



UPPSALA
UNIVERSITET

Påverkas mörtars reproduktiva förmåga av användandet av läkemedel som innehåller östrogen?



Viveka Törnqvist

Independent project in biology

Självständigt arbete i biologi, 15 hp, ht-13

Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Påverkas mörtars reproduktiva förmåga av användandet av läkemedel som innehåller östrogen?

Viveka Törnqvist

Självständigt arbete i biologi 2013

Sammandrag

Det släpps ut mycket hormoner i våra avlopp idag på grund av ett stort användande av läkemedel som bland annat innehåller östrogen. Detta östrogen sprids i miljön och stör olika organismers hormonsystem. Det sprids särskilt mycket i vattenmiljöer och stör djurlivet där. Mörtar och andra fiskar påverkas i hög grad av östrogen i miljön. Hanarna påverkas genom att de blir feminiserade och får könsorgan som liknar honornas. De får äggceller i testiklarna och kan även få andra delar av honliga könskörtlar. Även sädesledaren hos dessa fiskar blir missbildad eller saknas helt. De här fiskarna är intersexuella, vilket innebär att de både har honliga och hanliga könsattribut. Effekten på honor är bland annat en reducerad äggläggning. Fiskarnas endokrina system störs också, vilket sker hos båda könen. De får på grund av detta exempelvis en ökad nivå av ägguleproteinet vitellogenin, som normalt endast uttrycks hos honor och en störd tillväxt. Den största effekten av östrogenet i miljön är att fiskarnas reproduktiva förmåga påverkas negativt, vilket även kan ge negativa effekter på mörtpopulationer i stort. Det är ett tydligt samband som visar att en ökad grad av intersexualisering hos hanarna ger ett minskat antal lyckade befruktningar.

Problemet med östrogen i vattenmiljön finns utspritt i hela världen. Idag görs det inte tillräckligt mycket för att förhindra problemet, trots att det får stora negativa konsekvenser hos fiskar. Det krävs en förbättrad rening av hormoner och hormonstörande ämnen från avloppsvattnet. Detta görs i en utsträckning som är långt ifrån tillräcklig. Det här arbetet ska ge en översikt över hur fiskar, med mörtar i centrum, påverkas av östrogenet som sprids i miljön, för att få en insikt i de stora negativa effekterna av användandet av läkemedel som innehåller östrogen.

Inledning

I naturen finns det många ämnen som stör hormonernas väg i våra kroppar, vilket påverkar hela djurlivet inklusive människor. Särskilt påverkat är vattenmiljön (Jobling *et al.* 1998). Hormonstörande ämnen, eller så kallade EDCs (Endocrine Disrupting Chemicals), är naturliga eller syntetiserade ämnen som kan störa hormonets transport, metabolism, syntes, bindning till receptorer och sekretion. På så sätt störs flera av kroppens system, såsom homeostas och reproduktiva system (Segner *et al.* 2003).

Tvåkönade mörtar

Intersexuella mörtar (*Rutilus rutilus*) i vilda populationer hittades för första gången på 1990-talet i floder i Storbritannien. Att fiskarna är intersexuella innebär att de är hermafroditer, alltså att de har könsorgan som är karaktäristiska för både honor och hanar. I det här fallet handlade det om hanfiskar som blivit feminiserade. De hade i olika grad utvecklat honliga könskaraktärsdrag, såsom oocyter (äggceller) i testiklarna samt delar av äggledare. Effekterna visade sig bero på hormonsstörande östrogener och östrogenliknande ämnen som finns i vattnet och stör fiskarnas utveckling (Jobling *et al.* 1998). Det är främst vid avloppsvatten från reningsverk som man har hittat de här effekterna hos fiskar. Fenomenet finns på flera ställen i Europa, förutom Storbritannien även i till exempel Frankrike och Tyskland. Även i andra delar av världen har fenomenet uppstått, som i Japan och USA (Tyler & Jobling 2008, Lange *et al.* 2009).

Östrogen är en grupp av hormoner. Det man har hittat i avlopp från vattenreningsverk är framförallt det naturliga östrogeten 17- β -östradiol (E2) och det syntetiska 17- α -etinylostradiol (EE2), som är en potent östrogenagonist och huvudkomponenten i p-piller. I avloppsvatten råder det en blandning av östrogener och östrogenliknande ämnen, som alla kan påverka djurlivet. Framför allt är det dock EE2 som har kopplats till feminiseringen av fisk (Sumpter & Jobling 1995, Desbrow *et al.* 1998, Lange *et al.* 2009).

I vattenmiljöer har det, förutom östrogener, även hittats så kallade xenoöstrogener, som är syntetiserade kroppsfrämmande ämnen som liknar östrogen. De har en liknande effekt i kroppen som östrogen och därför stör dessa ämnen östrogetens naturliga väg i kroppen. Exempel på xenoöstrogener är det tidigare brett använda insektsmedlet DDT, dess metabolit DDE och vissa PCB:er (Routledge & Sumpter 1997). Även bisfenol A och ftalater, ämnen som stör östrogenreceptorerna, har hittats i utsläpp från vattenreningsverk (Jobling *et al.* 1998) och har hormonstörande effekter på vattenlevande organismer.

Mörtar, andra fiskar och andra organismer som påverkas av östrogen i miljön

Den sötvattenslevande karpfisken mört är en fisk som lever i kalla vatten. Det är också en långlivad fisk som kan bli mer än 10 år gammal (Paull *et al.* 2008, Tyler & Jobling 2008). Mörtar är allätare som bland annat äter insekter, växt- och djurplankton (Kahl & Radke 2006). Mörtar är en av de fiskarter som vanligen används för att övervaka vildlevande fiskars påverkan av kemikalier i miljön. Andra sådana arter är karp (*Cyprinus carpio*) och storspigg (*Gasterosteus aculeatus*). På laboratorier används ofta knölskallelöja (*Pimephales Promelas*) och zebrafisk (*Danio rerio*) (Lange *et al.* 2012).

Det är inte bara mörtar som påverkas av östrogener, utan det sker en allmän feminisering av hanfiskar som utsätts av EE2, det syntetiska östrogeten. Utvecklingen av könsorganen störs med bland annat försenad spermatogenes (då spermier utvecklas) och missbildade gonader (könskörtlar) som effekt. Exponering av EE2 leder också till att hanfiskar får honliga könskaraktärsdrag, som de beskrivna för mörtar (Segner *et al.* 2003, Kidd *et al.* 2007). EE2 kan ge stora konsekvenser för hela populationer av fiskar. Detta visas av Kidd *et al.* (2007) som exponerade en sjö för EE2 för att se hur fiskar påverkades och för att se effekterna på en fiskpopulation. Exponeringen ledde till att populationen av karpfisken knölskallelöja kollapsade.

Det flesta studier om hormonstörande ämnen har utförts på vertebrater, främst på benfiskar. Trots att evertrebrater utgör en viktig del i akvatiska ekosystem finns det få studier som visar hur de påverkas av EDCs. Det har dock visats att även mollusker, genom modelldjuret stor dammsnäcka (*Lymnea stagnalis*), påverkas av EE2 med bland annat en förändrad äggläggning som följd (Segner *et al.* 2003).

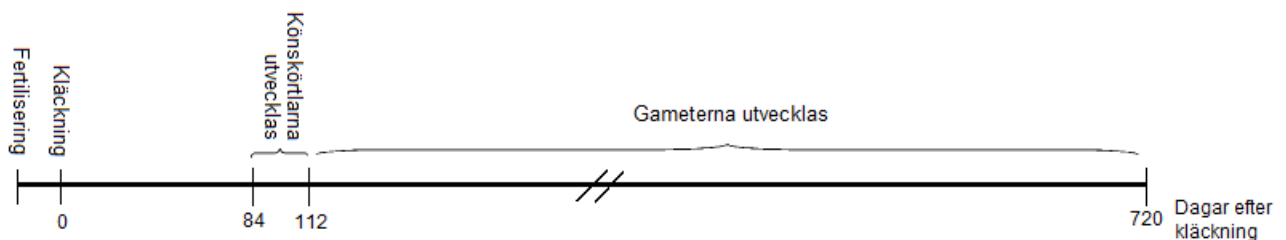
Syfte

Människor påverkar miljön genom vårt stora användande av läkemedel. Exempelvis använder många kvinnor idag läkemedel som innehåller östrogen, såsom p-piller och läkemedel mot klimakteriebesvär. Dessa blir hormonstörande för djur då de kommer ut i miljön. Syntetiska hormoner, som EE2, kan ge stora effekter på fiskar, såsom de tvåkönade mörtarna. Det här kommer undersökas detta närmare i detta arbete utifrån huvudfrågan om mörtars reproduktiva förmåga påverkas av östrogen i miljön. Vilka åtgärder som finns och görs för att motverka det här problemet kommer också att belysas. För att få en bättre helhetsbild kommer även paralleller till de andra modellfiskarna, som nämnts ovan, att göras.

Mörtars kön och sexuella utveckling

Sexuell differentiering

Den sexuella differentieringen (könskörtlarnas utveckling) hos mörtar sker i två steg som till viss del kan överlappa varandra. Först utvecklas könskörtlarna och sedan gameterna (könscellerna). Gametogenes innebär gameternas utveckling och innefattar oogenes eller spermatogenes, då de honliga gameterna, oocyter, respektive de hanliga gameterna, spermier, utvecklas. Denna process, särskilt oogenesen, sker under inverkan av östrogen. Den sker under en period som startar strax efter kläckning och fortgår cirka 720 dagar (Lange *et al.* 2009) (figur 1). Mörtens sexuella mognad sker under en lång tid, vilken hos vilda mörtar kan pågå upp till fyra år (Paull *et al.* 2008).



Figur 1. Sexuell differentiering hos mörtar. Den sker i två steg, först utvecklas könskörtlarna, sedan produceras gameterna under gametogenesen. Omritat efter Lange *et al.* (2009).

Mörtars gonader

Både hanliga och honliga könsorgan, testiklar respektive äggstockar, innefattar parade delar som finns på varsin sida av simblåsan (Paull *et al.* 2008). Hanar har en könsledare, sädesledaren, som sitter på gonadens dorsala sida (sidan som är upp mot ryggen). Deras testiklar sitter fast i kroppsväggen med så kallade mesorchium. Honorna har en motsvarande mesovarium som fäster honornas två könsledare, äggledare, i kroppsväggen. Äggledarna sitter på ett sätt så det bildas ett hålrum, ett äggstockshålrum, på gonadens dorsala sida. Detta hålrum varierar i storlek beroende på säsong och har som tjockast väggar under lekperioden (Nolan *et al.* 2001, Paull *et al.* 2008).

Östrogens påverkan på mört

Hormonella förändringar

Det är flera hormonella system hos fisken som påverkas och störs då den exponeras för östrogener i miljön. Flores-Vaverde *et al.* (2010) har visat att EE2 är en EDC då det kan störa fiskarnas homeostas för både honliga och hanliga könssteroider. Högre koncentration av EE2 i gallan, som är relaterad till en högre plasmakoncentration av EE2, står i samband med minskning av koncentrationerna av östron och E2, två av kroppens naturliga östrogen, och även minskning av testosteron i testiklarna. Detta visar att det sker en störning i steroidernas biosyntes. Filby *et al.* (2006) menar att en minskning av steroidutsöndring hos hanfiskarna kan bero på negativ feedback av östrogenet på hypofysens utsöndring av FSH (follikelstimulerande hormon) som stimulerar steroidutsöndringen. Då fiskar exponeras av E2 påverkas receptorer för könssteroider i alla körtlar utom i hjärnan. Även EE2 ändrar uttrycket av steroidhormoners receptorer (Filby *et al.* 2007).

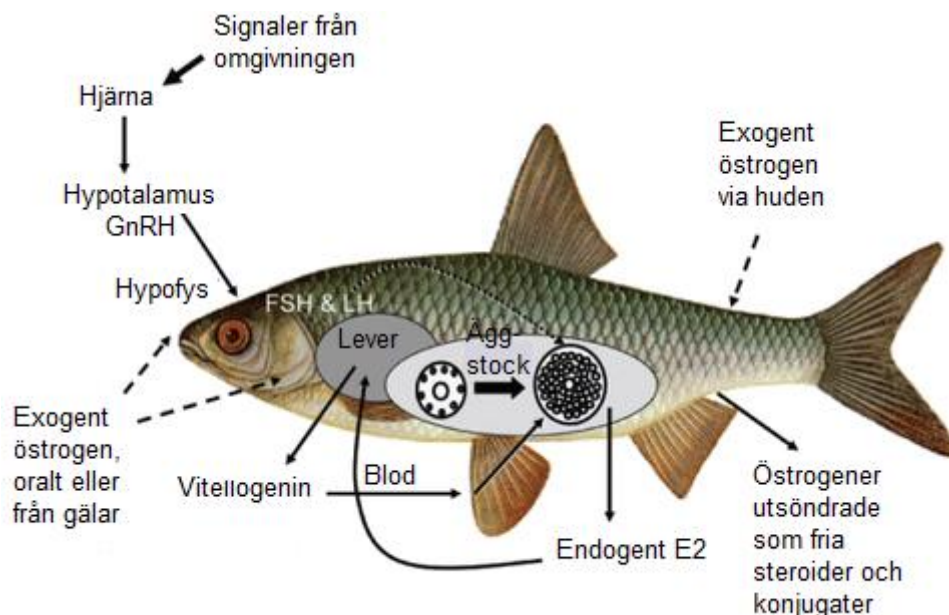
Flertalet endokrina vägar påverkas av exogen exponering av östrogen. Detta innebär att flertalet fysiologiska system påverkas, inte bara det reproduktiva systemet. Bland annat blir det effekter på tillväxten, interrenala funktioner och funktioner för sköldkörteln (Filby *et al.* 2006). Interrenala körteln är en steroidproducerande körtel som finns hos många benfiskar,

däribland mört, och har en motsvarande funktion som binjuren har hos däggdjur (Chou *et al.* 2013).

Filby *et al.* (2007) har även gjort en undersökning som visar att knölskallelöja får en nedreglering av mRNA för GHR (tillväxtshormonsreceptorer) i levern vid exponering av EE2. Den endokrina regleringen för GH sker genom hypotalamus, hypofysen och sköldkörteln, som är den som i slutändan utsöndrar GH. EE2 påverkar denna endokrina väg. Även IGF-1 (insulinlik tillväxtfaktor 1) påverkas av EE2-exponering. IGF-1-regleringen sker genom hypotalamus, hypofysen och den interrenala körteln och även denna endokrina väg påverkas av EE2. Nivåerna av GH och IGF-1 kommer genom dessa mekanismer att ändras. Då de här hormonerna påverkar flera viktiga fysiologiska processer, såsom osmosregleringen, utveckling, tillväxt, beteende, reproduktion och immunologiska funktioner (Filby *et al.* 2007), kan nivåändringar hos dem förklara fiskarnas tillväxtförändringar.

Vitellogenin

Vitellogenin är ett honligt protein som vanligtvis inte uttrycks hos hanfiskar. Det finns många studier som visar att hanmörta uttrycker vitellogenin vid exponering av E2, EE2, andra östrogener eller östrogenliknande substanser. Även honfiskar får en ökad plasmakoncentration av proteinet vid exponering (bl a Jobling *et al.* 1998, MacLatchy *et al.* 2003, Filby *et al.* 2006, 2007, Lange *et al.* 2009). Vitellogenin syntetiseras i levern och lagras som äggula hos honorna. Hanar syntetiserar vitellogenin då de utsätts för exogent östrogen i miljön och ackumulerar det i blodplasman (Tyler & Jobling 2008) (figur 2). Det råder ett dos-effektförhållande, det vill säga att plasmakoncentrationen vitellogenin hos fiskarna ökar med en ökad EE2-dos (Pawlowski *et al.* 2004). Detta har lett till att plasmakoncentrationen av vitellogenin används som en biomarkör för att påvisa huruvida fisken har blivit exponerad för östrogener och i så fall i vilken grad. Vitellogenin är den indikator som är vanligast att använda för att påvisa östrogenexponering (Jobling *et al.* 1998).



Figur 2. Vitellogenesis i mört. De heldragna pilarna visar den naturliga vägen för vitellogenin hos honmört. Hypotalamus utsöndrar GnRH (gonadotropinfrisläppande hormon) som gör att hypofysen utsöndrar FSH och LH (follikelstimulerande hormon och luteiniserande hormon) vilket stimulerar äggstockarna att producera östrogen (hypotalamus-hypofys-äggstock-endokrina axeln). Östrogen inducerar syntes av vitellogenin i levern, som sedan transporteras till äggstockarna. De streckade pilarna visar exponering för exogent östrogen. Omritad efter Tyler och Jobling (2008).

HSI och GSI

Hepatosomatiskt index, HSI, betecknar leverns massa i förhållande till den totala kroppsmassan. Det har visats att honmörtar får ett större HSI när de har en större plasmakoncentration av EE2 i sina kroppar (Flores-Valverde *et al.* 2010). Då syntesen av vitellogenin sker i levern på fiskar (Sumpter & Jobling 1995, Tyler & Jobling 2008) kan en ökad leverstorlek bero på en ökad syntes av vitellogenin, vilket är östrogenberoende (Flores-Valverde *et al.* 2010) (figur 2).

Det finns även ett gonadsomatiskt index, GSI, som anger könskörtelns storlek i förhållande till den totala kroppsmassan. GSI-värdet hos både hanar och honor har visat sig ha ett samband till plasmakoncentrationen av EE2. En högre EE2-koncentration ger ett lägre GSI. Ett sänkt GSI-värde innebär att fiskarna har mindre könskörtlar i förhållande till kroppsmassan än normalt (Liney *et al.* 2005, Flores-Valverde *et al.* 2010).

Kritiska perioder och irreversibla effekter

I ett EU-finansierat projekt som genomfördes i början av 2000-talet, IDEA – Identification of Endocrine Disrupting Effects in Aquatic organisms, testades bland annat EE2-exponering av de nivåer som kan hittas i miljön, 0,05-40 ng EE2 L⁻¹, på olika organismer. Det gjordes bland annat livscykeltest på zebrafisk (Segner *et al.* 2003). Zebrafisken är liksom mörtan en karpfisk. De resultat som framgick i undersökningen liknar de resultat som framkommer i flera andra studier: ökad plasmakoncentration av vitellogenin, försenad start för lek och färre lyckade befruktningar. Honor producerade färre ägg och hanar utvecklade honliga könskörtlar och testiklar innehållandes äggceller (Jobling *et al.* 1998, Segner *et al.* 2003, Filby *et al.* 2007).

IDEA-projektet visade också att fiskarna var mer känsliga för exponering för EE2 under en specifik kritisk period under utvecklingen än i vanliga fall. Fiskarna hade denna kritiska period under den sexuella differentieringen, under könskörtlarnas utveckling (figur 1). Detta är en labil period hos fiskarna då de är som mest känsliga för endokrina störningar i allmänhet (Jobling *et al.* 1998, Segner *et al.* 2003). Då den sexuella differentieringen hos fiskar sker under inverkan av östrogen, kan östrogen och östrogenliknande ämnen i miljön ge stora effekter på fiskarnas utveckling, såsom ändrad reproduktiv förmåga hos vuxna individer (Segner *et al.* 2003, Lange *et al.* 2009).

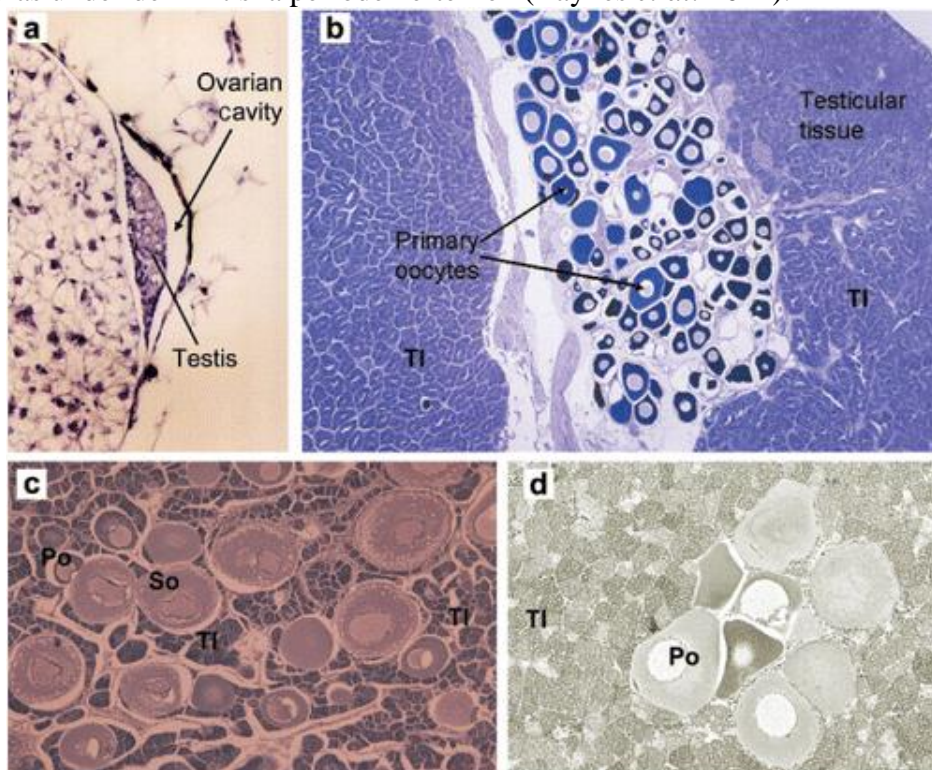
När zebrafiskarna i IDEA-projektet utsattes för 10 ng EE2 L⁻¹, från att de var fertiliserade ägg till vuxenstadiet, blev deras reproduktion helt inhiberad. Både parningsbeteende och lek uteblev. Fiskarna flyttades till vatten utan kontaminering av EE2 då de uppnått vuxenstadiet för att se hur reversibla effekterna var. Fiskarna inledde sin lekperiod efter en tid i det icke kontaminerade vattnet – alltså var den effekten reversibel. Däremot var plasmakoncentrationen av vitellogenin fortfarande förhöjd, gonaderna fortfarande strukturellt missbildade och antalet lyckade befruktningar fortfarande förminskat. Fiskarna blev inte helt återbildade då exponeringen för EE2 upphörde, vissa av effekterna var irreversibla. Skedde exponeringen under den kritiska perioden var risken alltså större för irreversibla effekter (Segner *et al.* 2003). Det är dock inte bara under den sexuella differentieringen som mörtar är extra känsliga för östrogenexponering. Baynes *et al.* (2012) märkte i sin studie att även vuxna hanar kan utveckla oocyter i testiklarna. Precis efter den årliga leken har hanarna en återväxt av testiklarna. Detta är också en kritisk period då fiskarna är extra känsliga för hormonstörande ämnen.

EE2 är ett mycket potent östrogen; det krävs alltså bara små koncentrationer för att ge en effekt, särskilt då exponeringen av EE2 sker under kritiska utvecklingssteg. Det kan räcka med $0,3 \text{ ng L}^{-1}$ för att mörtar ska störas i den normala sexuella utvecklingen och på grund av detta få en ökad känslighet för östrogen senare i livet, vilket då kan påverka mörtens hälsa negativt (Lange *et al.* 2009). Undersökningar visar att EE2 är 11-27 gånger mer potent än E2 hos fiskar (Thorpe *et al.* 2003).

Reproduktiva konsekvenser

Feminisering av hanmörta

En effekt av östrogen, östrogenliknande ämnen och xenoöstrogen i avlopp och vattendrag är, som nämnts ovan, att hanfiskar blir feminiserade. Fiskarna blir alltså intersexuella. Könskörtlarna hos dessa intersexuella individer karaktäriseras av att de har oocyter i testikelvävnaden och/eller delar av en äggstock eller äggstockshålrum. (Jobling *et al.* 1998, Lange *et al.* 2009) (figur 3). De intersexuella fiskarna har alltså både karaktäristiska hanliga och honliga könsattribut. Detta fenomen har hittats både i vilda populationer som lever vid utlopp för reningsverk (Jobling *et al.* 1998) och i laborativa försök där fiskar exponerades för östrogen (Segner *et al.* 2003) och båda fallen visar att det är just östrogen och östrogenliknande ämnen som ger denna effekt. Lange *et al.* (2009) visar i en studie gjord *in vitro* (med mörtar i tankar på ett laboratorium) att då mörtar exponerats av $4,0 \text{ ng EE2 L}^{-1}$ under en dryg tvåårsperiod hade alla fiskar utvecklat en äggstocksmorfologi. Alla fiskar i studien hade alltså blivit feminiserade, dock med olika grad av honliga gonaddelar. Feminisering av fiskar sker när de blir exponerade av östrogenliknande ämnen under en lång tid, om exponeringen sker under fiskarnas sexuella differentiering (Liney *et al.* 2005) eller om de exponeras under den kritiska perioden efter lek (Baynes *et al.* 2012).



Figur 3. Histologiska sektioner av fenotypen i testiklarna i olika grads intersexualitet hos mörtar **a.** En normal testikel förutom närvaro av äggstockshålrum (ovarian cavity). **b.** En allvarlig grad av feminisering, där primära oocyter finns i testikeln. **c.** En allvarlig grad av feminisering, med både primära oocyter, Po, och sekundära oocyter, So. **d.** En medelsvår feminisering, några primära oocyter vid vissa punkter i testikeln. TI står för testikellobber. Med tillstånd från Tyler och Jobling (2008).

Feminiseringen sker genom olika processer som bland annat innefattar minskning av testosteronproduktion, ökad plasmakoncentration av vitellogenin, ökad plasmakoncentration av östrogener, minskad GSI (i koncentrationer över 10 ng EE2 L⁻¹), minskad storlek på testiklarna, minskad spermatogenes och, som nämnts ovan, olika delar av typiska honliga gonader (figur 3) (Jobling *et al.* 1998, MacLatchy *et al.* 2003, Pawlowski *et al.* 2004).

Hos fiskar kan feminiseringen även ske på grund av att aktiviteten av östrogen ökar, vilket i sin tur beror på den förändrade aktiviteten hos flera olika enzymer som exponering av EE2 ger. Exempelvis ökar EE2 uttrycket av CYP19-gener, som kodar för cytokrom P450-aromatas, vilket är ett enzym som katalyserar biosyntesen av östrogen. Testosteron och andra androgener omvandlas till östrogen genom flera steg. Det sista steget katalyseras av cytokrom P450-aromatas och är det steg som begränsar hastigheten på biosyntesen (Filby *et al.* 2007, Lange *et al.* 2008). Ju mer EE2 som finns närvarande, desto aktivare CYP19 och mer E2 kommer att omvandlas från testosteron, vilket kan öka feminiseringen.

Oocyter i testiklarna

I en undersökning av Nolan *et al.* (2001) kom författarna fram till att den vanligaste formen av intersexualitet hos mörtar var oocyter utspridda i testikelvävnaden. Oftast var det primära oocyter, det stadiet där meios I sker, som var utspridda för sig själva eller i kluster. Ibland var det både primära och sekundära oocyter, där meios II sker, som satt tillsammans (figur 3). Enskilda oocyter stör inte testikelns struktur i övrigt. Däremot skapades det hos vissa intersexuella fiskar hålrum längs med testiklarna där det ansamlades oocyter som packades tätt tillsammans, vilket liknade organisationen i äggstockar hos honorna. Dessa äggfyllda hålrum varierar i storlek och i antal oocyter och stör strukturen i testikelloberna betydligt mer än enskilda oocyter på grund av den stora volymen de upptar. Detta är en mer extrem form av feminisering, då gonadvävnaden till stor del består av äggstocksvävnad (Nolan *et al.* 2001).

Missbildningar på sädesledare

Nolan *et al.* (2001) visade också att det hos allvarligt feminiserade mörtar ofta förekom en missbildad sädesledare, som hade en reducerad storlek eller var blockerad utan något slut. Detta fenomen förekom hos de flesta intersexuella mörtar som hade oocyter i testiklarna. I några av dessa fall hade delar av sädesledaren blivit en del av väggen till ett äggstockshålrum. Hos några av de mest allvarligt intersexualiserade fiskarna hade sädesledaren helt försvunnit och ersatts av äggstockshålrum. I samma undersökning fann de även intersexuella mörtar med två sädesledare i en gonad, vilket är ett tecken på feminisering då hanfiskar annars endast har en sädesledare medan honor har två äggledare.

Reproduktionsförmågan hos feminiserade fiskar

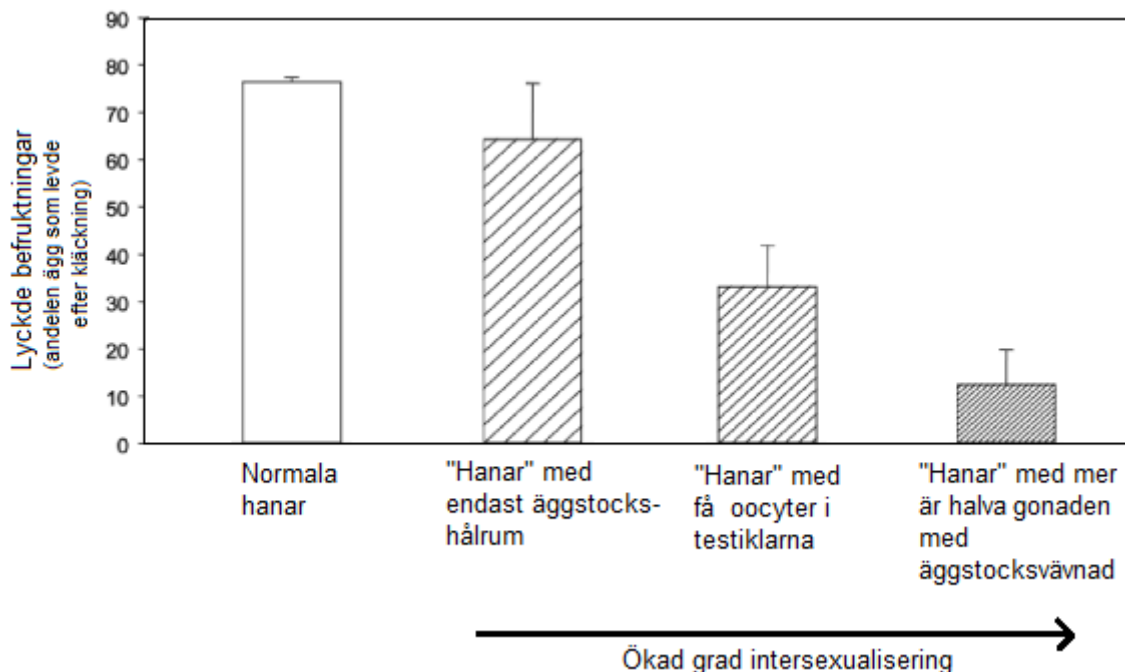
Flera undersökningar visar att feminiserade fiskar har sämre reproduktionsförmåga. Allvarlig feminisering, då både oocyter i testiklarna och äggledare finns närvarande, ger det lägsta antalet lyckade befruktningar (Jobling *et al.* 2002, Harris *et al.* 2010). Jobling *et al.* (2002) visar att minskningen av lyckade fertiliseringar kan gå från 81,4 % hos de vanliga hanarna till 22,3 % hos de mest intersexualiserade mörtarna. Det finns ett negativt samband mellan lyckade befruktningar och graden av intersexualisering hos fisken (figur 4). Minskningen av lyckade befruktningar handlar mycket om problem under embryoutvecklingen, men det sker även färre lyckade kläckningar.

Spermiekvalitet på feminiserade mörtar

Fiskarna får både försämrad kvalitet och en förminskad kvantitet på sina spermier vid feminisering. Spermier från grovt feminiserade fiskar simmar med en nästan 50 % reducerad

hastighet jämfört med de från de mindre feminiserade fiskarna. Även spermimobiliteten har visat sig bero på graden av intersexualitet, mobiliteten minskade med ökad feminisering (Jobling *et al.* 2002).

Det var färre intersexuella fiskar som vid lek släppte ifrån sig mjölke. De som inte gjorde det antogs vara sterila. De intersexualiserade fiskarna som fortfarande hade mjölke producerade mindre mängd än de normala hanarna, en skillnad som uppgick till 50 %. Även spermiedensiteten i mjölken minskade med ökad intersexualisering (Jobling *et al.* 2002). Spermatogenesisen blev i hög grad inhibiterad vid grov intersexualitet (Nolan *et al.* 2001). Intersexuella mörtar har alltså mindre mjölke, färre spermier i mjölken samt långsammare och mindre mobila spermier än normala hanmörtar.



Figur 4. Lyckade befruktningar i förhållande till grad av intersexualisering hos vilda mörtar, från hanar som endast har äggstockshållrum vid sidan av testikeln och hanar med några få oocyter (äggceller) till hanar där 50 % eller mer av gonaden är äggstocksvävnad. Ju mer intersexualiserade fiskarna är, desto sämre fertilitet. Omgjord efter Tyler och Jobling (2008).

De flesta feminiserade fiskarna deltar i lek, men det är färre feminiserade fiskar än normala hanar som reproducerar sig. Förutom att feminiserade fiskar har minskad kvalitet på sina spermier, missbildade gonader och oocyter i testiklarna som stör deras struktur (Jobling *et al.* 2002), påverkar flera andra variabler fortplantningsförmågan hos hanfiskar. Hanarnas längd och genetiska skillnader spelar också in i huruvida de lyckas reproducera sig (Harris *et al.* 2010). Fiskarnas längd har också påvisats påverkas av EE2. Fiskar som exponeras av stor mängd EE2 blir kortare än normalt (Parrott & Blunt 2005), vilket i sin tur alltså kan påverka huruvida de lyckas reproducera sig.

Effekter på honor

Det har även observerats effekter på honor av EE2-exponering, även om de effekterna inte är lika stora som hos hanarna. Honorna får, liksom hanarna, en ökad plasmakoncentration av proteinet vitellogenin. De får också en minskad storlek på äggstockarna, vilket har visats i studier på både mörtar och andra karpfiskar som exponerats av E2 och EE2 (Parrott & Blunt 2005, Filby *et al.* 2006, 2007, Lange *et al.* 2009).

Timing för när honors gameter utvecklas blir störd vid exponering för östrogen. De förändringar som Lange *et al.* (2011) spårade hos honors gametogenes var antingen en fördröjd mognad, då de fick ägglossning våren efter att de borde, eller att mognaden skedde för tidigt. Detta kan leda till att populationer i det vilda reproducerar sig i en minskad utsträckning. Vanligtvis förökar sig mörtar en gång per år. Detta sker på våren, från sent i april till tidigt i maj. Utvecklas inte gameterna till dess eller om de utvecklas för tidigt, kommer inte befruktning kunna ske. I denna undersökning var det dock omöjligt att veta huruvida honorna som påvisade detta fenomen var tidigare hanar som feminiserats, eller om de var födda som honor. Anledningen till den här ändrade mognadsprocessen kan vara att det endokrina systemet förändras och därför inte fungerar som det ska, eller att de saknas riktiga hanar i populationen som driver synkroniseringen i den slutliga mognaden (Lange *et al.* 2011).

Parrott och Blunt (2005) bedrev forskning på knölskallelöja där de utsatte fiskarna för olika koncentrationer av EE2 för att undersöka reproduktionsförmågan. Honorna i de lägsta koncentrationerna (0,32 respektive 0,96 ng EE2 L⁻¹) producerade fler ägg än kontrollfiskarna under avelsperioden. Antal lyckade befruktningar var trots detta lägre för denna grupp. Antalet ägg honorna lade spelade alltså ingen roll i hur lyckosam reproduktionen blev. Detta kan bero på att antalet hanar hade reducerats på grund av feminisering. Hos honor som exponerades för vatten med högre koncentration av EE2 (3,5 - 23 ng L⁻¹) uteblev äggläggningen helt. Detta kan bero på att den endokrina regleringen för östrogen hos fisken störs och det blir negativ feedback för gonadotropinutsöndringen (Gunnarsson *et al.* 2009). Detta leder till minskad utsöndring av GnRH, FSH och LH vilket gör att östrogensyntesen i äggstockarna inhiberas (se figur 2 för den endokrina hypotalamus-hypofys-äggstocksaxeln). Minskad mängd östrogen i äggstockarna gör att äggläggning uteblir. Inhiberad ägglossning är även den effekt EE2 i p-piller har hos människor, vilket beror på samma mekanismer (Rivera *et al.* 1999).

Trots alla de effekter som östrogen i miljön har på fiskar, som presenteras ovan, har man inte sett någon ökad dödlighet hos mörtarna efter exponering av EE2, ens efter längre exponeringar (Lange *et al.* 2009).

Åtgärder

Rening av avloppsvatten

I en studie gjord av Lange *et al.* (2011) visades att hanmörtar som utsattes för en livslång exponering av utsläppsvatten från avloppsreningsverk genomgick en total könsförändring och blev totalt feminiserade. Fiskpopulationer som lever runt eller nedströms ett utsläpp har en större kvot av intersexualiserade individer (Jobling *et al.* 1998). Detta visar att reningen från östrogen i avloppsvattnet är bristfällig. I Sverige sker avloppsreningen genom mekaniska, biologiska och kemiska processer. Detta renar vattnet mestadels från organiskt material, nitrat och fosfor, medan exempelvis läkemedel och dess nedbrytningsprodukter inte renas bort (Lundström *et al.* 2010). Dessa vanliga reningsmetoder är primärt inte gjorda för att ta bort hormoner (Gunnarsson *et al.* 2009). Genom att förbättra metoderna för reningsverken skulle östrogenkoncentrationerna i våra vatten kunna reduceras och vattenmiljön förbättras.

Det har i flera studier gjorts tester för att få fram den mest effektiva reningen (t ex Gunnarsson *et al.* 2009, Lundström *et al.* 2010, Baynes *et al.* 2012). Baynes *et al.* (2012) testade fyra olika reningsprocesser för att se vilken av dem som var effektivast på att rena bort östrogen och se effekterna hos mörtar som levde i vattnet från respektive reningsprocess. De reningsmetoder

som testades var filtrering genom ett sandfilter, aktivt slam (innehållandes mikroorganismer, används i vanlig rening), granulerat aktivt kol och ClO₂. Detta försök visade att det var ClO₂ som mest effektivt renade vattnet från östrogen. Fiskar som levde i vattnet som hade renats med sandfiltreringen och det aktiva slammet hade högre plasmakoncentration av vitellogenin och lägre GSI än kontrollfiskarna, reningen av östrogen var alltså inte fullständig. En ökning av nivåerna plasmavitellogenin kunde inte säkerställas hos fiskarna i vattnet efter de övriga metoderna.

Genom att kombinera de för Sverige vanliga reningsmetoderna, se ovan, med sandfiltrering lyckades Lundström *et al.* (2012) kraftigt minska nivåerna av östrogen, E2 och EE2 i utsläppsvattnen. Östrogenhalterna reducerades från 8,6 µg L⁻¹ till 0,17 µg L⁻¹. Genom att lägga till ytterligare reningsmetoder kunde de åstadkomma en ännu mer effektiv rening, såsom att kombinera vanlig rening och sandfiltrering med ozonbehandling respektive MBBR. MBBR står för Moving Bed Biofilm Reactor och innebär ett rörande filter där vattnet sipprar igenom och täpps igen om det blir för mycket partiklar (Leiknes & Ødegaard 2007). Då Lundström *et al.* (2012) adderade MBBR respektive ozonbehandling till den vanliga reningen blev det en signifikant minskning av östrogen, jämfört med endast vanlig rening. Dessa reningsmetoder minskade också flera andra kemikalier i utsläppsvattnet. Exempelvis minskade halterna av bisfenol A, som även det är hormonstörande med en östrogenliknande effekt (Kuiper *et al.* 1998, Lundström *et al.* 2010).

Komplex problem

Rening av avloppsvatten är en komplex fråga, då det är många faktorer som spelar in för att effektivisera reningen och många olika slags substanser som ska renas bort. En faktor som har stor inverkan är kostnaden, då de mer avancerade teknikerna är dyrare. Förutom rent ekonomiskt är de även mer kostsamma när det gäller CO₂-utsläpp. Baynes *et al.* (2012) visade i sin forskning att filtrering genom granulerat aktivt kol är dyrast och släpper ut mest CO₂, sedan kommer rening med ClO₂.

Andra faktorer som gör reningsfrågan komplex är att östrogen mestadels kommer ut i avloppen i konjugerad form, alltså då det inte är biologiskt aktivt, på grund av biotransformationen i människor. Den mikrobiella aktiviteten i reningsverken för dock med sig att östrogen avkonjugeras och då åter blir aktivt (Kumar *et al.* 2011, Baynes *et al.* 2012), reningen har alltså en negativ effekt på halten av aktivt östrogen. Baynes *et al.* (2012) menar också att vatten kan bli för rent för att växt- och djurliv ska trivas. Det finns fördelaktiga föreningar som inte bör renas bort från avloppsvattnet då de gör nytta.

Resultaten från Lundström *et al.* (2010) stämmer överrens med de Gunnarsson *et al.* (2009) har fått i sina undersökningar. Den forskningen visade att reningsprocesser med MBBR gav minskade nivåer av östrogen i det renade vattnet. Trots minskning av östrogen skedde ändå en östrogeninducerad biologisk påverkan hos fiskarna. Induceringen av vitellogenin i det MBBR-renade vattnet skedde i lika hög grad som för fiskar i vatten som renats genom sandfilter. Detta kan bero på att andra kemikalier med liknande effekt, exempelvis insekticider, inte mättes i studien gjord av Gunnarsson *et al.* (2009) och att de kan ha skapat denna inducering. De biologiska effekterna hos fiskarna sade alltså inte riktigt samma sak som de kemiska analyserna av vattnet gjorde. Ozonbehandlat avloppsvatten var i undersökningen den enda metod som tog bort de uppmätta biologiska effekterna av östrogen (Gunnarsson *et al.* 2009).

Trots att nivån av plasmavitellogenin inte ökade hos fiskarna som levde i vattnet renat av granulerat aktivt kol i undersökningen av Baynes *et al.* (2012) visade det sig vara ett ökat antal intersexualiserade fiskar i det vattnet. Dessa resultat motsäger varandra. Rening med granulerat aktivt kol tar effektivt bort östrogen de första sex månaderna jämfört med sandfiltrering och filtrering genom aktivt slam. Det verkar dock bli mättat efter ytterligare användning, vilket då försämrar reningen betydligt.

Sandfiltrering är en effektiv metod för att ta bort hormoner. Däremot gjorde metoden inte att vattenkvaliteten för övrigt blev så mycket förbättrad, med hänsyn till minskning av andra substanser (Lundström *et al.* 2010).

Diskussion

De resultat som presenteras ovan visar att mörtar påverkas mycket av det östrogen som finns i miljön. Både hanar och honor påverkas. De får bland annat störda hormonbalanser med ändrade nivåer av hormoner och proteiner som konsekvens. Deras reproduktiva förmåga blir också kraftigt reducerad, vilket framför allt syntes på hanfiskarna som blivit feminiserade av östrogen och östrogenliknande ämnen i miljön. Hanmörtarnas gonader blev missbildade, med bland annat oocyter i testiklarna och missbildade sädesledare. Hos honorna kan äggläggningen reduceras. Det blir alltså tydliga effekter hos de enskilda mörtarna.

Intersexualitet – en fara för mörtpopulationen?

Hur en population av mört påverkas av närvaron av flera intersexuella individer är märkligt nog ett relativt utforskat område. Det är mestadels spekulationer och möjliga slutsatser dragna från forskningen om och hur mörtpopulationer kan påverkas. Som det är visat i studien gjord av Lange *et al.* (2009) blev alla hanmörtar som utsattes för EE2 i cirka två år feminiserade. Hela populationen blev alltså honor. Detta skulle få stora konsekvenser i en population om det skedde i det vilda, då reproduktion blir omöjlig. Forskning visar också att reproduktionsförmågan hos intersexuella mörtar är sämre än hos normala hanar (Jobling *et al.* 2002). Även honor påverkas av exogent östrogen på ett sätt som kan påverka deras reproduktionsförmåga negativt (Parrott & Blunt 2005, Lange *et al.* 2011). Påverkas en hel population av östrogen skulle det bli betydligt svårare för den att på sikt klara sig. Även Harris *et al.* (2010) anser att det finns en ökad risk för fiskpopulationens överlevnad ju fler intersexuella fiskar som finns i den.

I en undersökning av Kidd *et al.* (2007) kollapsade en fiskpopulation av knölskallelöja då sjön de levde i exponerades för EE2. Det är en skillnad i hur länge fiskar lever, vilket kan spela en roll i hur mycket intersexualitet en population klarar av. Knölskallelöjan är en relativt kortlivad fisk och Kidd *et al.* (2007) anser att populationer med långlivade fiskar, såsom mörtan, troligen är mer motståndskraftiga än de kortlivade. Det är svårare att se effekterna i en population då fiskarna lever längre. För att se hur populationerna i vatten med höga koncentrationer av östrogen påverkas mer långsiktigt anser Tyler och Jobling (2008) att det krävs långsiktig forskning på minst 25 år. Då är det också möjligt att kontrollera huruvida mörtar adapterar till höga koncentrationer av östrogener och östrogenliknande ämnen i sin levnadsmiljö. Minskar mörtbeståndet kan det bli stora konsekvenser för ekosystem som de lever och verkar i. Exempelvis kan beståndet av plankton, som är en del av mörtens huvudföda, påverkas.

Då feminisering av mörtar är ett problem som i det vilda framförallt uppkommer vid utsläppsvatten från avloppsreningsverk (Jobling *et al.* 1998) är det möjligt att påverkan på

mörtbeståndet i stort i världen inte är så allvarligt. Huruvida så är fallet är dock svårt att säga på grund av för lite forskning på området.

Avloppsrening

Trots att feminiseringen är ett mycket utforskat område och har visat sig vara ett utbrett problem, finns det ingen forskning som tydligt visar vilka åtgärder som bör vidtagas och är mest effektiva även på lång sikt (Baynes *et al.* 2012). Det är först under de senare åren som det har kommit fram forskning på vilka reningsmetoder som effektivast minskar denna biologiska effekt hos fiskarna. Det är viktigt att veta vilka reningsprocesser som medför minst negativa biologiska effekter för att veta vilka metoder man ska lägga kraft och pengar på anser Gunnarsson *et al.* (2009). De biologiska effekterna bör tas med som en faktor att studera i studier om reningsmetoder för hormoner och hormonstörande ämnen. Endast en kemisk undersökning visar inte om de biologiska effekterna faktiskt minskar. Trots att analyserna säger att det är mindre östrogen i vattnet, kan de biologiska effekterna hos fiskarna visa något annat, vilket bland annat forskningen från Gunnarsson *et al.* (2009) och Baynes *et al.* (2012) visar. I slutändan är det ju faktiskt hur fiskarna mår som spelar roll, oavsett vad de kemiska analyserna av vattnet säger.

Rening i Uppsala

Det största avloppsreningsverket i Uppsala är Kungsängsverket. Där sker reningen mekaniskt, biologiskt och kemiskt och det reade vattnet släpps ut i Fyrisån. Det som renas bort genom denna rening är syreförbrukande ämnen, fosfor, kväve och synliga föroreningar (Uppsala Vatten 2012). Dock det sker ingen avancerad rening och ingen sandfiltrering. Det är den här typen av rening som är den vanliga använda i Sverige, trots att den inte effektivt tar bort produkter som läkemedel (Lundström *et al.* 2010). För att Uppsala Vatten ska få ta hand om Uppsala kommuns avloppsvatten har kommunen som krav att reningseffektiviteten måste vara så hög som möjligt. Detta har Uppsala Vatten kommenterat med ”Reningsverket har drivits så bra som möjligt med tekniskt-ekonomiskt rimliga insatser” (Uppsala Vatten 2012). Det finns tekniker som mer effektivt tar bort östrogen än de som används; exempelvis sandfiltrering, ClO₂ och ozonbehandling har visat sig effektivare (Gunnarsson *et al.* 2009, Lundström *et al.* 2010, Baynes *et al.* 2012). Det blir dock, som Uppsala Vatten (2012) skriver i sin rapport, antagligen endast en fråga om ekonomi, då det är dyrare att ha mer avancerade tekniker för rening. Frågan är vad man är villig att lägga pengar på och prioritera. Det är anmärkningsvärt att i Uppsala Vattens (2012) miljörapport inte nämns något om hormoner eller hormonstörande ämnen som eventuellt finns i det vatten som släpps ut i Fyrisån. Det tas mestadels hänsyn till organiska substanser, fosfor och kväve i rapporten. Hormoner är knappast det som syftas på med att få upp reningseffektiviteten, utan snarare rening från fosfor och kväve. Även om fosfor och kväve har stor negativ påverkan på miljön behöver det inte innebära att andra substanser som finns i avloppsvatten och har miljöfarlig karaktär får glömmas bort.

Mer forskning behövs

Det finns mycket forskning på hur fiskar påverkas av östrogen i vattenmiljön, både när det gäller mörtar och andra fiskarter. Denna visar tydligt att påverkan är mycket stor. Däremot, som nämnts ovan, finns det vissa delar inom detta område där det bör ske en betydligt mer uttömmande forskning. Vad blir de långsiktiga effekterna på mörtbeståndet av att det finns östrogen i vattnet och att populationernas hanar feminiseras? Hur kan ekosystem förändras om mörtbeståndet påverkas negativt? Vilka åtgärder hindrar bäst spridningen av östrogener i vattenmiljöer? Det finns kunskapsbrister.

Det saknas tillräckligt med långsiktiga fältstudier om hur mörtpopulationer som lever vilt i naturen påverkas av närvaron av östrogen i sin vattenmiljö. Det är viktig forskning för att få den fullständiga bilden av hur mörtar påverkas av östrogen. Det är inte rimligt att endast bedriva forskning på fiskar i tankar på laboratorium. Fiskarna utsätts i det vilda för en blandning av östrogen och östrogenliknande ämnen som tillsammans kan ge en feminiserande effekt på fiskar, även om nivåerna av östrogenerna var för sig inte skulle göra det (Jobling *et al.* 2006, 1998). Detta märks i resultaten av studier på fiskar som lever i vatten från reningsverk. De biologiska effekterna hos fiskarna stämmer inte alltid överrens med de kemiska analyserna av östrogennivån i vattnet. Den sammansatta påverkan av östrogenerna är svår att efterlikna i ett laboratorium. Det går inte heller att se effekterna på mörtbeståndet och ekologiska system om forskningen inte sker i mörtarnas naturliga habitat.

Vissa kunskapsbrister kan bero på att det inte är särskilt etiskt att exponera en hel sjö med hormonstörande ämnen för att undersöka effekterna hos sjöns organismer. Avloppsreningen har dessutom visat sig vara en oväntat komplex fråga, vilket gör det svårt att få ett bra konkret svar på vilka reningsmetoder som är de bästa. Det är antagligen inte heller helt enkelt att följa en mörtpopulation i minst de 25 år som Tyler och Jobling (2008) anser behövas för att få en förståelse av de långsiktiga effekterna. Dock är östrogens påverkan på mörtar och andra fiskar ett problem som finns nu och därför behöver lösas nu. Det går inte att vänta i 25-30 år på att mer forskning ska komma och använda brist på forskningsresultat som bortförklaring till att inte sätta in åtgärder.

Slutsats

Det är tydligt att mörtars reproduktiva förmåga påverkas negativt av östrogen som finns i miljön, varav mycket kommer från läkemedel, som exempelvis EE2 i p-piller. Det finns dock för lite forskning på hur populationer av mörtar påverkas och i det långa loppet hur effekterna på mörtbeståndet blir då reproduktionsförmågan blir sämre. Det saknas också tillräckligt med forskning i hur man mest effektivt förhindrar detta problem.

Tack

Tack Johanna Sundqvist, Robin Löfgren, Sofie Svanholm, Axel Spaxes och handledare Anders Ödeen för bra kommentarer och hjälp på vägen!

Referenser

- Baynes A, Green C, Nicol E, Beresford N, Kanda R, Henshaw A, Churchley J, Jobling S. 2012. Additional treatment of wastewater reduces endocrine disruption in wild fish - a comparative study of tertiary and advanced treatments. *Environmental Science & Technology*. **46**: 5565–5573.
- Chou CW, Chiu CH, Liu YW. 2013. Fibronectin mediates correct positioning of the interrenal organ in zebrafish. *Developmental Dynamics* **242**: 432–443.
- Desbrow C, Routledge EJ, Brighty GC, Sumpter JP, Waldock M. 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environmental Science & Technology* **32**: 1549–1558.
- Filby AL, Thorpe KL, Tyler CR. 2006. Multiple molecular effect pathways of an environmental oestrogen in fish. *Journal of Molecular Endocrinology* **37**: 121–134.

- Filby AL, Thorpe KL, Maack G, Tyler CR. 2007. Gene expression profiles revealing the mechanisms of anti-androgen- and estrogen-induced feminization in fish. *Aquatic Toxicology* **81**: 219–231.
- Flores-Valverde AM, Horwood J, Hill EM. 2010. Disruption of the steroid metabolome in fish caused by exposure to the environmental estrogen 17 α -ethinylestradiol. *Environmental Science & Technology* **44**: 3552–3558.
- Gunnarsson L, Adolfsson-Erici M, Björlenius B, Rutgersson C, Förlin L, Larsson DGJ. 2009. Comparison of six different sewage treatment processes - reduction of estrogenic substances and effects on gene expression in exposed male fish. *Science of the Total Environment* **407**: 5235–5242.
- Harris CA, Hamilton PB, Runnalls TJ, Vinciotti V, Henshaw A, Hodgson D, Coe TS, Jobling S, Tyler CR, Sumpter JP. 2010. The consequences of feminization in breeding groups of wild fish. *Environmental Health Perspectives* **119**: 306–311.
- Jobling S, Nolan M, Tyler CR, Brighty G, Sumpter JP. 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science & Technology* **32**: 2498–2506.
- Jobling S, Coey S, Whitmore JG, Kime DE, Look KJWV, McAllister BG, Beresford N, Henshaw AC, Brighty G, Tyler CR, Sumpter JP. 2002. Wild intersex roach (*Rutilus rutilus*) have reduced fertility. *Biology of Reproduction* **67**: 515–524.
- Jobling S, Williams R, Johnson A, Taylor A, Gross-Sorokin M, Nolan M, Tyler CR, van Aerle R, Santos E, Brighty G. 2006. Predicted exposures to steroid estrogens in U.K. rivers correlate with widespread sexual disruption in wild fish populations. *Environmental Health Perspectives* **114**: 32–39.
- Kahl U, Radke RJ. 2006. Habitat and food resource use of perch and roach in a deep mesotrophic reservoir: enough space to avoid competition? *Ecology of Freshwater Fish* **15**: 48–56.
- Kidd KA, Blanchfield PJ, Mills KH, Palace VP, Evans RE, Lazorchak JM, Flick RW. 2007. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **104**: 8897–8901.
- Kuiper GGJM, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JÅ. 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology* **139**: 4252–4263.
- Kumar V, Nakada N, Yasojima M, Yamashita N, Johnson AC, Tanaka H. 2011. The arrival and discharge of conjugated estrogens from a range of different sewage treatment plants in the UK. *Chemosphere* **82**: 1124–1128.
- Lange A, Katsu Y, Ichikawa R, Paull GC, Chidgey LL, Coe TS, Iguchi T, Tyler CR. 2008. Altered sexual development in roach (*Rutilus rutilus*) exposed to environmental concentrations of the pharmaceutical 17 α -ethinylestradiol and associated expression dynamics of aromatases and estrogen receptors. *Toxicological Science* **106**: 113–123.
- Lange A, Paull GC, Coe TS, Katsu Y, Urushitani H, Iguchi T, Tyler CR. 2009. Sexual reprogramming and estrogenic sensitization in wild fish exposed to ethinylestradiol. *Environmental Science & Technology* **43**: 1219–1225.
- Lange A, Paull GC, Hamilton PB, Iguchi T, Tyler CR. 2011. Implications of persistent exposure to treated wastewater effluent for breeding in wild roach (*Rutilus rutilus*) populations. *Environmental Science & Technology* **45**: 1673–1679.
- Lange A, Katsu Y, Miyagawa S, Ogino Y, Urushitani H, Kobayashi T, Hirai T, Shears JA, Nagae M, Yamamoto J, Ohnishi Y, Oka T, Tatarazako N, Ohta Y, Tyler CR, Iguchi T. 2012. Comparative responsiveness to natural and synthetic estrogens of fish species commonly used in the laboratory and field monitoring. *Aquatic Toxicology* **109**: 250–258.

- Leiknes T, Ødegaard H. 2007. The development of a biofilm membrane bioreactor. *Desalination* **202**: 135–143.
- Liney KE, Jobling S, Shears JA, Simpson P, Tyler CR. 2005. Assessing the sensitivity of different life stages for sexual disruption in roach (*Rutilus rutilus*) exposed to effluents from wastewater treatment works. *Environmental Health Perspectives* **113**: 1299–1307.
- Lundström E, Adolfsson-Erici M, Alsberg T, Björlenius B, Eklund B, Lavén M, Breitholtz, M. 2010. Characterization of additional sewage treatment technologies: Ecotoxicological effects and levels of selected pharmaceuticals, hormones and endocrine disruptors. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **73**: 1612–1619.
- MacLachy DL, Courtenay SC, Rice CD, Van Der Kraak GJ. 2003. Development of a short-term reproductive endocrine bioassay using steroid hormone and vitellogenin end points in the estuarine mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**: 996–1008.
- Nolan M, Jobling S, Brighty G, Sumpter JP, Tyler CR. 2001. A histological description of intersexuality in the roach. *Journal of Fish Biology* **58**: 160–176.
- Parrott JL, Blunt BR. 2005. Life-cycle exposure of fathead minnows (*Pimephales promelas*) to an ethinylestradiol concentration below 1 ng/L reduces egg fertilization success and demasculinizes males. *Environmental Toxicology* **20**: 131–141.
- Paull GC, Lange A, Henshaw AC, Tyler CR. 2008. Ontogeny of sexual development in the roach (*Rutilus rutilus*) and its interrelationships with growth and age. *Journal of Morphology* **269**: 884–895.
- Pawlowski S, van Aerle R, Tyler CR, Braunbeck T. 2004. Effects of 17 α -ethinylestradiol in a fathead minnow (*Pimephales promelas*) gonadal recrudescence assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **57**: 330–345.
- Rivera R, Yacobson I, Grimes D. 1999. The mechanism of action of hormonal contraceptives and intrauterine contraceptive devices. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **181**: 1263–1269.
- Routledge EJ, Sumpter JP. 1997. Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 3280–3288.
- Segner H, Carroll K, Fenske M, Janssen CR, Maack G, Pascoe D, Schafers C, Vandenberg, GF, Watts M, Wenzel A. 2003. Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **54**: 302–314.
- Sumpter JP, Jobling S. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives* **103**: 173–178.
- Thorpe KL, Cummings RI, Hutchinson TH, Scholze M, Brighty G, Sumpter JP, Tyler CR. 2003. Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish. *Environmental Science & Technology* **37**: 1142–1149.
- Tyler CR, Jobling S. 2008. Roach, sex, and gender-bending chemicals: The feminization of wild fish in English rivers. *BioScience* **58**: 1051–1059.
- Uppsala vatten. 2012. Miljörapport 2012 Kungsängsverket. Uppsala Vatten och Avlopp AB.
- Omslagsfoto från Wikimedia. 2013. *Rutilus rutilus*. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Rutilus_rutilus_Prague_Vltava_4.jpg. Hämtad 2013-12-02