

# **Dubbelkönighet hos mört – normalt eller miljöinducerat?**

Mats Österholm

Handledare: Leif Norrgren  
Institutionen för patologi, Sveriges Lantbruksuniversitet

Biträdande handledare: Anna Norman  
Institutionen för patologi, Sveriges Lantbruksuniversitet

Examensarbete 2003:53  
Veterinärprogrammet  
Veterinärmedicinska fakulteten  
SLU  
ISSN 1650-7045  
Uppsala 2003

# **Innehållsförteckning**

## **Inledning**

## **Bakgrund**

Östrogena effekter på fisk orsakade av endokrinstörande ämnen  
Vitellogenin som biomarkör  
Dubbelkönighet hos fisk  
Gonadhistologi hos mört  
Lakvattenproblematiken

## **Syfte**

## **Material och metoder**

Hovgårdens avfallsanläggning  
Fiske och provtagning  
Statistik

## **Resultat**

## **Diskussion**

## **Summary**

## Inledning

”Den fråga det rör sig om är huruvida en civilisation kan föra ett skoningslöst krig mot livet självt, utan att samtidigt förstöra sig själv och utan att förlora rätten till att kalla sig civiliserad” (Carson, 1962)

Ett ständigt lika aktuellt ämne för diskussion är människans förorening av miljön. 1962 kom den första upplagan av Rachel Carsons bok ”Tyst vår”, där hon höjer ett varnande finger för de världsvida miljöeffekter som åstadkoms av de gifter människan mer eller mindre medvetet sprider i naturen. I hennes fotspår har nu mängder av forskare studerat effekterna av globala föroreningar orsakade av människan.

Kemikalier och gifter sprids och påverkar såväl naturen som djur och människor. Något som diskuterats livligt under senare år är hur dessa föroreningar kan påverka djur och människors förmåga att reproducera sig. Det är känt att somliga kemikalier kan interferera med, blockera, eller till och med härma, olika steroider och deras verkan, och därmed utöva endokrina effekter. Dessa substanser kallas allmänt endokrinstörande ämnen (Endocrine Disrupting Chemicals, EDCs). Många substanser i miljön kan utöva östrogen effekt, tex. naturligt förekommande substanser såsom fitoöstrogener och mykoöstrogener. Även kemikalier som är tillverkade av människan (syntetiska) och som ingår i mjukgörare, pesticider, läkemedel och detergentter kan vara östrogenlika och kan ge effekter på såväl däggdjur och fågel som fisk (Sumpter & Jobling 1995, Routledge *et al.*, 1998).

## Bakgrund

### Östrogena effekter på fisk orsakade av endokrinstörande ämnen

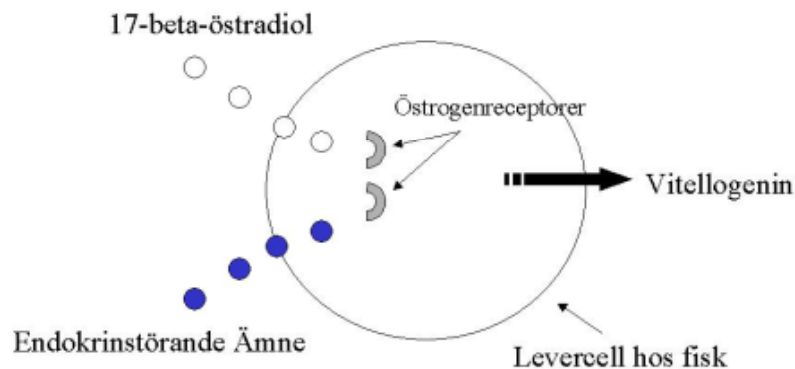
I Storbritannien har undersökningar visat att en varierande andel av den vilt levande mörten (*Rutilus rutilus*) uppvisar dubbelkönighet, dvs. förekomst av honliga äggceller i de hanliga gonaderna. Särskilt hög frekvens av dubbelkönighet har iakttagits i recipienter i anslutning till kommunala reningsverk. Man har funnit att avloppsvatten med såväl kommunalt som industriellt ursprung innehåller ämnen med östrogenliknande egenskaper vilka kan antas bidra till femininisering av vilda mörthanar (Trevor *et al.*, 2001). Man har också visat att experimentell exponering av fisk för avloppsvatten från reningsverk uppvisar bestående rubbningar i gonadutvecklingen (Purdom *et al.*, 1994, Jobling *et al.*, 1998).

Endokrinliknande substansers potens kan vara mycket varierande. Studier har gjorts av 17- $\alpha$ -etinyloestradiol, som härrör från farmaceutisk användning (p-piller). Man har funnit att det är en substans med extremt hög östrogen potens och att den i mycket högre grad inducerar vitellogenesis (se nedan) än det endogena 17- $\beta$ -östradiolet. (Purdom *et al.*, 1994) Sumpter & Jobling (1995) visade att en rad substanser av industriellt ursprung såsom nonylfenol och octylfenol

(nedbrytningsprodukter av detergent), o,p-DDT, aroclor 1221 (PCB-blandning) samt bisfenol A (ingår i plaster) alla hade svag östrogen effekt (Sumpter & Jobling, 1995). I avloppsvattenrecipienter exponeras fisk för en cocktail innehållande både naturliga och syntetiska östrogener. Detta innebär att det är svårt att identifiera vilka kemikalier som ligger bakom förändringarna. (Sumpter, 1998).

### Vitellogenin som biomarkör

Vitellogenin är ett lipoglykofosfoprotein som syntetiseras i levern hos äggläggande hondjur, vilket visat sig leda till ett ökat leversomatiskt index (LSI, levervikt/kropssvikt). Syntesen induceras normalt genom stimulering av östrogenreceptorn från endogent 17- $\beta$ -östradiol. Proteinet frisätts i blodet och tas upp av oocyter via endocytos (Shimizu *et al.*, 2002). Normalt syntetiseras inte vitellogenin hos hanar eller juvenil fisk men eftersom de har genen för bildning kan man därför använda detta protein som en biomarkör för att se om de exponerats för östrogena substanser (Sumpter & Jobling, 1995). Purdom *et al.*, (1994) visade att fisk som levde i avloppsvattenrecipienter hade onormalt höga halter av proteinet vitellogenin i blodplasma. (Purdom *et al.*, 1994)



Förhöjda halter av vitellogenin är en accepterad biomarkör för bedömning av östrogenexponering (Sumpter & Jobling, 1995). Vitellogeninkoncentrationer i blodplasma hos juvenil fisk och hanar i storleksordningen mg/ml har konstaterats i samband med exponering för endokrinstörande ämnen. Vid dessa halter ansamlas vitellogenin i företrädesvis njure och kan därmed orsaka skador, såsom nekros och andra degenerativa förändringar i tubuli och interstitiell vävnad. Även

eosinofila, amorfa inlagringar i hepatocyter har noterats. (Herman & Kincaid, 1988).

## Dubbelkönighet hos fisk

Fiskars könstillhörighet är dynamisk och styrs såväl genetiskt som av omgivningsfaktorer, tex. pH, temperatur och kemikalier. De flesta fiskarters kön är förutbestämt, men i vissa fiskfamiljer är dubbelkönighet och könsbyte frekvent. Mörten anses höra till den stora majoriteten, med stabilt kön utan dubbelkönighet eller könsbyte, dvs. vara gonochoristiska (Nolan *et al.*, 2001) med en tidig gonaddifferentiering till testis eller ovarier.

Exponering för endokrinstörande ämnen kan orsaka dubbelkönighet hos fisk. Jobling *et al.*, (2002) visade att dubbelkönade mörthanar hade reducerad förmåga till reproduktion, då dessa hanar hade sämre spermimotoilitet och därmed försämrade möjligheter till befruktning av äggceller. Fenomenet miljöinducerad dubbelkönighet anses inte vara artspecifikt för mört. Förekomst av äggceller i annars normal testikelvävnad har hittats hos sandkrypare (*Gobio gobio*), från avloppsvattenrecipienter. Dessa individer har även förhöjda nivåer av vitellogenin, något som därmed indikerar att fisken exponerats för östrogena substanser (van Aerle *et al.*, 2001). I floden Po, Italien, har dubbelkönighet påvistats hos barb (*Barbus plebejus*) (Vigano *et al.*, 2001), i Missisippifloden hos stör (*Scaphirhynchus platyrhynchus*) (Harshbarger, Coffey & Young, 2000), i nordöstra Tyskland hos tånglake (*Zoarces viviparus*), storspigg (*Gasterosteus aculeatus*), samt abborre (*Perca fluviatilis*) (Gercken & Sordyl, 2002). I Seinebukten har det påvisats hos skrubbskädda (*Platichthys flesus*) (Minier *et al.*, 2000), för att nämna några exempel.

## Gonadhistologi hos mört

Mört har parvisa, transversalt triangulära testiklar förbundna till kroppsväggen av mesorchium. De har lobulär struktur, utan efferenta gångar. Spermato gonier utvecklas i cystor i lobuli från primordiala könsceller under de tidiga stadierna av spermato genesen. Primära spermato gonier (spermato gonier A) har en stor cirkulär kärna och är cirka 12-16  $\mu\text{m}$  i diameter (Nolan *et al.*, 2000, Jafri, 1990). De skiljer sig från senare mognadsstadier genom större storlek och lågt kärncytoplasmatiskt förhållande. Sekundära spermato gonier (spermato gonier B) är 6-10  $\mu\text{m}$ , och har ett flertal centrala nukleoler. Spermato gonierna undergår en serie mitoser och utvecklas vidare till spermato cyter som är 3-10  $\mu\text{m}$ . Dessa delar sig meiotiskt och övergår till spermato ider som är klart mindre; cirka 2  $\mu\text{m}$ , sfäriska celler med en distinkt rund kärna. Spermato iden utvecklar en flagell och kallas därefter spermato zo. Strax innan lekperioden bryts den lobulära strukturen i testikelvävnaden ned, och spermato zoerna frisätts till lumen (Nolan *et al.*, 2000, Jafri, 1990).

Ovarierna är pariga, transversalt hjärtformade. De är förbundna till kroppsväggen via två mesovarier. Ovarierna omsluts apikalt av glatt muskulatur. Ovarieväggens tjocklek varierar under året, och är som tjockast, och mer veckad, under

lekperioden, dvs. under våren. Oogonier är det första stadiet av honliga könsceller. Dessa är cirka 15-20  $\mu\text{m}$  i diameter med en cirkulär kärna omgiven av ett väldefinierat membran. De undergår meios och utvecklas till oocyter vars senare stadier har väl definierade kromosomer. Oocyterna är reellt stora; strax innan ovulation är de 500-700  $\mu\text{m}$  och består då i huvudsak av fett, protein och kolhydrater (Nolan *et al.*, 2000, Jafri 1990).

## Lakvattenproblematiken

I Sverige har man kunnat iakttä effekter på fisk i lakvattenrecipienter i anslutning till avfallsanläggningar. Det mest dokumenterade exemplet är sjön Molnbyggen i Dalarna som tar emot lakvatten från avfallsanläggningen i Lindbodarna. Förutom ett flertal patologiska fynd, tex. hud- och fenskador, har man noterat endokrina störningar speciellt hos abborre. Dessa yttrar sig som kraftiga sänkningar av gonadosomatiskt index (GSI, gonadvikt/kroppsvikt) speciellt hos honor, och ofullständig utveckling av äggceller (Noaksson *et al.*, 2001).

Sedan dessa observationer gjordes har det riktats allt större intresse för avfallsanläggningar och deras eventuella effekter i recipienterna. 1999 gjordes en mindre studie på mört från Funbosjön i Uppland. Vid studien fann man att en stor andel av de undersökta individerna vara dubbelkönade (Andersen *et al.*, 2002). Funbosjön tar emot avloppsvatten från avfallsanläggningen Hovgården. Avloppsvattnet når sjön via Lissaån som mynnar i den nordvästra delen. Sjön är 4,5 kilometer lång, och på sitt bredaste ställe 500 meter. Som djupast är den cirka 4,7 meter. Den har rik vegetation längs stränderna, mestadels vass och näckrosor. Sjön är artrik med avseende på fiskar (egna undersökningar 2002).

## Syfte

Syftet med detta projekt var att bedöma frekvensen av dubbelkönighet hos mört i Funbosjön under våren och hösten 2002, och att jämföra denna med tidigare observationer och med mörtar som under lång tid vistats under kontrollbetingelser i laboratoriemiljö.

## Material och metoder

### Hovgårdens avfallsanläggning

Avfallsanläggningen är organiserad under Uppsala kommuns tekniska beställarnämnd. Ragn-Sells sköter driften av anläggningen med hjälp av underentreprenörer på tekniska kontorets avfallsavdelnings uppdrag. Anläggningen som ligger cirka 12 kilometer nordost om Uppsala har drivits sedan 1971 och avfall från hela Uppsala kommun deponeras där. Den består av en deponiyta, två slamceller, en återvinningscentral för hushållsavfall, ett reningsverk för lakvatten samt fem hårdgjorda ytor där avfall sorteras och komposteras (Uppsala kommuns tekniska kontor, 2002).

Under 2001 hanterades följande mängder avfall, angivet i ton:

Deponering:

Förbränningsaskor	48.762
Annat avfall	39.424

Kompostering:

Hushållsavfall	7.253
Park- och trädgårdsavfall	5.374

Sortering:

Grov- bygg- och industriavfall	20.816
--------------------------------	--------

Mellanlagring:

Spillolja	408
-----------	-----

Lakvattnet avbördas från dräneringsledningar i botten på deponin. Även vatten från en kondensatcell, de ytor som avsatts för kompostering samt från sorteringsplattan leds via ledningar och ytvattendiken till dräneringen. Efter att ha passerat reningsverket, med mekanisk och kemisk rening, leds vattnet ut i Hovgårdsbäcken/Lissaån som mynnar i den nordvästra delen av Funbosjön. Lakvattnet som avbördas till bäcken innehåller förhöjda halter av organiskt material, kväve, klorid, sulfat och vissa metaller. Då vattnet når Funbosjön uppger Uppsala kommuns tekniska kontor att halterna i de flesta fall är i samma storleksordning som uppströms deponin (Uppsala kommuns tekniska kontor, 2002).

## **Fiske och provtagning**

Fisket i Funbosjön bedrevs med tre metoder; mete, mjärde och nät. Det fiske som genomfördes under våren (n=59, april/maj) gjordes i huvudsak med mete och mjärde. Den fisk som då fångades var förhållandevis stor, och utgjordes till största delen av honor. För att få mindre fiskar där andelen hanar antogs vara större, bedrevs höstfisket (n=118, september/oktober) till största delen med nät, maskstorlek 13 mm. Mörten från Funbosjön jämfördes med mörtar (n=71) fångade i Ekoln (en del av Mälaren) vid Skarholmens Båtklubb 1997 och 1998 och som därefter gått i rent vatten vid EBCs vattenavdelning, Uppsala Universitet fram till provtagning.

Mörtarna fraktades levande till institutionen för patologi, veterinärmedicinska fakulteten, SLU. Före undersökning bedövades fisken genom immersion med MS 222 (syn. Tricaine), vägdes och mättes. För vitellogeninanalys togs blodprov på varje fisk med spruta och kanyl från kaudalvenen. Blodet centrifugerades, och plasman frystes ned i flytande kväve. Fisken avlivades sedan via dekapitering. Buken öppnades, lever och gonaderna dissikerades fram och vägdes varefter LSI och GSI beräknades. Efter vägning fixerades gonaderna i formalin, preparerades

och snittades i sex nivåer. Efter färgning med Hematoxylin Eosin undersöktes preparaten ljusmikroskopiskt.

Blodplasma skickades till Zoofysiologiska avdelningen, Göteborgs Universitet för analys av vitellogeninnivå. Resultatet av vitellogeninanalyserna kommer inte att diskuteras vidare här då resurser saknats att analysera proverna i tid.

### Statistik

För att statistiskt jämföra LSI och GSI mellan olika grupper användes Mann-Whitney *U*-test i StatView 4.5.

## Resultat

Vid fisket i Funbosjön fångades 177 mörtar. Vårfisket resulterade i totalt 59 individer varav 3 var hanar och 56 var honor. Den ljusmikroskopiska undersökningen av hanarna visade varierande testikelmorfologi där alla utvecklingsstadier av spermier fanns representerade, från spermatogonier till spermatozoer (Fig 1.). De två individer som fångades i slutet av maj hade båda genomgått lek. I en av dessa observerades ett mindre antal äggceller i testikelvävnaden.

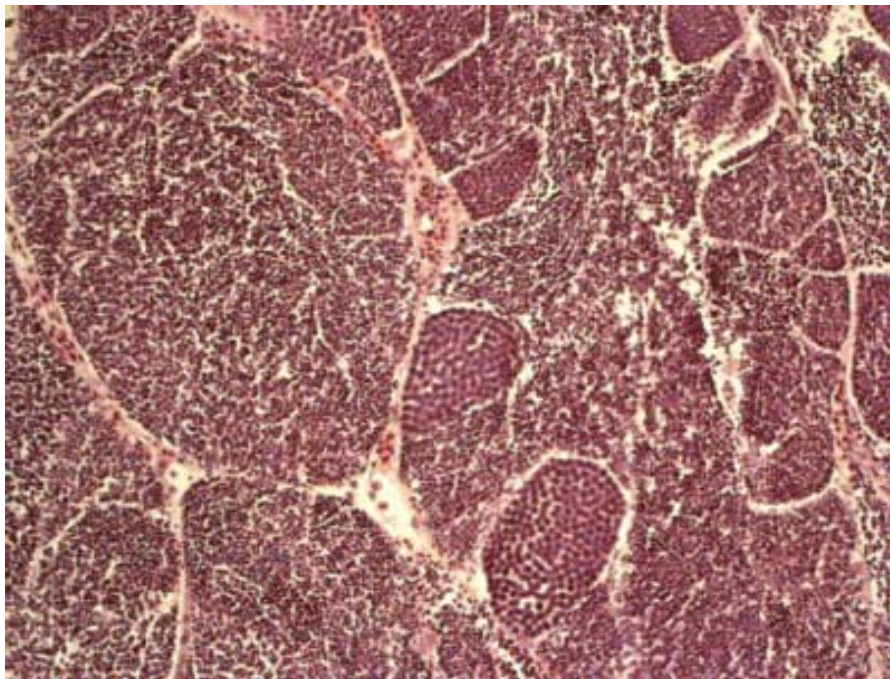


Fig 1. Mört fiskad 020419 i Funbosjön. Hane, testikelvävnad med spermatocyter, spermatider och spermatozoer.



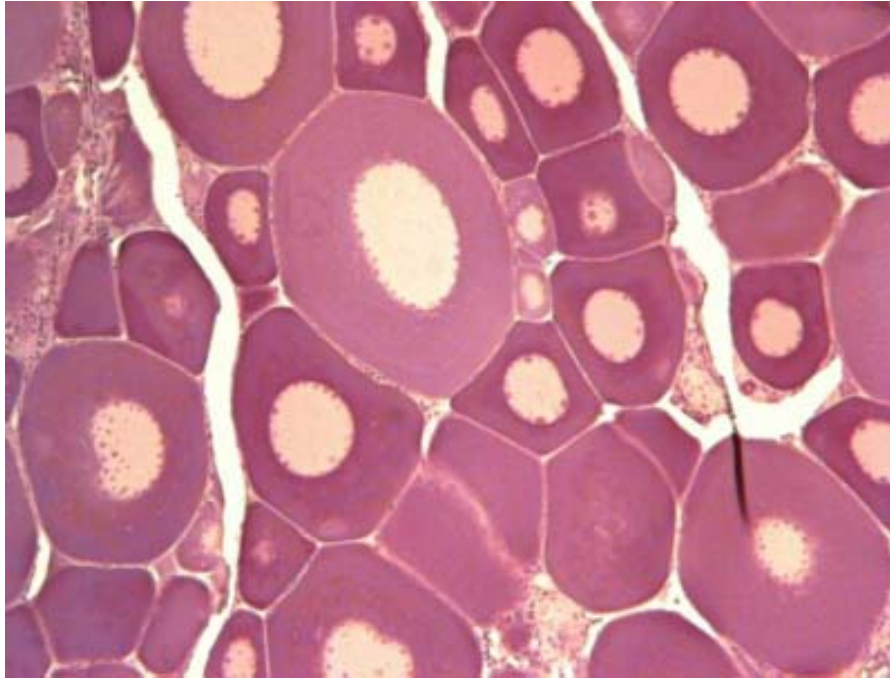


Fig 2. Mört fiskad 020419 i Funbosjön. Hona, ovarier innehållande oocyter i tidigt utvecklingsstadium..

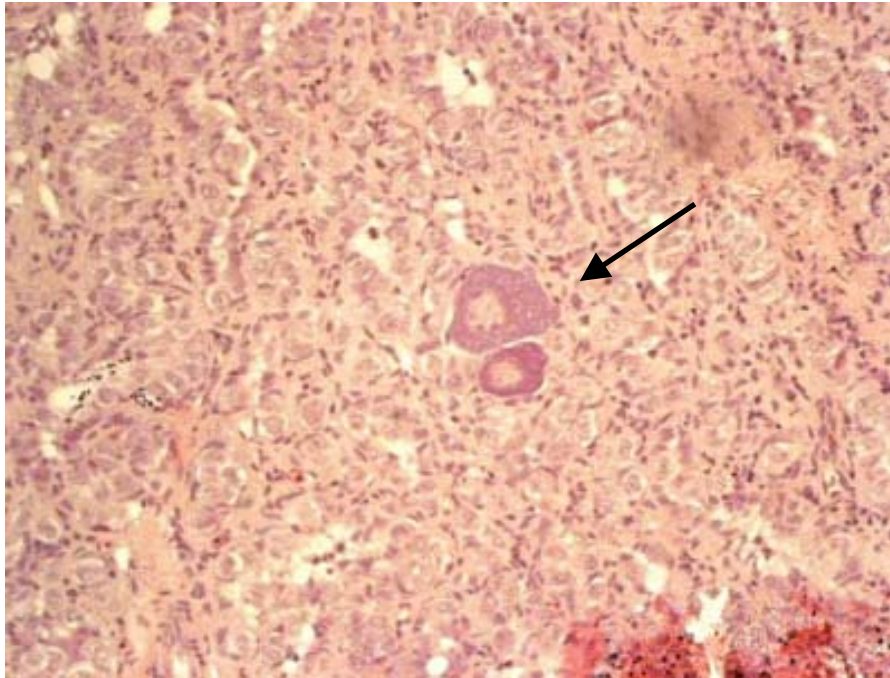


Fig 3. Mört fiskad 020521 i Funbosjön. Förekomst av äggceller i testikelvävnad strax efter lek. På bilden syns två äggceller.

Höstfisket resulterade i totalt 118 individer varav 36 var hanar och 79 var honor. Testikelvävnaden karakteriserades generellt av spermatogonier och spermatocyter. Tre av fiskarna hade odifferentierade gonader (juvenila). De honliga gonaderna innehöll allt från tidiga oocyter, liknande dem från det tidiga vårfisket, till mer mogna oocyter. Inga dubbelkönade individer återfanns.

Den grupp som fångats i Ekoln och sedan dess, dvs. under 4-5 år, gått i rent vatten, uppgick till totalt 71 individer. Av dessa var 45 honor, 19 normala hanar och 7 individer med både äggceller och testikelvävnad. De dubbelkönade individerna uppvisade varierande antal äggceller i testikelvävnaden, allt ifrån enstaka till multipla samlade i kluster. Bland hanarna fanns både individer med omogna testiklar samt sådana med spermatozoer. I denna grupp jämfördes även GSI och LSI statistiskt mellan de hanar som hade normal testikelvävnad och de individer som uppvisade dubbelkönighet. Inga statistiskt signifikanta skillnader kunde dock påvisas.

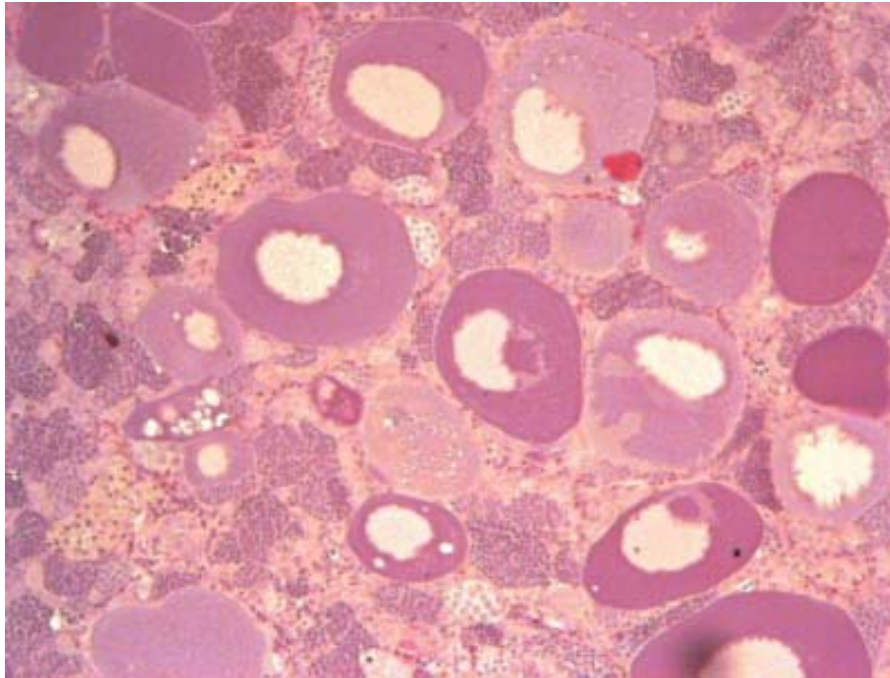


Fig 4. Mört från laboratorium, obducerad 021022. Multipla äggceller i testikelvävnad.

## Diskussion

Resultaten av undersökta mörthanar i Funbosjön visade en klart mindre andel av dubbelkönighet än vad som visades i undersökningen som genomfördes 1999. De mörthanar som undersöktes 1999 fångades i den norra delen av sjön, medan undersökta mörtar 2002 fångades i den södra delen av sjön. Lakvattnet från Hovgården når Funbosjön via Lissaån som mynnar i den norra delen. Vattnet i sjön har ett naturligt södergående flöde och rinner ut i Funboån som via Fyrisån utgör biflöde till Mälaren. Funbosjöns vattenvolym är relativt liten vilket innebär att utspädningseffekten av lakvattnet är begränsad, en nord-sydlig gradient kan dock inte uteslutas. Sjöns ringa storlek torde medföra att fiskar rör sig i hela vattenområdet, dvs. mellan de sydliga och nordliga delarna.

De mörtar som vistats i laboriemiljö sedan 1997 och 1998 visade en hög frekvens av dubbelkönighet. Fiskarna fångades i närheten av en småbåtshamn. Denna typ av miljö har visats vara kontaminerad av såväl olika typer polcykliska kolväten med sitt ursprung i petroleumprodukter, som organiska metallföreningar härstammande från båtbottnfärger. Flera av dessa substanser har visats ha

endokrinstörande egenskaper. Vissa fiskarters fenotypiska könstillhörighet bestäms under perioden strax efter kläckning. Exponering för östrogena alternativt androgena substanser under denna period resulterar i honor respektive hanar. Dessutom kan dubbelkönighet utvecklas. En tänkbar förklaring till den oväntat höga frekvens av dubbelkönighet hos laboratoriemörtarna kan vara en exponering för endokrinstörande ämnen under tidig fas av livscykeln som resulterat i en irreversibel förändring av gonaderna (muntlig information Norrgren, 2003).

Under mörtarnas tid i laboratoriemiljö förvarades de i vattenledningsvatten, med en temperatur på mellan 7 och 14°C. Under denna period har de utfodrats med två typer av cyprinidfoder, vintertid Vitakraft Pond Energy, och sommartid Vitakraft Guldfisk Sticks. Båda dessa fodertyper är i hög grad baserade på växtproteiner. Naturliga ämnen med östrogenliknande egenskaper, s.k. fytoöstrogener förekommer i en mängd växter, tex. baljväxter och klöver. (Lundh & Madej, 2002) Dessa har relativt hög östrogen aktivitet och har visats kunna orsaka försämrad fertilitet hos däggdjur, tex. genom klöversjuka hos får och getter. Lång tids ensidig utfodring med artificiellt fiskfoder kan således förklara den höga incidensen av dubbelkönighet hos laboratoriemörtarna. En annan faktor för laboratoriemörtarna som bör beaktas är antalet fiskar per vattenenhet. Även fiskträgen som är tillverkade av PVC-plast kan inte uteslutas påverka fisken genom migration av mjukgörare från plast till vatten. Den mest använda mjukgöraren, DEHP, har svagt östrogenliknande egenskaper vilket bland annat visats genom vitellogenininduktion hos sebrafisk och skeva könskvoter hos lax (muntlig information Norrgren, 2003, Norrgren *et al.*, 1999).

Mörtarna i Funbosjön uppvisade endast i enstaka fall tecken på patologiska förändringar, tex. apikala skador såsom fenröta, hudsår eller missbildningar vilket indikerar att mörtarnas hälsotillstånd är gott. Andelen dubbelkönade mörtar var liten, endast en individ från vårprovtagningen. Det bör dock betonas antalet undersökta fiskar i denna studie är relativt begränsat.

Dubbelkönighet hos mört är ett komplext fenomen som kan ha sin förklaring i såväl naturlig variation som en rad miljöfaktorer. Ytterligare studier måste genomföras för att förstå betydelsen av dubbelkönighet för den enskilda individen, men framför allt vilka eventuella konsekvenser dubbelkönighet kan ha på populationsnivå.

## Summary

A number of chemical agents, and their degradation products, have been recognized as having estrogenic activity on animals. On fish they interfere with endogenous estrogen and in many cases mimic its activity, thus increase estrogenic response, with elevated levels of vitellogenin. Hence they are called Endocrine Disrupting Chemicals, EDCs. Vitellogenin levels is often used as a biomarker of exposure to estrogenic pollutants. Wastewater from sewage treatment works contains chemicals known as EDCs, and there are evidence of roach (*Rutilus*

*rutilus*) living in recipients of such wastewater having traits of both gender, i.e. oocytes in male gonads (intersex) on histological examination.

This study was done on roach living in Lake Funbosjön Uppland, Sweden. The lake is a recipient of drainage water from a local refuse dumping area. We also investigated a group of roach that had been kept in laboratory environment for 4-5 years. They were captured in Ekoln, a part of Lake Mälaren.

The results of the study showed only one intersex individual from Lake Funbosjön out of 39 males. The laboratory roach had a higher incidence of intersex; 7 out of 26 males had oocytes in testis.

The conclusion of the study is that intersexuality on roach is a complex phenomenon, possibly induced by natural variation and environmental factors. The material in the study is relatively small, and further investigations need to be done.

## Källor

- Andersen L., Petersen G. I., Gessbo Å., Örn S., Bjerregaard H. H. & Norrgren L. 2002. Zebrafish *Danio rerio* and roach *Rutilus rutilus*: Two species suitable for evaluating effects of endocrine disrupting chemicals? *Aquatic Ecosystem Health and management*: 4(3), 275-282
- Carson R., 1962. *Tyst vår*. Ny utgåva med efterskrift av Björn Berglund september 1979, Berglings, Lund, 1979
- Gercken J. & Sordyl H. 2002. Intersex in feral marine and freshwater fish from northeastern Germany. *Marine Environmental Research* 54, 651-655.
- Herman R. L. & Kincaid H. L. 1988. Pathological Effects of Orally Administered Estradiol to Rainbow Trout. *Aquaculture* 72, 165-172.
- Harshbarger J. C., Coffey M. J. & Young M. Y. 2000. Intersexes in Mississippi River shovelnose sturgeon sampled below Saint Louis, Missouri, USA. *Marine Environmental Research* 50, 247-250.
- Jafri S. I. H. 1990. Gametogenesis in roach (*Rutilus rutilus*) (L.) (Cyprinidae: teleostei). *Pakistan J. Zool.*, 22(4), 361-377.
- Jobling S., Nolan M., Tyler R., Brighty G. & Sumpter J. P. 1998. Widespread Sexual Disruption in Wild Fish. *Environ. Sci. Technol.* 32, 2498-2506.
- Jobling S., Coey S., Whitmore J. G., Kime D. E., Van Look K. J. W., McAllister B. G., Beresford N., Henshaw A. C., Brighty G, Tyler C. R. & Sumpter J. P. 2002. Wild Intersex Roach (*Rutilus rutilus*) Have Reduced Fertility. *Biology of Reproduction* 67, 515-524.
- Norrgren L., muntlig information 030110.
- Norrgren L., Blom A., Andersson P.L., Börjeson H., Larsson D. G. J. & Olsson P-E. 1999. Effects of potential xenoestrogens (DEHP, nonylphenol and PCB) on sexual differentiation in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Ecosystem Health and Management* 2 (1999), 311-317.
- Lundh T. & Madej A. 2002. *Fytoöstrogener i foder och dess effekt på husdjuren*, Konferens 29 oktober 2002. Feminisering av Moder natur? Östrogener i naturen och livsmedel
- Minier C., Levy F., Rabel D., Bocquené G., Godefroy D., Burgeot T. & Leboulenger F. 2000. Flounder health status in the Seine Bay. A multibiomarker study. *Marine Environmental Research* 50, 373-377.
- Noaksson E., Tjärnlund U., Albertus T. C., Bosveld C. & Balk L. 2001. Evidence for Endocrine Disruption in Perch (*Perca fluviatilis*) and Roach (*Rutilus rutilus*) in a Remote Swedish Lake in the Vicinity of a Public Refuse Dump. *Toxicology and Applied Pharmacology* 174, 160-176.
- Nolan M., Jobling S., Brighty G., Sumpter J. P. & Tyler C. R. 2001. A histological description of intersexuality in the roach. *Journal of Fish Biology* 58, 160-176.
- Purdum C. E., Hradiman P. A., Bye V. J., Eno N. C., Tyler C. R. & Sumpter J. P. 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chemistry and Ecology* 8, 275-285.

- Rodgers-Gray T. P., Jobling S., Kelly C., Morris S., Brighty G., Waldock M. J., Sumpter J. P. & Tyler C. R. 2001. Exposure of juvenile roach (*Rutilus rutilus*) to treated sewage effluent induces dose-dependent and persistent disruption in gonadal duct development. *Environ. Sci. Technol* 1;35(3), 462-470.
- Routledge E. J., Parker J., Odum J., Ashby J. & Sumpter J. P. 1998. Some Alkyl Hydroxy Benzoate Preservatives (Parabens) Are Estrogenic. *Toxicology and applied Pharmacology* 153, 12-19.
- Shimizu M., Fujiwara Y., Fukada H. & Hara A. 2002. Purification and Identification of a Second Form of Vitellogenin From Ascites of Medaka (*Oryzias latipes*) Treated With Estrogen. *Journal of experimental zoology* 293, 726-735.
- Sumpter J. P. & Jobling S. 1995. Vitellogenesis as a Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment. *Environ. Health Perspect* 103 (suppl 7), 173-178.
- Sumpter J. P. 1998. Xenoendocrine disrupters – environmental impacts. *Toxicology Letters* 102-103, 337-342.
- Tekniska Kontoret Uppsala 2001. Miljörapport 2002 Hovgårdens avfallsanläggning, diarienummer TBN-2002-0046 91.
- van Aerle R., Nolan T. M., Jobling S., Christiansen L. B., Sumpter J. P. & Tyler C. R. 2001. Sexual Disruption in a second species of wild cyprinid fish (the gudgeon, *Gobio gobio*) in United Kingdom freshwaters. *Environ. Toxicol. Chem. Dec:20(12)*, 2841-2847.
- Vigano L., Arillo A., Bottero S., Massari A. & Mandich A. 2001. First observation of intersex cyprinids in the Po River (Italy). *The Science of the Total Environment* 269, 189-194.