

# Har vi tilfredsstillende metoder for å overvåke biologiske effekter av forurensing?

Av Anders Goksøy

Anders Goksøy er ansatt ved Laboratorium for marin molekylærbiologi, Molekylærbiologisk institutt, Universitetet i Bergen

Innlegg på seminar i  
Norsk Vannforening 27.11.96

## Sammendrag

I overvåkingssammenheng er det nødvendig å undersøke de biologiske effektene forurensing har, ikke bare forekomst og nivåer av kjente forurensningsstoffer. Dagens kjemibaserte overvåkingssystemer tilfredsstillende vanligvis ikke dette behovet. Biomarkører blir definert som målinger som indikerer at en organisme har blitt eksponert for et fremmedstoff og i hvilken grad organismen har reagert. Målingene gjøres vanligvis på det molekylære, cellulære eller fysiologiske nivå. Biomarkør-analyser har de siste årene fått stor oppmerksomhet i internasjonale forskningsmiljøer som et nytt, kraftig og informativt verktøy for miljøovervåking. Også i norske prosjekter er flere av de aktuelle biomarkørene studert og evaluert for bruk gjennom laboratorie- og feltforsøk. I denne artikkelen anbefales det å ta i bruk et utvalg biomarkører i norske overvåkingssystemer.

## Summary

In a monitoring context it is necessary to study the biological effects of pollution, not only the occurrence and levels of known pollutants. Present chemistry-based monitoring programmes do not fulfill this goal. Biomarkers are defined as analyses indicating the exposure of an organism to pollutants and the extent of response to such exposure. Analyses are normally performed at the molecular, cellular, and physiological level. Biomarker assays have recently attracted great attention by the international research community as a new, powerful and informative tool for environmental monitoring. In norwegian projects several biomarker candidates have been studied and evaluated for use through laboratory and field studies. In this paper it is recommended to implement a selection of biomarkers also in norwegian monitoring programmes.

## **Biologiske markører og miljøovervåking**

Forurensning av havområdene er et av verdenssamfunnets mest alvorlige problemer (OECD 1991), og mest utsatt er de kystnære områdene og fjordene. I ressursammenheng er dette samtidig de mest produktive områdene. Daglig slippes 50-100 000 forskjellige kjemiske stoffer ut i havmiljøet. I Norge er flere store fjorder berørt av disse problemene slik at restriksjoner på fiske og konsum er blitt innført. Vår innsikt i miljøgiftenes skjebne, deres spredning og eventuelle effekter på organismene i havet eller indirekte på mennesket selv, er imidlertid fortsatt liten.

Miljøovervåking har som mål å få et totalbilde av et havområdes helsetilstand. Dette bildet omfatter både mengder og tilførsler av kjemiske stoffer og de effektene disse har på det biologiske liv i området. Dagens metoder er imidlertid bare i stand til å gjengi bruddstykker av denne virkeligheten. Mange overvåkingsprogram (inkl. de norske) bygger i stor grad på kjemiske analyser. Disse suppleres til en viss grad med bestands- eller samfunnsanalyser, som er biologiske parametre med svært lang responstid.

Kjemiske metoder har rent analytiske begrensninger. Det er ikke mulig å analysere på alle de tusenvis av stoffene som tilføres miljøet, både fordi det er kostnadskrevende, og fordi vi ikke har analysemetoder for alle stoffgrupper. I tillegg gir kjemiske nivåer ingen informasjon om effekter av en belastning, selv om eksisterende klassifiserings-

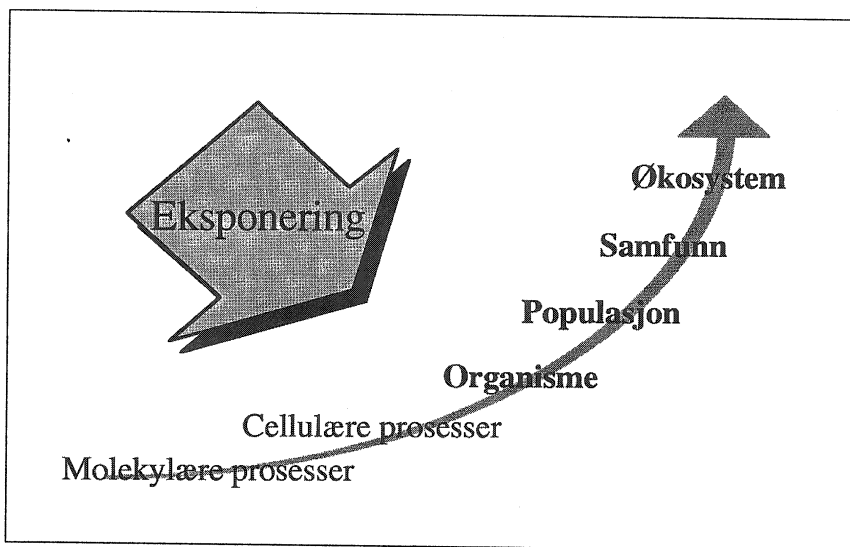
system for miljøkvalitet fra Statens forurensningstilsyn gir inntrykk av det (SFT, 1993).

"Biomarkør"- (eller "bioindikator"-) -konseptet har etter hvert fått stor oppmerksomhet blant økotoksikologer som et nytt og potensielt kraftig og informativt verktøy for påvisning av eksponering og effekter av miljøforurensninger (jfr. et større antall internasjonale symposier med dette tema på dagsorden (se også McCarthy & Shugart, 1990, Huggett et al., 1992; Peakall, 1992; Fossi & Leonzio, 1993). Likevel er det en viss treghet i å få innført biomarkør-analyser i offentlige overvåkingsprogram. Dette skyldes særlig at kunnskapsgrunnlaget når det gjelder responsens relevans for effekter på økosystemet fortsatt er noe spinkelt. På den annen side har økosystem-indikatorer i tillegg til en lang responstid (år) ved lave eller kroniske belastninger et motsatt problem. Jo lengre vekk responsen står i forhold til eksponeringssituasjonen, jo vanskeligere er det knytte effekten til en spesifikk årsak (Peakall, 1994).

### **"Føre var"-prinsippet**

Generelt har biomarkører blitt definert som målinger som indikerer i molekylære, cellulære eller fysiologiske termer at en organisme har blitt eksponert for et fremmedstoff og i hvilken grad organismen har reagert.

Målet med et miljøovervåkingsprogram vil alltid være å søke å unngå uakseptable og irreversible effekter slik som massedød, tap av økologisk eller kommersielt viktige arter gjennom ødelagt reproduksjonsevne eller økt syk-



Figur 1. Effekter av eksponering på et biologisk system vil først kunne spores på det molekylære og cellulære nivå. Responser på disse nivåene kan brukes som biomarkører til å forhindre en uheldig utvikling mot irreversible effekter på høyere økologiske nivåer, i tråd med "føre var"-prinsippet.

domsfrekvens, eller kvalitetsforringelse av beskattede bestander gjennom forhøyete innhold av miljøgifter. Ved å studere biomarkører kan vi få signaler om en slik utvikling på et tidligere stadium, dvs. på et "lavere" biologisk nivå, før påvirkningen har fått alvorlige, irreversible effekter. Dette er også i pakt med "føre var"-prinsippet, vedtatt på Bergens-konferansen i 1990 (og senere på Rio-konferansen i 1992), og forsøkt gjennomført gjennom Nordsjøavtalen. Biomarkører er generelt billige og enkle analyser som raskt kan gjennomføres på et stort prøvemateriale, dvs. med høy kost-nytte effekt.

Gjennom prosjektet "Evaluering av markører for biologiske effekter av miljøgifter i norske farvann" under Pro-

gram for marin forurensning (NFR, 1992-1995), har det blitt lagt et grunnlag for bruk av biomarkører i miljøovervåkingssammenheng, gjennom å dokumentere responsen på miljøgiftbelastning hos utvalgte typer fisk i norske farvann (Beyer, 1996; Beyer et al., 1996; Goksøy, 1995; Goksøy et al., 1997). Konklusjonen i dette prosjektet er at flere biomarkører bør kunne inngå i mer standardiserte overvåkingsprogram. I utlandet er biomarkør-analyser tatt i bruk i nasjonale program i Sverige, USA, Canada og Frankrike. Internasjonale organisasjoner som ICES, IOC, North Sea Task Force og MEDPOL har arrangert en rekke workshops og miljøundersøkelser der biomarkører har inngått.

## **Ekstrapolering og tidlig varsel**

Effekten av en forurensningsbelastning på celle, organ eller individ vil kunne føres oppover gjennom systemet dersom forsvars- og reparasjonsmekanismer på det enkelte nivå ikke takler belastningen (figur 1). Slike forsvars- og reparasjonssystemer bør derfor inngå i vår overvåking av kyst- og fjordøkosystemer. Den eksakte sammenhengen mellom en gitt respons på det molekylære eller cellulære nivået og effekter på høyere nivåer behøver ikke alltid være kjent for at biomarkøren skal kunne gjøre nytte i et overvåkingsprogram (jfr. "føre var"-prinsippet). Ettersom dette likevel er en av de største innvendingene mot bruk av biomarkører, er det viktig å fokusere forskning på de mekanismene som knytter et biomarkør-signal sammen med effekter på høyere biologiske nivåer på kortere eller lengre sikt. Slik kunnskap vil gjøre det mulig å ekstrapolere fra et biomarkørsignal til populasjons- og samfunnseffekter (Goksøy, 1995).

Det er særlig to responser på populasjonsnivå som har viktige komponenter på det cellulære og molekylære nivå. Dette gjelder reproduksjonsevne og immunforsvar (NRC, 1992). Molekylære biomarkører for begge disse feltene kan gi økt innsikt i sammenhengen mellom miljøgifteksponering og effekter på høyere biologisk nivå. Et annet viktig felt er sammenhengen mellom molekylære responser og generell fysiologisk velbefinnende (homeostase) og vekst. I ressursammenheng er alle disse faktorene viktige.

Eksempler på biomarkører for reproduksjonseffekter som har fått anerkjennelse i internasjonal sammenheng, er nivåene av vitellogenin (plommeprotein) og eggeskallprotein i hannfisk eller juvenil fisk (se nedenfor).

## **Supplement til miljøkjemiske analyser ("screening")**

Generelt måles biomarkører i biologiske prøver fra organismer innsamlet på lokaliteter med mistanke om forurensning, og responsene blir sammenlignet med de vi finner hos den samme arten innsamlet fra referanseområder uten kjent kjemikaliebelastning og med sammenlignbar genetisk og fysiologisk bakgrunn. Slike målinger har en rekke fordele som gjør dem til et informativt og nødvendig supplement til andre indikatorer for forurensninger i miljøet, som miljøkjemiske analyser av vann, sediment og organismer (biota).

Kjemiske analyser av vann, sediment og organismer er spesifikke, kvantitative, og svært følsomme og presise. Den biologiske betydningen av de nivåene som måles er imidlertid vanskelig å avlede. Det er kun for noen få av de mange tusen kjemikalier som finnes i miljøet at vi kjenner deres gifteffekt, og vi har lite kunnskap om samvirkende effekter av komplekse blandinger av fremmedstoffer, eller om den rollen fysiske miljøfaktorer spiller i organismens følsomhet. I tillegg vil en slik kjemisk analyse kun representere et øyeblikksbilde i tid og rom. Langtids-eksponering for lave eller moderate ni-

våer av miljøgifter kan også gi effekter som ikke kommer frem i et kjemisk analyseprogram. Variasjoner i konsentrasjoner over tid pga. ujevne utslipp fra industrivirksomhet eller meteorologiske forhold kan kun studeres med gjentatte analyser over lengre tidsrom. Dette øker omkostningene både ved prøvetaking og allerede dyre kjemiske analyseoppsett.

Biomarkører, derimot, ved at de viser biologisk effekt, kan gi et bilde på hvor mye av en miljøgift som er biologisk tilgjengelig, integrert over tid og rom. Også effekten av samvirkende blandinger eller langtidsbelastning for lave nivåer får et integrert signal gjennom studiet av biomarkører. I tillegg vil effekter av ukjente kjemiske forbindelser, som ikke inngår i det batteriet det rutinemessig analyseres for, kunne gi utslag i et biomarkør-basert analyseprogram. Dette kan brukes som basis for å gå i gang med et utvidet kjemisk analyseperspektiv.

## **Indikatorer for spesifikk og generell miljøbelastning**

Noen biomarkører er generelle indikatorer for eksponering eller effekt, mens andre er mer spesifikke responser på enkeltkjemikalier eller klasser av fremmedstoffer. For eksempel hemmes enzymet aminolevulinsyre dehydrase spesifikt av bly, induksjon av cytokrom P450 systemet (CYPIA) er en respons spesifikk for klassen organiske miljøgifter (aromatiske og klorerte hydrokarboner; Förllin et al., 1994), og påvis-

ning av DNA-addukter viser eksponering for spesifikke kjemikalier. På den annen side er endringer i DNA-integritet eller induksjon av stressproteiner (varmesjokkproteiner) responser på en lang rekke forskjellige typer av kjemiske eller fysiske påvirkninger. Slike generelle og spesifikke biomarkører kan tenkes å være anvendelige i forskjellige faser av et overvåkingsprogram, avhengig av hvilken kunnskap man på forhånd har om situasjonen i området (Tabell 1 - neste side).

Galle-FAC har vist seg å være en svært enkel markør som ligger i grenselandet mellom biomarkører og mer kjemiske analyser. Fordi den inkluderer metabolitter av PAH-forbindelsene har den likevel vært regnet til biomarkørene. Analysen baserer seg på de aromatiske forbindelsenes fluoresens-egenskaper, og at disse oppkonsentreres i galle hos fisk. Pga. høy metabolisme av slike stoffer er det vanskelig å spore disse med kjemiske analyser av fiskevev (se også Knutzen, 1996). Analyse kan gjøres svært enkelt med direkte fluorimetri, eller mer spesifikt v.h.a. høytrykks væskeskromatografi (HPLC).

CYPIA har vært testet ut i laboratorie- såvel som i feltforsøk. Både i forbindelse med utslipp fra celluloseindustrien i Sverige og i et burforsøk i Sjøfjorden (Hardanger), viste denne markøren klare responser på belastning (Knutzen et al., 1994; Beyer et al., 1996). I USA inngår CYPIA sammen med flere biomarkører i det omfattende National Status and Trends-programmet, som i snart ti år har dekket hele den amerikanske kyststrøpen. Metallotione-

**Tabell 1: Oversikt over utvalgte biomarkører og analyseteknikker**

Biomarkør	Indikerer	Måles i	Organisme	Metode
Galle-FAC <sup>a</sup>	PAH, olje- hydrokarboner	galle	fisk	enkel fluoresensana- lyse, kan også gjøres mer spesifikk med HPLC
CYP1A <sup>b</sup> (bl.a. EROD)	PAH, PCB, dioksiner, olje, pesticider	lever (evt. gjelle, nyre el)	fisk	enkel enzymmåling, evt. immunteknikk <sup>c</sup>
Metallotio- nein	tungmetaller (Cu, Cd, Zn og Hg)	lever, nyre	fisk, inverte- brater	polarografi el. immunteknikk
Vitellogenin/ eggeskall- protein	østrogene miljø- gifter ("hormon- hermere")	blodplasma	fisk (amfibier, reptiler, fugl)	immunteknikk
DNA-skader	forskjellige typer av stoffer	blodceller, leverceller	fisk, inverte- brater	forskjellige teknikker
Stress- proteiner	forskjellige typer stoffer og belastninger	blodceller, leverceller	fisk, inverte- brater	immunteknikk
Imposex	tributyltinn (TBT)	hele organismen	snegl (neo- gastropoder)	disseksjon under mikroskop
Histopatologi (celleforand- ringer, kreft)	organiske miljøgifter (særlig PAH)	lever	fisk	histokjemi og mikroskopi

a. FAC: fluorescent aromatic compounds, indikerer fluorescens av PAH-forbindelser og deres metabolitter.

b. CYP1A: cytokrom P450 1A, målt bl.a. som EROD (7-etoksyresorufin O-deetylase aktivitet).

c. Immunteknikker baserer seg på bruk av et spesifikt antistoff som reagerer med proteinet det skal analyseres for. Vanlige teknikker er ELISA, RIA, Western blott, immunhistokjemi.

in er et protein som induseres når fisken eksponeres for tungmetallene kobber (Cu), sink (Zn), kadmium (Cd) og kvikksølv (Hg).

Vitellogenin er en biomarkør som har kommet sterkt i fokus de siste årene i forbindelse med oppmerksomheten rundt østrogenlignende miljøgifter, de såkalte "hormonhermerne" (f.eks. alkylfenoler, DDT, lindan, bisfenol A, ftalater). Tilstedeværelse av vitellogenin indikerer normalt en hunnfisk som er i ferd med å bygge opp eggene (rogn) før gyting. Det skjer ved et østrogensignal flere måneder før gytingen skal skje. Hormonlignende stoffer kan sette i gang prosessen i umoden fisk og i hannfisk (se Bråten, dette nr.) Nyere forskning viser at også eggskallproteiner produseres i fisken av de samme stimuli, og sannsynligvis med en høyere følsomhet enn vitellogenin i forhold til nivåene av østrogene stoffer i miljøet (Arukwe et al., 1997).

*Imposex* er en reproduksjonsforstyrrelse som er påvist hos snegler av orden Neogastropoda (se Gibbs & Bryan, 1994). Hunnsneglene blir her maskulinisert og sterile ved at et hannlig kjønnsorgan vokser ut over åpningene der eggsekkene vanligvis frisettes. Effekten er spesifikk for tributyltinn (TBT), som brukes som begroingshindrende middel på store båter. I marinaer og havneområder i Europa er hele populasjonene av purpursnegl (*Nucella lapillus*) på randen av utryddelse, men effekter er også påvist hos kongssnegl (*Buccinum undatum*) fra skipsleder i det sørlige Nordsjøområdet (ten Hallers-Tjabbes et al., 1994). I Norge kan

det se ut som den tilsvarende tilstanden intersex hos strandsnegl (*Littorina littorea*) er utbredt langs hele kysten av Sør-Norge (Bråten, dette nr.).

## Supplement til toksisitestetster

Toksisitestetster har vist seg nyttige i å påvise toksiske effekter av enkeltstoffer, blandinger, utslipp og sedimenter. I tillegg til at mange av disse testene har en rekke begrensninger når det gjelder det rent logistiske ved eksponeringssituasjonen, vil slike korttidstester imidlertid ikke fange opp langtids-effekter og heller ikke subletale effekter siden måleparameteren gjerne er død eller overlevelse.

Studier av subletale biologiske effekter på biomarkørnivå vil kunne gjøre slike toksisitestetster langt mer relevante. I forbindelse med kjemikalietesting vil det være mulig å undersøke om et stoff har uønskede egenskaper på CYPIA, på reproduksjonsmarkører eller andre måleparametre. Det er ikke langt igjen før vi har metodene etablert på et nivå som gjør internasjonal interkalibrering mulig, selv om det er tvilsomt om metodene noensinne vil nå det samme presisjonsnivået som kjemiske analyser. Biologiske analyser vil alltid ha et mer kvalitativt aspekt ved seg. Spørsmålet er om vi ikke skal si oss tilfreds med det, særlig når trenden internasjonalt er å gå etter null-effekt nivåer (NOEL/NOEC), snarere enn effekt-medianer (EC50/LC50).

## Remediering

I forbindelse med opprensing og reme-

diering av tidligere miljøsynder vil det alltid være nyttig å følge nøye med om tiltakene har den ønskede effekt på forbedring av miljøforholdene. I slike sammenhenger kan biomarkører utgjøre en nyttig del av overvåkingsprogrammet, fordi de forteller om det skjer endringer i organismenes helse som kan relateres til et forbedret miljø, evt. om remedieringstiltakene har forverret situasjonen og om ytterligere tiltak er nødvendige (Collier, 1994; Depledge & Fossi, 1994). Slike analyser har blant annet blitt brukt under opprensing av den sterkt PCB-forurensede Järnsjön i Syd-Sverige (se Gullbring & Hammar, 1993).

Biomarkører kan fungere like godt i ferskvannssystemer som i saltvann. Biomarkørbaserte overvåkingsprogram kan ha et spesielt stort potensiale i utviklingsland og Øst-Europa, fordi de bygger på enkle, rimelige og raske analyser med et lavt instrumenteringsbehov. I et prosjekt i Volta-elven i Ghana (Vest-Afrika) har vi sett klare biomarkøreffekter i tilapia som ble holdt i bur nedenfor utslippene fra en tekstilfabrikk (Gadagbui, 1996; Gadagbui & Goksøy, 1996). I dette tilfellet var ingen av de kjemiske analysene (PCB, DDT, PAH) i stand til å identifisere hvilke stoffer som var ansvarlige for effektene (bl.a. sterkt forhøyete nivåer av CYPIA/EROD-aktivitet).

## **Kvalitetskontroll i biomarkøranalyser**

Som i alle andre sammenhenger der analytiske metoder skal inngå i et test- eller overvåkingsprogram, er det nød-

vendig med rutiner for kvalitetssikring av prøvetaking, analyser og data. Alle biologiske måleparametre vil ha et større innslag av naturlig variasjon enn det man vanligvis finner i kjemiske analyser. Dette må man forsøke å minimere ved å gjennomføre prøvetaking og analyser i henhold til bestemte retningslinjer. Under OSPARCOM arbeides det for tiden med slike retningslinjer for flere av de biologiske effektmålene som er nevnt i denne artikkelen. Dette går blant annet ut på at man inkluderer en internkontroll i prøvetakingen ved å ha med referansestasjoner. Organismene som det blir tatt prøver av bør være så homogene som mulig når det gjelder genetisk bakgrunn og fysiologisk status. Den sikreste måten å oppnå dette på er gjennom utselling av organismer fra en homogen gruppe i bur i det området man vil undersøke. For sedimentbundet forurensing må burene plasseres på bunnen, og organismene må sikres god kontakt med sedimentet.

Faktorer som er kjent for å påvirke biomarkørnivåer er bl a temperatur og kjønnsmodning. Det anbefales derfor å gjøre prøveinnsamling på tider av året der disse parametrene er noenlunde stabile. For de fleste fiskeslag vil dette si høst- og vintermånedene. I vår- og sommerhalvåret vil temperatursvingninger og kjønnsmodning kunne forstyrre analysene. Det mange glemmer er at disse faktorene også vil påvirke kjemiske nivåer av miljøgifter i organismen, uten at det foreligger så veldig mye kunnskap om akkurat dette. Også under analysene må det inkluderes positive og negative kontroller.



De fleste laboratorier som driver med biomarkør-analyser har denne typen kvalitetssikring på plass allerede. For å bringe flere laboratorier opp til denne standarden bør det arrangeres opplæringsprogram og interkalibrering gjennom ringtester. Også dette arbeides det for tiden med i OSPARCOM-regi.

## Konklusjon

Biomarkører kan allerede i dag bidra med verdifull tilleggsinformasjon til kjemiske analyser i overvåkingsprogram av miljøforurensing i hav og ferskvann. Dette gjelder enten formålet med programmet er ren overvåking, risikovurdering av et utslipp til en resipient, kontroller pålagt av miljøvernmyndighetene, eller i forbindelse med opprensing og remediering. Biomarkør-analyser kan også spille en viktig rolle i toksisitetstesting. Særlig fordi vi hverken har gode kjemiske analyser for 70-80% av de stoffene som tilføres miljøet eller kunnskap om deres virkningsmåter, vil et batteri av biomarkører kunne være en uvurderlig del av et førstelinjesystem for overvåking basert på "føre var"-prinsippet.

## Referanser

Arukwe A., Knudsen F.R. & Goksøyr A. (1997) Fish *zona radiata* (eggshell) protein: A sensitive biomarker for environmental estrogens. *Environ. Health Persp.*, 105:000-000.

Beyer J. (1996) Fish biomarkers in marine pollution monitoring - Evalua-

tion and validation of laboratory and field studies. Dr scient.-avhandl., Univ. i Bergen.

Beyer J., Sandvik M., Skåre J.U., Hylland K., Egaas E. & Goksøyr A. (1996) Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed by caging to polluted sediments in Sjørfjorden, Norway. *Aquat. Toxicol.* 36:75-98

Braaten, Bjørn (1997) Fremtidens miljøtrusler - hvilke utfordringer bør vi konsentrere oss om? *VANN 1/97*, s. 55-71

Collier, T. (1994) Remediation of contaminated subtidal sediments: How do we proceed? 3rd International Marine Biotechnology Conference, Tromsø, 7.-12. aug. 1994.

Depledge & Fossi (1994) The role of biomarkers in environmental assessment (2) Invertebrates. *Ecotoxicology* 3, 161-172.

Fossi & Leonzio (1993) Nondestructive Biomarkers in Vertebrates. *Lewis Publ.*

Förlin L., Goksøyr A. & Husøy A.-M. (1994) Cytochrome P450 monooxygenase as indicator of PCB/dioxin like compounds in fish. I: Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries, Kramer, ed. CRC Press, s.135-150.

Gadagbui B. K.-M. (1996) Biomarker responses in tropical fish species. Evaluation of ecotoxicological tools for

developing countries. Dr. scient.-avhandl., Univ. i Bergen.

Gadagbui B. K.-M. & Goksøy A. (1996) CYPIA and other biomarker responses to effluents from a textile mill in the Volta River (Ghana) using caged tilapia (*Oreochromis niloticus*) and sediment-exposed mudfish (*Clarias anguillaris*). *Biomarkers* 1, 252-261.

Gibbs P.E. & Bryan G.W. (1994) Bio-monitoring of tributyl tin (TBT) pollution using the imposex response of neogastropod molluscs. I: Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries, Kramer, ed. CRC Press, s. 205-222.

Goksøy A. (1995) Use of cytochrome P450 1A (CYPIA) in fish as a biomarker of aquatic pollution. *Arch. Toxicol.*, suppl. 17, 80-95.

Goksøy A., Beyer J., Egaas E., Grøsvik B.E., Hylland K., Sandvik M. & Utne Skåre J. (1997) Biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus*) and their use in pollution monitoring. *Marine Poll. Bull.* in press.

Gullbring P. & Hammar T. (1993) Remediation of PCB-contaminated sediments in Lake Järnsjön, Emån river system, Sweden. *Wat. Sci. Tech* 28, 297-306.

Huggett et al., eds. (1992) *Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress.* Lewis Publ.

Knutzen J. (1996) Referanseverdier for

miljøgifter i akvatiske organismer - fremdeles store mangler. *VANN* nr. 3-1996, s. 365-374.

Knutzen J., Beyer J., Goksøy A., Green N., Hylland K., Egaas E., Sandvik M. & Skåre J.U. (1994) Tiltaksorienterte miljøundersøkelser i Sørfjorden og Hardangerfjorden 1992. Delrapport 2: Miljøgifter i organismer og biomarkører for miljøgifter. NIVA, Oslo.

McCarthy & Shugart, eds. (1990) *Biomarkers of Environmental Contamination.* Lewis Publ.

National Research Council (1992) *Biologic Markers in Immunotoxicology.* National Academic Press.

OECD (1991) *The State of the Environment.*

Peakall, ed. (1992) *Animal Biomarkers as Pollution Indicators, Ecotoxicological Series no. 1.* Chapman & Hall.

Peakall (1994) The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. *Ecotoxicology* 3, 157-160.

SFT (1993). Klassifisering av miljøkvalitet i fjorder og kystfarvann. Virkninger av miljøgifter. Statens forurensningstilsyn 93:03.

ten Hallers-Tjabbes C.C., Kemp J.F. & Boon J.P. (1994). Imposex in whelks (*Buccinum undatum*) from the open North Sea: relation to shipping traffic intensities. *Marine Poll. Bull.* 28, 311-313.