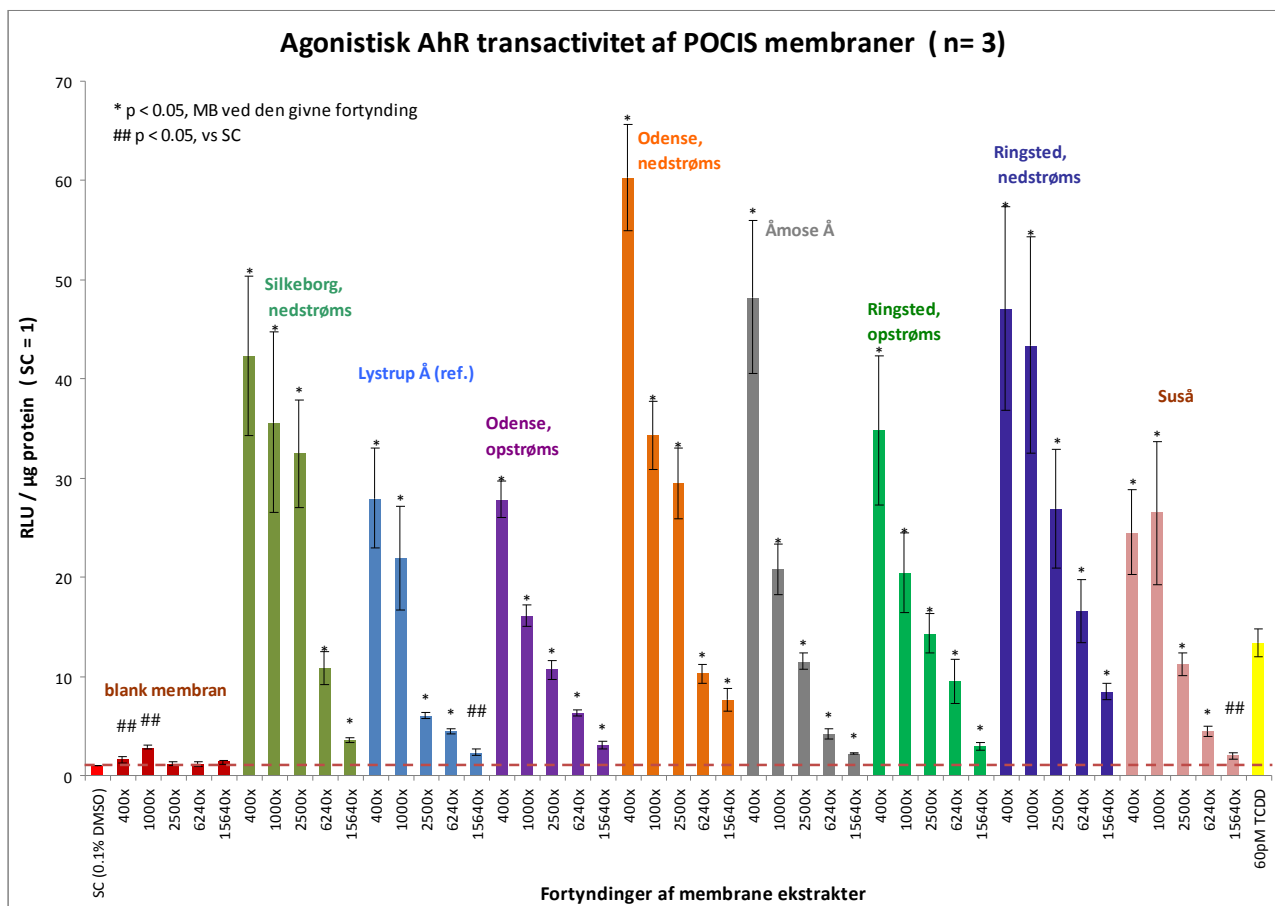
Figur 5.4. Bestemmelse af androgenaktiviteten i POCIS-membranerne. Fortyndingsrække fra 400x til 10.000x. SC: solvent kontrol (0,1% DMSO). MB: Membran Blind. Den stiplede linje repræsenterer referencelinjen, hvor MB = 1 ved den givne fortynding. Data er præsenteret som middel RLU (relative luciferase enheder) / μg protein ± SD af 2-5 uafhængige forsøg (triplikat) og udtrykt i forhold til MB ved den givne fortynding. Lystrup Å er en referencelokalitet.



Figur 5.5. Bestemmelse af den additive androgenaktivitet i POCIS-membranerne i forhold til det syntetiske androgen (R1881). Fortyndingsrække fra 400x til 10.000x. SC: solvent kontrol (0,1% DMSO + 0.025 nM R1881). MB: Membran Blind. Den stiplede linje repræsenterer referencelinjen hvor MB + 0.025 nM R1881 = 1 ved den givne fortynding. Data er præsenteret som middel RLU(relative luciferase enheder) / μg protein ± SD af 2-5 uafhængige forsøg (triplikat) og udtrykt i forhold til MB + 0.025 nM R1881 ved den givne fortynding. Lystrup Å er en referencelokalitet.

5.3.3 AhR-aktivitet

POCIS ekstrakterne fra alle lokaliteter aktiverede Ah-receptoren. Den højeste aktivering blev fundet i nedstrøms lokaliteterne v. Odense, Ringsted og Silkeborg (Figur 5.6). Imidlertid var kun Odense nedstrøms signifikant forskellig fra oplandslokaliteterne, Suså og Åmose Å, og reference lokaliteten, Lystrup Å, ud fra en statistisk vurdering. For de målte AhR aktiviteter sås ikke en tilsvarende hæmning af AhR af POCIS ekstrakterne som beskrevet ovenfor af ER og AR. Altså vurderes der at være primært dioxin-lignende AhR aktiverende stoffer til stede i vandløbene.



Figur 5.6. Bestemmelse af den AhR-aktivitet i POCIS-membranerne. Fortyndingsrække fra 400x til 15640x. SC: solvent kontrol (0,1% DMSO). MB: Membran Blind. Den stiplede linje repræsenterer referencelinjen hvor MB = 1 ved den givne fortynding. Data er præsenteret som middel RLU(relative luciferase enheder) / µg protein ± SD af 3uafhængige forsøg (triplikat) og udtrykt i forhold til MB ved den givne fortynding. Lystrup Å er en referencelokalitet. 60pM TCDD svarer til E50 = 50% maksimal effekt af TCDD.

5.3.4 Bio-ækvivalenter

For at kunne sammenligne mønstret af ER-, AR-, og AhR-aktiviteter mellem de enkelte lokaliteter blev de målte receptoraktiviteter for membranekstrakterne omregnet til bio-ækvivalenter i forhold til de anvendte, potente receptorligander:

- ER-EEQ: 17β-østradiol (E2) /membran
- AR-AEQ: R1881 (androgen)/membran
- AhR-TEQ: TCDD (dioxin)/membran

Ækvivalenterne blev udregnet som både pmol og ng pr membran (Tabel 5.9).

Membraneekstrakterne fra Odense nedstrøms og Ringsted nedstrøms havde et højere niveau af stoffer, der aktiverer ER, AR og AhR end opstrøms prøver. Der kan derfor konkluderes, at der frigives hormonforstyrrende stoffer via det tilledte spildevand. Endvidere viser resultaterne i tabel 5.9, at også vandløb, som ikke umiddelbart burde være særligt belastede af spildevand, indeholdt hormonforstyrrende stoffer i koncentrationer, som var i stand til at aktivere alle tre testede receptorer.

Tabel 5.9. Bio-ækvivalenter: ER-EEQ, AR-AEQ og AhR-TEQ (beregnet på basis af *in vitro* ER-, AR-, AhR-aktiviteter for POCIS-membran ekstrakterne). nc: ikke beregnede, da AR-aktivitet af membranen var lav og nåede aldrig niveauet for R1881-EC25

Lokalitet	Silkeborg nedstrøms	Lystrup Å	Odense opstrøms	Odense nedstrøms	Åmose Å	Ringsted opstrøms	Ringsted nedstrøms	Suså
ER-EEQ (ng E2/membran)	0,55	0,41	1,58	5,24	0,55	1,08	18,9	0,71
ER-EEQ (ng E2/l)	0,037	0,014	0,144	0,128	0,050	0,045	0,788	0,037
AR-AEQ (ng R1881/membran)	nc	nc	113	>1540	154	nc	>1540	nc
AR-AEQ (ng R1881/l)	nc	nc	10,3	>37,6	14,0	nc	>64,2	nc
AhR-TEQ (ng TCDD/membran)	16,3	4,48	3,8	21	4,31	7	21,2	6,62
AhR-TEQ (ng TCDD/l)	1,087	0,154	0,345	0,512	0,392	0,292	0,883	0,348

Eksempler på beregningen af Bio-ækvivalenter (Kusk et al. 2010): Dosis-respons kurver for den ER medierede luciferase aktivitet af ER liganden E2 og POCIS-membran ekstrakterne blev lavet ved brug af tre-parameter-sigmoid-Hill-ligningen. Den koncentration, hvor 50 % af den maksimale E2 effekt er opnået (E2-EC50), blev estimeret. Herefter blev volumen af POCIS-membran ekstrakterne (EV50E2), der giver samme effekt som E2-EC50, estimeret. Bio-EEQ af POCIS-membran ekstrakterne blev herefter beregnet som forholdet mellem E2-EC50 og EV50E2:

$$ER-EEQ(ng / membran) = \frac{E2-EC50(\frac{ng}{ml})}{EV50E2(\frac{membran}{ml})}$$

5.3.5 Aktiviteter af enkelte pesticider samt organotinforbindelser

Ved anvendelse af samme *in vitro* cellekultur-metoder som for ekstrakterne fra de passive POCIS-prøveopsamlere blev desuden ni pesticider samt TBT, DBT og MBT testet som enkeltstoffer i de tre receptor-respons bio-assays. De andre kemiske stoffer målt i membranerne er testet i tidligere undersøgelser (Andersen et al. 2002, Bonefeld-Jørgensen et al. 2007; Krüger et al. 2008; Ghisari & Bonefeld-Jørgensen, 2009) eller er endnu ikke publiceret.

I tabellerne (Tabel 5.10-5.12) er angivet følgende: LOEC: den laveste testede koncentration, som har en signifikant effekt ($p < 0,05$). MOEC: den lavest testede koncentration, som har en maksimal effekt ($p < 0,05$). % af SC: Relative effekt i forhold til solventkontrol. Farvekoden indikerer signifikante værdier ($p < 0,05$); Grøn for øget agonistisk receptoraktivitet sammenlignet med referencen, og rød for nedsat receptoraktivitet (antagonistisk) sammenlignet med referencen. Stofferne blev kun screenet en enkelt gang ved 10^{-4} , 10^{-6} og 10^{-8} M undtagen simazin, der er testet i koncentrationerne 5×10^{-5} , 5×10^{-7} og 5×10^{-9} M for ER-aktivitet. Resultaterne for malathion, prochloraz og propiconazol er fra tidligere undersøgelser eller andre igangværende projekter.

Tabel 5.10. ER-aktivitet testet på enkeltstoffer (n=1). NE: Ingen effekt. ***data fra et andet projekt. #: rød er nedsat receptoraktivitet (antagonistisk) og grøn er øget receptoraktivitet (agonistisk) sammenlignet med referencen.

Stof Navn	Uden tilsat E2		Med tilsat E2 E2-EC50= 25 pM	
	LOEC/MOEC (M)	MOEC effekt (% of SC)	LOEC/MOEC (M)	% af E2-EC50 ved MOEC
pesticider				
Atrazin	10 ⁻⁴ / -	151	10 ⁻⁸ / 10 ⁻⁴	144
Carbofuran	10 ⁻⁴ / -	129	10 ⁻⁸ / 10 ⁻⁴	144
Dimethoat	10 ⁻⁴ / -	114	10 ⁻⁸ / 10 ⁻⁴	127
Linuron	10 ⁻⁴ / -	143	10 ⁻⁸ / 10 ⁻⁴	163
Malathion ***	10 ⁻⁸ / 10 ⁻⁵	132	NE	
Prochloraz ***	NE		10 ⁻⁶ / 2.5x10 ⁻⁵	51
Propiconazol***	10 ⁻⁸ / 5x10 ⁻⁵	146	10 ⁻⁹ / 10 ⁻⁵	117
Simazin	5x10 ⁻⁵ / -	113	5x10 ⁻⁵ / -	114
Tebuconazol	10 ⁻⁸ / 10 ⁻⁴	124	NE	
Bromoxynil	10 ⁻⁸ / 10 ⁻⁶	126	10 ⁻⁸ / 10 ⁻⁴	60
Ioxynil	10 ⁻⁴ / -	38	10 ⁻⁴ / -	69.7
Diuron	10 ⁻⁸ / 10 ⁻⁶	117	10 ⁻⁴ / -	89.3
organotin				
Tributyltin (TBT) chlorid	10 ⁻⁶ / -	64.7	10 ⁻⁶ / 10 ⁻⁴	142
Dibutyltin (DBT) dichlorid	10 ⁻⁶ / -	24.8	10 ⁻⁶ / 10 ⁻⁸ #	24.5/115#
Monobutyltin (MBT) trichlorid	10 ⁻⁶ / -	84.2	10 ⁻⁴ / -	144

De fleste pesticider havde en aktiverende effekt på ER, også i kombination med det naturligt forekommende østrogen (17β-estradiol, E2), dvs. en additiv effekt (Tabel 5.10). Dog viste bromoxynil, ioxynil samt diuron også hæmmende (antagonistiske) effekter, når de blev testet med det naturlige E2 hormon. Prochloraz, testet i et tidligere studie (Andersen et al 2002) viste ingen østrogen effekt alene men havde en antagonistisk ER effekt sammen med E2. Organotin virkede ligeledes hæmmende. #: grønne og røde tal indikerer potentieret og antagoniseret E2 induceret ER aktivitet.

De stoffer, som udløste en androgen aktivitet, var i næsten samtlige tilfælde hæmmende (Tabel 5.11). Denne antagonistiske virkning blev dog ikke fundet for simazin. Specielt TBT og DBT havde en meget kraftig toksisk effekt på cellerne, også ved de højeste fortyndinger. Tidligere er stofferne malathion (upubliceret) og prochloraz (Andersen et al, 2002) påvist at have antagonistiske effekter, hvorimod stofferne dimethoat (Andersen et al, 2002) og propiconazol (upubliceret) ikke tidligere er vist at have effekt på androgen aktivitet.

Tabel 5.11. AR-aktivitet testet på enkeltstoffer (n=1). NE: Ingen effekt. ND: Ikke bestemt
***data fra et andet projekt.

Stof Navn	Uden tilsat R1881		Med tilsat R1881 (R1881-E50=0,25 nM)	
	LOEC/MOEC (M)	MOEC effekt (% af SC)	LOEC/MOEC (M)	% of 1881-EC50 ved MOEC
pesticider				
Atrazin	10 ⁻⁴ / -	68	10 ⁻⁴ / -	56
Carbofuran	NE		NE	
Dimethoat***	ND		ND	
Linuron	10 ⁻⁴ / -	21	10 ⁻⁴ / 10 ⁻⁶	1,7 - 33
Malathion	ND		ND	
Prochloraz***	ND		ND	
Propiconazol	ND		ND	
Simazin	NE		10 ⁻⁶ / -	118
Tebuconazol	10 ⁻⁴ / -	20	10 ⁻⁴ / 10 ⁻⁶	1,4 - 48
Bromoxynil	10 ⁻⁴ / -	35	10 ⁻⁴ / -	41
Ioxynil	10 ⁻⁴ / -	4,8	10 ⁻⁴ / -	0,9
Diuron	NE		10 ⁻⁴ / -	26
organotin				
Tributyltin (TBT) chlorid	død		død	
Dibutyltin (DBT) dichlorid	10 ⁻⁸ / -	11	10 ⁻⁸ / -	6
Monobutyltin (MBT) trichlorid	10 ⁻⁴ / -	24	10 ⁻⁴ / -	32

Tabel 5.12. AhR-aktivitet testet på enkeltstoffer (n=1). NE: Ingen effekt. ***data fra et andet projekt.

Stof Navn	Uden tilsat TCDD		Med tilsat TCDD (TCDD=EC50=60pM)	
	LOEC/MOEC (M)	MOEC effekt (% of SC)	LOEC/MOEC C (M)	% ved TCDD- EC ₅₀ ved MOEC
Pesticider				
Atrazin	10 ⁻⁴ / -	242	10 ⁻⁸ / 10 ⁻⁴	26
Carbofuran	10 ⁻⁴ / -	188	10 ⁻⁴ / -	125
Dimethoat	10 ⁻⁴ / -	161	10 ⁻⁸ / -	79
Linuron	10 ⁻⁶ / 10 ⁻⁴	1726	NE	
Malathion ***	10 ⁻⁸ / 10 ⁻⁶	78	10 ⁻⁸ / -	56
Prochloraz***	NE		NE	
Propiconazol***	10 ⁻⁴ / -	417	10 ⁻⁴ / -	22
Simazin	10 ⁻⁶ / -	74	10 ⁻⁸ / -	125
Tebuconazol	10 ⁻⁸ / 10 ⁻⁴	42	10 ⁻⁴ / -	30
Bromoxynil	10 ⁻⁸ / 10 ⁻⁴	70	10 ⁻⁴ / -	65
Ioxynil	10 ⁻⁸ / 10 ⁻⁴	34	10 ⁻⁴ / -	31
Diuron	10 ⁻⁶ / 10 ⁻⁴	1716	NE	
Organotin				
Tributyltin (TBT) chlorid	NE		10 ⁻⁸ / 10 ⁻⁶	56.7
Dibutyltin (DBT) dichlorid	NE		10 ⁻⁸ / 10 ⁻⁶	57.4
Monobutyltin (MBT) trichlorid	NE		10 ⁻⁴ / -	58.5

Ah receptoren blev påvirket af pesticider, men ikke af organotin (Tabel 5.12). Halvdelen af pesticiderne havde en aktiverende effekt, hvorimod de andre var hæmmede for receptor aktiviteten. Derimod, sammen med det potente dioxin, TCDD, virkede de fleste pesticider samt organotin, hæmmende (antagonistisk). Resultaterne dokumenterer, at andre stoffer end dioxiner kan påvirke AhR funktionen.

5.4 Effektmålinger på muslinger

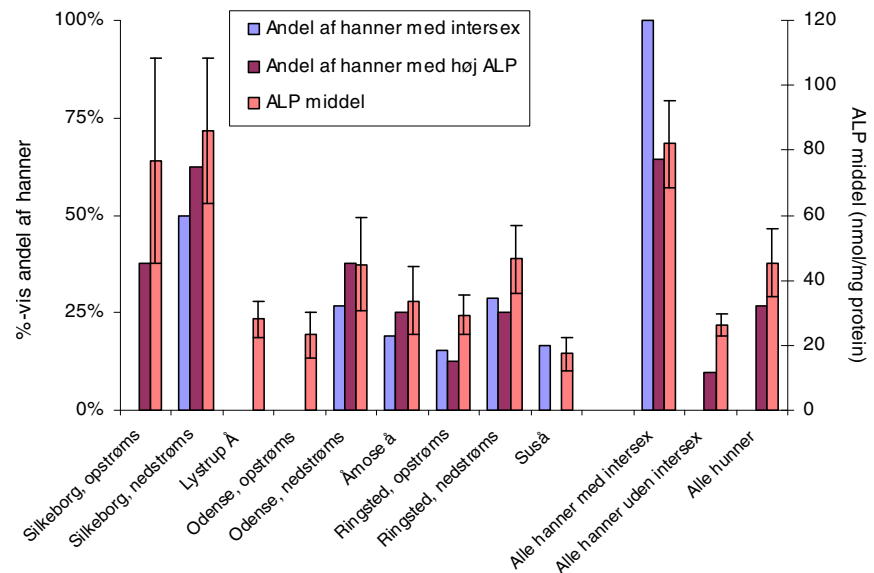
Blandt de i alt indsamlede 270 individer af *Unio tumidus* fra Thorsø, som blev eksponeret på de 9 undersøgelseslokaliteter, overlevede 96 % forsøgsperioden (tabel 5.13). Blandt disse overlevende var 40 % hanner og 60 % hunner, svarende til en kønsratio på 1:1,5. Kønsratio afveg derved signifikant (Chi2 test, $P < 0,05$) fra den 1:1 ratio, som er fundet ved andre undersøgelser (Aldridge 1999). Det er usikkert om den skæve kønsratio er reel for Thorsø, eller - hvis hanner og hunner ikke fordeler sig jævnt i søen - om der kan være tale om en effekt af, at dyrene blev indsamlet fra et meget begrænset område.

Undersøgelsen de transplanterede malermuslinger viser, at alkali-labilt phosphat (ALP) i hæmolymf (blodvæske) fra hanner er generelt højere, og at de derved udviser tegn på hormonforstyrrelser, nedstrøms for renseanlæg. ALP er en biomarkør for udvikling af vitellogenin-lignende (blomme-proteiner) i hanner, og indikerer derved om de har været udsat for en østrogenlignende påvirkning. Således var niveauet af ALP (angivet både som middelkoncentration og som andel af hanner med højt ALP-niveau på >60 nmol/mg protein) generelt højest nedstrøms for renseanlæg. For Silkeborg opstrøms blev der også fundet markant forhøjede ALP-niveauer (Tabel 5.13 og Figur 5.7), hvilket formodentlig skyldes den nære beliggenhed ved Silkeborg Marina, hvor der må formodes også at være forhøjede forureningsniveauer af en række forskellige miljøfarlige stoffer, se fx Strand et al. (2007).

Tabel 5.13. Undersøgelse af transplanterede malermuslinger. Tegn på hormonforstyrrelser er opgjort som hhv. andel af hanner med intersex, middelniveauet af ALP i hanner og andelen af hanner med høje ALP-niveauer (dvs. >60 nmol/mg protein). Intersex er undersøgt i samtlige hanner, hvorimod ALP er analyseret i 8 hanner fra hver station

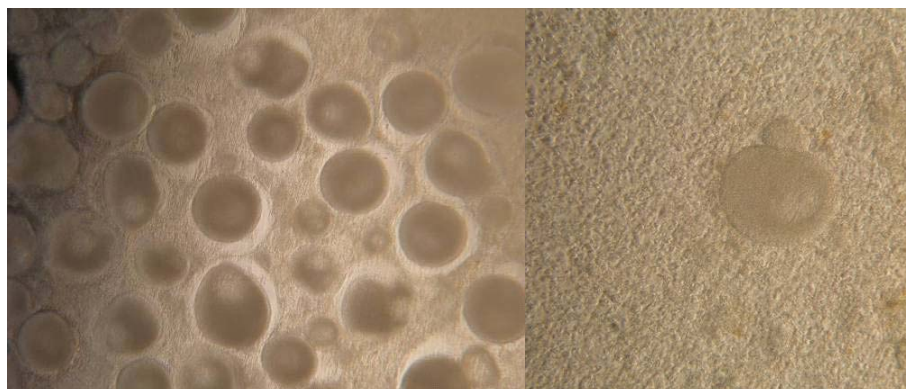
Station	Antal undersøgt	Døde	Hunner	Hanner	Hanner med intersex	ALP i hanner (nmol/mg protein), middel + SD	%-vis andel af hanner med høj ALP
1. Silkeborg, opstrøms	29	0,0%	58,6%	41,4%	ej undersøgt	$76,7 \pm 89,1$	37,5%
2. Silkeborg, nedstrøms	28	3,4%	64,3%	35,7%	50,0%	$85,9 \pm 63,5$	62,5%
3. Lystrup Å (reference)	27	3,3%	70,4%	29,6%	ej undersøgt	$28,0 \pm 13,4$	0,0%
4. Odense, opstrøms	26	13,3%	57,7%	42,3%	ej undersøgt	$23,2 \pm 19,7$	0,0%
5. Odense, nedstrøms	29	3,3%	48,3%	51,7%	26,7%	$44,8 \pm 40,5$	37,5%
6. Åmose Å	30	0,0%	70,0%	30,0%	19,0%	$33,8 \pm 29,3$	25,0%
7. Ringsted, opstrøms	29	3,3%	55,2%	44,8%	15,4%	$29,4 \pm 17,6$	12,5%
8. Ringsted, nedstrøms	30	0,0%	53,3%	46,7%	28,6%	$46,5 \pm 29,4$	25,0%
9. Suså	30	0,0%	60,0%	40,0%	16,7%	$17,3 \pm 14,6$	0,0%

Baseret på hele datamaterialet viste ALP-målingerne, at andelen af muslinger med forhøjede ALP-værdier >60 nmol/mg protein var signifikant højere i muslingerne placeret nedstrøms for renseanlæg sammenlignet med muslingerne opstrøms herfor eller ved de øvrige lokaliteter (2x2 Contingency table, $p < 0.01$) (Figur 5.7).



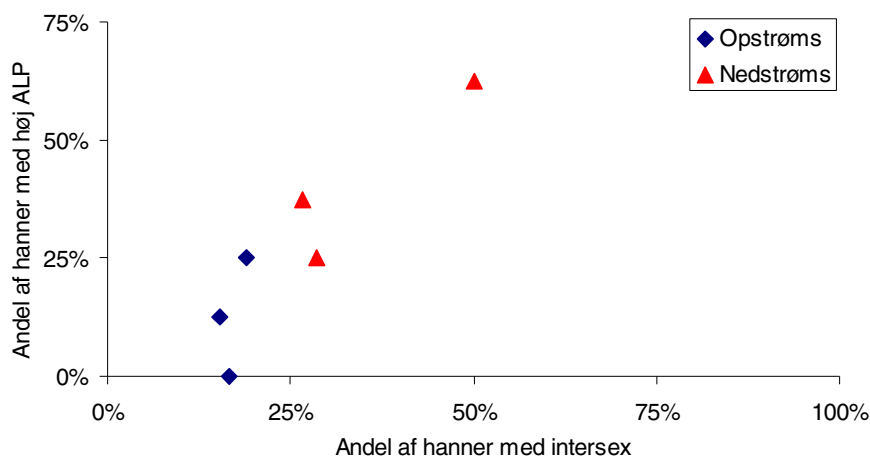
Figur 5.7. Sammenligning af hhv. %-vis andel af hanner med intersex og med høj ALP-niveauer (dvs. >60 nmol/mg protein) er angivet på primær akse og koncentrationsniveau af ALP (middel $\pm$ SE) i hæmolymfævæske fra transplanterede malermuslinger. Desuden angives også ALP-niveauer for hhv. alle analyserede hanner med og uden intersex samt for hunner.

Dette understøttes af, at der i forbindelse med kønsbestemmelsen af muslingerne blev konstateret en overraskende høj andel af hanner med tegn på intersex i form af æg-lignende celler i gonadevæskens, især nedstrøms for renseanlæg (Figur 5.7). Tegn på intersex kom til udtryk i form af udvikling af enkeltliggende æg i testes (Figur 5.8). Dette var ikke forventet, da denne form for intersex tidligere kun er dokumenteret for marine muslinger og ikke for ferskvandsmuslinger. Af denne grund blev – og fordi forholdet først blev opdaget undervejs i analyseprocessen – tegnene på intersex i hanner kun undersøgt for en del af lokaliteternes vedkommende (Tabel 5.13, Figur 5.7). Resultaterne understøtter ALP-målingerne, idet de også indikerer, at andelen af hanner, der udviser tegn på intersex og dermed hormonforstyrrelser, er højere nedstrøms end opstrøms for renseanlæggene (Figur 5.9). Dette kan dog ikke betragtes som statistisk signifikant, eftersom antallet af undersøgte hanner og lokaliteter var begrænsede. På den anden side var andelen af hanner med høje ALP-niveauer også signifikant højere i alle hanner samlet set på de lokaliteter, hvor der var fundet tegn på intersex, sammenlignet med de normale hanner (2x2 Contingency table, $p < 0.01$) (Figur 5.7). Dette underbygger sammenhængen mellem forhøjede ALP-niveauer og forekomsten af intersex. ALP-niveauet var overraskende nok også højere i hanner med intersex end i normale hunner. Det skal dog i denne sammenhæng også bemærkes, at den anvendte metode til karakterisering af forekomst af intersex i form af æg-lignende celler i gonadevæskens hos hanner bør betragtes som en screeningsmetode, hvor identifikationen af de æg-lignende celler er behæftet med visse usikkerheder.



Figur 5.8. Mikroskopibilleder af udvikling af æg i ovarievæske fra normal hunmusling (tv) og en enkeltliggende æg-lignende celle omgivet af spermatozoer i testis fra hanmusling som tegn med intersex (th).

Der blev efterfølgende indsamlet yderligere muslinger fra Thorsø samt fra Silkeborg Langsø (samme sted, hvor der blev eksponeret muslinger fra Thorsø). Resultaterne viste, at der i Thorsø var 12,5 % hanner med tegn på intersex, mens den tilsvarende andel i Silkeborg Langsø var 50 %. Sidstnævnte andel svarer nøje til den, som blev fundet for de eksponerede muslinger; ALP blev dog ikke målt i muslingerne ved den supplerende indsamling. Thorsø blev som bekendt udvalgt på baggrund af en stor population af muslinger, samt fordi den ikke burde være direkte belastet med spildevand eller landbrugsdrift (søen er klarvandet med et lavt fosfor indhold). Resultaterne fra Thorsø tyder enten på, at søen er mere belastet end antaget, eller der kan forekomme et vist baggrundsniveau af intersex hos hanner for disse muslinger. En nærmere undersøgelse af dette ligger dog uden for projektets rammer.



Figur 5.9. Andelen af hanner med intersex er ligesom andelen af hanner med høje ALP-niveauer på >60nmol/mg protein højere nedstrøms end opstrøms for rensningsanlæg.

En række udenlandske undersøgelser har tidligere vist, at spildevand fra rensesanlæg kan øge niveauet af vitellogenin (Vn)-lignende proteiner målt som ALP i ferskvandsmuslinger (de Lafontaine 2000, Quinn et al. 2004; 2006, Gagne et al. 2006). Derimod er der ikke tidligere gjort tilsvarende fund af intersex i hanner hos beslægtede ferskvandsmuslinger, hvor man primært har fundet tegn på intersex hos hunner (Grande et al. 2001, Cek & Sereflisan 2006). Undersøgelserne er dog ikke direkte sammenlignelige pga. forskellige

arter og metoder. Til gengæld har andre nyere udenlandske undersøgelser fundet tegn på, at intersex kan forekomme i hanner hos marine muslinger, og der peges specifikt på, at årsagen skal søges i påvirkning fra hormonforstyrrende stoffer (Chesman & Langston 2006, Langston et al. 2007).

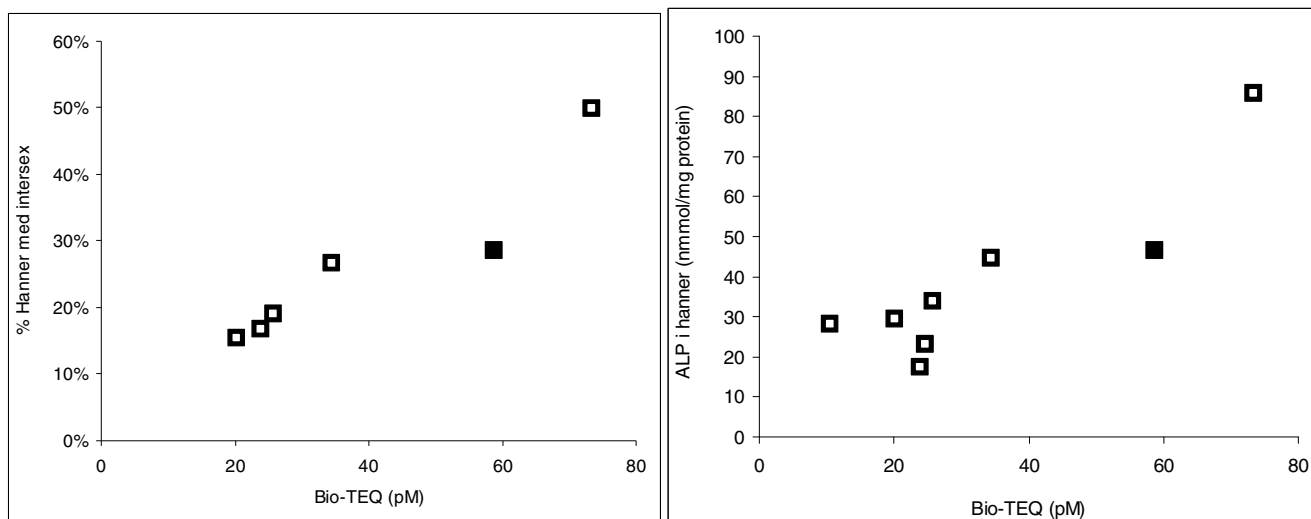
Intersex hos hanner er ligeledes påvist hos fisk, bla. i 5-26 % af hanner af skalle (*Rutilus rutilus*) fra danske vandløb (Bjerregaard et al. 2006a). Ligeledes er intersex fundet hos ålekvabber i de indre danske farvande, hvor 8-36 % af hannerne havde udviklet intersex i form af forstadier til æg i deres testikler (Strand et al. 2009). Dette tyder på at østrogenlignende effekter i fisk også er vidt udbredte i det danske vandmiljø.

Undersøgelsen af ALP i muslinger viser, at hannerne udviser tegn på hormonforstyrrelser nedstrøms for renseanlæg, hvilket korrelerer med det høje antal tilfælde, hvor der blev fundet mulige tegn på intersex hos hanner. Dette er ikke tidligere blevet dokumenteret for ferskvandsmuslinger i Danmark.

5.5 Sammenhæng mellem *in vivo* og *in vitro* biomarkører

Der blev fundet en signifikant korrelation ($R=0,84$, $p<0,05$) mellem intersex hos hanner af malermuslinger og koncentrationen af stoffer, som påvirker Ah-receptoren i *in vitro* bioassays målt som AhR-TEQ (Figur 5.10a). Hvis data fra Ringsted nedstrøms renseanlægget udelukkes, forbedres korrelationen nævneværdigt ($R=0,99$) (Figur 5.10a).

På samme måde var der en signifikant korrelation mellem ALP i muslingehanner og AhR-TEQ ($R=0,75$, $p<0,05$) (Figur 5.10b). Udelukkes samme lokalitet som ovenfor fås en højere korrelation ($R=0,85$).



Figur 5.10 Sammenhæng mellem *in vivo* og *in vitro* effekter. a) Intersex og AhR-TEQ, b) ALP i hanner og AhR-TEQ. Sammenhængene er statistisk signifikante, hvis Ringsted nedstrøms (sort firkant) ikke medtages.

AhR-TEQ er som nævnt et udtryk for koncentrationen af stoffer, som kan aktivere Ah-receptoren, og er målt som dioxinækvivalenter (sat i relation til det højpotente dioxin, TCDD). Hos hvirveldyr har receptoren betydning for produktionen af nedbrydningsenzym, der indgår i P450-systemet, men er også involveret i reguleringen af kønshormonerne. I muslinger (*Mya arenaria*) er der også identificeret Ah-receptorer, men disse har indtil videre ikke vist sig at fungere som receptorer for dioxin-lignende stoffer som fx TCDD (Butler 2001). I hvirvelløse dyr (fx *Mya arenaria*) er der identificeret små proteiner til sammenligning med hvirveldyr AhR (28-39 kDa versus 95-146

kDa), som specifikt kan binde dioxin-lignende stoffer men deres biologiske funktion kendes ikke (Brown et al. 1997). Det er ligeledes påvist, at dioxin-lignende stoffer påvirker gonadeudviklingen negativt hos muslinger som *Mya arenaria* (Cooper 2009). Dette betyder, at disse stoffer påvirker et hormon-signalsystem i muslinger. Der forekommer "vertebratlignende" hormoner hos muslinger, men selv om man har målt disse stoffer og påvist effekter på dem, ved man i dag intet om, hvordan reguleringen af disse hormoner foregår (Lafont 2007).

Selv om der ikke var andre signifikante korrelationer mellem *in vivo* og *in vitro* effekter, så kan østrogen- og androgenlignende stoffer stadig have betydning for muslingernes hormonomsætning og gonadeudvikling som understøttes af følgende opsummering af de fundne kemiske og biologiske *in vitro* og *in vivo* data:

De fleste af de testede enkelte pesticider (Tabel 5.10) og phenoler som BPA og 4-t-Oc-Ph inducerede *in vitro* ER-transaktivitet (Bonefeld-Jørgensen 2007, Ghisari & Bonefeld-Jørgensen, 2009). For Ringsted og Odense var sumkoncentrationerne af disse kemikalier højere nedstrøms end opstrøms renseanlæg samt også højere end Silkeborg nedstrøms (Tabel 5.2, Tabel 5.3 og Tabel 5.6). Desuden viste de kemiske målinger, at koncentrationer af østrogener også var højere nedstrøms end opstrøms (Tabel 5.6). For ER hæmmede stoffer som pesticiderne ioxynil (IOX) og prochloraz (PRO) samt organotin forbindelser var sumkoncentrationerne lavere nedstrøms end opstrøms for Odense men ikke for Ringsted (Tabel 5.2 Tabel 5.3 og Tabel 5.10). Data for kemiske målinger samt østrogenitet af enkelte kemikalier støtter de biologiske *in vitro* data målt som integreret netto ER transaktivitet af de blandinger af kemikalier, der blev ekstraheret fra POCIS-membraner (Tabel 5.9). Endvidere, *in vivo* østrogene effekter, målt ved ALP i muslinger og mulige tegn på intersex, blev også observeret på et højere niveau nedstrøms end opstrøms, hvor niveauet for Silkeborg var højere end for Ringsted og Odense nedstrøms målinger (Tabel 5.13). Altså blev der fundet højere østrogenitet nedstrøms renseanlæg både for de biologiske *in vitro* og *in vivo* analyser hvilket endvidere støttes af de kemiske målinger, hvor højere sumkoncentrationer af hormonforstyrrende stoffer blev fundet i nedstrøms prøver. Således mener vi, at den kemiske blanding ekstraheret fra POCIS-membranen, der afspejler de kemikalier som findes i vandløbet, bidrager til såvel det integrerede østrogene potentiale bestemt i mammale celle kulturer *in vitro* som den inducerede ALP og de mulige tegn på intersex i muslinger.

Vedrørende den observerede korrelation mellem AhR-TEQ og *in vivo* muslinge intersex, var der ikke forventet en positiv korrelation idet der for vertebrater er rapporteret antihormonelle effekter medieret via AhR (Matthews & Gustafsson, 2006, Kharat & Saatcioglu, 1996, Bonefeld-Jørgensen, 2010). Dog skal artsforskelle tages i betragtning (hvirvelløse (muslinger) versus hvirveldyr (mammale cellekulturer)). Om de identificerede små cytosoliske proteiner, som kan binde dioxinlignende forbindelser, og som er identificeret i muslinger (Brown et al. 1997), kan være involveret i den observerede positive sammenhæng mellem AhR-TEQ og intersex kræver dog yderligere undersøgelse.

Vores studie observerede de højeste østrogen- og androgenækvivalenter for Ringsted nedstrøms (Tabel 5.9), hvorimod AhR-TEQ var på samme høje niveau for Ringsted og Odense sammenlignet med Silkeborg nedstrøms. Yderligere undersøgelser er påkrævet for at vurdere årsagen til, at andelen af

hanner med intersex og ALP-niveauerne var lavere for Ringsted og Odense i sammenligning med Silkeborg nedstrøms (Figur 5.7).

5.6 Sammenhæng mellem *in vitro* og *in vivo* markører og stoffer i membranerne

Et af formålene med projektet var at undersøge om der kunne konstateres biologiske effekter, *in vivo* og *in vitro*, ved de vandkoncentrationer og stof-sammensætninger, som fandtes i de udvalgte vandløb. Der blev fundet en sammenhæng mellem de generelt forhøjede koncentrationer af hormonforstyrrende stoffer og biologiske effekter ved Ringsted og Odense nedstrøms (hhv. Odense Å og Høm Lilleå). En tilsyneladende undtagelse var Silkeborg nedstrøms (afløbet fra Silkeborg Langsø), hvor der også skulle være en betydende påvirkning i form af udledt spildevand fra Søholt renselanlæg. Bortset fra TBT blev der imidlertid kun fundet relativt lave stofkoncentrationer, uden tvivl fordi der er en meget stor fortynding via Gudenåens vand. Alligevel blev der her fundet lige så store (og endda større) biologiske effekter som ved de to oven nævnte lokaliteter. Imidlertid mangler målinger af stofkoncentrationerne fra Silkeborg opstrøms, hvilket komplicerer tolkningen af de biologiske data.

Det kunne have været interessant at koble stofkoncentrationer af enkeltstofferne med *in vivo* og *in vitro* effekterne ved hjælp af PCA analyse. Dette var imidlertid ikke statistisk muligt sandsynligvis på grund af for få data (lokaliteter) og for kompleks stofsammensætning.

Det er teoretisk muligt at sammenkoble koncentrationerne af de enkelte stoffer i membranerne med *in vitro*-receptoreffekt resultaterne for de forskellige lokaliteter på baggrund af de foreliggende data. Imidlertid vil det kræve, at man kender alle enkeltstofferne *in vitro* effekter ved de pågældende koncentrationer, hvilket ligger uden for dette projekts mål og rammer. Enkelte stoffer blev testet, dog kun en gang, da dette lå udenfor projektets rammer. Data for disse enkeltstoffer er derfor tentative og skal gentages, før de kan indgå i en egentlig analyse.

Tilsvarende kunne sammenhængen mellem *in vivo* effekter i muslinger og koncentrationerne af de målte stoffer også undersøges, men som for de hormonforstyrrende *in vitro*-receptoreffekter kræver det, at der kan beregnes toksicitetsækvivalenter for alle de enkelte stoffer, hvilket ville kræve en række effektforsøg på muslinger på enkeltstof niveau, hvilket igen er udenfor projektets mål og rammer.

Der blev detekteret hormonforstyrrende stoffer på alle lokaliteter om end for de fleste i lave koncentrationer. Der blev også fundet biologiske effekter for stort set alle lokaliteter, og i den forbindelse kan det naturligvis ikke udelukkes, at andre stoffer end de, som blev målt, kan have haft en betydning. Endvidere kan det være svært at vurdere om disse effekter har betydning i miljøet. I evaluering af de observerede bioeffekt data skal der tages med i betragtning, at de målte effekter er et resultat af eksponering til komplekse kemiske blandinger, og der er derfor ikke mulighed for i dette projekt at vurdere, om der er enkelte stoffer som dominerer den målte sluteffekt. Dog formodes det, at de målte bioeffekter er den integrerede og kombinerede "netto" påvirkning af kemikalieblandingen på de anvendte effekt biomarkører for receptor funktioner

6 Konklusioner og anbefalinger

Nærværende metodeprojekt har vist at kombinationen af passive prøveopsamlere til karakterisering af forekomst og koncentrationsniveau af hormonforstyrrende stoffer og biologiske effektundersøgelser ved *in vitro* og *in vivo* biomarkører, er velegnet til at detektere de pågældende stoffer og deres effekter i ferskvandsmiljøet. Nedenstående konklusioner er på basis af de fundene resultater. Da der i projektet kun er medtaget 9 stationer til test af metoderne, kan der ikke konkluderes generelt på tilstanden i det danske vandmiljø på baggrund af disse resultater.

Der er således fundet en tendens til, at koncentrationerne for visse hormonforstyrrende stoffer er forhøjet i vandløb nedstrøms for udløb fra kommunale renseanlæg, ligesom disse forhøjede koncentrationer har potentiale til at påvirke de tilstedeværende organismer. Dette er understøttet af resultaterne fra såvel *in vivo* undersøgelserne med biomarkører i malermuslinger som resultaterne fra *in vitro* undersøgelser af receptoreffekter i cellekulturer. Dvs. at effekterne både er set i muslinger i selve vandmiljøet og fra membranerne som østrogener, androgener og dioxin effekter i vertebra cellekultur analyserne. Sammenholdt med tidligere undersøgelser er det således dokumenteret, at spildevandsudledninger kan medføre målbare biologiske effekter i vandmiljøet.

Undersøgelsen viste, at der også forekommer hormonforstyrrende stoffer i vandløb, som må formodes at være relativt lidt belastede med disse stoffer, hvilket blev yderligere understøttet af specielt *in vitro*-receptoreffekt biomarkørerne. Dette bekræfter, at det er vanskeligt at finde områder i Danmark, som er helt eller stort set upåvirkede af menneskets aktiviteter og dermed forurening, såvel lokalt som generelt.

Da de udvalgte lokaliteter repræsenterer et udsnit af belastede og ikke belastede områder antyder denne screeningsundersøgelse en udbredt forekomst af de målte stoffer. 3 ud af 15 pesticider, der indgik i denne undersøgelse, blev målt i koncentrationer over detektionsgrænsen ved alle lokaliteter. Tilsvarende gjaldt for 3 ud af 4 organotinforbindelser, at de blev fundet ved alle lokaliteter og med undtagelse af Lystrup Å og Odense nedstrøms over detektionsgrænsen. For phenoler og østrogener blev bisphenol A og østron fundet over detektionsgrænsen ved alle lokaliteter, mens billedet var mere diffust for PFAS-forbindelserne; dog blev 3 ud af 9 stoffer fundet over detektionsgrænsen ved alle lokaliteter. Resultaterne viste endvidere, at selvom renseanlæg er en signifikant kilde for mange af de målte stoffer, er der indikationer af at specielt organotin, PFAS og visse pesticider kan have andre og mere diffuse kilder.

I forbindelse med projektet er der opnået en del erfaring med anvendelse af passive prøveopsamlere som et alternativ til traditionel udtagning af vandprøver i vandmiljøet. Det er således første gang, at passive opsamlere er blevet anvendt til analyse af så mange forskellige stoffer på en gang. Projektet har i den forbindelse vist, at det er muligt at screene for et stort antal stoffer uden at skulle øge antallet af prøver. Analyserne for mange af stofferne har desuden vist sig at være ganske robuste, og mere følsomme end almindelige vandanalyser. Membranerne viser således potentiale for at optage selv meget små mængder af stoffer. I den sammenhæng skal man dog være op-

mærksom på forskellen mellem screeningsanalyser og monitoringsanalyser. Monitoring kræver en højere grad af nøjagtighed og validering af metoder. Imidlertid er POCIS-membranerne forholdsvis komplicerede at validere til eksakte monitoringsmålinger, da deres optagelseskinetik ikke er en ligevægtsfunktion. Silikonemembranerne har allerede i andre undersøgelser vist sig effektive som et alternativ til koncentrationsmålinger i biotaprøver, som fx muslinger. Det samme forventes ikke at være tilfældet for POCIS-membranerne. POCIS-membranerne er mere velegnede til screening for stoffer, som efterfølgende kan indgå i monitoringsprogrammer på basis af de fremkomne data fra membranerne. Anvendelsen af membraner som passive prøveopsamlere ved screening giver forholdsvis lave omkostninger, idet man kan nøjes med langt færre data, bl.a. på grund af opsamling over længere tid og dermed langt færre prøver.

For vurdering af vandkoncentrationer er det essentielt at kunne beregne den passerende vandmængde. Til dette formål er anvendelsen af referencestoffer i membranen (Performance Reference Compounds, PRC) en ganske kosteffektiv metode, hvorpå man kan beregne den passerende vandmængde på basis af den tilbageværende mængde af PRC efter eksponering. Resultater fra anvendelsen af PRC i POCIS-membranerne viste dog, at teknikken med denne type membraner endnu kræver en betydelig metodeudvikling. Til gengæld fungerer PRC udmærket i silikonemembraner, og det er således muligt at bestemme stofkoncentrationer og "bearbejdede" vandmængder ved en kombination af disse to membrantyper. Endvidere viste projektet, at det er helt nødvendigt at kunne beregne faktiske stofkoncentrationer for derefter at muliggøre fortolkning af resultaterne fra de biologiske undersøgelser.

Det var ikke muligt statistisk at korrelere målingerne af de enkelte kemiske stoffer med de biologiske effekter, hvilket primært skyldes, at datamaterialet var for lille (dvs. antallet af stationer), i forhold til de mange parametre der måles, samt at effekter ikke er relateret til de enkelte stoffer men til netto effekten af den samlede stoffblanding som ofte kaldes "cocktaileffekt". Imidlertid antyder resultaterne en sammenhæng mellem de biologisk bestemte toksiske dioxinækvivalenter (AhR-TEQ) og hyppigheden af intersex/alkalilabilt phosphat (ALP) i hanmuslinger. Det er første gang, at denne sammenhæng er blevet undersøgt. Denne sammenhæng betyder også, at bestemmelse af ALP i hæmolymfe (blodvæske) fra hanmuslinger sandsynligvis kan anvendes som indikation på østrogenlignende påvirkning. Det er dog nødvendig at foretage flere undersøgelser for en bedre dokumentation og for at belyse bagved liggende mekanismer.

For alle de undersøgte vandlokaliteter blev der i cellekulturer fundet signifikante effekter på funktionen af østrogen-, androgen- og Ah-receptor ved udsættelse for de kemiske blandinger, der blev ekstraheret fra membranerne. Disse hormonforstyrrende effekter på receptoraktiviteter var højest i vandløb nedstrøms udledning fra renseanlæg. Dog blev der fundet hormonforstyrrende receptoreffekter også for andre lokaliteter, inklusiv referencevandløb. Analyser af enkeltstoffer, identificeret ved kemiske analyser af membranekstrakter, viste et potentiale af disse fundne stoffer til at forstyrre de pågældende receptorer, og derfor antages de at være årsag til de receptor effekter, der blev observeret for membran ekstrakterne. Dog er der behov for en nærmere analyse af, hvor meget disse undersøgte enkeltstoffer bidrager til den samlede receptor-effekt, som blev bestemt for membranekstrakterne. Det er svært præcist at vurdere, hvor store effekter der reelt vil forekomme i miljøet på basis af resultaterne. Dels er analyserne øjebliksbilleder i forhold

til de akkumulerede effekter, som vil optræde ved længere tids eksponering i miljøet, og dels er de foretaget på opkoncentrerede prøver. Resultaterne kan betragtes som en biomarkør.

Resultaterne fra *in vivo* undersøgelserne viste, at den valgte spids malermusling (*Unio tumidus*) kan være velegnet til undersøgelse af hormonforstyrrende påvirkninger. Således blev der fundet indikation på intersex for hanmuslinger, hvilket ikke tidligere er blevet set. Muslingerne kan derfor i en vis grad være påvirket af de hormonforstyrrende stoffer. I hvor høj grad det i praksis har indflydelse på populationernes trivsel og overlevelse er dog uklart. Dels producerer muslingerne store mængder æg og sæd, dels lever muslingerne længe og har få naturlige fjender. Derfor betyder det måske ikke så meget, såfremt produktionen af sæd og æg reduceres noget. På den anden side kan det måske være et problem, hvis en population af andre grunde er meget lille. Således kendes der i Danmark kun 4 populationer af den nærtstående *Unio crassus*, som via sin placering på EU-habitatdirektivets bilag II kræver særlig beskyttelse. Kun én af de danske populationer synes at reproducere sig, mens de andre alene består af individer, som nærmer sig "pensionsalderen" og/eller er meget små (Larsen & Wiberg-Larsen 2006). Det er ikke afklaret præcist, hvorfor arten klarer sig så dårligt, men nedsættelse af muslingernes reproduktionsevne kan ikke udelukkes som en medvirkende faktor.

Projektet viser, at der kan opnås mere uddybende viden ved at kombinere undersøgelse af biologiske effekter (*in vivo* og *in vitro*) med koncentrationsmålinger af miljøfarlige stoffer, når den økologiske tilstand af vandmiljøet skal vurderes. Der blev således påvist, at stofferne har potentiale til at medføre biologiske effekter på alle lokaliteter, til trods for generelt lave koncentrationer.

Tidligere undersøgelser har vist, at den kombinerede effekt af blandinger er forskellig fra effekten af de enkelte komponenter i blandingen (Krüger et al. 2008, Ghisari & Bonefeld-Jørgensen, 2009, Birkhøj et al. 2004), samt at der ikke kun vil forekomme et enkelt stof i vandløbene. Det vurderes derfor, at "cocktail" effekten af kemikalieblandingen i vandløbene kan relateres til de fundne data for de anvendte effekt biomarkører.

7 Referencer

- Aldridge, D.C. (1999) The morphology, growth and reproduction of *Unionidae* (Bivalvia) in a fenland waterway. J. Moll. Stud. 65: 47-60.
- Alzieu, C., Héral, M., Thibaud, Y., Dardignac, J.M. & Feuille, M. (1982). Influence des peintures antisalissures à base d'organostanniques sur la calcification de la coquille de l'huitre. *Crassostrea gigas*. Rec. Trav. Int. Pêches Marit. 45: 101-116.
- Andersen, H.R., Vinggaard, A.M., Rasmussen, T.H., Gjermansen, I.M. & Bonefeld-Jørgensen, E.C. (2002) Effect of currently used pesticides in Assays for estrogenicity, androgenicity and aromatase activity *in vitro*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 79: 1-12.
- Birkhøj, M., Nellemann, C., Jarfelt, K., Jacobsen, H., Andersen, H.R., Dalggaard, M. & Vinggaard, A.M. (2004) The combined antiandrogenic effects of five commonly used pesticides. Toxicol. Appl. Pharmacol. 201: 10-20.
- Bjerregaard, L.B., Korsgaard, B. & Bjerregaard, P. (2006a) Intersex in wild roach (*Rutilus rutilus*) from Danish sewage effluent-receiving streams. Ecotoxicology and Environmental Safety 64: 321-328.
- Bjerregaard, L.B., Madsen, A.H., Korsgaard, B. & Bjerregaard, P. (2006b) Gonad histology and vitellogenin concentrations in brown trout (*Salmo trutta*) from Danish streams impacted by sewage effluent. Ecotoxicology 15: 315-327.
- Bjerregaard, P., Hansen, P.R., Larsen, K.J., Erratico, C., Korsgaard, B. & Holbech, H. (2008) Vitellogenin as a biomarker for estrogenic effects in brown trout, *Salmo trutta*: Laboratory and field investigations. Environmental Toxicology and Chemistry 27: 2387-2396.
- Bonefeld-Jørgensen, E.C., Long, M., Hofmeister, M.V. & Vinggaard, A.M. (2007) Endocrine-disrupting potential of bisphenol A, bisphenol A dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol *in vitro*: new data and a brief review. Environ Health Perspect. 115: Suppl 1:69-76.
- Bonefeld-Jørgensen, E.C. (2010) Biomonitoring in Greenland: human biomarkers of exposure and effects - a short review. Rural Remote Health 10: 1362.
- Booij, K., Smedes, F. & van Weerlee, E.M. (2002) Spiking of performance reference compounds in low density polyethylene and silicone passive water samplers. Chemosphere 46: 1157- 1161.
- Bossi, R., Strand, J., Sortkjær, O. & Larsen, M.M. (2008) Occurrence of perfluoroalkyl contaminants in the Danish environment. Environment International 34: 443-450.

Boutrup, S., Fauser, P., Thomsen, M., Dahlöf, I., Larsen, M.M., Strand, J., Sortkjær, O., Ellermann, T., Rasmussen, P., Jørgensen, L.F., Pedersen, M.W. & Munk, L.M. (2006) Miljøfremmede stoffer og tungmetaller i vandmiljøet. Tilstand og udvikling, 1998-2003. Faglig rapport fra DMU, nr. 585, Danmarks Miljøundersøgelser, Aarhus Universitet, pp 140. (http://www2.dmu.dk/1_viden/2_Publikationer/3_fagrapporter/rapporter/FR585.pdf)

Brown, D.J., Clarke, G. C. & van Benden, R.J. (1997) Halogenated aromatic hydrocarbon-binding proteins identified in several invertebrate marine species. *Aquatic Toxicology* 37(1): 71-78.

Butler, R.A., Kelley, M.L., Powell, W.H., Hahn, M.E. & Van Beneden, R.J. (2001) An aryl hydrocarbon receptor (AHR) homologue from the soft-shell clam, *Mya arenaria*: evidence that invertebrate AHR homologues lack 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and beta-naphthoflavone binding. *Gene* 278: 223-234.

Carnevali, O., Tosti, L., Speciale, C., Peng, C., Zhu, Y. & Maradonna, F. (2010) DEHP impairs zebrafish reproduction by affecting critical factors in oogenesis. *PLoS One* 5(4): e10201.

Czaplicka, M. (2004) Review. Sources and transformations of chlorophenols in the natural environment. *Sci. Tot. Env.* 322: 21-39.

Cek, S. & Sereflisan, H. (2006) Certain reproductive characteristics of the freshwater mussel *Unio terminalis delicatus* (Lea, 1863) in Gölbaşı Lake, Turkey. *Aquaculture Research* 37: 1305-1315

Chesman, B. S. & Langston, W. J. (2006) Intersex in the clam *Scrobicularia plana*: a sign of endocrine disruption in estuaries? *Biol. Lett.* 2: 420-422

Christiansen, L.B. & Plesner, T. (2001) Intersex og andre effekter på reproduktionssystemet i skaller og bækørred – relationer til østrogener og østrogenlignende stoffer. Århus Amt, Natur og Miljø.

Cooper, K. R. & Wintermyer, M. (2009) A Critical Review: 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (2,3,7,8-TCDD) Effects on Gonad Development in Bivalve Mollusks. *J. Environ. Sci. and Health Part C-Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews* 27(4): 226-245.

Dahlöf, I., Mogensen, B.B., Bossi, R. & Jensen, I. (2008) Forekomst af herbicider i Nissum Fjord. Arbejdsrapport fra DMU nr. 244. Danmarks Miljøundersøgelser, Aarhus Universitet. 21 pp. (<http://www.dmu.dk/Pub/AR244.pdf>)

Dobson, S., Howe, P.D. & Floyd, P. (Eds) (2006) Mono- and disubstituted methyltin, butyltin, and octyltin compounds. Concise international chemical assessment document, nr. 73, World Health Organization

EU (2013). DIRECTIVE 2013/39/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy.

Fisher, J.S. (2004) Environmental anti-androgens and male reproductive health: focus on phthalates and testicular dysgenesis syndrome. *Reproduction* 127: 305-315.

Flammarion, P., Brion, F., Babut, M., Garric, J., Migeon, B., Noury, P. & Thybaud, E. (2000) Induction of fish vitellogenin and alternations in testicular structure: Preliminary results of estrogenic effects in Chub (*Leuciscus leuciscus*). *Endocrinology* 9: 127-135.

Gagné, F. & Blaise, C. (2000) Organic alkali-labile phosphates in biological tissue: A generic assay to detect vitellogenin in biological tissues. Technical method section. *Environ. Toxicol.* 15: 243-247.

Gagné, F., Blaise, C., Pellerin, J., Pelletier, E. & Strand, J. (2006) Health status of *Mya arenaria* bivalves collected from contaminated sites in Canada (Saguenay Fjord) and Denmark (Odense Fjord) during their reproductive period. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 64: 348-361.

Ghisari, M. & Bonefeld-Jørgensen, E.C. (2009) Effects of plasticizers and their mixtures on estrogen receptor and thyroid hormone functions. *Toxicol. Lett.* 25: 67-77.

Glezer, V. (2003) Environmental effect of substituted phenols. Chap. 18 in *The Chemistry of phenols*. John Wiley & Sons: 1347-1368.

Grande, C., Araujo, R. & Ramos, M.A. (2001) The gonads of *Margaritifera auricularia* (Spengler 1793) and *M. margaritifera* (Linnaeus 1758) (Bivalvia: *Unionoidea*). *J. Mollusc. Stud.* 67: 27-35.

Hecker, M., Tyler, C.R., Hoffmann, M., Maddix, M. & Karbe, L. (2002) Plasma biomarkers in fish provide evidence for endocrine modulation in the Elbe river, Germany. *Environ. Sci. and Technol.* 36: 2311-2321.

Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G. & Sumpter, J.P. (1998) Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ. Sci. and Technol.* 32: 2498-2506.

Kannan, K., Corsolini, S., Falandysz, J., Oehme, G., Focardi, S. & Giesy, J.P. (2002) Perfluorooctanesulfonate and related fluorinated hydrocarbons in marine mammals, fishes, and birds from coasts of the Baltic and Mediterranean Seas. *Environ. Sci. & Technol.* 36: 3210-3216.

Kharat, I. & Saatcioglu, F. (1996) Antiestrogenic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin are mediated by direct transcriptional interference with the liganded estrogen receptor. Cross-talk between aryl hydrocarbon- and estrogen-mediated signaling. *J. Biol. Chem.* 271: 10533-10537.

Kjølholt, J., Stuer-Lauridsen, F., Høiby, L., Halling-Sørensen, B., Ingerslev, F., Bach, K., Hansen, M., Hansen, N., Køppen, B., Bjerregaard, P. & Frost, B. (2006) Survey of Estrogenic Activity in the Danish Aquatic Environment Part B. Environmental Project No. 1007, Danish Ministry of Environment, 48 pp.

Kojima, M., Tsunoi, S. & Tanaka, M. (2004) High performance solid-phase analytical derivatization of phenols for gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chrom. A* 1042: 1-7.

- Kolodziej, E.P., Gray, J.L. & Sedlak, D.L. (2003) Quantification of steroid hormones with pheromonal properties in municipal wastewater effluent. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 2622-2629.
- Krüger, T., Long, M. & Bonefeld-Jørgensen, E.C. (2008) Plastic components affect the activation of the aryl hydrocarbon and the androgen receptor. *Toxicology* 18: 112-23.
- Kusk, K.O., Krüger, T., Long, M., Taxvig C., Lykkesfeldt, A.E., Frederiksen, H., Andersson, A.M., Andersen, H. R., Nellemann, C. & Bonefeld-Jørgensen, E.C. (2010) Endocrine potency of wastewater: contents of endocrine disrupting chemicals and effects measured by *in vivo* and *in vitro* assays. *Environ. Toxicol. Chem.* 30:413-26
- Lafont, R. & Mathieu, M. (2007) Steroids in aquatic invertebrates. *Ecotoxicology* 16: 109–130.
- de Lafontaine, Y., Gagne, F., Blaise, C., Costan, G., Gagnon, P. & Chan, H.M. (2000) Bio-markers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquatic Toxicol.* 50: 51–71.
- Langston, W.J., Burt, G.R., Chesman, B.S. 2007. Feminisation of male clams *Scrobicularia plana* from estuaries in Southwest UK and its induction by endocrine-disrupting chemicals. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 333: 173–184.
- Larsen, F.G. & Wiberg-Larsen, P. (2006) Udbredelse og hyppighed af Tykskallet Malermusling (*Unio crassus* Philipson, 1788) i Odense Å-systemet. *Flora & Fauna* 112: 89-98.
- Larsen, M.M., Allan, I., Næs, K., Nyberg, E. & Hoydal, K. (2009) Evaluation of passive samplers for the monitoring of contaminants in sediment and water. Monitoring of POPs and PCBs in international monitoring programmes. TemaNord 2009 / 563, 100 pp.
- Latini, G., Verrotti, A. & De Felice, C. (2004) Di-2-ethylhexyl phthalate and endocrine disruption: a review. *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* 4: 37-40.
- Lau, C., Anitole, K., Hodes, C., Lai, D., Pfahles-Hutchens, A. & Seed, J. (2007) Perfluoroalkyl acids: a review of monitoring and toxicological findings. *Toxicol. Sci.* 99, 366-394.
- Long, M., Laier, P., Vinggaard, A.M., Andersen, H.R., Lynggaard, J. & Bonefeld-Jørgensen, E.C. (2003) Effects of currently used pesticides in the AhR-CALUX assay: comparison between the human TV101L and the rat H4IIE cell line. *Toxicology* 194: 77-93.
- Long, M., Andersen, B.S., Lindh, C.H., Hagmar, L., Giwercman, A., Manicard, G.C., Bizzaro, D., Spano, M., Toft, G., Pedersen, H.S., Zvyedday, V., Bonde, J.P. & Bonefeld-Jørgensen, E.C. (2006) Dioxin-like activities in serum across European and Inuit populations. *Environ. Health* 25, 5: 14
- Lye, C.M., Frid, C.J.L., Gill, M.E. & McCormack, D. (1997) Abnormalities in the reproductive health of flounder (*Platichthys flesus*) exposed to effluent from a sewage treatment work. *Marine Pollution Bulletin* 34: 34-41.

MacLeod, S.L., McClure, E.L. & Wong, C.S. (2007) Laboratory calibration and field deployment of the polar organic chemical integrative sampler for pharmaceuticals and personal care products in wastewater and surface water. *Environ. Toxicol. and Chem.* 26: 2517-2529.

Magnusson, U. (2005) Can farm animals help to study endocrine disruption? *Domest. Anim. Endocrinol.* 29: 430-435.

Matthews, J. & Gustafsson, J.A. (2006) Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Nucl. Recept. Signal* 4: e016.

Matthiessen, P., Arnold, D., Johnson, A.C., Pepper, T.J., Pottinger, T.G. & Pulman, K.G.T. (2006) Contamination of headwater streams in the United Kingdom by oestrogenic hormones from livestock farms. *Sci. Total Environ.* 367: 616-630.

Mazzella, N., Dubernert, J. & Delmas, F. (2007) Determination of kinetic and equilibrium regimes in the operation of polar organic chemical integrative samplers. Application to the passive sampling of the polar herbicides in the aquatic environment. *J. Chromatography A* 1154: 42-51.

Mazella, N., Lissalde, S., Moreira, S., Delmas, F., Mazellier, P. & Huckins, J.N. (2010) Evaluation of the Use of Performance Reference Compounds in an Oasis-HLB Adsorbent Based Passive Sampler for Improving Water Concentration Estimates of Polar Herbicides in Freshwater. *Env. Sci. Technol.* 44: 1713-1719.

Mihaich, E.M., Friederich, U., Caspers, N., Hall, A.T., Klecka, G.M., Dimond, S.S., Staples, C.A., Ortego, L.S. & Hentges, S.G. (2009) Acute and chronic toxicity testing of bisphenol A with aquatic invertebrates and plants. *Ecotox. Env. Safety* 72: 1392-1399.

Miljøministeriet 2010. Bekendtgørelse om miljøkvalitetskrav for vandområder og krav til udledning af forurenende stoffer til vandløb, søer eller havet. Miljøministeriets Bekendtgørelse nr. 1022 af den 25/08/2010.

Miljøstyrelsen, Bekæmpelsesmiddelstatistik (2007) Orientering fra Miljøstyrelsen Nr. 4 / 2008.

OSPAR convention for the protection of the marine environment of the north east Atlantic. Working group on concentrations, trends and effects of substances in the marine environment (SIME), Edinburgh (Scotland): 11-13 march 2008.

Plesner, T. (2003) Undersøgelse af østrogene stoffer i Voel Bæk og tilløb. Teknisk Notat. Århus Amt, Natur og Teknik, 20 pp.

Pocar, P., Fischer, B., Klonisch, T. & Hombach-Klonisch, S. (2005) Molecular interactions of the aryl hydrocarbon receptor and its biological and toxicological relevance for reproduction. *Reproduction* 129: 379-89.

Purdom, C.E., Hardiman, P.A., Bye, V.J., Eno, N.C., Tyler, C.R. & Sumpter, J.P. (1994) Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works, *Chem. and Ecol.* 8: 275-285.

Quinn, B., Gagné, F., Costello, M., McKenzie, C., Wilson, J. & Mothersill, C. (2004) The endocrine disrupting effect of municipal effluent on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquatic Toxicol.* 66: 279–292.

Quinn, B., Gagne, F., Blaise, C., Costello, M.J., Wilson, J.G. & Mothersill, C. (2006) Evaluation of the lethal and sub-lethal toxicity and potential endocrine disrupting effect of nonylphenol on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 142: 118-127.

Rusina, T.P., Smedes, F., Klanova, J., Booij, K. & Holoubek, I. (2007) Polymer selection for passive sampling: a comparison of critical properties. *Chemosphere* 68: 1344–1351.

Servos, M.R. (1999) Review of the aquatic toxicity, estrogenic responses and bioaccumulation of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. *Water Qual. Res. J. Canada* 34: 123-177.

Smedes, F. (2007) Monitoring of Chlorinated Biphenyls and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Passive Sampling in Concert with Deployed Mussels. In: *Comprehensive Analytical Chemistry* (R. Greenwood, G. Mills & B. Vrana, eds.) Volume 48, 2007 Elsevier.

Smedes, F., van Der Zande, T., Tixier, C. & Davies, I.M. (2007) ICES Passive sampling trial survey for water and sediment (PSTS) 2006 – 2007. Part 2: Laboratory intercomparison, analytical issues and lessons learned. Presentation på ICES Annual Science Conference, 17-21 september, Helsinki, Finland.

Staples, C.A., Adams, W.J., Parkerton, T.F., Gorsuch, J.W., Biddinger, G.R. & Reinert, J.W. (1997a) Aquatic toxicity of eighteen phthalate esters. *Env. Tox. Chem.* 16: 875-891.

Staples, C.A., Peterson, D.R., Parkerton, T.F., & Adams W.J. (1997b). Environmental fate of phthalate esters: A literature review. *Chemosphere* 35: 667-749.

Strand, J. & Jacobsen, J.A. (2002) Imposex in Two Sublittoral Neogastropods from the Kattegat and Skagerrak: The Common Whelk *Buccinum undatum* and the Red Whelk *Neptunea antiqua*. *Marine Ecology Progress, Series* 244: 171-177.

Strand, J., Bossi, R., Sortkjær, O., Landkildehus, F. & Larsen, M.M. (2007) PFAS og organotinforbindelser i punktkilder og det akvatiske miljø. NO-VANA screeningsundersøgelse. Faglig rapport fra DMU nr. 608. Danmarks Miljøundersøgelser, Aarhus Universitet. 49 pp.
(<http://www.dmu.dk/Pub/FR608.pdf>)

Strand, J., Bossi, R., Dahllöf, I., Jensen, C.A., Simonsen, V., Tairova, Z. & Tomkiewicz, J. (2009) Dioxin og biologisk effektmonitoring i ålekvabbe i kystnære danske farvande. Faglig rapport fra DMU nr. 743. Danmarks Miljøundersøgelser, Aarhus Universitet. 66 pp.
(<http://www.dmu.dk/Pub/FR743.pdf>)

Strand, J. (2009) Coupling marine monitoring and environmental risk assessment of TBT: A case study using the contamination of organotin compounds in the Danish marine environment, VDM Verlag Dr. Müller, Germany, 84 pp.

Styczen, M., Wiberg-Larsen, P., & Aagaard, A. (2003) Tag pulsen på pesticiderne i vandmiljøet. Vand & Jord 10: 84-87

Stuer-Lauridsen, F., Kjølholt, J., Poulsen, E., Huckins, J. N. & Álvarez, D.A. (2004) Report on the deployment and analysis of SPMD and POCIS samplers from field trials in three streams in Storstroems County, Denmark.

Stuer-Lauridsen, F., Kjølholt, J., Høibye, L., Hinge-Christensen, S., Ingerslev, F., Hansen, M., Andersen Krogh, K., Andersen, H.R., Halling-Sørensen, B., Hansen, N., Køppen, B., Bjerregaard, P. & Frost, B. (2005) Survey of estrogenic activity in the Danish aquatic environment. Environmental Project. no. 977, Danish Ministry of Environment, 98 pp.

Tomy, G.T., Budakowski, W., Halldorson, T., Helm, P.A., Stern, G.A., Friesen, K., Pepper, K., Tittlemier, S.A. & Fisk, A.T. (2004) Fluorinated organic compounds in an eastern Arctic marine food web. Environ. Sci. Technol. 38: 6475-6481.

Tudorancea, C. (1972) Studies on *Unionidae* populations from the Crapina-Jijila complex of pools (Danube zone liable to inundation). Hydrobiologia 39: 527-561.

van Aerle, R., Nolan, M., Jobling, S., Christiansen, L.B., Sumpter, J.P. & Tyler, C.R. (2001) Sexual disruption in a second species of wild cyprinid fish (the gudgeon, *Gobio gobio*) in United Kingdom freshwaters. Environ. Toxicol. Chem. 20: 2841-2847.

Van de Vijver, K.I., Hoff, P., Das, K., Van Dongen, W., Esmans, E., Siebert, U., Bouqueneau, J.M., Blust, R. & De Coen, W. (2004) Baseline study of perfluorochemicals in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from Northern Europe. Marine Pollution Bulletin 48: 992-997.

Vrana, B., Mills, G.A., Allan, I.J., Dominiak, E., Svensson, K., Knutsson, J., Morrison, G. & Greenwood, R. (2005) Passive sampling techniques for monitoring pollutants in water. Trends in Analytical Chemistry 24: 845-868.

Wold, S. (1995) Chemometrics; what do we mean with it and what do we want from it? - Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 30: 109-115.

Yen, J.-H., Lin, K.-H. & Wang, Y.-S. (2002) Acute lethal toxicity of environmental pollutants to aquatic organisms. Ecotox. Env. Safety 52: 113-116.

Ying, G.-G., Williams, B. & Kookana, R. (2002) Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates – a review. Env. Int. 28: 215-226.

Zhang, Z., Hibberd, A. & Zhou, J.L. (2008) Analysis of emerging contaminants in sewage effluent and river water: comparison between spot and passive sampling. Anal. Chim. Acta 607: 37-44.

Zhou, J., Cai, Z.H., Li, L., Gao, Y.F. & Hutchinson, T.H. (2010) A proteomics based approach to assessing the toxicity of bisphenol A and diallyl phthalate to the abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*). Chemosphere 79: 595-604.

Bilag 1 Stationsoplysninger

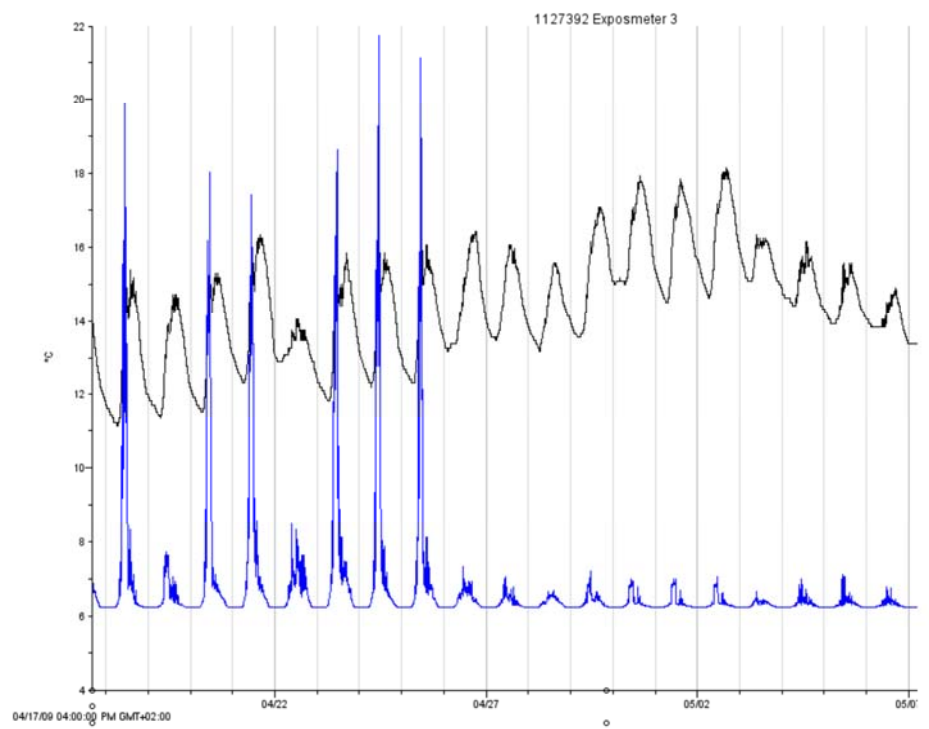
Tabel 1. Stationsoplysninger for passive samplers og transplanterede muslinger.

Station Nr.	Stations navn	UTM nordlig	UTM østlig	Startdato, passi-Indsamlingsdato, ve samplers og passive sam- Indsamlingsdato, muslinger plers muslinger		
1	Silkeborg, opstrøms	5610,419	933,393	16-04-2009	12-05-2009	12-05-2009
2	Silkeborg, nedstrøms	5610,452	935,991	16-04-2009	12-05-2009	12-05-2009
3	Lystrup Å	5602,181	929,987	16-04-2009	12-05-2009	12-05-2009
4	Odense, opstrøms	5523,774	1024,941	17-04-2009	12-05-2009	13-05-2009
5	Odense, nedstrøms	5523,997	1025,212	17-04-2009	12-05-2009	13-05-2009
6	Åmose å	5536,734	1123,189	17-04-2009	13-05-2009	13-05-2009
7	Ringsted, opstrøms	5525,115	1147,981	17-04-2009	13-05-2009	13-05-2009
8	Ringsted, nedstrøms	5525,177	1147,717	17-04-2009	13-05-2009	13-05-2009
9	Suså	5523,155	1146,608	17-04-2009	13-05-2009	13-05-2009

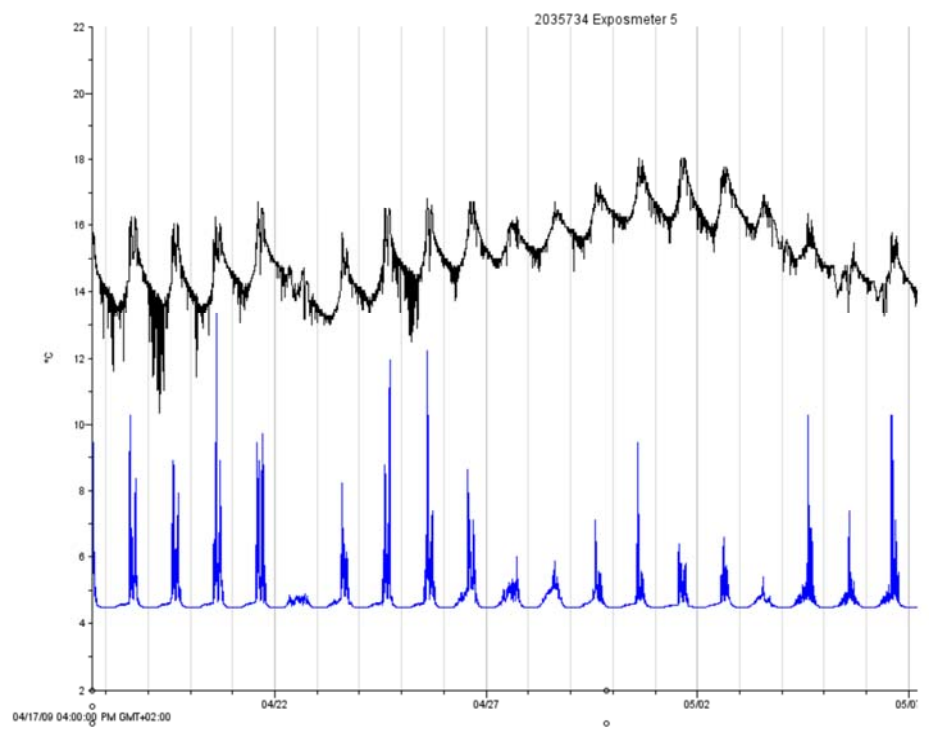
Tabel 2. Supplerende stationer med "vilde" muslinger.

Station Nr.	Stations navn	Position	Position
10a	Thorsø, start	5607,668	933,174
10b	Thorsø, supplerende	5607,668	933,174
11	Silkeborg langsø	5610,452	935,991

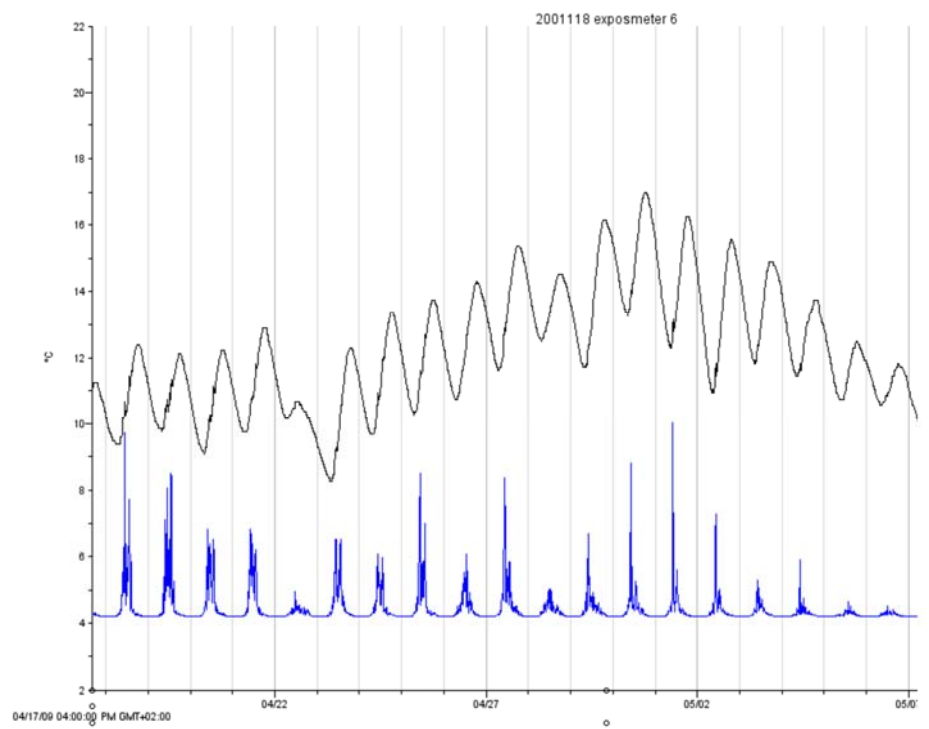
Resultater fra Termologgere med angivelse af temperatur (sort, venstre skala) og lys intensitet (blå, højre skala). Bemærk at en del samplers lå under broer. Ikke alle samplers havde temperaturlogger på.



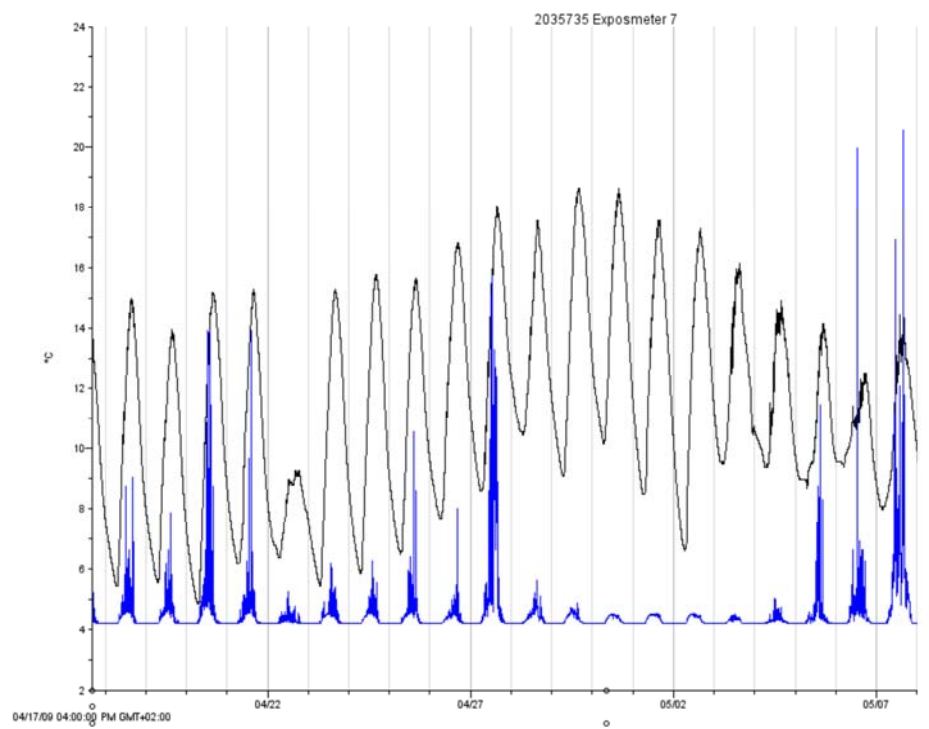
Figur 1. Temperatur forløb i Lystrup å.



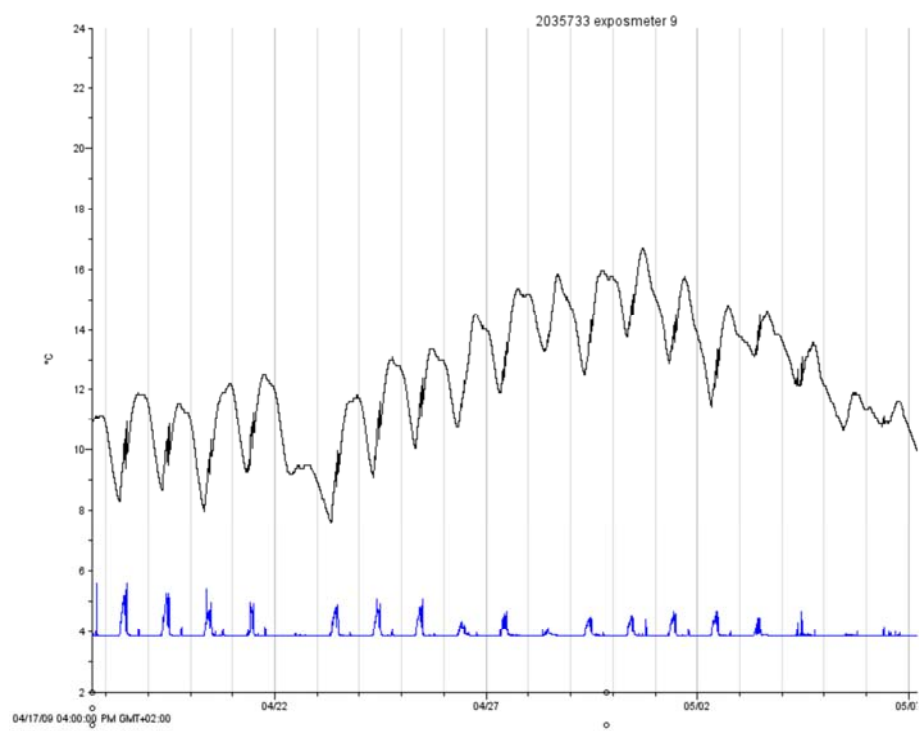
Figur 2. Temperatur forløb i Odense Å, nedstrøms



Figur 3. Temperatur forløb i Åmose å.



Figur 4. Temperatur forløb i Ringsted å, Opstrøms.



Figur 5. Temperatur forløb i Suså.

Bilag 2 Metode data

Tabel 1. Pesticider i POCIS-membraner, dobbeltbestemmelser (ng/membran) analyseret ved LC-MS-MS. dl: Data under detektionsgrænsen derfor ikke muligt at kvantificere spredning

	Atrazine	Carbofuran	Diflubenzuron	Dimethoate	Diuron	Fluazifop butyl	Linuron
Detektionsgrænse (ng pr POCIS)	5	5	5	3	3	3	3
Absolut spredning mellem dobbelt best.	0,2-0,7	0,14	dl	0,07-0,14	0,1-18,7	dl	0,1-198
Relativ spredning (%) mellem dobbelt best.	2,4-22,1	15,7	dl	12,9-28,3	0,4-15,2	dl	4,3-29,3

Tabel 2. Pesticider i POCIS-membraner, dobbeltbestemmelser (ng/membran) analyseret ved LC-MS-MS. dl: Data under detektionsgrænsen derfor ikke muligt at kvantificere spredning

	Malathion	Pendimetha- lin	Prochloraz	Propiconaz- zole	Simazine	Tebucon- nazole	Ioxynil	Bromoxynil
Detektionsgrænse (ng pr POCIS)	5	5	3	3	3	3	3	3
Absolut spredning mellem dobbelt best.	0-1,5	dl	0,1	0-4,5	0,6-5,4	0-13,3	0-0,5	0,1-0,5
Relativ spredning (%) mellem dobbelt best.	0-8,3	dl	4,0-7,4	0-13,8	4,7-27,6	0-15,8	0-13,2	7,4-15,7

Interne standarder anvendt til korrektion for genfindning for pesticider:

Atrazin D5, Diuron D6, Pendimethalin D5, Propiconazole D5, Fluazifop butyl D9, Bromoxynil ¹³C₆

Tabel 3. PFAS fundet i POCIS-membraner, dobbeltbestemmelser (ng/membran) analyseret ved LC-MS-MS. dl: Data under detektionsgrænsen derfor ikke muligt at kvantificere spredning

	Perfluorohexane sulfonic acid (PFHxS)	Perfluorooctane sulfonic acid (PFOS)	Perfluorooctane sulfonamide (PFOSA)	Perfluoroheptanoic acid (PFHpA)	Perfluorooctanoic acid (PFOA)
Detektionsgrænse (ng pr POCIS)	2	2	0,3	2	2
Absolut spredning mellem dobbelt best.	0-0,2	0-4,4	dl	0,1-0,7	0,1-1,5
Relativ spredning (%) mellem dobbelt best.	0-10,9	0-22,8	dl	6,7-78,6	2,9-20,2

Tabel 4. PFAS i POCIS-membraner, dobbeltbestemmelser (ng/membran) analyseret ved LC-MS-MS. dl: Data under detektionsgrænsen derfor ikke muligt at kvantificere spredning

	Perfluoro- nonanoic acid (PFNA)	Perfluoro- decanoic acid (PFDA)	Perfluoroun- decanoic acid (PFUnA)	Perfluorodo- decanoic acid (PFDoA)	Perfluorotri- decanoic acid (PFTTrA)
Detektionsgrænse (ng pr POCIS)	1	2	2	2	2
Absolut spredning mellem dobbelt best.	0-0,4	0-2,0	dl	dl	dl
Relativ spredning (%) mellem dobbelt best.	0-32,6	0-35,4	dl	dl	dl

Interne standarder anvendt til korrektion for genfinding for PFAS:

$^{13}\text{C}_6$ PFOA, $^{13}\text{C}_4$ PFOS, $^{13}\text{C}_2$ PFDA

Tabel 5. Phenoler i POCIS-membraner, dobbeltbestemmelser (ng/membran) analyseret ved GC-MS. dl: Data under detektionsgrænsen derfor ikke muligt at kvantificere spredning

	4-chloro-3- methylphenol	Pentachlorophenol	4-tert-Butylphenol	4-tert-octylphenol	octylphenol
Detektionsgrænse (ng pr POCIS)	10	8	2	6	5
Absolut spredning mellem dobbelt best.	1,0-10,4	0,3-1,4	dl	0,2-567	0,2-2,8
Relativ spredning (%) mellem dobbelt best.	3-110	15,1-85,9	dl	1,7-59,5	33-83

Tabel 6. Phenoler mv. i POCIS-membraner, dobbeltbestemmelser (ng/membran) analyseret ved GC-MS. dl: Data under detektionsgrænsen derfor ikke muligt at kvantificere spredning

	4-n-Nonylphenol 25154-52-3	4-Nonylphenol (4-NP) 104-40-5	Bisphenol A	Estrone (E1)	17b-Estradiol (E2)	17a-Ethinyl- estradiol (EE2)
Detektionsgrænse (ng pr POCIS)	20	5	1	2	2	80
Absolut spredning mel- lem dobbelt best.	dl	dl	0,2-8,1	0,6-2,7	0-0,8	5,4-27,5
Relativ spredning (%) mellem dobbelt best.	dl	dl	2,7-27,7	4,3-43,7	0,7-69,5	8,9-110,4

Interne standarder anvendt til korrektion for genfinding for phenoler og østradioler: 2,4-dichlorphenol- $^{13}\text{C}_6$, 2,4,6-trichlorphenol- $^{13}\text{C}_6$, 4-octylphenol-D17, Nonylphenol- $^{13}\text{C}_6$, Bisphenol_A-D6, Estradiol- $^{13}\text{C}_2$

Tabel 7. Organotin silikone membraner analyseret ved GC-PFDP. Organotin forbindelserne foreligger derfor kun i enkeltbestemmelse. Detektionsgrænsen er beregnet som 3 X standardafvigelsen af blind.

	Tributyltin	Dibutyltin	Monobutyltin	Triphenyltin
Detektionsgrænse (ng pr SM)	0,07	0,01	0,1	0,2

Tabel 8. Phthalater i POCIS-membraner, dobbeltbestemmelser (ng/membran) analyseret ved GC-MS. dl: Data under detektionsgrænsen derfor ikke muligt at kvantificere spredning

	Diethyl phthalat Dep	Dibutylphthalat DBP	butylbenzyl- phthalat BBP	Diethylhexyl- phthalat DEHP	Di-n-octyl- phtha- lat DnOP	Diisononyl phtha- lat DiNP
Detektionsgrænse (ng pr POCIS)	10	1	3	5	15	10
Absolut spredning mellem dobbelt best.	22-135	5-592	2-59	7-222	0,07-0,58	24-563
Relativ spredning (%) mellem dob- belt best.	9-45	3-108	7-108	2-64	5-78	10-62

Interne standarder anvendt til korrektion for genfinding for phthalater: DBP-D4, DEHP-D4, DEHP-D4, DnOP-D4

For PRC stoffer i POCIS-membraner anvendes de samme genfindingsstandarder som for pesticid analyserne.

For PRC stoffer i silikonemembraner anvendes følgende genfindingstandarder: Flouren-D10, Antracen-D10, Benz(e)pyren-D12, Dibenz(a,h)antracen-d14

UNDERSØGELSE AF HORMONFORSTYRRENDE KEMI-KALIER I VANDLØB

I dette pilotprojekt er undersøgt forekomst og effekt af hormonforstyrrende stoffer i det danske vandmiljø, herunder belastningen fra renseanlæg. Projektet kombinerer analyse vha. passive opsamlere af hormonforstyrrende stoffer i vandløb med stoffernes effekter på dels reproduktions-systemet hos malermuslinger, og dels med hormonforstyrrelser i mam-male cellekulturer i form af *in vitro* bioanalyser. Resultaterne viste ikke overraskende en forhøjet belastning med hormonforstyrrende stoffer og øgede biologiske effekter nedstrøms renseanlæg i forhold til opstrøms. Endvidere blev der fundet hormonforstyrrende stoffer selv i vandområder, som formodes at være relativt ubelastede. Der blev fundet en sammenhæng mellem *in vivo* og *in vitro* målingerne, hvilket ikke tidligere er blevet dokumenteret. Projektet viser, at der er en relevans i at kombinere biologiske effektmålinger med koncentrationsmålinger, når den økologiske tilstand skal vurderes.