



INSTITUTT FOR FISKERI- OG MARINBIOLOGI
DEPT. OF FISHERIES AND MARINE BIOLOGY

Universitetet i Bergen

Rapport nr.

15, 1999

Tilgjengelighet

Åpen

Høyteknologisenteret, N-5020 Bergen, Norway

☎ 55 58 44 00

📠 55 58 44 50

Rapportens tittel	Dato
Alkylerte fenolers hormonelle innvirkning på torsk - generasjonseffekter. Vekst, overlevelse og kjønnsdifferensiering	03.12.99
	Antall sider og bilag
	11
Forfattere	Prosjektleder
Arild Folkvord ¹ , Erling Otterlei ¹ og Asbjørn Svardal ²	Asbjørn Svardal
¹ Institutt for fiskeri- og marinbiologi, ² Havforskningsinstituttet i Bergen	Prosjektnummer

Oppdragsgiver	Oppdragsgivers ref.
Olje og Energidepartementet	

Abstract
Adult cod were fed diets containing different levels of alkyl phenols to determine effects on growth, survival and sex determination of the offspring (0 ppb, 5 ppb and 500 ppb per fish per day). The results indicated that exposure of parental cod to alkyl phenols did not influence growth and survival of the offspring, either in the larval stage or as early juveniles. The survival in all groups was high, over 50% from hatching past metamorphosis. Furthermore, the data on sex determination of the offspring from the different treatments did not indicate hormonal influences and generation effects on sex differentiation in cod. However, it cannot be ruled out that the choice of exposure (oral versus immersion), the dosage, and the timing relative to the developmental state of the parental fish can influence the results.

Keywords
Cod
Maternal effects
Alkylphenols
Fish larvae
Growth
Survival
Otoliths
Fluctuating asymmetry
Sex determination

Emneord
Torsk
Maternale effekter
Alkylfenoler
Fiskelarver
Vekst
Overlevelse
Otolitter
Fluktuerende assymetri
Kjønnsbestemmelse

Serien refereres som: **IFM Rapport**

ISSN 0803-1924

Redaktør

Alkylerte fenolers hormonelle innvirkning på torsk - generasjonseffekter. Vekst, overlevelse og kjønnsdifferensiering

Faglig beskrivelse

Bakgrunn

Havforskningsinstituttet gjennomførte høsten 1997 et kontrollert forsøk på reproduksjonseffekter av alkylfenoler på førstegangsgytende torsk. Som en oppfølging av dette arbeidet var det ønskelig å studere eventuelle langtidseffekter på neste generasjon. Larver og yngel, avkom fra foreldrefisk eksponert til alkylfenoler, ble drept frem og undersøkt for eventuelle effekter på befruktning- og klekkeprosent på eggstadiet, samt organismens videre evne til fødeopptak, vekst og overlevelse. Størst interesse er det imidlertid knyttet til hvorvidt eksponering av morfisk kan påvirke kjønnsdifferensieringen hos avkommet. Et representativt utvalg med larver er dessuten kontrollert for eventuell morfologisk asymmetri mht otolittvekst.

Alkylfenol er en gruppe kjemiske stoffer som forekommer blant annet i utslipp fra oljerelatert virksomhet og har en molekylstruktur som ligner basisstrukturen til enkelte hormon og betegnes derfor som en "hormonhermer". Det er imidlertid usikkert hvilke konsekvenser dette stoffet har for det marine miljø og organismene som lever der. Vi har derfor i dette forsøket hovedsakelig valgt å legge vekt på å undersøke effekter som gir synlige og lett tolkbare svar. Dersom skadelige effekter påvises i et slikt forsøksoppsett kan det indikere at man har et problem som det må arbeides videre med. Resultatene fra slike tester kan benyttes som beslutningsstøtte ved valg av rensemetoder og utslippsstrategi fra oljeindustrien.

Målsetting

Hovedmålsettingen med prosjektet har vært å undersøke om eksponering til alkylerte fenoler hos foreldrefisk påvirker befruktning, vekst, overlevelse og kjønnsdifferensiering hos avkommet.

Forsøksgjennomføring

Den eksperimentelle delen av dette forsøket ble startet høsten 1997 og avsluttet 17. desember 1998. Selve forsøket blir beskrevet med utgangspunkt i fire naturlige eksperimentelle faser: i) *eksponering av foreldrefisk*, ii) *inkubering av egg*, iii) *startfôring med vekst og overlevelse hos larver og tidlig yngel* samt iv) *videre tilvekst og kjønnsbestemmelse av yngel*.

Eksponering av foreldrefisk

Høsten 1997 ble 300 førstegangsgytende torsk (skrei) fordelt tilfeldig til tre kar hver på 15 m³ (100 fisk per kar). Fisken i to av forsøkskarene ble eksponert for henholdsvis en høy (500 ppb per fisk per dag) og lav konsentrasjon (5 ppb per fisk per dag) av C4-C7 parasubstituerte alkylfenoler tilført oralt gjennom fôret over en periode på 4 måneder. Forsøksfisken i det tredje karet var kontrollfisk som ble tilført fôr av samme type, men uten tilsetninger av alkylfenoler. Gytefisken ble oppbevart i kar utendørs under et naturlig lysregime.

Sjøvannstemperaturen i karene var 8-9 °C og selve gyteprosessen foregikk naturlig og uproblematisk.

Inkubering av egg

Den 23. februar 1998 ble det samlet inn 50 ml nybefruktede egg fra hver av de tre behandlingene. Egg-gruppene ble inkubert adskilt i 10 l glassakvarier ved 5 °C og en saltholdighet på 34,5 psu, ved Havforskningsinstituttet i Bergen. Ti dager seinere ble 40 ml egg fra hver av behandlingene overført til 70 l inkubatorer ved Institutt for fiskeri og marinbiologi ved Universitetet i Bergen, der videre aktiviteter som startfôring og produksjon av torskelyngel ble utført. Den 12. mars eller 17 dager etter befruktning hadde mer enn 50% av larvene klekket i hver av inkubatorene (dag 0).

Startfôring med vekst og overlevelse hos larver og tidlig yngel

Tre dager gamle ble 2000 larver fra hver av behandlingene overført til grønne glassfiberkar hver på 500 l. Hver behandlingsgruppe ble satt opp med to paralleller slik at forsøket totalt utgjorde seks karenheter. Dette delforsøket var i all hovedsak viet betydningen av vekst og overlevelse i larvefasen. Forsøkets varighet var åtte uker og larvene ble holdt ved en konstant sjøvannstemperatur på 8,1°C ($\pm 0,41$, SD). Som en ekstra kontroll på larvenes levedyktighet ble 100 larver fra hver av inkubatorene overført til bølter på 10 l. Disse gruppene ble ikke tilført fôr (sultgrupper).

Torskelarvene i karene ble derimot daglig fôret med naturlig dyreplankton, supplert med en mindre biomasseandel av hjuldyr (*Brachionus*) og tilsatt et mindre volum alger (*Isochrysis galbana* og *Rhodomonas baltica*) produsert i kultur. Innsamling av naturlig dyreplankton ble foretatt ved filtrering av sjøvann gjennom to UNIK 900 hjulfiltre (Unik Filtersystem A/S, Os, Norway). Ved startfôring ble larvene gitt byttedyr fra 80-150 μm , med tilbud om et gradvis økende størrelsesspekter (80-2000 μm) etter hvert som fiskelarvene og yngelen vokste til. Tintinnider og hjuldyr dominerte planktonet tidlig i sesongen, mens larver (nauplier) og yngre stadier av hoppekrepsarter (copepoder) ble mer tallrike seinere i sesongen. Byttedyrtettheten i karene ble kontrollert daglig og forsøkt opprettholdt på et nivå tilsvarende 1000 ind l^{-1} .

Under forsøket ble larvene eksponert for et simulert naturlig lysregime tilsvarende en breddegrad som for Bergen (60°25'N). Vannstanden i karene var konstant, med tilførsel av byttedyrkonsentratet som viktigste vannutskiftning. Sedimentert organisk materiale i karene ble fjernet daglig, samtidig som antall døde larver ble registrert. Viktige miljøparametre som sjøvannstemperatur ble målt daglig mens oksygenkonsentrasjonen (% og mg l^{-1} , $\geq 83\%$) i karene ble registrert annenhver dag.

Under forsøket ble det gjennomført en relativt intensiv prøvetaking med ukentlig uttak av 40 torskelarver fra hver behandling. Standardlengde (mm) ble målt på levende materiale (i alt 960 larver). Larvene ble siden individuelt fiksert på flytende nitrogen for seinere tørrvektmålinger (mg). Et spritfiksert materiale på 900 larver likt fordelt fra hver av behandlingene er tilgjengelig for bl. a. morfologiske otolittstudier mht asymmetri. Tørrvektmålinger er opparbeidet for 10 larver per kar per prøvetaking ($n=540$), mens otolittstudiet bygger på 90 larver, likt fordelt mellom behandlingene, fra dag 28. Larvens høyre og venstre lapillus ble forsiktig dissekert ut og montert på objektglass. Totalt ble 180 otolitter målt mht max radius, min radius, omkrets og areal ved hjelp av et mikroskop med 400X forstørrelse og billedanalyse-programmet Image Pro Plus. I de videre undersøkelsene av fluktuerende asymmetri ble otolittareal foretrukket som mål da tidligere undersøkelser har vist at den er et mer sensitivt mål enn radius mål (Somarakis et al., 1997). Det var forventet at de eksponerte gruppene skulle ha større høyre-venstre avvik som følge av miljørelatert stress.

Overlevelse (%) i larveperioden er estimert som antall larver og yngel i live etter åtte uker, beregnet ut i fra antall larver satt ut, korrigert for prøveuttak. Nøstet ANOVA ble benyttet for testing på forskjeller i tørrvekt og lengdetilvekst. Forskjeller i høyre-venstre otolithareal ble testet vha lineær regresjon. Styrketester på ikke-signifikante tester ble foretatt ved hjelp av programmet Pass 6.0 (Hintze, 1996).

Videre tilvekst og kjønnsbestemmelse av yngel

Åtte uker gammel (*SL* 19,1 mm) ble fisken overført til tre kar med kontinuerlig vann-gjennomstrømning ved Industrilaboratoriet ved Høyteknologisenteret i Bergen. Yngelen ble holdt i nye fire uker for endelig tilvenning til tørrfôr (weaning). Ytterligere fire uker senere ble 500 fisk fra hver behandling talt opp og inngikk i videre vekstforsøk frem mot kjønnsbestemmelse. For å øke tilveksten på yngelen i denne perioden ble sjøvannstemperaturen justert opp til 12,0 °C ($\pm 0,35$, SD), slik at en med større sikkerhet kunne kjønnsbestemme fisken ved avslutning. Yngelen ble fortsatt eksponert for et simulert naturlig lysregime. Vanntilførselen til karene ble justert opp jevnlig, likevel sank oksygenmetningen til 66% på grunn av en relativt høy fiskebiomasse i karene (72 kg m⁻³) ved forsøkslutt.

Gjennom yngelfasen ble det hver fjerde uke foretatt et tilfeldig uttak av 40 fisk fra hver av behandlingene. Fiskens totallengde (cm) og våtvekt (g) ble målt, før den ble avlivet og frosset ned (± 20 °C) for eventuelle seinere analyser. Tilsvarende prøvetaking ble også utført på 200 fisk fra hver behandling ved forsøkslutt. Hvert individ ble da kjønnsbestemt (visuelt) og gonadeprøver fiksert. Våtvekt (g) av gonade og lever ble samtidig målt på 40 fisk fra hver behandling ved avslutning. Overlevelse (%) i yngelfasen er beregnet tilsvarende som for i larveperioden. Gjennomsnittlig daglig vektspesifikk vekstrate (*G*) i % er beregnet i henhold til Houde og Schekter (1981):

$$(1) \quad G = 100 \cdot (e^g - 1)$$

der daglig øyeblikkelig vekstrate

$$(2) \quad g = \frac{(\ln W_2 - \ln W_1)}{(t_2 - t_1)}$$

og *W* er gjennomsnittlig vekt (i g for yngel eller mg dersom beregnet for larver) ved henholdsvis dag *t*₁ og *t*₂. En enveis ANOVA ble benyttet for testing på forskjeller i vekt og lengdetilvekst under yngelforsøket. Forskjeller i gjennomsnittlig daglig spesifikk vekstrate i yngelfasen ble testet vha kovariansanalyse. Data for vekt, lengde, vekstrate og geometrisk gjennomsnittlig våtvekt ble ln transformert. Forskjeller i fiskens kondisjon, behandlingene imellom, ble beskrevet ved lengde-vekt forhold av ln-transformerte data, gitt som en generell allometrisk ligning:

$$(3) \quad \ln W = \ln a + b \cdot \ln TL$$

der *W* er våtvekt (g), *TL* er totallengde (cm) og *a* og *b* er konstanter (Pepin, 1995), og testet vha kovariansanalyse. Leverindeks (*HSI* i %) er beregnet som:

$$(4) \quad HSI = \frac{(LW \cdot 100)}{(W)}$$

der LW er levervekt (g) og W er fiskens våtvekt (g), mens gonadeindeks (GSI i %) er definert som:

$$(5) \quad GSI = \frac{(GW \cdot 100)}{(W)}$$

der GW er gonadevekt (g) og W er våtvekt (g). Ved avslutning av forsøket er forskjeller i vekt, lengde, HSI og GSI , kjønnene og behandlingene imellom, testet ved toveis ANOVA. Ved statistisk testing er det benyttet et signifikansnivå $\alpha < 0,05$ for forskjeller mellom gruppene. I figurene er signifikant forskjellig gruppesnitt (Tukey HSD test) indikert vha ulike bokstaver, med a som høyeste verdi.

Faglige resultater

Inkuberingen forløp greit, noen døde egg og larver (deformerte/tidlige aborterte) ble tappet ut, uten at en kan si at dette avvek fra det en tidligere har observert ved inkubering av torskeegg. Estimert antall larver i inkubatorene ved forsøksstart (15.03.98) var hhv 7000, 5700 og 4700 i kontroll, lav- og høy eksponert gruppene. Dette tilsvarer en overlevelse på ca 30-50 % av individene inkubert i karene. Øvrige resultater vedrørende overlevelse på eggstadiet er tilgjengelig fra en annen del av prosjektet. Torskelarvene målte 4,2 mm ved klekking. Åtte uker seinere hadde de vokst til 19,1 mm. Dette tilsvarer en gjennomsnittlig daglig lengdetilvekst på 0,27 mm (Fig. 1). Larvene og yngelen fra de ulike behandlingene var ikke signifikant forskjellig i lengde eller vekt ved disse to tidspunktene ($p > 0,05$; styrke $> 0,99$ ved 10% forskjell i middellengde; og styrke $> 0,55$ ved 10% forskjell i middelvekt; Fig. 1 og 2). Riktignok ble det funnet noen forskjeller i SL mellom behandlingene på larvestadiet, hhv dag 3, 7, 28 og 35, men disse syntes ikke å være av biologisk betydning (Fig. 1). Larvene i hver av forsøksgruppene begynte å metamorfosere (12 mm) 40 dager gamle. Midlere daglig spesifikk vekstrate for perioden fra dag 7 og frem til yngel av 19,1 mm SL varierte lite mellom behandlingene, 10,7 til 11,2%. Det ble ikke funnet forskjeller i kondisjonsforholdet til larvene fra de ulike behandlingene ($p > 0,9$; Fig. 3).

Gjennomsnittlig overlevelse på larve og tidlig yngelstadiet var høy i alle behandlingene (for torsk å være), hhv 54, 51 og 62% for fisken i kontroll, lav- og høy eksponert gruppene til dag 56 etter klekking (Fig. 4). Det var ingen klare trender i forskjeller mellom behandlingene.

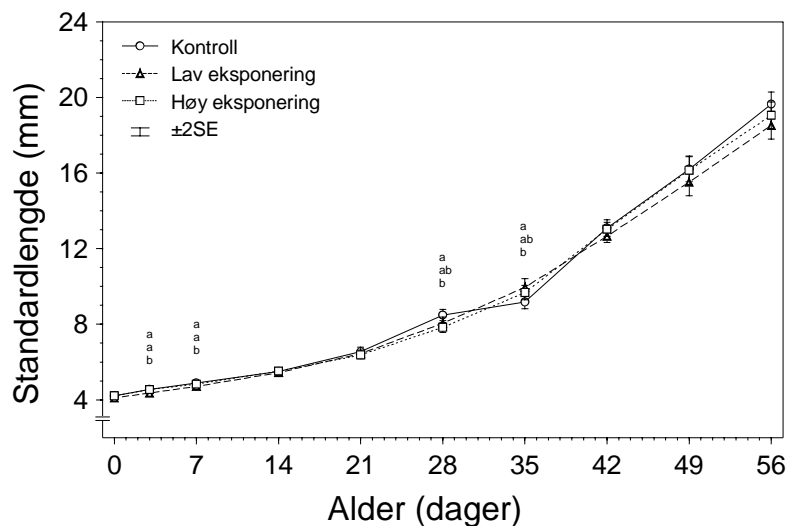


Fig. 1. Gjennomsnittlig standardlengde ved alder for larver og yngel av torsk fra foreldrefisk eksponert til lav og høy konsentrasjon av alkylfenoler, samt en kontrollgruppe. Ulike bokstaver i figuren angir signifikante forskjeller mellom gruppene (Tukey test, $p < 0.05$).

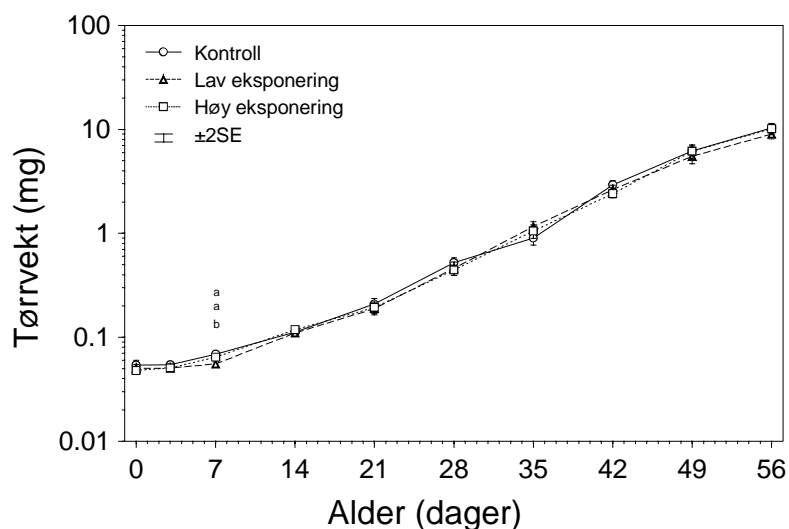


Fig. 2. Gjennomsnittlig tørrvekt ved alder for larver og yngel av torsk fra foreldrefisk eksponert til lav- og høy konsentrasjon av alkylfenoler, samt en kontrollgruppe. Ulike bokstaver i figuren angir signifikante forskjeller mellom gruppene (Tukey test, $p < 0.05$).

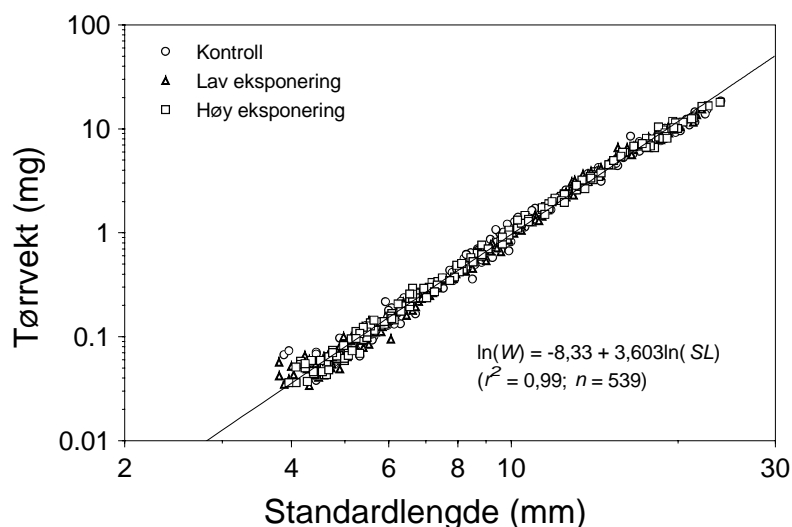


Fig. 3. Lengde-vektforholdet for larver og tidlig yngel av torsk, sortert på behandling. Regresjonsligningen er felles for alle behandlingene.

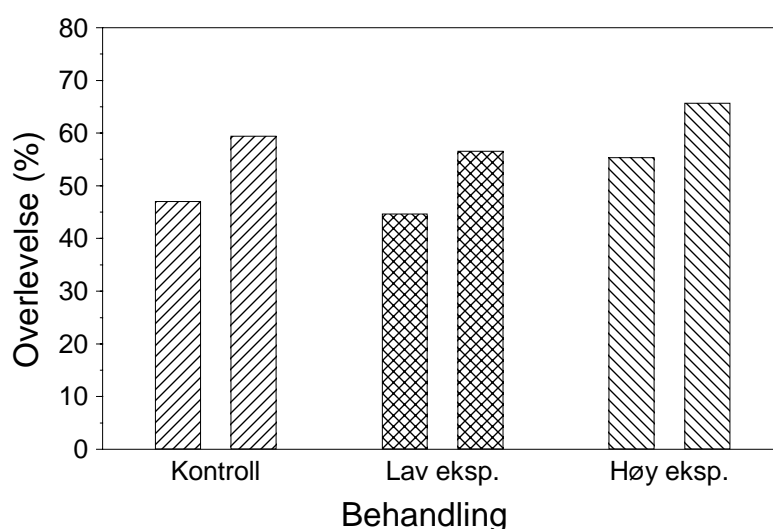


Fig. 4. Overlevelse til dag 56 etter klekking for larver og yngel av torsk fra foreldrefisk eksponert til lav og høy konsentrasjon av alkylfenoler, samt en kontrollgruppe.

Høyre-venstre avvikene i otolittareal var tilnærmet normalfordelte med forventet verdi rundt null, og de oppfylte dermed det første av kravene til analyser av fluktuerende asymmetri. En svak størrelsesavhengig sammenheng mellom størrelse målt som gjennomsnittlig otolittstørrelse og absolutt avvik ble riktignok funnet (regresjon, $r^2 = 0,09$, $p < 0,01$), men det ble ikke vurdert som nødvendig å korrigere for denne tendensen siden det var marginale forskjeller mellom gjennomsnittlig otolittstørrelse i de ulike gruppene. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i høyre-venstre otolittareal mellom de ulike behandlingsgruppene (Fig. 5, ANOVA, $p > 0,1$).

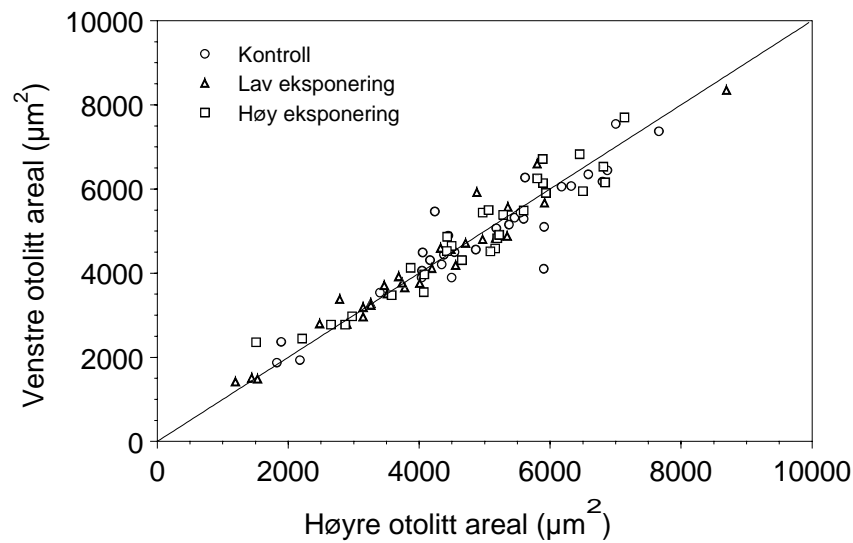


Fig. 5. Forholdet mellom høyre og venstre otolittstørrelse (lapillus) hos larver av torsk fra foreldrefisk eksponert til lav og høy konsentrasjon av alkylfenoler, samt en kontrollgruppe. Linjen angir $y = x$.

Yngelen fra høy eksponert gruppen var signifikant minst både mht lengde og vekt i perioden rundt tørrfôrtilvenning ($p < 0,05$; Fig. 6 og 7). Videre utover i forsøket ble det ikke funnet noen forskjeller hverken mht lengde eller vekt ($p > 0,05$, styrke $> 0,99$ ved 5% forskjell i lengde og vekt ved avslutning). Vekstraten avtok med økende fiskestørrelse gjennom yngelstadiet, men var ikke signifikant forskjellig mellom behandlingene ($p > 0,9$). Fiskens gjennomsnittlig daglig vektspesifikke vekstrate (G) var 6,3% ved en fiskestørrelse på 3 g våtvekt mot 1,2% for yngel av 100 g (Fig. 8). Forholdet mellom vekstrate og fiskestørrelse er uttrykt ved ligningen:

$$(6) \quad \ln(G) = 2,471 - 0,517 \cdot \ln(G_M)$$

der G er gjennomsnittlig daglig vektspesifikk vekstrate (%) og G_M er geometrisk gjennomsnittlig våtvekt i g ($r^2 = 0,92$; $n = 21$).

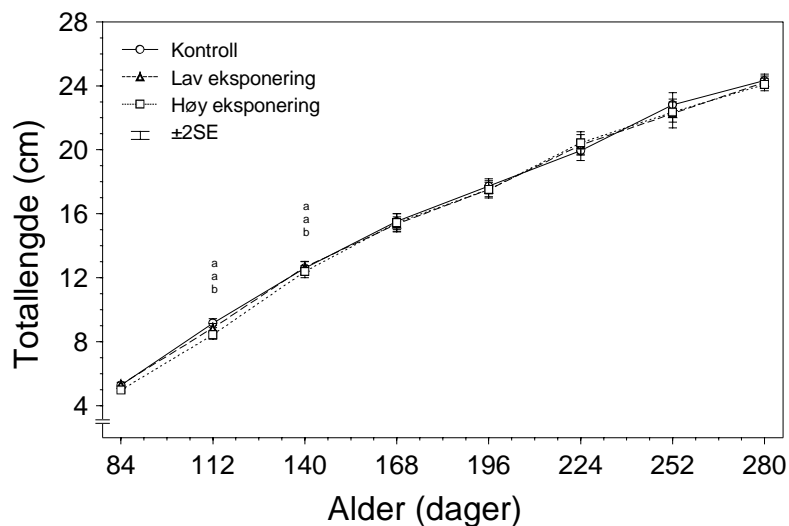


Fig. 6. Torskeyngelens midlere vekst i total lengde ved alder for avkom fra foreldrefisk eksponert til lav og høy konsentrasjon av alkylfenoler, samt en kontrollgruppe. Signifikante forskjeller mellom gruppene er angitt med ulike bokstaver ved respektive prøvetakingstidspunkt (Tukey test, $p < 0.05$).

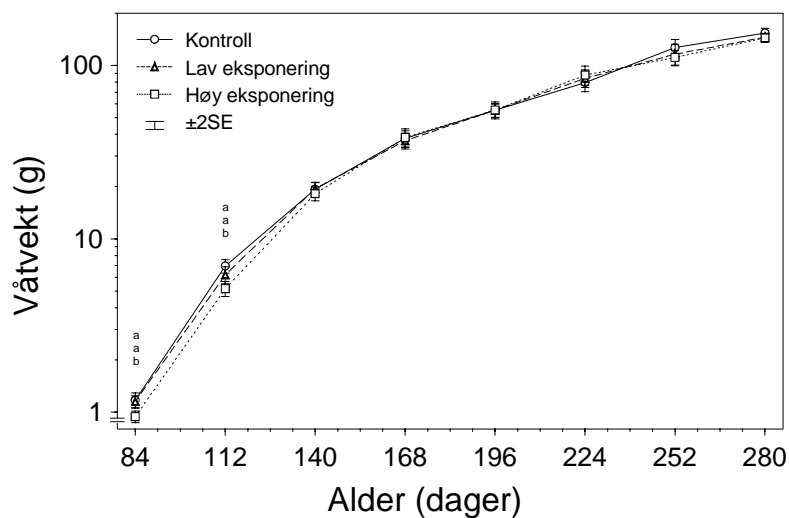


Fig. 7. Gjennomsnittlig våtvekt ved alder for yngel av torsk fra foreldrefisk eksponert til lav- og høy konsentrasjon av alkylfenoler, samt en kontrollgruppe. Signifikante forskjeller mellom gruppene er angitt med ulike bokstaver ved respektive prøvetakingstidspunkt (Tukey test, $p < 0.05$).

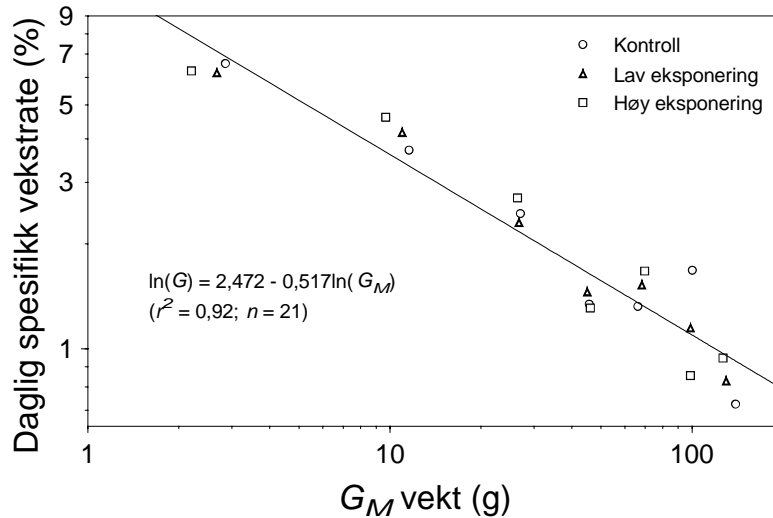


Fig. 8. Forholdet mellom gjennomsnittlig daglig spesifikk vekstrate og geometrisk gjennomsnittlig våtvekt for yngel av torsk fra foreldrefisk eksponert til lav og høy konsentrasjon av alkylfenoler, samt en kontrollgruppe.

Kondisjonsforholdet til yngelen var signifikant forskjellig og avtok med eksponeringsgraden ($p < 0,05$; Fig. 9). Ser en på figuren, fremgår det imidlertid at forskjellene er marginale og i større grad en konsekvens av størrelsen på det statistiske datamateriale ($n = 1440$). Et alternativt kondisjonsmål, Fulton's kondisjonsfaktor, gav verdier på 0,75 ved tørrfôrtilvenning, men økte utover i forsøket for å stabilisere seg rundt 1,0 for fisk mellom 35 og 150 g våtvekt.

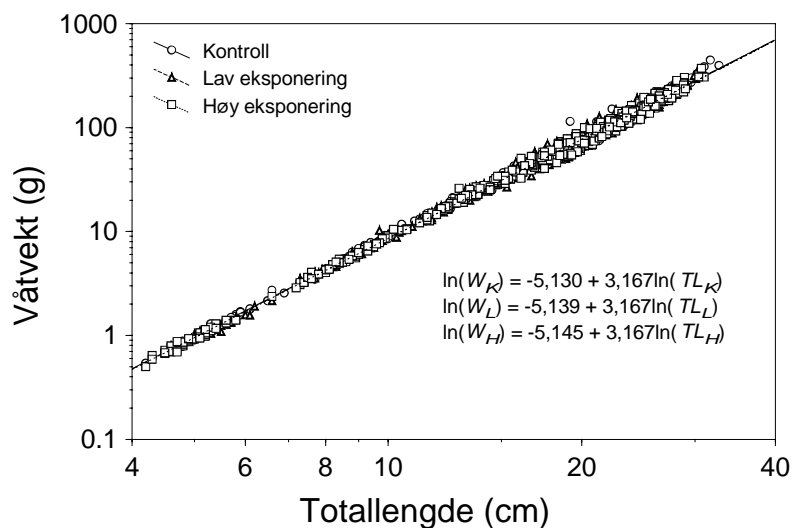


Fig. 9. Lengde-vektforholdet, med gruppe spesifikke regresjonsligninger, for yngel av torsk.

Data på kjønnsdifferensiering viser at det ikke er forskjeller mellom behandlingene og en tilnærmet 1:1 fordeling mellom kjønnene ($P > 0,7$; styrke $> 0,8$ ved 1/3 endring av kjønnsandelen, Tab. 1). Det ble heller ikke funnet signifikante forskjeller hverken mellom kjønnene eller behandlingene, mht lengde, vekt og *HIS* ($p > 0,05$). Gjennomsnittlig leverindeks for yngelen ved forsøkslutt var 8,0%. Yngelens *GSI* var signifikant forskjellig mht kjønn ($p < 0,05$), men ikke mht behandling ($p > 0,05$). Hunnfisken hadde en høyere gonadosomatisk indeks sammenlignet med hannfisken. *GSI* verdiene var likevel lave for begge kjønnene, varierte mellom 0,27 og 0,33% for hunnfisk og 0,05 og 0,28% for hannfisk, noe som tyder på at svært få av fiskene ville kjønnsmodne som 1-åringer. Det ble ikke påvist noen interaksjonseffekter mellom kjønn og behandling i dette forsøket.

Tab. 1. Forholdet mellom hunn- og hannfisk, totallengde, våtvekt, leverindeks og gonadosomatisk indeks for de ulike behandlingene ved avslutningen av forsøket.

Behandling	Kjønnsfordeling	Totallengde (cm)	Våtvekt (g)	<i>HIS</i> (%)	<i>GSI</i> (%)
Kontroll	95 hunnfisk	24,0	143,0	8,0	0,27
	105 hannfisk	24,6	163,5	8,8	0,23
Lav eksp.	95 hunnfisk	23,9	141,4	7,2	0,31
	105 hannfisk	24,4	149,0	8,5	0,28
Høy eksp.	97 hunnfisk	24,1	144,7	8,1	0,33
	103 hannfisk	24,1	143,9	7,6	0,05

Overlevelsen gjennom yngelperioden var høy, hhv 93, 94 og 95% for fisken i kontroll, lav- og høy eksponert gruppene. Kannibalisme utgjorde fra 0,8 til 2,4% av dødeligheten i gruppene.

Oppsummering

En oppsummering av de viktigste resultatene viser at det er ingen ting som tyder på at eksponering til alkylfenoler hos foreldrefisk i dette forsøket har påvirket vekst og overlevelse hos avkommet, hverken for larver eller yngel. Data på kjønnsdifferensiering (tilnærmet 1:1 fordeling mellom kjønnene) tyder heller ikke på at det har forekommet noen hormonelle innvirkninger eller generasjonseffekter på kjønnsdifferensiering hos torsk i dette forsøket. Videre er det ingen tegn til endringer i morfologisk otolitt symmetri på larvestadiet mht eksponering. Valg av eksponeringsmetode, dose og tidspunkt relatert til fiskens utviklingsstadium vil selvsagt kunne påvirke resultatene. Særlig bør en anta at en direkte eksponering av larver og tidlig yngel til alkylerte fenoler i perioden før og rundt selve kjønnsdifferensieringen kan være kritisk.

Referanser

Bagenal, T.B. and Tesch, F.W. 1978. Age and growth. - Pp. 101-136 in T. Bagenal (ed), *Methods for assessment of fish production in fresh waters*. IBM Handbook No. 3, 3rd. edition. Blackwell Scientific Publications. Oxford.

Hintze, J.L. 1996. *PASS 6.0 user's guide*. NCSS. Kaysville, Utah. 245 pp.

Houde, E.D. and Schekter, R.C. 1981. Growth rates, rations and cohort consumption of marine fish larvae in relation to prey concentrations *Rapports et Procès-verbaux des Réunions. Conseil international pour l'Exploration de la Mer* 178:441-453.

Pepin, P. 1995. An analysis of the length-weight relationship of larval fish: limitations of the general allometric model. *Fishery Bulletin U.S.* 93: 419-426.

Somarakis, S., Kostikas, I. and Tsimenides, N. 1997. Fluctuating asymmetry in the otoliths of larval fish as an indicator of condition: conceptual and methodological aspects. *Journal of Fish Biology*. 51: 30-38.