

Indikatorer för effekter från organiska ämnen i limniska system

John Sternbeck (WSP), Mikael Remberger (IVL)
Katarina Josefsson (WSP)
B1771
Februari 2008

Rapporten godkänd
08-02-14



Lars-Gunnar Lindfors
Forskningschef



Organisation IVL Svenska Miljöinstitutet AB	Rapportsammanfattning
Adress Box 21060 100 31 Stockholm	Projekttitlel Anslagsgivare för projektet Naturvårdsverket, Dnr 07/53
Telefonnr 08-598 563 00	
Rapportförfattare John Sternbeck (WSP), Mikael Remberger (IVL) och Katarina Josefsson (WSP)	
Rapporttitlel och undertitel Indikatorer för effekter från organiska ämnen i limniska system.	
Sammanfattning <p>På uppdrag av Naturvårdsverket har möjligheten utretts att använda biomarkörer som indikatorer på effekter från organiska ämnen i sötvatten. Avsikten är att kunna föreslå ett system av biomarkörer som ska kunna implementeras inom den nationella miljöövervakningen i sötvatten. Arbetet har inletts med att beskriva hotbilden så som den är känd idag: vilka kemiska ämnen påträffas i våra sjöar och vattendrag; vilka effekter kan de ge upphov till hos t.ex. fisk; i vilka typmiljöer förekommer dessa ämnen? Därefter har olika biomarkörer beskrivits och utvärderats. Internationella erfarenheter av långsiktig övervakning med biomarkörer sammanfattas också. Följande effekter bedöms relevanta att följa i svenska ytvatten:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> genotoxiska effekter <input type="checkbox"/> påverkan på immunförsvaret <input type="checkbox"/> reproduktionsstörningar <p>Dessutom bör biomarkörerna återspegla allmän hälsostatus samt exponering för kemiska ämnen. Flertalet biomarkörer påverkas inte bara av organiska ämnen, utan även av andra kemikalier och faktorer såsom temperatur, årstid, ålder mm. För att biomarkörer ska kunna användas som indikatorer på kemisk påverkan (orsak och ekologisk konsekvens) bör övervakningen integreras med kemiska och biologiska mätningar. I rapporten diskuteras även hur ett system med biomarkörer skulle kunna implementeras inom den nationella miljöövervakningen i sötvatten, samt vilka frågor som kvarstår att belysa.</p>	
Nyckelord samt ev. anknytning till geografiskt område eller näringsgren Bioindikatorer, exponering, effekter, EROD, P450, AST, Vtg, steroider, DNA-addukter, DNA-brott, GST, SOD, GPOX, Omics, CAT, Ach, Lysosomer, mikrokärn, onkogener, PAH, lymfocyter.	
Bibliografiska uppgifter IVL Rapport B1771	
Rapporten beställs via Hemsida: www.ivl.se, e-post: publicationservice@ivl.se, fax 08-598 563 90, eller via IVL, Box 21060, 100 31 Stockholm	

Sammanfattning

På uppdrag av Naturvårdsverket har möjligheten utretts att använda biomarkörer som indikatorer på effekter från organiska ämnen i sötvatten. Avsikten är att kunna föreslå ett system av biomarkörer som ska kunna implementeras inom den nationella miljöövervakningen i sötvatten. Arbetet har inletts med att beskriva hotbilden så som den är känd idag; vilka kemiska ämnen påträffas i våra sjöar och vattendrag; vilka effekter kan de ge upphov till hos t.ex. fisk; i vilka typmiljöer förekommer dessa ämnen? Därefter har olika biomarkörer beskrivits och utvärderats. Internationella erfarenheter av långsiktig övervakning med biomarkörer sammanfattas också. Följande effekter bedöms relevanta att följa i svenska ytvatten:

- ❑ genotoxiska effekter
- ❑ påverkan på immunförsvaret
- ❑ reproduktionsstörningar

Dessutom bör biomarkörerna återspegla allmän hälsostatus samt exponering för kemiska ämnen. Flertalet biomarkörer påverkas inte bara av organiska ämnen, utan även av andra kemikalier och faktorer såsom temperatur, årstid, ålder mm. För att biomarkörer ska kunna användas som indikatorer på kemisk påverkan (orsak och ekologisk konsekvens) bör övervakningen integreras med kemiska och biologiska mätningar. I rapporten diskuteras även hur ett system med biomarkörer skulle kunna implementeras inom den nationella miljöövervakningen i sötvatten, samt vilka frågor som kvarstår att belysa.

Summary

The possibility to use biomarkers as indicators of effects from organic pollutants in fresh water systems have been investigated on behalf of the Swedish Environmental Protection Agency. The intention is to suggest a battery of biomarkers to be used in the Swedish national long-term environmental monitoring of fresh water. The task was initiated by describing the environmental threats as we know them today: what chemical substances are found in our lakes and water-courses, what their possible biological effects are, and in what habitats these chemicals are found? Thereafter, different biomarkers have been described and evaluated. International experiences of longterm environmental monitoring with biomarkers have also been summarized. The following effects are considered relevant to monitor in Swedish surface waters:

- ❑ Genotoxic effects
- ❑ Effects on the immune system
- ❑ Effects on the reproductive system

Furthermore, biomarkers should also be used that indicate general health status and exposure to chemical substances. The majority of the biomarkers evaluated are not exclusively affected by organic substances, but also by other chemical substances and factors such as e.g. age, temperature and season. To be able to use biomarkers as indicators of toxic impact from chemicals in the environmental monitoring, the biomarkers should be integrated with the chemical and biological surveys. The report also discusses how a battery of biomarkers could be implemented within the national environmental monitoring of fresh water, and what questions that need further attention.

Innehållsförteckning

Sammanfattning.....	1
Summary	1
1 Inledning.....	3
2 Uppdragets syfte och mål.....	4
3 Genomförande och metodik.....	4
4 Hotbilden.....	5
4.1 Genomgång av olika ämnesgrupper.....	5
4.2 Källor & Spridningsvägar.....	10
4.3 Sammanfattning av den potentiella hotbilden.....	12
5 Inventering av biomarkörer.....	14
5.1 Biomarkörer för könsendokrina effekter.....	17
5.2 Biomarkörer för påverkan på immunförsvaret.....	18
5.3 Biomarkörer för neurotoxiska effekter.....	18
5.4 Biomarkörer för genotoxiska effekter.....	19
5.5 Biomarkörer för oxidativ stress.....	19
5.6 Ospecifika biomarkörer för exponering.....	20
6 Biomarkörer i existerande övervakningssystem.....	21
6.1 Naturvårdsverkets marina program.....	21
6.2 HELCOM.....	21
6.3 OSPAR/ICES.....	22
6.4 AMAP.....	22
6.5 USA.....	23
6.6 Andra erfarenheter.....	24
6.7 Sammanfattning – effektövervakning i etablerade system.....	24
7 Utvärdering av biomarkörer för limnisk övervakning.....	25
7.1 Förutsättningar.....	26
7.2 Biomarkörer för exponering.....	28
7.3 Reproduktionsstörningar.....	34
7.4 Immunförsvaret.....	38
7.5 Neurotoxiska effekter.....	43
7.6 Genotoxiska effekter.....	43
7.7 Allmänna effekter.....	46
7.8 Sammanfattning av olika biomarkörer.....	47
8 Implementering i den limniska miljöövervakningen.....	49
9 Sammanfattning och rekommendation.....	51
10 Referenser.....	52

1 Inledning

Den nationella miljöövervakningen i sötvatten omfattar både yt- och grundvatten, och beskriver det biologiska och kemiska tillståndets utveckling över tid. Programmet omfattar f.n. två typer av provtagningsstationer: trendstationer och omdrevsstationer. Trendstationer i sjöar och vattendrag analyseras årligen (eller oftare) avseende vattenkemi och tillståndet för fauna och flora.

Programmet är f.n. under revidering, men övervakningen av organiska miljögifter i sötvatten genomförs dels genom provbankning av abborre och röding (för retrospektiva trendstudier) och dels genom enstaka riktade insatser. Under de senaste åren har ramdirektivet för vatten varit i fokus, bl.a. genom mätningar av de prioriterade ämnena i ytvatten, sediment och fisk (Bignert, 2005; SWECO, 2007). I det s.k. screeningprogrammet genomförs också mätningar av olika organiska föreningar. Många av dessa mätningar genomförs i sötvattenmiljöer men det finns ingen systematik, t.ex. avseende provlokaler eller matriser, och mätningarna upprepas sällan. Fiskfaunan övervakas också på populations- och samhällsnivå. Tidigare har elva sjöar inventerats årligen och flera sjöar mer sällan (Holmgren, 2007). Från 2008 kommer 15 sjöar undersökas årligen. Inom programområdet Jordbruk övervakas dessutom många bekämpningsmedel som används inom jordbruket.

Totalhalter av vissa enskilda miljögifter kan utvärderas avseende risk för skadliga effekter, genom jämförelse mot effektbaserade riktvärden. Alla riktvärden har inneboende osäkerheter och medger sällan bedömning av samverkans effekter från olika föroreningar. Som komplement kan biomarkörer användas för övervakning av effekter. Biomarkörer kan studeras på olika organisationsnivåer: molekylär – individ – population – ekosystem. Orsakssambanden mellan påverkansfaktor (t.ex. ett miljögift) och effekt blir ofta tydligare på lägre organisationsnivå, dvs specificiteten är högre. Den ekologiska relevansen är dock vanligen högre på högre organisationsnivåer. Detta illustrerar vikten av att vara tydlig med sitt syfte när ett övervakningsprogram med biomarkörer ska utformas.

Biomarkörer på molekylär nivå kan variera mellan t.ex. olika årstider och med icke-föroreningsrelaterade faktorer (Van der Oost m.fl., 2003; Hagger m.fl., 2006). För att kunna använda biomarkörer som indikator på förändrad exponering för/effekter av organiska föroreningar krävs därför kunskap om naturliga kortsiktiga variationer, samt att långsiktigt program som möjliggör att skilja på oregelbundna mellanårsvariationer och långsiktiga trender. Därutöver är det en stor fördel om mätningarna är integrerade med övrig kemisk och biologisk övervakning.

2 Uppdragets syfte och mål

Syftet är att föreslå en eller flera indikatorer för biologiska effekter av organiska ämnen i limniska system. Indikatorn (-erna) ska kunna användas inom miljöövervakningen (toxicitetsscreening), och kunna ge en tidig varning om eventuella risker på individ, population och ekosystem. Schematiskt kan effektövervakningens roll i miljögiftsövervakningen illustreras enligt nedan:

Kemisk övervakning ↔ effektövervakning ↔ biologisk övervakning

Målen är att

- Inventera tillgängliga biologiska indikatorer för kända organiska ämnesgrupper.
- Utvärdera dessa avseende bl.a. selektivitet, känslighet och genomförbarhet.
- Föreslå indikatorer som ger möjlighet att påvisa trender och tidiga effekter i lågpåverkade sjöar, t.ex. de s.k. provbankssjöarna och trendsjöarna, men även i mer påverkade områden.

I första hand är Naturvårdsverkets syfte att systemet ska användas i s.k. lågpåverkade sjöar och sätta nationella bakgrundsnivåer. Dessa bakgrundsnivåer ska sedan kunna utnyttjas vid regionala och lokala undersökningar av mer påverkade områden. Metodiken ska kunna användas i hela landet. Det finns inga krav på att biomarkörerna i sig ska kunna ge en förklaring av vare sig orsaker eller ekologiska konsekvenser. Dessa frågor kan vid behov bli föremål för riktade insatser där biomarkörer utgör ett av flera underlag. Vi bedömer därför att biomarkörer på molekylär och individnivå är de som bäst tjänar syftet.

Utgångspunkten är att indikatorn ska bygga på mätningar av parametrar som representerar *in situ* exponering, och alltså inte innefatta artificiell exponering. Det är också viktigt att indikatorn återspeglar just exponering för organiska ämnen.

3 Genomförande och metodik

Arbetet har genomförts stegvis. Efter en inledande beskrivning av den kemiska hotbilden i svenska sötvatten har en bred inventering av biomarkörer utan djupare metodikgranskning genomförts. Denna inventering innefattar en bedömning av hur allmänt vedertagna olika biomarkörer är och om de är relevanta för den aktuella hotbilden samt för de kritiska effekter som bör beaktas. Detta redovisas i kapitel 5. Efter en genomgång av biomarkörer i olika långsiktiga övervakningsprogram (kapitel 6) presenteras en mer detaljerad granskning av ett antal biomarkörer i kapitel 7.

4 Hotbilden

I detta kapitel genomförs en genomgång av de kemikalier vars egenskaper och användning inneburit att de fått stor spridning i miljön. Kapitlet syftar till att utgöra en referens så att relevansen av olika biomarkörer kan bedömas i förhållande till rådande eller förväntad hotbild. Naturvårdsverkets Screeningprogram utgör ett viktigt underlag eftersom resultaten från dessa beskriver den aktuella situationen i Sverige, och omfattar både påverkade områden och bakgrundsområden. Vidare har vetenskaplig litteratur använts för att identifiera föreningar som kan ingå i hotbilden. Ämnen och ämnesgrupper som är internationellt prioriterade (t.ex. Water Framework Directive och OSPAR) har också beaktats i detta arbete. Kriterier som används vid selektionen av de kemikalier som ingår i hotbilden är:

- föreningen som kan transporteras via luft och tillföras sjöar genom luftdeposition
- föreningen är stabil i miljön
- ämnet används i en omfattning och på ett sätt som kan medföra stor spridning till miljön
- föreningarna har påvisats i den svenska miljön i både urbana och opåverkade referenssjöar.

Föreningar och föreningsgrupper som behandlas här finns sammanställda i tabell 1.

4.1 Genomgång av olika ämnesgrupper

I detta avsnitt ges en genomgång av olika ämnen och ämnesgrupper som bedömts kunna ingå i hotbilden för limniska system.

4.1.1 Biocider

Biocider är sällan skräddarsydda med selektiv verkan utan har ofta en relativt bred akut effekt. Till denna grupp hör också kemikalier som används som ”antifouling agents”, slembekämpning och träimpregnering. Ett antal olika biocider som har ingått i svenska screeningprogram sammanfattas i tabell 1. Några av de undersökta biociderna (t ex bronopol, propikonazol, 4-klor-3-metylfenol och resorsinol, parabener) är kemiskt labila och återfanns därför bara i ett fåtal miljöprover och aldrig i bakgrundsmiljöer. Föreningarna utgör därför sannolikt inget hot mot den akvatiska miljön (Remberger m.fl. 2006).

2-merkaptobensotiazol har detekterats framför allt i kommunala reningsverk, men även i sediment från urbana områden. Föreningen är tillräckligt stabil för att kunna spridas via luft (Remberger m.fl. 2006).

Triklosan, en bakteriocid som tillsätts bl a. tandkräm, sprids främst via reningsverken. En stor del av det till reningsverket inkommande triklosanet bryts ned eller binds till slammet. Trots det detekteras triklosan regelbundet i utgående renat vatten från reningsverken (t ex. Remberger m.fl. 2006). Föreningen har också påvisats i luftprover från städer och från bakgrundsområden vilket betyder att föreningen är tillräckligt stabil för att kunna nå en stor spridning. Triklosan har inte påvisats i sediment eller biotaprover från ”opåverkade” sjöar (Remberger m.fl. 2006). Föreningen kan metyleras i miljön av aeroba bakterier vilket gör föreningen mer lipofil och ökar därmed biokoncentreringspotentialen (Balmer m.fl. 2004). Metyleringen ökar också föreningens ångtryck

och fotokemiska stabilitet och ökar därmed möjligheten för lufttransport av föreningen (Lindström m.fl. 2002).

Tabell 1. Föreningar och föreningsgrupper som undersökts i den svenska miljön.

Förening	Ref.	Sprids via & anm.
Bronopol	B1700	Instabil. Ej hittad i miljön
Propikonazol	B1700	Ej hittad i miljön
4-klor-3-metylfenol	B1700	Ej hittad i bakgrundsprover eller luft
Resorsinol	B1700	Ej i miljöprover. Instabil.
Parabener	B1700	Återfinns i urbana områden. Relativt instabil.
2-merkaptobensotiazol	B1700	Ej detekterade i luft. Höga halter i slam. långlivad
Triklisan	B1700; B1477	Har påvisats i luftprover.
Läkemedel	B1689; B1751	Via kommunala & enskilda avlopp. NSAIDs föreslås ingå i WFD.
Könshormoner	B1689	Kommunala och enskilda avlopp. Djurbesättningar
Klorbensener	B1557	1,4-CB och HCB sprids med luft.
Pentaklorfenol	B1474	Återfinns bara i låga halter i miljön. Lufttransport
Herbecider	SLU 2002:6	Besprutning inom jordbruket. MCPP förslag till WFD.
Tennorganiska föreningar	Sternbeck m.fl., 2006; Tesfalidet 2003	Vattenmiljön (båtbottenfärg) TBT ingår i WFD
WFD biocider	SWECO 2007	Få som är tillåtna i Sverige. (Isoproturon)
Ftalater	B 1167; Sternbeck m.fl. 2003; B1750	Vanligt förekommande. Lufttransport. Föreslagen att ingå i WFD
Adipater	B1645	Låga halter: bryts lätt ned.
Siloxaner	B 1643	I luft & slam
PFAS	B 1698	I alla faser i bakgrund. Förslag till WFD.
Alkylfenoler	B 1538 B 1594	Vanligt förekommande i miljön. Lufttransport.
Bromerade flamskyddsmedel	Remberger, m.fl. (2004a); ITM 2003-09- 03	Ingår i WFD. Luftburen. TBBPA föreslås ingå i WFD.
Endosulfan	B1641; SWECO 2007	Med livsmedel & luft
PAH		Ingår i WFD. Luftburen
Pesticider (1)	Sternbeck och Persson, 2005	Lufttransport. Ingår i miljöövervakningsprogram
PCB, PCDD, PCDF, Bisfenol A	WSP 2004	Föreslagen att ingå i WFD.
Myskämnen	Morgensen, m.fl. 2004; Eriksson m.fl. 2001	Föreslagen att ingå i WFD.

DDT, HCH, endrin, dieldrin, aldrin m.fl.

4.1.2 Läkemedel

Läkemedel är designade att ha en specifik effekt. Denna effekt är väl dokumenterad för människan men kunskapen om oavsiktliga effekter i miljön är dålig eller fragmentarisk. Ett antal läkemedel screenades i den svenska miljön år 2006 (Andersson m.fl. 2006) och 2007 (Woldegiorgis m.fl. 2007). Många av läkemedlen återfanns i varierande frekvens i utgående vattnet och i slam från kommunala reningsverk. Antiinflammatoriska läkemedel (NSAIDs) återfanns i alla slam och vattenprover från reningsverken. Tillsammans med betablockeraren metoprolol är det de läkemedel som förekommer i högst halter i utgående avloppsvatten (Helmfrid m.fl. 2006). Två benzodiazepiner (oxazepam och citalopram) återfanns frekvent i höga halter. I lägre halter och mer sällan detekterades även risperidon (antipsykos), zolpidem (sedativ) och flunitrazepam (SSRI) (Woldegiorgis m.fl. 2007).

Antibiotika som förekom frekvent i utgående avloppsvatten var tetracyklin och chlorocyklin. Mer sällan påvisades doxycyklin, oxytetracyklin och demeclocyklin. Halten i vattenfasen är dock relativt låg (Andersson m.fl. 2006). Spridningen av ovan nämnda läkemedel sker i huvudsak via reningsverken eftersom föreningarna inte är flyktiga.

Läkemedelsrester (t ex. NSAIDs; tetracykliner; hormoner) har detekterats i ytvatten och sediment i urbana miljöer (t ex. Läkemedelsverkets 2004; Halling-Sörensen m. fl, 1998, Kolpin m. fl. 2002, Wiegel m. fl. 2002, Lindberg m.fl. 2005, Woldegiorgis m.fl. 2007). Ännu saknas det data på hur långt från den urbana miljön som läkemedlen sprids varför det inte går att värdera problemets omfattning ännu. En möjlig spridningsväg för läkemedel att nå sjöar och vattensystem utanför den urbana sfären är ”enskilda avlopp” (se 4.2.3).

Veterinärmedicinska produkter (antibiotika och antiparasitära) screenades år 2006. De undersökta antibiotika och antiparasitära produkterna detekterades i vare sig ytvatten, sediment eller gödsel (Sternbeck m.fl. 2007).

Hormoner är främst ett problem i de vattendrag som är påverkade av avloppsvatten från kommunala reningsverk. Könshormoner kan också nå vattenmiljön från djurbesättningar (Andersson m.fl. 2006). Påverkan på fiskens reproduktion har påvisats i många studier (t ex. Hileman 1996).

4.1.3 Bekämpningsmedel

Föreningarna 1,4-diklorbensen och hexaklorbensen är inte tillåtna att använda i Sverige men detekteras trots det regelbundet i luft- och sedimentprover (Sternbeck m.fl. 2003; Kaj och Dusan 2004). Föreningarna är stabila och kan därför transporteras via luft till bakgrundsområden. Ämnena har påvisats i abborrar från bakgrundssjöar (Kaj och Dusan 2004).

Pentaklorfenol (PCP) har använts som biocid i impregneringsmedel för trä och textilier men förbjöds i Sverige 1978. PCP är en relativt stabil förening med ett ångtryck som gör att den har uppnått global spridning. PCP sprids via luft både som fenol och som metaboliten pentakloranisol (PCA; Allard, m.fl. 1987; Palm m.fl. 2002). Halterna som uppmäts av PCP och PCA i den svenska miljön är generellt låga men förhöjda halter förekommer vid t.ex. vissa äldre industrianläggningar, (Palm m.fl. 2002).

Inom jordbruket används ett stort antal olika herbicider. SLU har gjort många undersökningar på vattendrag i jordbruksområden och påvisat relativt höga halter av vissa herbicider (Sundin m.fl. 2002; Adielsson m.fl., 2006). Mest frekvent förekommande var bentazon, glyfosat, 4-klor-2-metylfenoxiättiksyra (MCPA) och, 2-(4-chloro-2-methylphenoxy)-propionsyra isooctyl ester (mekaprop-P). Vanliga var också fluroxipur, dikloroprop och atrazin. Atrazin är förbjuden i Sverige sedan 1989. Flera bekämpningsmedel uppträdde sporadiskt i halter över de effektbaserade riktvärdena, t.ex. isoproturon, metazaklor, fenitrition, metribuzin och pirimikarb.

Bekämpningsmedlet malation och mjukgörare baserade på organiska fosfatestrar har det gemensamma att de är neurotoxiska (AChE inhibitorer). Malation är förbjudet i Sverige men organiska fosfatestrar har många tillämpningar. Föreningarna kan spridas via luft (Haglund och Marklund, 2004).

De högklorade pesticiderna (HCH, DDT, klordan, transnonaklor m.fl.) har varit förbjudna i decennier. Halterna har därför sakta sjunkit i den svenska miljön och är idag generellt låga

(Sternbeck och Persson 2005). På grund av sin persistens och långväga transport kommer sannolikt dessa föreningar att finnas kvar i miljön under lång tid.

Användning av biociden endosulfan är förbjöds i Sverige 1995 men är tillåten i några europeiska länder. Endosulfan kan nå den svenska miljön dels genom import av frukt och grönsaker men också genom lufttransport (Palm Cousins m.fl. 2005; Kaj m.fl. 2007). Endosulfan har detekterats i låga halter i svenska ytvatten (SWECO, 2007) men inte i fisk- och sedimentprover. I sedimentprover påvisades en omvandlingsprodukten endosulfansulfat i låga halter (Palm Cousins m.fl. 2005).

Organiska tennföreningar är kända som ett marint problem. Studier visar dock att flera tennorganiska föreningar sprids diffust från urbana områden dvs. återfinns i avloppet från reningsverk och i dagvatten (Sternbeck m.fl., 2006). Halterna är i allmänhet låga men lokalt kan halter överskrida ”environmental quality standard” (EQS) uppmätts (SWECO 2007).

I dagvatten från PVC-industrier kan halterna vara betydande. Båtbottenfärger kan lokalt (båthamnar) ge betydande tillskott. Oktyl- och butyltenn har påvisats i luftprover och regnvatten. Resultaten antyder att föreningarna kan spridas via luften (Sternbeck m.fl. 2006).

4.1.4 Mjukgörare

Ftalater används för att göra plaster flexibla. Den mest kända mjukgöraren är DEHP. Adipater och organiska fosforföreningar används också för detta ändamål men i betydligt mindre skala. Detta avspeglas också i de mätningar som utförts i den svenska miljön. Man återfinner DEHP i alla delar av miljön men halterna är högst i vattendragens sediment. Ftalater och organiska fosforföreningar återfinns i utgående vatten från reningsverken (Haglund och Marklund 2004; Haglund och Olofsson 2005; Remberger m.fl. 2005). Gemensamt för ftalater (Parkman och Remberger 1994; Sternbeck m.fl. 2003; Palm-Cousins m.fl. 2007) och organofosfater (Haglund och Marklund 2004) är att de kan sprids globalt via lufttransport.

Åren 2000-2001 genomfördes en frivillig substituering av DEHP till förmån för ftalaterna DINP och DIDP. Detta skifte kan nu spåras i luft-, slam och sedimentprover: halterna av de ”nya” ftalaterna ökar relativt DEHP och kan i en del prover vara dominerande (Palm-Cousins m.fl. 2007). De högmolekylära ftalaterna (DEHP, DINP; DIDP) har en relativ hög persistens framför allt i sediment men räknas inte som långlivade. Ftalatestrar med långkedjiga alkoholer (> C₆) har ingen påvisbar toxisk effekt på vattenlevande organismer (Staples m.fl. 1997; David och Gans 2003; Bradlee och Thomas 2003). Adipater bryts antagligen för snabbt ned i atmosfären för att kunna transporteras längre sträckor (Remberger m.fl. 2005).

4.1.5 Siloxaner

Siloxaner är en stor grupp av ämnen med molekylvikt från några hundra till flera hundratusen. De som har undersökts i den svenska miljön är tre cykliska (D4, D5, D6) och fyra linjära (MM, MDM, MD2M, MD3M) polydimetylsiloxaner med låg molekylvikt. Undersökta föreningarna är viskösa vätskor vid rumstemperatur med högt ångtryck. Siloxanerna har höga Koc-värden och förväntas därför binda till partiklar i vattenmiljön.

Siloxanerna har en mycket bred användning och är en högvolymskemikalie. Siloxaner används inom kosmetikaindustrin, är ett bränsleadditiv, används i färg, lacker, rengöringsmedel mm. (Kaj, m.fl. 2005).

Av siloxanerna återfanns D5 i högst halt i slam och i urban luft. D4 och D6 förekom också frekvent. De linjära siloxanerna återfanns i betydligt lägre halter. Låga halter återfanns i sediment från vattendrag i urbant område. Inga siloxaner kunde påvisas i vatten och fiskprover från såväl urbana som bakgrundsområden (Kaj, m.fl. 2005). D4 är toxisk och finns upptagen på OSPAR listan.

4.1.6 Alkylfenoler och bisfenol A

Under år 2004 undersöktes förekomsten av 30 alkylfenoler i den svenska miljön. Gruppen *tert*-butylfenoler var vanligt förekommande i avloppsvatten, rötslam och sediment men i relativt låga halter. Frekventast återfanns 4-*tert*-butyl-butylfenol, 2,4-di-*tert*-butylfenol och 2,6-di-*tert*-4-metylfenol. I luftprover från bakgrundsområden detekterades bara 2,6-di-*tert*-4-metylfenol. Inga av *tert*-butylfenolerna återfanns i opåverkade sjösediment.

I den svenska screeningundersökningen 2004 återfanns 4-nonylfenol (4-NP) och 4-*tert*-oktylfenol (t-OP) i samtliga insamlade vatten-, sediment- och slamprover (Remberger m.fl. 2004b). 4-NP och t-OP påvisades i denna undersökning i vatten- och sedimentprov från opåverkade sjöar. Halterna av nonylfenoler är förhöjda i sjösediment i urbana områden (Sternbeck m.fl. 2003). En nyligen genomförd studie visar att 4-NP och t-OP uppträder allmänt i svenska sjöar och vattendrag (SWECO, 2007). 4-NP och t-OP har visat sig ha en svag östrogen effekt i fisktester.

Bisfenol-A är en synteskemikalie som används för tillverkning av plaster (polycarbonat), lim, färger mm. Eftersom föreningen har påvisats i luftprover visar det att den har en potential att spridas långväga (WSP 2004). Föreningen har också påvisats i låga halter i fisk och sjösediment i såväl urbana som bakgrundsområden (WSP 2004, Sternbeck 2007). Bisfenol-A har en svag östrogen effekt.

4.1.7 PAH

Polycykliska aromatiska kolväten (PAH) kommer från många olika källor, både naturliga och antropogena. De viktigaste källorna är olika former av förbränning t ex. i bilmotorer och skogsbränder. PAH sprids främst via luft och genom luftdeposition återfinns PAH i alla miljöer. PAH med 5-6 aromatiska ringar är de som har den högsta potentialen att orsaka cancer. PAH själv är inte cancerogena utan blir det först efter aktivering via cytokrom P450 systemet (e.g. Parkinson, 1996).

4.1.8 Perfluorerade ämnen

Perfluorerade ämnen är generellt sett mycket stabila föreningar. I dag är intresset fokuserat på PFAS som är ett samlingsnamn för ett stort antal alifatiska perfluorerade sulfonater, karboxysyror och sulfonamider med kedjelängd på C₄-C₁₁. PFAS har nått en stor spridning och har påvisats i luft, vatten, nederbörd, sediment och fisk från bakgrundsområden (Kallerborn m.fl. 2004; Woldegiorgis m.fl. 2006). Reningsverken är en viktig källa för PFAS och kan påverka sjösystem i urbana områden (Woldegiorgis m.fl. 2006). Få ekotoxikologiska data finns tillgängliga men effekt på zooplankton har rapporterats. De toxiska effekterna kan förklaras med störningar i cellmembranen. Kroniska toxdata saknas (Kallerborn m.fl. 2004). PFOS har i tester med fisk visat sig orsaka oxidativ stress och ge påverkan på vitellogeninhalt i plasma. Det senare kan bero på att halten 17 β -estradiol och 11-ketotestosterone samtidigt var förhöjda.

4.1.9 Bromerade flamskyddsmedel

Polybromerade difenyletrar (PBDE), hexabromcyklododecan (HBCD) och tetrabrombisfenol-A (TBBPA) används för att flamskydda plaster och textilier. TBBPA återfinns sällan i miljön. Inom EU används idag bara BDE-209 dvs. den fullbromerade difenyletern. Föreningen har trots sitt låga ångtryck nått en avsevärd spridning. Föreningen har bedömts vara icke biotillgänglig på grund av att molekylens diameter överstiger 9.5 Å och därför inte kan passera cellmembranen i t ex i fiskens gälar eller mag-tarmkanalen. I dag vet man att BDE-209, HBCD och TBBPA kan tas upp av biota och att avgiftningssystemet P450 sannolikt deltar i nedbrytningen av föreningarna (Kierkegaard m.fl. 1999; Morris m.fl. 2004; Zegers m.fl. 2005). PBDE och HBCD sprids storskaligt via luft (Sternbeck m.fl., 2003; Remberger m.fl. 2004a) och ytvatten (SWECO, 2007).

4.1.10 Några övriga klorerade miljögifter

Polyklorerade bifenyler (PCB), dibensdioxiner (PCDD), och dibensfuraner (PCDF) är dokumenterat stabila miljögifter med global spridning. Föreningarna sprids i luften och återfinns överallt. Halterna av PCB i limniska system i Sverige har i biota sjunkit under lång tid. Halterna av PCDD och PCDF i biota uppvisar ingen signifikant trend (Sternbeck och Persson 2005). PCB, PCDD och PCDF aktiverar avgiftningssystemet cytokrom P450 och kan ge en rad olika toxiska effekter.

Kortkedjiga klorparaffiner uppträder starkt anrikade i sediment från sjöar påverkade av tätorter, men återfinns även i skogssjöar (Sternbeck m.fl., 2003). I svenska ytvatten kunde dessa ämnen inte detekteras (SWECO, 2007): I Norge har man uppmätt klorparaffiner i fisk (Fjeld m.fl. 2004).

4.1.11 Mystkämnen

Myskämnen är en grupp av ämnen som används som parfym i tvättmedel, hygienprodukter mm. Ämnesgruppen delas upp i två undergrupper: polycykliska och nitromyskämnen. Konsumtionen av polycykliska myskämnen är störst eftersom användningen av nitromyskämnen fasas ut. Myskämnen återfinns inte i regnvattenprover från urbana områden. Förklaringen kan vara att huvuddelen av myskämnen hamnar i reningsverken eftersom myskämnen finns i tvättmedel, rengöringsmedel och hygienartiklar. Detta avspeglas också i de höga halterna i rötslam främst av galaxolid och tonalid (Morgensen m.fl. 2004).

Fisk fångad nedströms kommunala reningsverk har visats innehålla höga halter av främst galaxolid och tonalid och celestolid (Morgensen m.fl. 2004). I fisk från opåverkade områden påvisades också myskämnen vilket indikerar en långväga transport (Eriksson m.fl. 2001; Morgensen m.fl. 2004).

4.2 Källor & Spridningsvägar

4.2.1 Den urbana miljön

Många ämnen används eller bildas oavsiktligt (t ex genom förbränning) i tätorter. Avrinningen från städernas hårda ytor (vägar, tak etc) innehåller därför en komplex blandning av föreningar (se Ledin m.fl., 2005 för review). Dagvattnet från städer samlas upp i dagvattenssystemet som leds med eller utan rening ut i vattendrag eller sjöar.

4.2.2 Kommunala reningsverk

Reningsverken utgör en viktig källa för ett stort antal kemikalier som används i samhället. Detta för att avloppen från hushåll, dagvatten och industrier sammanförs i reningsverken. Reningen är för många föreningar god men en mindre del passerar reningsverken och följer med det utgående avloppsvattnet. Utsläpp från reningsverken har därför en direkt påverkan på många sjösystem i tätbebyggda områden. Lipofila och persistenta föreningar kan binda till slammet som bildas i reningsprocessen. Det betyder att vattnet renas men slammet blir kontaminerat. Slam kan användas som jordförbättring eller deponeras. I båda fallen kan föreningarna med tiden lakas ut och spridas i miljön.

4.2.3 Enskilda avlopp

Ett enskilt avlopp består vanligen av en trekammarbrunn (slamavskiljare) med markinfiltration. Reningen av fosfor och kväve är låg och huruvida avloppsvattnet renas från organiska ämnen t ex läkemedel och biocider är okänt. Med tanke på att det finns nästan en miljon enskilda avlopp i Sverige kan dessa vara ge ett viktigt bidrag (Hellström m.fl., 2003). Ett exempel på en möjlig påverkan från enskilda avlopp är en av Naturvårdsverkets referenssjöar, Lilla Öresjön. Sjön har inom sitt avrinningsområde inga fast boende men där finns en del fritidsbebyggelse. Eftersom det är en referenssjö förväntas sjön vara fri från påverkan. Vattenprover tagna från sjön innehöll detekterbara halter av några antiinflammatoriska läkemedel, flunitrazepam och koffein samt triklosan och norfentanyl i sedimentprover (Woldegiorgis m.fl. 2007). Källan misstänks vara enskilda avlopp i avrinningsområdet. Undersökningar har visat att föreningar som infiltrerats från enskilda avlopp kan nå grundvattnet dvs föreningarna bryts inte ned i tanken eller i marken efter infiltration. Det är därför troligt att organiska föreningar även kan nå närliggande sjösystem (Swartz m.fl. 2006).

4.2.4 Lantbruket

Inom den agrara näringen används många kemikalier i stor skala. Exempel på det är besprutning med herbiciderna MCPP och bentazon. Besprutning ger en direkt exponering på lokala vattendrag men leder också till lufttransport av föreningarna.

Inom veterinärmedicinen används ett stort antal läkemedel som kan nå vattenmiljön i områden där man håller stora djurbesättningar (Hellström och Kreuger, 2005). I en svensk screening av ett 50-tal föreningar kunde man dock inte påvisa några detekterbara halter av undersökta föreningar (Sternbeck m.fl. 2007).

4.2.5 Lufttransport

I gasfas eller bundna till partiklar kan många stabila organiska föreningar transporteras över stora avstånd och via atmosfärisk deposition tillföras sjöar och vattendrag. Några exempel är ftalater, PCB, PAH och många pesticider t ex endosulfan, toxafen, mirex mf. Mer information finns att hämta i AMAP (2004), Hung m.fl. (2004) och Bernes (1998).

4.3 Sammanfattning av den potentiella hotbilden

I första hand syftar denna genomgång till att föreslå biomarkörer som är relevanta för lågpåverkade sjöar. En implementering av biomarkörer inom nationell miljöövervakning av sötvatten syftar dock till att 1) följa utvecklingen i olika områden; 2) utgöra nationella referensnivåer till mätningar i mer påverkade områden. Därför är även ämnen med typiskt urbant påverkansmönster relevanta för hotbilden.

Föreningar som enligt ovanstående utvärdering skulle kunna utgöra ett potentiellt hot mot den akvatiska miljön i Sverige listas i tabell 2. Sammanställningen bygger på de mätningar som hittills genomförts men som ofta består av ett mindre antal prov i varje typmiljö. Det är väl känt att ett stort antal ämnen har potential att spridas från samhället till miljön.

Miljöfarliga organiska föreningar som transporteras i lufthavet och som påvisats i ”opåverkade” sjösystem omfattar organiska fosforföreningar, PFAS, 4-NP, t-OP, PBDE, HBCD, PCB, DDT, dioxiner, PAH, triklosan, 1,4-diklorbensen, hexaklorbensen, myskämnena och bisfenol-A. I de fall uppmätta halter av ovanstående ämnen har riskbedömts har det oftast bedömts att någon direkt risk för det akvatiska ekosystemet inte föreligger. Osäkerheter kring effektnivåer och samverkans-effekter gör ändå att vi bedömde att ämnena bör ingå i hotbilden.

Enskilda avlopp och jordbruket kan också bidra till viss påverkan i ”bakgrundssjöar”. Exempel på sådana ämnen är vissa läkemedel och moderna bekämpningsmedel. I områden med mer intensivt jordbruk förekommer bl.a. bentazon, MCPA och mekaprop-P, men också fluroxipur, dikloroprop och glyfosat.

I tätorter och områden med reningsverk tillkommer många ämnen såsom vissa läkemedel (NSAIDs, antibiotika, metoprolol, hormoner och några psykofarmaka), tennorganiska ämnen, siloxaner. Dessutom är påverkan från många av tidigare nämnda ämnena avsevärt större i påverkade områden.

Sammantaget bedöms att ett stort antal ämnen kunna bidra till effekter på vattenlevande organismer. Effekter som har observerats är kronisk toxicitet, endokrina störningar och reproduktionstoxicitet, neurotoxicitet, påverkan på immunförsvaret och genotoxicitet.

Tabell 2. Översikt över föreningar som kan bidra till en ekotoxikologisk hotbild i svenska sötvatten.

Förening	Förekomst, spridning	Effekt / receptor	Påverkan i	Lista	Conc/E QS
2-merkaptobenzotiazol	Ej detekterade i luft. Höga halter i slam. långlivad		U	Biocid-direktivet	
4-nonylfenol grenad	Stor spridning. Luftburen	endokrin störning	U/R	WFD	<1- >1
4-tert-oktylfenol	Stor spridning. Luftburen	endokrin störning	U/R	WFD	<LOD- >1
Bisfenol A	Stor spridning. Luftburen	endokrin störning	U/R		
BFR BDE-47, -99, 100	Luftspridning påvisad	P4501A (EROD)	U/R	WFD	<0,5
Endosulfan	Med varor & luft. låga halter i miljön	Toxisk mot immun.	U/R	WFD	<0,5
Klorbensener	1,4-CB och HCB sprids med luft.		U/R	WFD	<0,1
<i>Myskämnen:</i> Galaxolid Tonalide Celestolide	Lufttransport. Påvisats i fisk i referenssjöar	CYP2B leverenzym	U/R		
Pentaklorfenol	Återfinns bara i låga halter i miljön. Lufttransport	frikopplare	U/R	WFD	<0,001
<i>Pesticider:</i> HCH, alaklor m.fl.	Klassiska som ingår i olika miljöövervakningsprogram		U/R	WFD	<0,1
PFAS	Återfinns i bakgrundsprover	störning i cellmembran	U/R	PRIO utfasning	
Siloxaner	I luft & slam		U		
Tributyltenn (TBT)	Vattenburen; Sedimentbunden.	Reprod.; akuttox. neurotox.	U	WFD	<1
Triklolan	Påvisats i luftprover i opåverkat område		U		
Herbicider: bentazon, dikloroprop fluroxipur glyfosat MCPA mekaprop	Frekvent förekomst & rel. höga halter i jordbruksbäckar		U	WFD. (MCPA)	
<i>B-blockerare:</i> Metoprolol	I WWTP AV		U		
<i>NSAIDs:</i> Ibuprofen Naproxen ketoprofen diclofenac	I WWTP AV & i recipienten	Inhib CYP2M I Carp. Inhib fas II (Thibaut m. fl. 2006)	U		
<i>Psykofarmaka:</i> oxazepam zolpidem citalopram risperidon	I WWTP AV & i recipienten		U		
DEHP	Sprids via luft & återfinns överallt	Reproduktionsstörning (? kring miljöeffekter)	U/R	WFR; PRIO, OSPAR	
<i>Antibiotica:</i> tetracykliner Norfloxacin ciprofloxacin	I WWTP AV & slam & i recipienten		U		
<i>Hormoner:</i> progesteron etinylestradiol noretisteron	I WWTP AV & slam & i recipienten	Reproduktionsstörning	U		
Organiska fosforföreningar	Hög halt i i avlopp & slamprover. luftburen	Neurotoxiska	U/R	WFD	
PAH 8 st	luftburen. 5-6 ringade PAH cancerogena	P450, immunttoxiska mm	U/R	WFD	<0,1

WFD = Vattendirektivet; U = påverkan i urbana miljöer dvs påvisa bara i urbana miljöprover.

R = kan nå och påverka sjöar i bakgrundområden.

5 Inventering av biomarkörer

I detta kapitel ges en kort överblick över tillgängliga biomarkörer. Biomarkörerna beskrivs avseende vilka ämnen de kan påverkas av, samt vilken typ av toxiska effekter de kan återspegla. Avsikten är att presentera biomarkörer som främst återspeglar exponering för, eller effekter av organiska ämnen. Många ekologiskt relevanta biomarkörer är dock mindre ämnesspecifika och kan påverkas även av oorganiska ämnen såsom metaller. Sådana biomarkörer ingår också i denna översikt.

Biomarkörer på dessa organisationsnivåer återspeglar antingen exponering eller effekter. Generellt är de fysiologiska biomarkörerna ett mått på toxiska effekter medan de biokemiska/molekylära biomarkörerna kan återspeglar exponering eller effekter. En lista över olika biokemiska biomarkörer ges i tabell 3 och biomarkörer på fysiologisk nivå listas i tabell 4.

Vissa biomarkörer för exponering kan ge respons långt under de halter där toxiska effekter uppstår. Det finns även vissa biomarkörer som anses ha hög specificitet både för exponering och effekter. Ett exempel är inhibering av acetylkolinesteras, som typiskt återspeglar exponering för organofosfater eller karbamater och som är ett direkt mått på neurotoxiska effekter och risk för dödlighet (Walker m.fl., 2006).

I princip kan biomarkörer återspegla olika steg längs en påverkanskedja:

(förekomst i miljön) → bioackumulation/exponering → bindning till receptor i cellen → biokemisk reaktion → effekt på cellnivå → effekt på individnivå (fysiologisk) → effekt på populationsnivå → ekologisk effekt

Biomarkörer som är tidigt i kedjan är vanligen mer känsliga, mer ämnesspecifika och mer reproducerbara, men svårare att tolka avseende ekologisk relevans. Då avsikten med denna genomgång är att föreslå indikatorer som kan fungera i ett early warning-system är det därför tidigt i kedjan som biomarkörer bör användas. Indikationer på ekologisk påverkan får leda till fördjupade punktinsatser för att bedöma ekologisk relevans och kausalitet.

En första gallring av biomarkörerna i tabell 3 och tabell 4 har genomförts utifrån en omfattande litteraturgenomgång. Gallringen avser följande aspekter:

- a) biomarkörerna kan mätas i allmänt förekommande och ekologiskt viktiga arter i svenska sötvatten,
- b) biomarkörerna motsvarar de hotbilder man önskar följa,
- c) biomarkörerna kan integreras med övrig limnisk övervakning
- d) biomarkörerna har använts i miljön (inte bara i laboratorium) och förefaller ge relevant information.

I det följande beskrivs mycket kort biomarkörer indelat efter olika typer av effekter, med redovisning av de ämnen som kan bidra till påverkan (från kapitel 4). I kapitel 7 presenteras en mer detaljerad utvärdering av de biomarkörer som prioriterats efter denna första gallring.

Tabell 3. Översiktstabell över olika biokemiska biomarkörer för organiska ämnen. Där inget anges är Hagger m.fl. (2006) referens.

Metod/ Biomarkör	Biologisk grupp	Substanser	Kommentar
"Gene array" (samma som genomics)	Fisk	Flertalet föroreningar	Påvisar kombinerade effekter från olika biomarkörer. Metoden är på forskningsstadiet.
Apoptos	Fiskceller	Flertalet föroreningar	Generell effekt
DNA-addukter	Fisk, ev. även mussla och evertebrater	PAH och övriga carcinogener	Påvisar genotoxisk effekt, framförallt från PAH. Känslig indikator pågående och tidigare exponering.
Förändrade leverfoci	Fisk	PAH, pesticider	Enzymatisk markör
EROD, P450A1	Fisk, ev. även evertebrater	Plana organiska ämnen (PAH, PCB, dioxiner), PBDE	Induktion av enzymer som metaboliserar vissa ämnen, känslig indikator på pågående och tidigare exponering.
Fagocytos ¹	Fisk, däggdjur	Flertalet föroreningar	Del av immunförsvaret
Glutation S-transferas (GST)	Fisk, mussla	Framförallt klorerade organiska ämnen, påverkas även av metaller	Indikerar oxidativ stress
Inhibering av acetylkolinesteras	Fisk, mollusker, kräftdjur ev. evertebrater	Organofosfater, karbamater	Påvisar exponering och effekt av neurotoxiska substanser
Inhibering/induktion av multixenobiotiskt motstånd	Blåmussla, ev även fisk och evertebrater	Flertalet föroreningar	Adaption/störning vid xenobiotisk stress
Katalas (CAT)	Fisk	Ej specifik	Indikerar oxidativ stress. Okänslig parameter, påverkas av naturliga stressorer som svält.
Lysozymal aktivitet	Fisk, molusker	Flertalet föroreningar	Generell hälsoindikator. Ospecifik påverkas av naturliga stressorer som svält och hypoxia.
Lysosomal stabilitet	Fisk, mussla, ostron, kräftdjur	Ej specifik, metaller & organiska ämnen	Generell hälsostatus på cellnivå, kan förutse risk för patologiska skador
Makrofagers enzymsystem ²	Fisk och däggdjur (ev. evertebrater)	Ej specifik	Tidig påverkan på immunförsvaret
Mikrokärnor	Fisk, mussla	Ej specifik	Genotoxisk påverkan på kromosomal nivå
Onkogener	Fisk	PAH, pesticider	Aktivering av onkogener eller avaktivering av tumörsuppressorgen
PAH-metaboliter i galla (fisk) och urin (kräftdjur)	Fisk och kräftdjur	PAH	Exponering och metabolism av PAH
Proliferering av peroxisomer i matsmältningskörteln	Fisk och evertebrater	Föroreningsspecifik	Påvisar förändringar i lipidmetabolism

¹ Bols m.fl., 2001² Broeg m.fl., 2005

Metod/ Biomarkör	Biologisk grupp	Substanser	Kommentar
Respiratory burst ³	Allmänt	Flertalet föroreningar	Del av immunförsvaret
Spiggin	Spigg	Androgener	Exponering och reproduktionseffekt av androgener
Stressproteiner, HSP	Fisk,	Ej specifik	Påvisar stressorer, både naturliga och "främmande". Kan även påvisa oxidativ stress.
Superoxid Dismutas (SOD)	Fisk, mussla	Framförallt organiska ämnen	Indikerar oxidativ stress
Vitellogenin	Hanfisk samt yngel	Östrogena substanser	Indikerar endokrin exponering och påverkan
Modifierade jästceller	Oklart, men det bygger på en human gen	Östrogena substanser	
DNA strängbrott	Fisk, mussla	PAH, genotoxiska substanser	Påvisar påverkan på DNA-strängen
Kromosomal avvikelse (chromosome aberration)	Fiskyngel		Påvisar påverkan på kromosomal nivå
Plasma AST (aminotransferas r)	Fisk	PAH, PFOS	Ej specifik för organiska föreningar ger utslag för metaller t ex Hg.
GSH (reducerad glutation)		Klorerade organiska föreningar	
Metabolomics		Flertalet föreningar	Generell metod för att studera effekt på metabolismen. Forskningsstadiet.
Genomics		Flertalet föreningar	Generell metod för att studera genernas svar på exponering. Forskningsstadiet.
Proteomics		Flertalet föreningar	Generell metod för att studera proteinsammansättningen (enzymer) som en funktion på exponering. Forskningsstadiet.
Lymfocyter		Många föroreningar	Blodkroppar som ingår i det adaptiva immunförsvaret.
Glutationberoende peroxidase (GPOX)		T ex. PAH, PCB, HCB, paraquat	Uppvisar ökad och sänkt aktivitet beroende av förening.
Steroider		Könshormoner	Analys på halten/fördelningen av könshormoner i organismen (fisk).

³ Bols m.fl., 2001

Tabell 4. Översiktstabell över olika fysiologiska biomarkörer för organiska ämnen. Där inget anges är Hagger m.fl. (2006) referens.

Metod/ Biomarkör	Biologisk grupp	Substanser	Kommentar
Abnormalitet i embryo och larver	Fisk	Ej kopplad direkt till föroreningar	Frekvens av missbildningar
Embryoförändringar hos amfipoder	Amfipoder		Frekvens av embryoförändringar
Försenad reproduktion och gonadutveckling	Fisk	Ej specifik	Reproduktionsstörning
Gonadsomatiskt index ⁴	Fisk	Ej specifik	Generell hälsostatus
Imposex	Snäckor	Tennorganiska ämnen	Reproduktionsstörning
Intersex	Hanlig flundra, strandsnäcka	Endokrinsterande ämnen	Feminisering och reproduktionsstörningar
Leversomatiskt index ⁵	Fisk	Ej specifik	Generell hälsostatus
Makrofagantal etc.		Flertal olika föroreningar & stressorer	Återspeglar immunförsvaret, men kemikaliekopplingen tvetydig
"Scope for growth"	Musslor	Flertal olika föroreningar & stressorer	Mäter ökad energiåtgång p.g.a. ökad stress.
Somatiskt index ⁶	Fisk	Ej specifik	Fysiologisk markör som visar generell hälsostatus.
Tidiga leverskador, histopatologi, levernoduler	Fisk, blåmussla	PAH och pesticider men även andra ämnen	Vävnadsskador till följd av ex. genotoxiska ämnen, visar även generell hälsostatus.
Utvärtes skador samt parasiter	Fisk	Stort antal föroreningar & stressorer	Generell hälsostatus, ökad frekvens kan tyda på föroreningar.

5.1 Biomarkörer för könsendokrina effekter

I England upptäcktes redan 1996-1997 omfattande påverkan på könsutvecklingen hos fisk i många vattendrag (Jobling m.fl., 1998). Effekter på könsutvecklingen kan på sikt påverka populationsutvecklingen och är därför en allvarlig effekt.

Det är känt att flera vanliga föroreningar kan binda till östrogenreceptorn och antingen orsaka feminisering eller maskulinisering. Det finns även andra mekanismer som kan påverka könsutvecklingen, t.ex. genom inhibering av testosterons nedbrytning av CYP. Exempel på sådana ämnen som påvisats i svenska vatten är alkylfenoler, bisfenol A, tributyltenn, naturliga och konstgjorda

⁴ se Naturvårdsverket 2006.

⁵ se Naturvårdsverket 2006

⁶ se Naturvårdsverket 2006

hormoner, ftalater och vissa klorerade pesticider. Det finns även naturligt förekommande ämnen från växtriket med starkt östrogen påverkan.

Könsendokrina effekter kan studeras på olika organisationsnivåer och kan därmed återspegla exponering eller effekter. Flera metoder som återspeglar exponering finns, bl.a. vitellogenin i hanfisk och tester med modifierade jästceller (t.ex. Vine m.fl., 2005). Metoder som återspeglar effekter är imposex (specifik för TBT), intersex (Jobling m.fl., 1998), samt gonadutveckling hos fisk. Som en mer ekologiskt relevant indikator har fiskreproduktion föreslagits (Arcand-Hoy och Benson, 1998), men detta är en indikator som är väldigt ospecifik för föroreningar.

5.2 Biomarkörer för påverkan på immunförsvaret

Påverkan på immunförsvaret är en potentiellt viktig mekanism, som kan påverka populationer. Immunförsvaret består av en medfödd del (innate immunity) och en del som är förvärvad genom tidigare exponering för virus eller bakterier (acquired immunity). Inom miljötoxikologin är flertalet studier inriktade på hur det medfödda immunförsvaret kan påverkas av föroreningar (Broeg m.fl., 2005).

Experimentella undersökningar har visat att ett stort antal föroreningar kan orsaka nedsatt immunförsvar (Broeg m.fl., 2005). Klororganiska föreningar anses kunna påverka bildningen av vitamin A, men det finns även andra mekanismer som misstänks vara inblandade i hur föroreningar kan påverka immunförsvaret. Ämnen som förekommer i svenska sötvatten och som har inneboende potential att påverka immunförsvaret är bl.a. PCB, PAH, PCDD, dibutyltenn och endosulfan. Även metaller och vissa yttre faktorer kan påverka immunförsvaret, varför biomarkörer för immunförsvaret ofta betraktas som relativt specifika indikatorer på miljöpåverkan (ICES, 2005b). Ofta kan en kortvarig exponering öka immunförsvaret, medan kronisk exponering leder till nedsatt immunförsvar.

Immunförsvaret är komplext och därför har många olika metoder använts som indikatorer för påverkan på immunförsvaret. Det medfödda immunförsvaret förefaller vara utvecklat tidigt under evolutionen, varför många system och mekanismer är gemensamma för alla flercelliga organismer. De olika metoderna betraktas som ”early-warning” för påverkan på immunförsvaret, men sällan har man kunnat påvisa ett samband med ökad mottaglighet för infektioner i fält. Exempel på biomarkörer för immunförsvaret som använts på akvatiska organismer är: lysosomer, akutfasproteiner, fagocytos, makrofagaggregat, respiratorisk burst och lymfocuter.

5.3 Biomarkörer för neurotoxiska effekter

Olika karbamater samt fosfororganiska och tennorganiska föreningar kan verka neurotoxiskt genom att påverka acetylkolinesteras i nervändarna. Fosfororganiska föreningar förekommer dels som insekticider inom jordbruket men även i den urbana miljön som t.ex. flamskyddsmedel. Det finns även vissa läkemedel som är neurotoxiska (Woldegiorgis m.fl., 2007).

Inhibering av acetylkolinesteras är en känslig biomarkör som indikerar både exponering och effekt av neurotoxiska ämnen. Acetylkolinesteras är det enzym som bryter ner transmittorsubstansen acetylkolin vid nervänden efter att en nervimpuls förts vidare. Inhibering av detta enzym leder till ackumulering av acetylkolin vilket i sin tur leder till störning i nervimpulsen, kramper och slutligen död. Denna biomarkör är mycket specifik och kan användas för att fastställa om en organisms

mortalitet beror av organofostater. Det finns undersökningar som tyder på att denna inhibering även kan induceras av komplexa blandningar av andra föroreningar. (Walker m.fl. 2006) Inhibering av acetylkolinesteras har använts som biomarkör på ett flertal organismgrupper, exempelvis fisk och kräftdjur.

5.4 Biomarkörer för genotoxiska effekter

Ämnen med genotoxisk påverkan kan utgöra ett hot mot såväl individer som populationer då genotoxiska skador kan nedärvas och skada reproduktionen. Skadorna kan ske på molekylär och/eller kromosomal nivå. De genotoxiska ämnen som utgör ett hot mot limniska ekosystem är framförallt PAH:er. PAH i sig är inte cancerogent utan blir det först efter aktivering av P450-systemet, se 5.6.

Det finns biomarkörer för genotoxiska effekter som påvisar effekter på både kromosomal och molekylär nivå. De vanligaste biomarkörerna påvisar effekt på molekylär nivå. Ett exempel på en biomarkör på molekylär nivå är förekomsten av DNA-addukter. (Bechmann 2002) Cancerogena ämnen kan reagera med cellkärnans DNA och bilda kovalenta strukturer s.k. DNA-addukter. (OSPAR, 2007; ICES 2004a) En annan biomarkör som påvisar effekt på molekylär nivå är detektion av DNA-brott (DNA strand brake). Detta mäts bl.a. genom ett s.k. ”kometsvanstest”, Comet-assay.

Biomarkörer som påvisar effekter på kromosomal nivå är bl.a. detektion av kromosomal avvikelser (chromosome aberration) och förekomst av mikrokärnor. Kromosomavvikelser i samband med anafasen har även kopplats till direkt påverkan på populationsnivå. (Bechmann 2002) Så kallade mikrokärnor utgörs av hela eller fragmenterade kromosomer som efter celledelning blir en ”extra” cellkärna.

Förekomst av aktiverade onkogener eller avaktivering av tumörsuppressorgener, ex p53, är andra indikatorer på förekomst av carcinogena ämnen. Studier av histopatologi i lever kan avslöja fysiologiska skador, såsom levernoduler, orsakade av carcinogena ämnen som lett till effekter på individen.

5.5 Biomarkörer för oxidativ stress

Av de ämnen som ingår i hotbilden mot limniska system i bakgrundsområden finns flera som bidrar till oxidativ stress, exempelvis PFAS och PAH. Studier visar att PFAS kan inducera oxidativ stress akut hos sötvattensfisk, vid kronisk exponering är effekterna mer oklara (Oakes et al 2004). Det finns även andra substanser som påverkar cellens oxidativa status och effekten är inte specifik för organiska ämnen. Oxidativ stress har även sammankopplats med störningar i det endokrina systemet hos fisk (Dorval m.fl. 2004).

Parametern oxidativ stress innebär att man undersöker cellens förmåga att hantera syreradikaler och andra reaktiva föreningar, s.k. reaktiva syreföreningar (ROS, reactive oxygen species) har överskridits. Denna stress innebär en ökad risk för exempelvis DNA- och proteinskador. Oxidativ stress kan påvisas med hjälp av ökad produktion och förekomst av reparationsproteiner såsom **Glutation S-transferas (GST)** och **Superoxid Dismutas (SOD)**. Det finns även andra glutationsberoende enzymer som kan vara mer föroreningsspecifika än GST (Petrivalsky m.fl., 1997). Även förekomsten av s.k. **stressproteiner** kan indikera oxidativ stress. Ämnen som inducerar GST har tre egenskaper: hydrofoba, innehåller en elektrofil atom (ofta ett kol) och de reagerar oenzymatiskt

med glutation (Parkinson, 1996). Även metaller påverkar glutation och därmed GST (se Sternbeck, 2000).

5.6 Ospecifika biomarkörer för exponering

Att genom biomarkörer påvisa effekter är inte möjligt för alla typer av ämnen. I många fall kan biomarkörer endast påvisa exponering. Flertalet biomarkörer påvisar inte exponering av en specifik substans utan ger utslag för många olika ämnen.

Det finns ett flertal försvarsmekanismer som induceras av olika slags stressorer. Dessa mekanismer kan induceras av såväl naturliga faktorer såsom svält, temperatur som av exempelvis xenobiotika.

Cytokrom P450 systemet är ett försvarssystem som reagerar på både ”naturlig” stress och exogena föroreningar. Framförallt är detta system inblandat vid nedbrytning av stora organiska molekyler. Det finns ett stort antal former av s.k. CYP enzymer som deltar i nedbrytning och då dessa enzymer är mer eller mindre specifika för olika typer av xenobiotika kan de användas för att påvisa exponering. Specificiteten beror av de olika receptorer som aktiverar systemet.

Lysosomal stabilitet kan användas för att visa generell hälsostatus på individnivå. Biomarkören kan även vara ett prognostiskt verktyg för att förutse bl.a. leverskador hos fisk och degenerering av hepatopancreas hos mollusker. Lysosomal stabilitet är en ospecifik biomarkör som påvisar exponering av exempelvis organiska föroreningar men även metaller. Då markören visar generell hälsostatus hos individen påverkas den även av naturliga stressorer såsom svält och hypoxia. Lysosomen är en subcellulär organell som är inblandad i en rad olika processer i cellen, bl.a. producerar den enzymer som bryter ner makromolekyler. Lysosomen är även första anhalt för de exogena substanser som kan komma in i cellen. När föroreningar tas upp påverkas lysosomen på olika sätt och dess stabilitet kan därför utgöra ett mått på exponering av skadliga exogena substanser. (OSPAR 2007)

Exponering och metabolisering av PAH kan påvisas genom att mäta förekomst av **PAH-metaboliter**. Denna mätning görs framförallt i fiskgalla men kan även göras i urin från kräftdjur.

6 Biomarkörer i existerande övervakningssystem

I detta kapitel redovisas en genomgång av vilka biomarkörer (för organiska ämnen) som används i olika nationella eller internationella miljöövervakningsprogram.

6.1 Naturvårdsverkets marina program

Inom programområdet Kust och Hav har integrerad övervakning, innefattande biomarkörer, bedrivits sedan början av 90-talet vid tre bakgrundslokaler längs Östersjökusten (abborre; Hansson m.fl., 2006a) samt i Fjällbacka på västkusten (Tånglake; Ronisz m.fl., 2005). Programmet beskrivs i Naturvårdsverket (2006) och omfattar bl.a. följande biomarkörer i abborre eller tånglake:

- gonadsomatiskt index
- leversomatisk index
- yttre sjukdomar
- histopatologi
- makrofagcenter
- lymfocyter, granulocyter, trombocyter
- CYP450
- EROD
- glutationreduktas
- vitellogenin
- DNA-addukter

Syftet med biomarkörerna var att ge en bred återspeglning av centrala livsfunktioner, omfattande röda blodkroppar, immunförsvar, metabolism, jonbalans och reproduktion. Data för perioden 1988-2000 har utvärderats. Generellt visade flertalet biomarkörer stor stabilitet över denna tidsperiod, men i vissa fall med osystematiska mellanårsvariationer. Vid en lokal (Kvädöfjärden) kunde dock över tiden ökad EROD aktivitet påvisas, och vid två lokaler påvisades minskande gonadsomatiskt index hos abborrhonor (Hansson m.fl., 2006a). Detta kan vara tecken på allvarliga effekter. På västkusten var det främst vikt och längd som förändrats över tidsperioden (Ronisz m.fl., 2005). Det nya programmet (Naturvårdsverket, 2007) ska även innefatta effektmätningar av TBT på snäckor i Östersjön, vilket sällan är en relevant effekt i sötvatten.

6.2 HELCOM

HELCOM har ett gemensamt integrerat övervakningsprogram för Östersjön, benämnt COMBINE. Effekter undersöks främst vid platser ”of special concern”. Syftet är att studera sambandet mellan föroreningar och effekter. Effekter ska studeras på individ och populationsnivå avseende reproduktion, immunologi och metabolism. De biomarkörer som nämns är EROD samt AchE i särskilt förorenade områden. Några ytterligare biomarkörer anges inte specifikt men man uppger att man avvaktar kommande rekommendationer från OSPAR och ICES. Något mer omfattande underlag om HELCOMs effektovervakning har vi inte funnit.

6.3 OSPAR/ICES

Metoder för långsiktig övervakning av biologiska effekter i marin miljö utvärderas av OSPAR i samarbete med ICES, i syfte att utgöra en del av deras s.k. integrerade program för övervakning och utvärdering (JAMP). Övervakningen av biologiska effekter avses göras integrerat med kemiska mätningar av föroreningar. Metoder för biologiska effekter är indelat i ämnesspecifika respektive generella biologiska effekter.

I det ämnesspecifika programmet (OSPAR 2003) finns f.n. metoder rekommenderade för

- ❑ metaller (diskuteras ej i denna rapport)
- ❑ PAH (EROD, DNA-addukter, metaboliter och lever patologi)
- ❑ TBT (imposex i gastropoder).
- ❑ Dessutom är metoder för endokrin påverkan under utvärdering (Hylland och Thain, 2007) och vitellogenin i plasma från hanfisk har föreslagits som lämplig och robust metod.

Att döma av den senaste utvärderingen är effekter av TBT (imposex) det enda som implementerats (OSPAR, 2005).

I programmet för generella effekter återfinns ”bioassays” för sediment, porvatten och vatten, samt bl.a. CYP1A, lysosomal stabilitet och fysiologiska leverundersökningar i fisk. På förslag är bl.a. inhibering av acetylkinesteras i musslor och fisk (Hylland och Thain, 2007). Programmet för generella effekter har två syften (OSPAR, 1997):

- 1) Early warning:
 - CYP1a
 - lysosomal stabilitet
 - leverpatologi
 - reproduktion i tånglake
- 2) Långsiktiga förändringar på individ, population eller samhällsnivå:
 - externa fisksjukdomar
 - bentisk artsammansättning
 - levernoduler

Lysosomal stabilitet anges generellt återspegla effekter av organiska ämnen. Levernoduler är karakteristiskt för cancerogena ämnen. Metoderna för den långsiktiga övervakningen (punkt 2 ovan) är inte specifika för föroreningar utan kan även påverkas av andra faktorer.

Inom ICES och OSPAR pågår ett aktivt arbete med att utvärdera och standardisera metoder för olika biomarkörer, och ett stort antal metoder har rekommenderats (Hylland och Thain, 2007).

6.4 AMAP

AMAP har utvecklat övervakningsprogram för halter och effekter i bl.a. sötvatten. Dokumentationen om sötvatten är relativt begränsad och effektövervakningens omfattning presenteras i tabell 5. Man har funnit samband mellan nivåerna av CYP 450 och PCB i röding (AMAP, 2004). Övriga biomarkörer för t.ex. immunsystemet är undersökta på fågel eller däggdjur, och inte på limniska arter.

Tabell 5. Effektövervakning i sötvatten enligt AMAP (2000)

Föroreningsgrupp	Effektmetodik	Bentiska evertebrater	Rödning
POPs	populationsutveckling		x
	generell patologi		x
	sjukdomar		x
	CYP1A		x
Olja/PAH	analys på samhällsnivå	x	
	BaP hydroxylas	x	

För den marina övervakningen har fler metoder rekommenderats (AMAP, 2000):

- Lysosomal membranstabilitet
- AchE (neurotoxicitet)
- Metallothionein (metaller)
- EROD (exponering för vissa organiska ämnen)
- PAH metaboliter i galla (exponering för PAH)
- DNA skador (genotoxicitet)
- Lipofuscin och neutrala lipider
- Vitellogenin (hormonpåverkan).

6.5 USA

I USA finns ett landsomfattande miljöövervakningsprogram för de stora floderna och deras tillflöden; The Biomonitoring of Environmental Status and Trends (BEST; Schmitt och Dehtloff, 2000). Programmet syftar att övervaka och vattenkvaliteten med biologin som fokus. Därför är ett kemiskt mätprogram kompletterat med biologiska undersökningar på olika organisationsnivåer, från subcellulära biomarkörer till indikatorer på population och ekosystemnivå. Programmet är väl dokumenterat och utvärderas regelbundet. Följande biomarkörer används:

- EROD (exponering för plana aromatiska kolväten)
- H4IIE (exponering för vissa plana halogenerade kolväten)
- Organsomatiska index (lever, mjälte och gonader; allmän hälsoindikator)
- Nekropsy-baserad hälsobedömning (visuell bedömning av yttre och inre skador)
- Histopatologi (allmän hälsoindikator)
- Immunsystemet
 - makrofagaggregat (föroreningskänslig hälsoindikator)
- Reproduktion
 - könssteroider (påverkas av endokrinstörande ämnen)
 - vitellogenin (påverkas av endokrinstörande ämnen)
 - gonadsomatiskt index (se ovan)
 - intersex

För immunsystemet föreslogs initialt även lysozymal aktivitet som föroreningskänslig hälsoindikator. Efter en inledande tämligen omfattande pilotstudie gjordes bedömningen att lysozymdata inte gav rimliga svar, och en litteraturstudie visade att olika föroreningar gav olika effekter på lysozymaktiviteter (Schmitt, 2002; C. Schmitt, USGS pers. komm.).

Dessa biomarkörer har tillsammans med kemiska data använts för att bedöma subletal kemisk påverkan på fisk. Framst har data utvärderats avseende hur påverkan varierar från referensområden högt upp i flodsystemen till nedströms områden belägna i mer urbaniserade eller industrialiserade regioner (Schmitt m.fl., 2005; Hinck m.fl., 2007). Metoderna förefaller ge rimliga resultat. Flertalet biomarkörer uppvisar dock måttliga skillnader mellan förmodat lågpåverkade och mer påverkade områden. Det finns också variationer som beror på art, kön och ålder, vilket måste tas hänsyn till. Behovet av noggrann statistisk utvärdering betonas i rapporterna. Utvärdering av tidstrender förefaller inte ha publicerats ännu.

6.6 Andra erfarenheter

I samband med undersökningar av biologiska effekter i Molnbyggen och andra sjöar påverkade av avfallsupplag studerades ett antal biomarkörer i abborre. Man fann hög EROD aktivitet, DNA addukter i levern, lågt gonadsomatiskt index (GSI), låga plasmahalter av testosteron och östradiol (anti-östrogen effekt) men också motsatsen i andra sjösystem (Noaksson m.fl., 2005). Både GSI och LSI gav i en del fall en signifikant signal om påverkan. Bilden var olika i de olika sjöarna vilket visar att det behövs flera biomarkörer för att kunna spåra påverkan på ett ekosystem.

Biomarkörers användbarhet har undersökts inom det stora projektet ”Biological Effects of Environmental Pollution in Marine Coastal Ecosystems” (BEEP) (Lehtonen m.fl. 2006). Projektet engagerade 30 institut i 12 länder och pågick i tre år. Projektet studerade biomarkörer i musslor och fisk i tre olika akvatiska miljöer: Nordatlanten, Medelhavet och Östersjön. Eftersom miljöparametrarna temperatur och salthalt samt artförekomsten varierade inom vida gränser mellan de olika haven var det inte möjligt att direkt jämföra resultaten mellan de tre haven. I Östersjön finns också en tydlig temperatur- och salthaltgradient från söder till norr som gör jämförelser av ekologisk status över stora arealer svår. Målsättningen med BEEP var att utveckla känsliga och kostnads-effektiva biomarkörer för miljöövervakning i de olika haven.

I projektet sammanställdes bakgrundsdata om olika biomarkörers årsvariation som kan användas för att möjliggöra jämförelse mellan olika lokaler. Eftersom undersökningen bara studerade marina arter kan dessa data tyvärr inte användas för limniska system.

6.7 Sammanfattning – effektövervakning i etablerade system

Flera långsiktiga miljöövervakningsprogram använder olika biomarkörer som komplement till kemiska och biologiska undersökningar. Genomgående används en uppsättning biomarkörer som kompletterar varandra. Man kan gruppera dessa enligt:

- allmän hälsostatus (LSI, GSI, gälskador m.fl.)
- exponering (EROD, oxidativ stress)
- genotoxiska effekter
- reproduktionsstörning
- neurotoxiska effekter
- immunförsvaret

Flertalet program använder några av ovanstående grupper. Studiet av neurotoxiska effekter genom hämning av acetylkolinesteras ingår inte i något program, men är på förslag inom OSPAR. Det finns en viss dominans av fysiologiska biomarkörer (organsomatiska index, gälskador mm), vilka inte är särskilt specifika för organiska föroreningar. Sannolikt är dessa dock mer robusta än flertalet biokemiska biomarkörer.

Trots omfattande litteratursökningar har vi endast funnit några få resultat från långsiktiga undersökningar av biomarkörer. I svenska bakgrundsmiljöer uppvisar flertalet av de studerade biomarkörerna stor långsiktig stabilitet, men i vissa fall med betydande mellanårsvariationer. De trender som påvisades kunde inte tolkas avseende vare sig orsak eller konsekvens, utan är en utgångspunkt för fördjupade utredningar kring dessa aspekter. Det nordamerikanska programmet BEST är det enda exempel vi funnit på långsiktiga mätningar i sötvatten, men tidstrender förefaller dock inte ha utvärderats ännu.

I samtliga program som implementerats är mätningar av biomarkörer integrerade med kemisk och i vissa fall biologisk övervakning. Det framhålls genomgående att detta är en förutsättning för att kunna tolka resultaten. Det finns sällan absoluta utvärderingskriterier för enskilda biomarkörer, utan data får tolkas i en indiciekedja (weight-of-evidence).

7 Utvärdering av biomarkörer för limnisk övervakning

De biomarkörer som bedömdes relevanta för limnisk övervakning enligt kapitel 5 utvärderas vidare här, i syfte att erhålla ett mindre antal prioriterade kandidater för de olika effekterna samt för exponering av ämnen som är prioriterade i hotbilden. Denna utvärdering syftar också till att beskriva respektive biomarkörs dynamik och olika kvalitetsaspekter.

Inledningsvis presenteras de förutsättningar som ges av miljöövervakningen samt en kort presentation av teoretiska aspekter som har betydelse för hur robust respektive biomarkör är. Liksom i kapitel 5 är själva utvärderingen indelad i olika avsnitt för respektive typ av effekter, och i ett samlande avsnitt om övriga biomarkörer som indikerar exponering för organiska ämnen. Det är dock känt att många effekter kan vara inbördes associerade. Exempelvis kan en nedsättning av immunförsvaret medföra ökad risk för cancer, och ökad EROD-aktivitet kan påverka vissa endogena hormoner. Kapitel 7 har följande indelning:

- Förutsättningar
- Biomarkörer för exponering
- Reproduktionsstörningar
- Påverkan på immunförsvaret
- Genotoxiska effekter
- Allmänna effekter

7.1 Förutsättningar

7.1.1 Miljöövervakningens förutsättningar

Biomarkörer kan studeras inom olika biologiska grupper, och representera exponering eller effekter i olika samhällen, t.ex. bentiskt eller pelagiskt. Det har visats att biomarkörer induceras långsammare i fisk än i evertebrater (Wu m.fl. 2005). Det torde få effekten att mätningar i fisk uppvisar lägre variabilitet. Det är sannolikt att provinsamling kan ske en gång per år eller mer sällan, i linje med övrig limnisk miljöövervakning. Frågan om respektive biomarkörs stabilitet i förhållande till över året varierande belastning är därför central. En biomarkör med kort responstid riskerar att ge stora osystematiska variationer (brus), dels mellan individer och dels över tiden. Härmed minskar möjligheten att upptäcka långtidsförändringar.

Mätningarna skall utföras på vildfångade organismer som är naturligt kroniskt exponerade i sin naturliga miljö. Med andra ord kan det aktuella akvatiska ekosystemet betraktas som ett biologiskt testsystem där organismerna används som indikator på sin kemiska miljö. Jämfört med alternativet burexponerad fisk kan den livslånga exponeringen av vildfångad fisk ge ett tydligare utslag i bioindikatorerna (Winter m.fl. 2005). Detta skall ställas mot de större variationerna i det genetiska materialet i vild fisk jämfört med fisk som används för burexponering (Beyer m.fl. 1996).

I förhållande till rådande miljöövervakning och ovanstående aspekter torde fisk vara en lämplig grupp att undersöka. Här finns viss information både om populationer och om miljögiftsexponering. Organismer från det bentiska samhället (främst evertebrater) bedöms mindre lämpliga eftersom abundans och diversitet varierar också av andra skäl än miljögifter, dvs. dessa individer utsätts i högre grad än fisk för annan stress som också påverkar biomarkörerna.

7.1.2 Teoretiska aspekter

Biomarkörerna avses användas för att belysa långsiktiga förändringar inom olika lokaler, samt att etablera referensnivåer för respektive biomarkör i lågpåverkade områden. Alla biomarkörer för biologiska effekter varierar med faktorer såsom artskillnader, kön, temperatur, salinitet, pH och ålder (Walker m.fl., 2006; Hylland och Thain, 2007). Det går därför generellt inte att definiera absoluta utvärderingskriterier. Skillnader mellan olika lokaler bör därför tolkas med försiktighet. För att bedöma graden av påverkan i en viss situation bör man därför använda en lokal referenslokal där andra faktorer än miljögiftsexponering är så lika som möjligt. På grund av de naturliga variationerna i biomarkörresponser är det viktigt att övervakningsprogrammet är långsiktigt. Signifikanta trender kan inte upptäckas på kort sikt. Det bedöms generellt inte lämpligt att dra slutsatser utifrån en jämförelse av data från två år om man inte känner den osystematiska mellanårsvariationen.

Ofta varierar föroreningsbelastningen på vattendrag över året. Detta medför att exponering via ytvatten eller föda också varierar över året. Denna varierande belastning kommer att bidra till att biomarkörer för ämnen som omsätts snabbt i biota kommer att variera över tiden. För ämnen som omsätts mycket långsamt ($t_{1/2} \approx$ år) kommer denna variation vara mindre. För ämnen som snabbt metaboliseras kommer de osystematiska variationerna vara större varför det blir svårare att uttala sig om reella trender i tiden.

Vid såväl val av biomarkörer som vid tolkning av data är det viktigt att ha kunskap om varje biomarkörs dynamik. Dynamiken består av flera olika aspekter (se Wu m.fl., 2005):

- induktionstid (hur fort induceras BM vid exponering?)
- anpassning (kan organismen anpassa sig så att BM sjunker vid kronisk exponering?)
- återhämtning (hur fort sjunker BM då exponering minskar?)
- reversibilitet (ger enstaka exponeringar permanenta förändringar av BM?).

Dessa aspekter har utvärderats av Wu m.fl. (2005) och generellt finns väldigt lite kunskap om dessa frågor. Wu visar sex typer av dynamiskt beteende och vissa är definitivt olämpliga i detta sammanhang. Biomarkörer som har lång induktionstid och lång återhämtningstid bedöms särskilt lämpliga för miljöövervakning där provtagning sker relativt sällan. De är inte så känsliga för korttidsvariationer i exponering, vilket inte heller är syftet med den avsedda tillämpningen. Även en motsvarande biomarkör men med kort induktion är utmärkt i detta sammanhang.

I många sammanhang förordas att flera olika biomarkörer ska användas parallellt, för att belysa olika steg längs exponering - effektkedjan samt för att belysa olika typer av ämnen och effekter. Wu m.fl (2005) betonar att det är idealiskt att använda biomarkörer som varierar avseende induktionstid och återhämtningstid, för att härigenom återspegla både snabba och långsamma förändringar. I deras review visar de att återhämtningstiden för endokrina effekter, oljekolväten och organofosfater förefaller längre än för metaller, PAH och klororganiska ämnen. Flera klororganiska ämnen omsätts dock så långsamt i fisk att snabbt varierande exponering inte är att förvänta.

I följande avsnitt utvärderas varje biomarkör avseende:

- Mekanismen
- Kvalitetsaspekter
- Kort utvärdering av fallstudier

Kvalitetsaspekterna omfattar följande moment, även om underlaget sällan tillåter att alla dessa aspekter diskuteras:

- 1) Känslighet (hur låga halter ger respons och är det relevant för lågpåverkade områden?)
- 2) Specificitet för organiska ämnen (påverkas biomarkören av oorganiska ämnen eller andra faktorer och är påverkan kontrollerbar?)
- 3) Tidsaspekter för induktion och återhämtningar (jfr Wu m.fl, 2005)
- 4) Är BM reversibel (dvs återgår BM då exp. upphör?)
- 5) Kan organismen anpassa sig till exponering (dvs sjunker BM trots kvarstående exp.?)
- 6) Kvalitet (finns QA utvärderat, interkalibrering, precision etc)
- 7) Ekonomiska aspekter och kompetenstillgång

Utvärdering av några fallstudier ska beskriva:

- 1) Hur fungerar BM operativt? Har man sett någon relation mellan allmän föroreningsbelastning (exponering) och BM-respons i något verkligt fall?
- 2) Har man sett någon relation mellan BM och effekter på högre organisationsnivåer?
- 3) I vilka haltnivåer/föroreningsnivåer har de använts? (t.ex. bakgrund, förorenade områden).

7.2 Biomarkörer för exponering

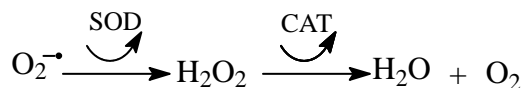
7.2.1 Glutation och glutatationrelaterade enzymer: metoder som bygger på enzymatiskt försvar mot oxidativ stress

Katalas (CAT) bryter ned väteperoxid till vatten och syre, huvudsakligen i peroxisomerna. CAT är lokaliserade till peroxysomerna i de flesta celler och är involverad i fettsyrametabolismen. Kunskapen om induktionsmekanismen för katalas är begränsad (Ronisz m.fl. 2005). Parametern är svår att utvärdera t ex i leverceller och ett bättre alternativ är att mäta aktiviteten i erythrocyter. CAT-aktiviteten anses vara lätt att mäta men bedöms som en mindre lämplig parameter för att utvärdera miljörisker eftersom den kan ge upphov till motsägelsefulla resultat på grund av att både induktion och inhibering har observerats efter exponering för miljöföroreningar. Mer forskning behövs för att förstå bakgrunden till detta (van der Oost m.fl. 2003).

Erfarenheten från BEEP projektet visar på samma problem att CAT-aktiviteter i fisk var svårtolkade och motsägelsefulla (Lehtonen m.fl. 2003). Livsmiljöfaktorer som svält kan påverka aktiviteten. Variationen av CAT över året är liten (Ronisz m.fl. 2005). Slutsatsen blir därför att CAT anses ge en dålig respons för miljöföroreningar.

Superoxid dismutas (SOD)

Katalyserar reduktionen av superoxidradikalen ($O_2^{\cdot -}$) till väteperoxid. Den senare är själv ett viktigt oxidationsmedel och detoxifieras av CAT och Glutation-beroende peroxidase (figur 1).



Figur 1. Schematisk beskrivning av enzymen SOD och CAT reaktion med superoxidradikalen.

Både laboratorieundersökningar (klorerade benzodioxiner, HCB, PCB, DDE, PAH) och fältstudier har visat påverkan på SOD-aktiviteten i fisk från förorenade områden. Emellertid finns det en anmärkningsvärd skillnad i respons mellan laboratoriestudier och fältundersökningar. Därför krävs mer kunskap om SOD för att parametern skall kunna användas för riskbedömning och trendundersökningar i miljön (van der Oost m.fl. 2003).

Glutation-beroende peroxidase (GPOX)

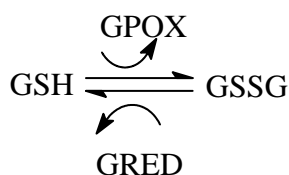
GPOX reducerar olika organiska peroxider till motsvarande alkoholer. Process förmedlas av ett seleninnehållande cytoplasmaenzym som använder glutatation (GSH) som co-faktor varvid GSH oxideras och bildar en disulfid (GSSG). GSH kan återskapas genom att disulfiden reduceras av enzymet glutatationreductas (se nedan).

Glutation (GSH) kan dels fungera som ett primärt skydd mot oxidativ stress eller som en co-faktor till glutatation peroxidase (GPOX). Ökat flöde av syreradikaler orsakat av xenobiotika ger en hög konsumtion av GSH som leder till en dränering av cellernas antioxidantpool. Cellerna försöker kompensera detta genom reduktion av GSH (glutation reductas). Denna process är energikrävande och kan förorsaka störningar i cellernas normala metabolism (van der Oost m.fl. 2003).

Fisk som exponerades för paraquat, PAH, PCB och HBC i födan reagerade med en förhöjd aktivitet men tricykliska PAH gav en sänkt aktivitet. Parametern anses inte tillräckligt väl undersökt för att kunna användas i miljöövervakning eller riskbedömning (van der Oost m.fl. 2003).

Glutationreduktas (GRED)

GRED är inte direkt involverad i försvaret mot fria radikaler utan är viktig för upprätthållandet av statusen på GSH/GSSG förhållandet under oxidativ stress. Schematiskt beskrivs processen i figuren 2.



Figur 2 Visar det cykliska förloppet där glutation används som co-faktor för reduktion av radikaler av enzymen GPOX och GRED.

För detta krävs energi som kommer från NADPH. GRED har inte används i någon stor utsträckning som biomarkör. Ökad aktivitet i laborieförsök med fisk har rapporterats vid exponering via föda för PCB, PAH, DDE och HCB. Ökad aktivitet har också påvisats i havslevande lax. Efter som GRED inte givit respons i kontaminerade områden så är metoden ifrågasatt. Vidare, GSH (reducerad glutation) korrelerade dåligt med exponeringen i både burexponeringsförsök och i vildfångad fisk i kontaminerade områden (van der Oost 2003; Winter m.fl. 2005).

7.2.2 Biokemiska indikatorer på oxidativ stress

Här kan nämnas lipidperoxidation som mäter oxidationen av polyomättade fettsyror. Slutbestämningen genomförs med HPLC-UV. Metoden anses ha en stor potential men kräver mer forskning innan den kan användas för monitoring.

DNA oxidation som kan vara resultatet av OH-radikal attack: metoden är känslig men är tekniskt komplicerad (van der Oost m.fl. 2003).

7.2.3 P450 – EROD – CYP1A

Mekanism

Monooxygenas enzymer (MO) kallas också ”mixed function oxidase” (MFO) eller cytokrom P450. CYP450 är en familj av många olika enzymer med central roll i cellernas omsättning av endogena föreningar (t ex hormoner) men också av xenobiotika (Fas I reaktion). Fas I-reaktioner minskar ofta giftigheten och ökar vattenlösligheten hos xenobiotika genom oxidering, hydrolys eller reduktion. Detta sker genom att ett syre införs i molekylerna. Andra enzymer (Fas II) konjugerar därefter metaboliten från Fas I för att underlätta utsöndring via njurarna. Enzymsystemet är induktivt. I tabell 6 ges exempel på vanliga miljöföroreningar som kan påverkas av eller som inducerar olika typer av CYP. CYP450-systemet aktiverar också av många föroreningar, bl.a. PAH, akrylnitril, bensen, trikloretylen och andra klorerade lösningsmedel (Parkinson, 1996).

Tabell 6. Exempel på ämnen som fungerar som substrat eller inducerar olika former av Cytokrom P450.

CYP	Föreningar	Referens
CYP1A1	PAH, plana PCB, PCDD/F	Parkinson, 1996
CYP1A2	aromatiska aminer, estradiol	Parkinson, 1996
CYP2A6	ickeplana PCB (t.ex. CB-101)	McGraw och Waller
CYP2C9	diklofenak,	Parkinson, 1996
CYP2E1	bensen, halogenerade alkaner, nitrofenoler,	Parkinson, 1996
CYP3A4	aldrin, etinylestradiol	Parkinson, 1996

Induktionen av CYP4501A har studerats ingående i miljösammanhang. Induktionen börjar med att en förening (t ex. PAH eller klorerade aromater) binder till Ah-receptorn. Komplexet transporteras till cellkärnan där det binder till DNA "uppströms" P450-generna (CYP1A-gener). Bindningen till DNA startar transkriptionen av mRNA. Bildad mRNA vandrar därefter ut i cytoplasman där syntesen av CYP1A-enzymerna sker. Många studier i den akvatiska miljön visar på en stark koppling mellan exponering för xenobiotika som PAH och polyklorerade aromatiska föreningar och induktionen av CYP1A-proteinerna. Som redan nämnts innehåller P450 många CYP-enzymmer men det är bara några få som är kopplade till detoxifiering av främmande organiska föreningar (tabell 6). Därför är inte total-P450 ett bra mått på exponering. Enzymerna CYP1A är de som bäst korrelerar (dos-responsförhållande) till exponering av plana aromatiska kolväten.

Förutom att mäta halten CYP1A **proteiner** kan transkriptionen användas som ett mått på exponering. I det fallet mäter man CYP1A mRNA nivåer i organismen. Ett känsligt mått på exponering är att bestämma CYP1As **katalytiska** aktivitet dvs. enzymernas förmåga att transformera xenobiotika. Det finns flera metoder men den känsligaste och mest använda tekniken är den som bygger på etoxyresorufin O-deetylas (EROD). Aktiviteten mäter ERODs förmåga att deetylera föreningen 7-etoxyresorufin till resorufin som kan detekteras fluorimetriskt. Det finns ett starkt samband mellan halten CYP1A-protein och EROD-aktiviteten (van der Oost 2003).

Induktion av CYP1A-produktion sker inte bara i levern utan också i flera andra organ som njurar, gälar och tarm. Det är exponeringsvägen som primärt avgör vilket organ som aktiverar bildandet av CYP1A. I fisk som exponeras via vattnet sker induktionen primärt i gälarna men också i hjärta och blodkärl. Exponeras fisken via födan sker induktion i tarmepitelet (van der Oost 2003; Geist m.fl. 2007).

Quirós et al (2007) jämförde CYP1A mRNA responsen i lever och i fiskfjäll dvs. inte själva enzymaktiviteten utan transkriptionen. Resultaten visar att responsen var likartad i lever och fjäll men responsen var snabbare i fiskfjällen. Författarna menar att fördelen med att använda fjäll är att fler mätningar på samma individ vid olika tidpunkter. Vidare är testet relativt billigt och snabbt och lämpar sig därför för miljöövervakning (Quirós m.fl. 2007).

Plana halogenerade aromaters toxicitet kan förklaras med att föreningar, förutom att inducera CYP1A-produktion, också har förmågan att frikoppla den katalytiska oxidationscykeln vilket får till följd att skadliga reaktiva syraradikaler frisätts i cellen. Av det följer att CYP1A/EROD är kopplat till oxidativ stress. Förutom induction kan en del föreningar inhibering P450-systemet. Exempel på föreningar med denna egenskap är en del metaller, organiska metallföreningar (TBT) och vissa PCB kongener (se även nedan) (van der Oost 2003).

Som med alla biomarkörer kan också denna biomarkör påverkas av andra faktorer än exponering för föroreningar. Biologiska faktorer som spelar en roll i detta sammanhang är bland annat fiskart, ålder, storlek och kön. Andra faktorer av betydelse är pH, temperatur, årstid (reproduktionscykel)

för provtagningen och hanteringen av testorganismen vid provtagningen (Andersson och Förlin 1992; Schmitt och Dethloff, 2000).

Utvärdering och fallstudie

Aktiveringen av avgiftningssystemet P450 (CYP1A) har använts för att studera hur stort påverkansområdet på fisk var från ett skogsindustriellt avlopp. Mätningarna gjordes i en gradient från fabriken och visade på god korrelation mellan biomarkören och halten hartssyror och klorfenolära föreningar. Andra fysiologiska blodparametrar var opåverkade (Soimasuo m.fl. 1995). Liknande resultat rapporteras av Al-Arabi m.fl., (2005).

Biomarkören EROD har framgångsrikt använts inom ett flertal monitoringprogram (Lehtonen m.fl. 2006; Sandström m.fl. 2005; Schmitt and Dethloff, 2000). I Sverige användes EROD framgångsrikt inom projektet Environment/Cellulose (Förlin m.fl. 1995) och det är också en parameter som ingår i Naturvårdsverkets marina tidsserieövervakning.

Beyer m.fl. (1996) burexponerade flundra och torsk för PAH och PCB kontaminerade fjord-sediment. Genom att använda odlad fisk undvek man problemet med stor genetisk variation som följer med den vilda populationen. Ett antal olika biomarkörer undersöktes varav CYP1A (EROD) och plasma AST (aminotransferaser) gav en tydlig signal för PAH exponering.

Det är viktigt att beakta att CYP1A aktiviteten är olika i han- och honfisk och att den påverkas av reproduktionscykeln (Beyer, Morten Sandvik m.fl. 1996; Lehtonen m.fl. 2006). Fördelen med att använda vild fisk är den långa exponeringstiden som avspeglar sig i att halten av föroreningar och även EROD-aktiviteten var högre i vild fisk jämfört med burexponerade (Winter m.fl. 2005).

Effekten på karpleverenzymerna av några läkemedel undersöktes av Thibaut m.fl., (2006). Antidepressiva läkemedel inhiberade CYP1A. P450 iso-formerna CYP1A och CYP2A i fisk och människa har ungefär samma substrat specificitet. Antiinflammatoriska läkemedel påverkade inte CYP1A men inhiberar andra CYP-enzym.

Chen m.fl. (2001), studerade BPE-kongenerernas förmåga att indicera lever enzymerna P-450 med hjälp av EROD-mätningar. Undersökningen gjordes på bl.a. på regnbågslox. Både rena PBDE-kongenerer och kommersiell PBDE-blandning hade affinitet till Ah-receptorn och gav induction av P450. Receptorbindningen var inte korrelerad till kongenerernas olika rymdgeometri troligen på grund av bromatomernas storlek.

Gruppen aminotransferaser (AST) katalyserar överförandet av en aminogrupp från en aminosyra till en ketosyra. AST finns i många vävnadstyper men i höga halter i hjärnan, levern och muskulaturen. Förhöjd AST är kopplad till akuta leverskador varför AST har använts som biomarkör för leverpåverkan: cellnekros studerades genom att mäta halten aspartat aminotransferas (ALT) och alanin aminotransferas (ALT) i fiskserum. Serum ALT men inte serum AST korrelerade positivt med PFOS halten i levern (Hoff et al. 2003).

Slutsatser

Testsystem som bygger på ett enzym i avgiftningssystemet CYP450 (CYP1A) är ett väl beprövat mycket känsligt och relevant test vars respons är relaterad till halten av vissa xenobiotika (dos-respons relation). Starkt samband mellan organiska miljöföroreningar och EROD-aktiviteten/CYP1A-halt har dokumenterats. EROD-aktiviteten tillsammans med halten av CYP1A och CYP1A mRNA ger ett känsligt "early-warning system" för många men inte alla organiska föreningar. CYP450A är intimt kopplat till oxidativ stress och DNA-addukter. Vidare finns en kopp-

ling till reproduktionsstörningar eftersom hormonbalansen påverkas av en förhöjd aktivitet i detta enzymssystem.

7.2.4 Genomics och proteomics, metabolomics

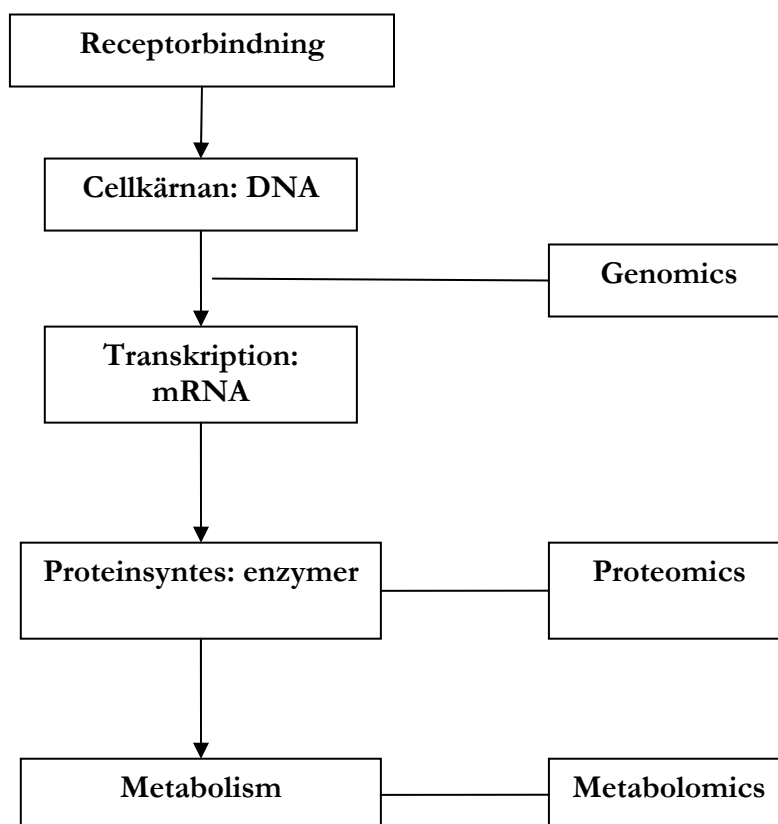
Bioindikatorer baserade på ”Omics” är mycket intressanta och kan ge tidiga, snabbare och känsliga biomarkörer i framtiden. Med bättre kunskap om mekanismerna som styr cellernas reaktion på xenobiotika kan vi förvänta oss att få en mer nyanserad förståelse för hur hela organismen påverkas. För att uppnå detta krävs emellertid mycket forskning vilket betyder att metoderna i dag inte kan användas i screeningundersökningar.

”Omics” innebär att man studerar många gemensamma parametrar samtidigt som ger en mer bred och nyanserad bild av hur en organism reagerar på en exponering. Nedan och i figur 3 förklaras hur de tre olika ”Omics”-teknikerna hänger samman.

- A. Organismen exponeras för xenobiotika som binder till en receptor och transporteras till cellkärnan. Komplexet binder till DNA uppströms de gener som skall aktiveras. Aktivering leder till transkription dvs. syntes av mRNA för aktuell gen (-er). Bestämning av på denna nivå av upp och nedreglerade gener kallas för ”Genomics”.
- B. mRNA transporteras ut till cytoplasman och utgör mallen för den proteinsyntes som leder till bildandet av enzymer. Bestämning av vilka proteiner som bildas kallas ”Proteomics”.
- C. Proteinerna dvs enzymerna som bildas sköter cellens olika kemiska processer. De metaboliter som enzymerna bildar kan bestämmas och används som biomarkörer. Metodiken för detta kallas ”Metabolomics”.

”Genomic” betyder att man läser av ett stort antal, 100-1000-tals eller hela genomets aktivering (expression signatur)

De biomarkörerna som används i dag är ofta på proteinnivå t ex. vitellogenin, P450 d.v.s. studeras bara ett eller fåtal protein/enzym i dessa tester. Med ”proteomics” vill man fånga hela cellens proteininnehåll. Man kan också studera förändringar i enzyrnas arbete dvs. metabolismen. Det senare kallas metabolomics.



Figur 3: Beskrivning av relationen mellan genomics, proteomics och metabolomics.

Genomics

Genomics betyder att man använder genomets respons (expressen) på ett stimuli (xenobiotica) som biomarkör för exponering. Man tar fram ”genkartor” på upp- och ned reglerade gener. I teorin kan man jämföra hela genom för exponerade och icke exponerade organismer. På detta sätt kan det åtminstone i teorin bli möjligt att utvärdera hur hela organismen reagerar i detalj på ett stimuli. Metodiken har bara använts i laboratorieexperiment där transkription för enstaka gener har studerats (Geist m.fl. 2007; Meucci och Arukwe 2006; Poynton m.fl. 2007). Metodiken är relativt dyr och oprövad i miljösammanhang men kan i framtiden bli ett viktigt verktyg för att studera effekter. Tyvärr är dos-respons samband inte möjliga att få eftersom genernas uttryck är temporala.

Proteomics

Proteomics innebär att man avläser hela eller delar av proteinsammansättningen i en organism och jämför det med en opåverkat proteom. Proteomics ligger mer nära effekter jämfört med genomics. Metoden anses ännu inte mogen för att användas i fältundersökningar (Legler, J. Amsterdam Norman Workshop 29-30 oktober 2007).

Metabolomics

Metabolomics är en multi endpoint analys och kallas också ”discovery driven method” (effektstyrd metod). Metoden innebär att man studerar den endogena metaboliska profilen hos en organism. Med andra ord utgör bildade slutmetaboliter en sorts register på vilka reaktioner som processats i cellerna. Slutmetaboliter anses kunna vara bättre biomarkörer än föreningar uppströms i den

biochemiska metaboliseringskedjan eftersom intermediäres kan förväntas vara kortlivade i relation till slutprodukten. Funktionen hos många gener och proteiner är fortfarande okända men man länge känt till i detalj ett stort antal metaboliska vägar. Detta och vetenskapen om att metabolismen (metabolom) är mycket känsligt för miljöförändringar gör metabolomics till en intressant biomarkör (Drahl, 2007).

På grund av resultatens komplexitet måste mätningarna kombineras med multivariat dataanalys för att finna dos-respons effekter. Metoden har potential att ge nya markörer för exponering och effekt. Metabolomicstekniken har testats i en undersökning som hade till syfte att studera miljöeffekter av farmaka och andra xenobiotica i miljön (Samuelsson m.fl. 2006).

Samuelsson m.fl. (2006) använde plasma från fisk som exponerats för EE2. Man kunde visa att metabolitprofilen i cellerna var påverkad och var kopplad till induktionen av vitellogeninsyntesen. Metabolomic visade i denna undersökning på effekt vid lägre EE2-halt än vitellogeninmätningen. Den viktigaste påverkan syntes på vitellogenin, alanin, fosfolipider och kolesterol (Samuelsson m.fl. 2006).

Metabolomics är inte en ny metodik utan har använts inom humandietforskningen under lång tid. Ett exempel är ”statistical total correlation spectroscopy” (STOCSY) där man kopplat ihop NMR-instrument med statistisk analys (Drahl, 2007). Ett liknande sätt att gå till väga hade Samuelsson m.fl (2006) som refereras nedan.

7.2.5 Metabolism av PAH

I fisk sker metabolism av PAH snabbt, halveringstiden är mellan 1 och 9 dagar, det är därför svårt att mäta korrekta halter i vävnad (van der Oost m.fl. 2002). Genom att mäta förekomst av de metaboliter som bildas kan man få ett mått på exponering av PAH. Denna biomarkör visar endast exponering som skett inom dagar från provtagningstillfället. Detta är troligen orsaken att denna parameter uppvisar en stora och snabba variation i tiden (Leadly m.fl. 1999). Försök både i laboratoriet och i fält har visat kraftigt förhöjda halter av PAH-metaboliter i galla från fisk exponerad för PAH. (Pinkney m. fl. 2003; van der Oost m.fl. 2003; Leadly m.fl. 1999; Wirgin m.fl. 1994) Mängden galla och koncentration av metaboliter i densamma påverkas av fiskens födotillgång och för att undvika variationer p.g.a. detta kan koncentrationen metaboliter jämföras med pigmenthalter i gallan. Flera av PAH-metaboliterna (ex. 1-OH pyrene) är fluorescerande och analysen kan antingen genomföras som en totalhalt av alla PAH-metaboliterna, s.k. fluorescent aromatic compounds FAC, eller genom att välja ut en metabolit som får representera all PAH-metabolism. (van der Oost m.fl. 2003). Metoden kan vara ett bra komplement till CYP1A/EROD mätningar. Metoden har bl.a. tillämpats på abborrhonor i en gradient från Mälaren genom centrala Stockholm och ut i skärgården (Hansson m.fl., 2006).

7.3 Reproduktionsstörningar

7.3.1 Steroider

Mekanism

Könshormonerna är derivat av kolesterol och syntetiseras i gonaderna. Hormonerna kan delas in i (a) androgena (testosteron; 1-ketotestosteron) som produceras i testis och ovariet (b) östrogen och

progesteron som främst produceras i ovariet men även testis i små mängder. Störningar i den hormonella regleringen kan användas som ett mått på exponering av kemikalier.

Kvalitetsaspekter

Könshormonresponsen är snabb både på naturliga och miljöberoende stimuli. Responsen står för både exponering och effekt eftersom hormonerna styr många könsrelaterade processer i organismen. Även om könshormonerna är känsliga indikatorer på stress är det inte alldeles lätt att utvärdera resultaten från sådana mätningar. Det finns ett stort antal naturliga faktorer som påverkar halten könshormoner: t.ex. temperatur, ljusets dygnsrytm. Även själva provtagningen i sig är en faktor att ta hänsyn till. För att minimera dessa variabler är det viktigt att upprätta ett standardiserat provtagningsprotokoll som tar hänsyn till ovan angivna faktorer.

Utvärdering med fallstudier

Påverkan på könshormoner har påvisats i fisk som exponerats för blekeriavloppsvatten (hartssyror, fenoler), pesticider som används inom jordbruket och olika industrikemikalier. Tungmetaller kan också påverka hormonbalansen (Schmitt och Dethloff 2000).

7.3.2 Vitellogenin

Mekanism

Vitellogenin är ett högmolekylärt fosforlipoglykoprotein som är en föregångare till ägguleproteinet och används som en biomarkör för östrogen exponering i fisk. Processen startar med att genen för vitellogeninbildning aktiveras. Normalt sker det efter att östrogen bundits till östrogenreceptorn. Andra föreningar med affinitet till östrogenreceptorn ger också i varierade grad en aktivering.

I hanfiskar är genen för vitellogeninsyntes normalt vilande men kan aktiveras i närvaro av föreningar som kan binda till östrogenreceptorn. Aktiveringen leder till feminisering och störd reproduktion. Mätningarna kan utföras i olika organ t ex lever, gälar och hjärna samt i hudslem på fisk. Reaktionen på östroger är olika i de olika organ- och provtyperna (Martyniuk m.fl. 2007; van der Ven m.fl. 2006; Van Veld m.fl. 2005; Meucci och Arukwe 2006). Parametern är specifik för organiska ämnen.

Kvalitetsaspekter

EE₂ är ett mycket potent syntetiskt östrogen som ger effekt på låg ng-nivå. Andra xeno-östrogener som 4-nonylfenol, *tert*-oktylfenol och bisfenol-A har en betydligt svagare bindning/effekt och ger därför påverkan först vid högre halter (µg/l nivå). Mätningar på hanfisk ger den högsta känsligheten eftersom hanfisk normalt inte skall producera vitellogenin (Lattier m.fl. 2001).

Påverkan på energiomsättningen, t ex vid överbelastning av avgiftningssystemet eller svält, kan ge en ospecifik effekt på det endokrina systemet (van der Oost 2003). Responsen är reversibel både på individ och på populationsnivå (Kidd m.fl. 2007).

Fisk blir inte resistent för påverkan av östrogener eller östrogenliknade föreningarna.

Kostnaden för testet och kompetenskraven avgör var i kedjan mellan receptorbindning och bildat protein man gör mätningarna. Mätningar på proteinet vitellogenin är standardiserat men kräver biokemisk kompetens och tillgång till artspecifika antikroppar för detektion. Det pågår ett intensivt utvecklingsarbete när det gäller att använda genaktiveringen (gen expression) som biomarkör för föreningar som binder till östrogenreceptorn. Denna typ av tester ger ett snabbare svar på exponering.

ring eftersom mätningarna utförs tidigare i den biokemiska processen som leder fram till bildandet av vitellogenin (Lattier m.fl. 2001). Nackdelarna med tekniken är att genernas aktivitet är kortvarig och att testorganismernas genom är dåligt kända vilket gör tolkningen svår: man vet inte vad de olika genernas respons betyder. Men med en god insikt i detta kan det bli möjligt i framtiden att få en mer nyanserad bild av hur xeno-östrogener påverkar en organism (se Genomics).

Utvärdering med fallstudier

Biokemiska, histopatologiska och populationsdynamiska effekter av 17 α -ethinylestradiol (EE2) har undersökts på olika trofnivåer i helsjöexperiment genomförda i två sjöar inom ”Experiment Lake Area, Canada”. En av sjöarna användes som opåverkad referenssjö. Den naturliga variationen i sjöarna följdes under några år innan exponeringen startades.

EE2 tillsattes därefter experimentsjön en gång per år som gav en genomsnittshalt på 4.8-6.1 ng/l. Hanfiskarten av arten Fathead minnows (*Pimephales promelas*) reagerade med att öka sin vitellogeninhalt 9000 ggr. Detta ledde till inhibering av testikelutvecklingen i hanfiskarna. I honfisk var ökningen av vitellogeninhalten 8-80 ggr den naturliga nivån. Fathead minnow har en kort generationstid (3 år) och man kunde därför inom experimenttiden på tre år även påvisa en dramatisk populationsdynamik för arten. På grund av femininiseringsen av hannarna misslyckades leken redan från år ett vilket ledde till en kraftig nedgång i populationen år två och en fullständig krasch år tre av exponeringen (Kidd m.fl. 2007). En återhämtning påvisades efter det att exponeringen upphört.

Fathead minnows respons jämfördes med en annan fiskart, Pearl Dance (*Margariscus margarita*). Halten vitellogenin hos hannarna ökade med 4000 ggr och gav även för denna art reproduktionsstörningar och påverkade därmed också populationen som helhet. Det senare var inte lika tydligt för denna art eftersom dess livslängd är betydligt längre än för fathead minnows (Palace m.fl. 2002).

Laxfisk i samma sjö visade inte upp samma känslighet för EE2 och ingen påverkan på lek eller yngelutvecklingen kunde påvisas (Werner m.fl. 2006). Populationen minskade något år tre troligen på grund av att födobrist eftersom Fathead minnow utgjorde en viktig del av laxens föda (Kidd Norman Workshop Amsterdam 29-30 oktober 2007). I sjöexperimenten kunde ingen påverkan av EE2 på alger, zooplankton påvisas.

Två groddarter i sjöarna studerades också. Leken påverkades signifikant för arten *Rana clamitans* men inte arten *Rana septentrionalis*. Den tidiga yngelutvecklingen var opåverkad för båda arterna. Ingen påverkan på könfördelningen eller gonadutvecklingen kunde påvisas för de båda groddarterna (Park och Kidd, 2005).

VTG som bioindikator är väl dokumenterad och känslig metod med ekologisk relevans. Användandet av VTG-halten i hannar är speciellt lovande eftersom hanfiskar normalt inte bildar VTG. Detta kan vara artberoende då VTG har om än i mycket låga halter påvisats i blod från vissa fiskarter. Emellertid finns det många faktorer som kan påverka resultaten vilket gör utvärderingen av denna biomarkör svår (Schmitt och Dethloff 2000).

7.3.3 Gonadsomatiskt index

Lågt gonadsomatiskt index (GSI) är en indikator på reproduktionsstörning och innebär en påverkan på fruktsamhet och oocytillväxt (en oocyt är en omogen äggcell i ovariet). GSI används ofta som en parameter för reproduktionsstörningar tillsammans med vitellogenin-, LSI och konditionsfaktorer (Sandström m.fl. 2005). Lågt GSI kan således indikera exponering för toxiska eller reproduktionsstörande föreningar och en förändrad fysisk livsmiljö. Ofta kopplar man indexet med histolo-

giska undersökningar som ger ytterligare information om organismens hälsotillstånd. GSI bestäms på samma vis som LSI d.v.s. $GSI = 100 * \text{gonadvikt (g)} / \text{totalvikt (g)}$. Bestämningen är således enkel och kan rutinmässigt ingå i undersökningar där reproduktionen undersöks.

Kopplingen mellan påverkan av EE2 på Vitellogeninhalten i plasma, GSI påvisades i fisk i helsjöexperimentet i Canada (Palace m.fl. 2002). Denna koppling gör att man ofta använder GSI tillsammans med mätningar av vitellogenin.

Mekanism

Gonadutvecklingen styrs av hormoner. Organiska föreningar som stör denna hormonbalans ger härigenom effekt på gonadutvecklingen och därmed reproduktionen. Hannar som exponeras för östrogener producerar förstadiet till gulekroppsprotein vitellogenin som normalt bara honor producerar, blir feminiserade och bildar också s.k ova-testis (ovarievävnad i testis kallas också intersex). Reduktion av GSI kan också ske indirekt på grund av att (a) medelåldern i populationen minskar, (b) tillväxthastigheten påverkas och (c) påverkan på energilagring (Sandström m.fl. 2005).

Kvalitetsaspekter

GSI kan på statistisk grund anses vara en acceptabelt känslig bioindikator i ett långsiktigt monitoringprogram (Sandström m.fl. 2005). Liksom för de övriga bioindikatorerna som bygger på reproduktionen måste den naturliga variationen vara väl karakteriserad för att indikatorn skall utvärderas på ett meningsfullt sätt. GSI lämpar sig bäst för att följa långtidsexponering eftersom indikatorns respons inte är snabb (Schmitt och Dethloff, 2000).

Fallstudier

Interaktionen mellan tillväxt, energilagring och reproduktion hos Abborre har studerats i områden som påverkats av kylvatten från kärnkraftverk. (Sandström m.fl. 2005). Sandström et al, (2005) summerar tre situationer där GSI kan utgöra en användbar biomarkör tillsammans med parametrarna tillväxt, kondition, LSI, lekmognad och dödlighet (tabell 7).

Tabell 7 Fallstudier som visar hur olika biomarkörer och hälsfaktorer sammantaget kan spegla indikatororganismens, fisk i detta fall, livssituation bättre än indikator var för sig.

Orsak	Tillväxt	Kondition	LSI	Mognad	GSI	Dödlighet
Påverkan på livsförhållanden t ex Förhöjd temp.	+	+	+	tidig	+	-
Toxisk påverkan t ex endokrin	+	+	+	sen	-	-
Indikerar allvarlig toxikologisk situation	-	-	-	sen	-	+

Fall 1 i tabell 7: Det varma vattnet ledde till en snabb tillväxt av ynglen och en tidig sexuell mognad vilket gav ökat GSI. Tillväxten gjordes på bekostnad av energilagringen vilket ledde till en högre mortalitet och minskad lek. Effekten är inte kemisk utan en effekt av fiskens fysiska livsmiljö och livshistoria.

Fall 2: Toxisk påverkan på det endokrina systemet avspeglade sig i lågt GSI kombinerat med sen mognad tyder på en toxisk påverkan av kemikalier som leder till metaboliska störningar. Trots det var tillväxten god men reproduktion var inhiberad.

Fall 3: Den höga dödligheten indikerade metaboliska störningar förorsakat av toxiska föreningar i fiskens miljö (Sandström m.fl. 2005). Minskad GSI åtföljdes av en ökad EROD-aktivitet uppmättes i Abborrar från Kvädöfjärden under åren 1988-2002. EROD-aktiviteten pekar åt samma

håll. Förhöjd EROD-aktivitet påverkat könshormon omsättningen och därmed GSI (Sandström m.fl. 2005; van der Oost m.fl. 2003).

7.3.4 Intersex

Hanfiskars som exponeras för östrogen blir feminiserade och bildar ova-testis dvs. man hittar oocyter i hannarnas testis. Honor som påverkas av androgener tillbakabildar sina oocyter (omogna ägg). Intersex indikerar endokrina störningar och har påvisats frekvent i förorenade områden men inte i referenslokaler. Det är viktigt att beakta att det finns stora skillnader i känslighet mellan arter (Lehtonen m.fl., 2006). I England upptäcktes redan 1996-1997 omfattande påverkan på könsutvecklingen hos fisk i många vattendrag, genom hög frekvens av intersex (Jobling m.fl., 1998). Parametern kan med fördel användas tillsammans med bioindikatorerna vitellogenin och GSI.

7.4 Immunförsvaret

Immunförsvaret består av flera olika komponenter och är delvis lokaliserat till olika organ eller celler. Man skiljer på nedärvt (innate) och förvärvat (acquired) immunförsvaret. Det senare aktiveras först vid infektioner och är specifikt för de virus eller bakterier som individen exponerats för. I fisk är det nedärvt immunförsvaret ofta av större betydelse och har föreslagits som lämpligt att studera avseende kemiska ämnens påverkan på immunförsvaret (Bols m.fl., 2001). I fisk är immunförsvaret främst lokaliserat i njure ("anterior kidney = head kidney"), mjälte och thymus, men finns även allmänt förekommande t.ex. som leukocyter i blodet. Immunförsvaret består av många olika komponenter och det finns därför många parametrar som i princip skulle kunna användas som markör för immuntoxisk påverkan.

Det nedärvt immunförsvaret har stor betydelse för kroppens försvar mot infektioner, och är inte beroende av tidigare exponering. Nedsättning av denna komponent innebär därför större känslighet vid infektioner, och det nedärvt immunförsvaret har därför även stor betydelse på högre organisationsnivåer. Det nedärvt immunförsvarets mekanismer förefaller vara utvecklade tidigt under evolutionen, varför många mekanismer är gemensamma för t.ex. fisk och däggdjur.

Ett stort antal kemiska ämnen, både metaller och organiska ämnen, påverkar immunförsvaret (t.ex. Broeg m.fl., 2005). Det finns därför inga biomarkörer som specifikt visar immuntoxiska effekter av organiska ämnen. Immunförsvaret är ofta extremt känsligt för påverkan från kemikalier, och vissa biomarkörer kan ge respons vid föroreningshalter långt under den exponering som krävs för andra toxiska effekter (Luebke m.fl., 1997; Luster och Rosenthal, 1993; van der Oost, 2003). Generellt är dock kunskapen om hur enskilda kemikalier påverkar olika delar av immunförsvaret hos fisk fortfarande mycket bristfällig. Kemikalier kan ge respons på vissa delar av immunförsvaret, medan andra delar inte påverkas (t.ex. Baier-Anderson och Anderson, 1998). Därför rekommenderas ofta att flera markörer för immunförsvaret används tillsammans.

Kunskapen om hur kemiska ämnen påverkar immunförsvaret kommer främst från labtester på olika däggdjur. Under de senaste 10-15 åren har kunskapen om immuntoxisk påverkan på fisk ökat, och även naturliga populationer har studerats (t.ex. Luebke m.fl., 1997; Zelikoff m.fl., 2000; Skouras m.fl., 2003a). Flera komplikationer tillkommer då biomarkörer för immunförsvaret undersöks i naturliga populationer. Många biomarkörer har visats variera med faktorer såsom kön, endogena hormoner, hanteringen av fisk vid provtagning och säsong (Van Der Oost m.fl., 2003; Luebke m.fl., 1997). Det är också känt att kortvarig exponering kan stimulera immunförsvaret, medan kronisk

exponering vanligen leder till nedsatt immunförsvar. I dynamiska miljöer med starkt varierande föroreningsexponering kan detta ge svårtolkade resultat.

I tabell 8 ges en översikt över olika biomarkörer som skulle kunna användas för att studera kemikaliers påverkan på immunförsvaret. I efterföljande avsnitt diskuteras de mest lovande biomarkörerna i mer detalj.

Tabell 8. Översikt över biomarkörer för toxiska effekter på immunsystemet i fisk. Där inget annat anges är uppgifter från Bols m.fl. (2001). De biomarkörer som förefaller mest lämpliga är markerade med fetstil och beskrivs ytterligare i följande avsnitt.

Biomarkör	Kort beskrivning	Använd i naturliga populationer	Dynamik och känslighet för andra faktorer	Övriga referenser
Lysozymer	Enzym som bryter ned bakteriers cellmembran	t.ex. Skouras m.fl (2003a,b)	Oklart, stora individvariationer enl. Skouras	Broeg m.fl., 2005
Akutfas proteiner	Proteiner i plasma/-serum som förändras vid infektioner /skador		Troligen för snabbt varierande för att fungera som biomarkör.	
Fagocytos	Lokala makrofagers assimilering av främ. partiklar, tex bakterier	Ja, förorenade områden hade lägre fagocytos än referensområden	Oklart	Zelikoff m.fl., 2000 Fournier m.fl. 2000
Makrofag-aggregat	Antal eller storlek av makrofager	I svensk marin MÖ: Hansson m.fl. 2006a; MÖ i sötvatten, USA: t.ex. Hinck m.fl., 2007	Oklart, men påverkas även av virus mm, dvs inte specifik för kemisk påverkan	
Respiratory burst	Produktion av reaktiva syreföreningar (ROS) i fagocyter (monocyter och makrofager)	T.ex. Zelikoff 2000 & Skouras m.fl. (2003ab)		Behov av metodutveckling enligt Bols m.fl. 2001 & Broeg m.fl. 2005
Lymfocyter	Blokkroppar som deltar i försvaret mot infektioner	Mycket låg power i svensk marin M: Hansson m.fl. 2006a	Krävs betydligt mer kunskap innan de kan användas reguljärt	Van der Oost m.fl. (2003)

7.4.1 Lysozymer

Mekanism

Lysozymer är en grupp enzymer som bryter ned bakteriers cellmembran, och som bl.a. kan mätas i blod eller plasma men även förekommer i flertalet organ i fisk (Bols m.fl., 2001). När en individ blir infekterad ökar vanligen den lysozymala aktiviteten.

Försök har visat att lysosomaktiviteten ökar i ett tidigt stadium av coccoidal infektion i carpfisk (*Cyprinus carpio*). Man har visat genom experiment att om man infekterar fisk med sjukdomsalstrande bakterier ökar halten av lysosomer i blodet.

Försök har gjorts att använda lysosomaktiviteten som en indikator för sjukdomsstressorer. Det har i flera studier visats att ökad exponering för metaller eller många organiska ämnen kan påverka den lysozymala aktiviteten.

Andra faktorer som påverkar lysosomaktiviteten är temperaturen, födan, årstiderna, kön, art och ålder. Generella stressorer som hantering och transport kan också påverka aktiviteten.

Både ökade, oförändrade och minskade aktiviteter har påvisats i olika studier (t.ex. Bols m.fl., 2001; Maule m.fl., 2005; Harford m.fl., 2007), vilket kan göra resultaten svårtolkade.

Kvalitetsaspekter

Både metaller och organiska ämnen påverkar den lysozymala aktiviteten. Aktiviteten varierar också starkt mellan olika fiskarter (Lie m.fl., 1989). Skouras m.fl. (2003a) visar markanta årstidsvariationer, ett samband mellan aktivitet och fiskens ålder eller storlek, men inte någon skillnad mellan kön. Aktiviteten var också positivt korrelerad med lindan, men negativt korrelerad med andra organiska miljögifter. Temperatur, som är en viktig aspekt i långsiktiga övervakningsprogram, förefaller ha positiv effekt på lysozymaktivitet (Schmitt och Dehtloff, 2000). Andra faktorer som påverkar lysozymer är sjukdomar, kön, och ålder (Schmitt och Dehtloff, 2000). Lysozymernas dynamiska aspekter, dvs hur snabbt aktiviteten ökar eller avtar vid förändrad miljögiftsexponering, är till stora delar okänd (Bols m.fl., 2001).

Mätmetoden anses relativt enkel och bl.a. kan blodprov konserveras genom frysning. Metodik beskrivs bl.a. i Schmitt och Dehtloff (2000) och Skouras m.fl. (2003a). I USA ingick lysozymal aktivitet inledningsvis i ett långsiktigt storskaligt övervakningsprogram (Schmitt och Dehtloff, 2000). Metodens begränsningar ansågs uppvägas av att det var en av få metoder som överhuvudtaget var praktiskt möjlig i detta sammanhang. Efter en större pilotstudie beslöt man dock att utsluta lysozymer från programmet. Lysozymal aktivitet rekommenderas dock av Skouras m.fl. (2003b) som biomarkör för immunsystemet. Individuella variationer gör att om syftet är att kunna upptäcka långsiktiga trender, måste relativt många individer analyseras varje år.

Slutsatsen blir att detta förefaller vara ett relativt lättanvänt verktyg som indikator av påverkan på immunförsvaret, men att tolkningen kan vara svår. Det torde vara lättare att tolka förändringar över tid inom en lokal, än att tolka skillnader mellan olika lokaler.

Fältundersökningar

Relativt få studier har undersökt lysozymer i naturliga fiskpopulationer. Längs den tyska Nordsjö-kusten har det visats att lysozymaktiviteterna samvarierar med föroreningsgradienten i sedimenten, och även uppvisar vissa samband med flera synliga sjukdomstecken (Skouras m.fl., 2003a, 2003b). I det amerikanska programmet BEST var lysozymaktiviteterna svårtolkade. Minskad aktivitet observerades när dab (*Limanda limanda*) exponerades för oljeföroreningar eller organiska fosfater. En sänkning av aktiviteten i carp fisk observerades när den i fältstudier exponerades för vatten från avloppsreningsverk. Här var artskillnaden uppenbar då Dab uppvisade ingen påverkan efter 12 veckors exponering. (Schmitt, 2002).

Trots den begränsade erfarenheten ingår den i BEST-programmet. Motivet för detta är att det är en av få markörer för immunförsvaret och därför en viktig generell indikator på fiskens hälsostatus. Det krävs dock mycket mer fält- och laboratoriedata för att kunna validera lysosomer som biomarkör.

7.4.2 Makrofagaggregat

Mekanism

Makrofager är en speciell stationär celltyp med stor förmåga att absorbera t.ex. virus och bakterier och är av central betydelse för immunförsvaret. Vid infektioner kan makrofagaggregat bildas i lever, mjälte eller njure. Bildningen av dessa aggregat är en naturlig process som anses inblandad i immunförsvaret mot främmande virus eller bakterier. Förekomsten ökar ofta med individernas ålder. Det finns ett antal studier som visar att exponering för främmande kemikalier ökar aggregaten i antal (Schmitt och Dehtloff, 2000).

Kvalitetsaspekter

Att mäta makrofagaggregatens antal och storlek är relativt enkelt och metoden fungerar väl i stora program (Schmitt och Dehtloff, 2000). Parametern är dock ganska ospecifik för typ av föroreningar och påverkas dessutom av infektioner och ålder. Resultaten kan därför vara svårtolkade avseende kemisk påverkan på immunförsvaret, och fungerar kanske bäst som ett komplement till andra metoder.

Fältundersökningar

Makrofagaggregat används i det stora nordamerikanska programmet BEST (avsnitt 6.5) som indikator för kemikaliers påverkan på immunförsvaret. Utvärderingar av fältdata ger svårtolkade resultat, och det diskuteras att denna parameter även varierar med ålder, kön, art och inte minst infektioner. Metoden har även utvärderats från ca 10 års tidsserieövervakning på svenska östkusten (Hansson m.fl., 2006a). Antalet makrofagcenter var lågt och varierade måttligt mellan åren. Inga slutsatser drogs utifrån dessa resultat.

7.4.3 Fagocytos

Mekanism

Makrofager är en speciell stationär celltyp med stor förmåga att absorbera t.ex. virus och bakterier och är av central betydelse för immunförsvaret. Makrofager bildas genom utveckling av monocytter som transporteras i blodet. Processen att assimilera främmande virus, bakterier och andra partiklar består av flera led och benämns fagocytos. Makrofagerna utsöndrar också ämnen som stimulerar andra delar av immunförsvaret (avsnitt 7.4.4).

Kvalitetsaspekter

Känsligheten för hur kemiska ämnen påverkar fagocytos varierar mellan olika arter och flera metaller ger en tydligt nedsatt fagocytos (Fournier m.fl., 2000). Enligt Fournier m.fl. (2000) är effekten av organiska ämnen på fagocytos mindre väl studerad. Resultat från olika labstudier är motsägande: vissa organiska ämnen minskar fagocytosen medan andra inte förefaller ge någon effekt (Bols m.fl., 2001). Kunskapen om vilka exponeringsnivåer av olika ämnen som påverkar fagocytosen är också starkt begränsad, men allmänt sett anses immunförsvaret ge respons vid mycket låga exponeringsnivåer.

Effekten är sannolikt reversibel. En fältundersökning av flundra i Nordsjön visade på tämligen stora individvariationer (Skouras m.fl., 2003). Könsskillnader har noterats av Fournier m.fl. (2000) men inte av Skouras m.fl. (2003). Vi känner inte till om metoden har använts i Sverige.

Fältundersökningar

Det finns ett mindre antal undersökningar där fagocytos undersökts i naturliga fiskpopulationer. Fournier m.fl. (2000) undersökte fagocytos i fisk nedströms ett pappersbruk och fann markant nedsatt kapacitet jämfört med lokala referenslokaler. Även i ett PCB-förorenat område har nedsatt fagocytos påvisats (Zelikoff m.fl., 2000). I flundra från olika lokaler längs den tyska Nordsjökusten fann dock Skouras m.fl. (2003) att fagocytosen var högre i individer med höga halter av vissa klororganiska ämnen. Variationerna var dock stora inom respektive lokal och undersökningen saknade en referenslokal.

Dessa exempel tyder på att fagocytos kan användas som indikator på immunförsvarets påverkan av kemikalier i naturliga populationer. Processen är av central betydelse för immunförsvaret, men många osäkerheter kring dos-respons för olika ämnen föreligger.

7.4.4 Acid fosfatas i makrofagaggregat

Enzymet "acid phosphatase" finns bl.a. i makrofagerna och indikerar att makrofagerna är aktiverade (t.ex. Broeg 2003).

Kvalitetsaspekter

Metodik för att kvantifiera "acid phosphatase" i makrofager (MA-AP) finns utvecklad och testad (Broeg, 2003), som även visade att temperaturen påverkade responsen. Påverkan av olika kemikalier på detta enzymssystem är så vitt vi vet väldigt lite undersökt i fisk, men Broeg (2003) fann i flundra från Nordsjön ett omvänt samband mellan MA-AP och flertalet klororganiska ämnen och metaller. Om detta verkligen var ett orsakssamband får betraktas som osäkert. I en tidigare laboratorieundersökning kunde man dock inte påvisa någon förändring i aktiviteten av MA-AP när fisk utsattes för en infektion, och man ifrågasatte om MA-AP är en lämplig markör för immunförsvaret i fisk (Enane m.fl., 1993). Metoden har dock föreslagits som lämplig biomarkör för immunkemiska effekter i Östersjön (Lehtonen m.fl., 2006), där man rekommenderar att den används tillsammans med andra generella biomarkörer.

Fältundersökningar

På svenska västkusten användes MA-AP som ett mått på påverkan på immunsystem i samband med muddring (Sturve m.fl., 2005). Många andra biomarkörer användes för att bedöma exponering eller andra typer av effekter. I samband med muddringen kunde man se vissa förändringar av MA-AP, men dessa var inte systematiska varför det är svårt att tolka resultaten både avseende orsak och relevans. I Nordsjön har också ett stort antal flundror undersökts och man fann ett generellt samband mellan vissa föroreningar och MA-AP (Broeg, 2003).

7.4.5 Respiratory burst

Mekanism

En del i makrofagernas och monocyternas aktivitet består i att reaktiva syreradikaler bildas, s.k. ROS (reactive oxygen species). Dessa radikaler utgör ett effektivt försvar mot mikroorganismer. Enzymet NADPH oxidas är involverat och processen kallas "respiratory burst".

Kvalitetsaspekter

Effekten av kemikalier på respiratory burst (RB) är bäst studerad för metaller och metallorganiska ämnen, men effekter har även påvisats från t.ex. PAH och klorerade ämnen. Flertalet under-

sökningar visar att RB minskar vid exponering för vissa föroreningar, men det finns även exempel när motsatt effekt erhålls med samma ämne (Bols m.fl., 2001; Reynaud och Deschaux, 2006). Detta tyder på att många andra faktorer också påverkar RB, t.ex. när i livscykeln exponering sker. Respiratory burst kan mätas på flera olika sätt vilka sammanfattas i Bols m.fl. (2001). Metodasppekter kan också bidra till de delvis motsägelsefulla resultaten. Enligt Broeg m.fl. (2005) är metoden svårtolkad och kräver standardisering.

Fältundersökningar

Respiratory burst har undersökts i flera naturliga fiskpopulationer och aktiviteten avtar ofta men inte alltid med ökande föroreningsgrad (t.ex. Zelikoff m.fl., 2000; Bols m.fl., 2001; Skouras m.fl., 2003a,b).

7.5 Neurotoxiska effekter

Mekanism

Som biomarkör för neurotoxiska effekter används två colinesteraszymer med affinitet för substraten acetylcolin och butyrylcolin. Acetylcolin och butyrylcolin fungerar som transmittorsubstanser i nervkopplingarna (synapserna). Hos fisk finns bara acetylcolin i hjärnvävnad men i muskelvävnad återfinns både acetylcolin och butyrylcolin. För att signalen från nerverna skall komma som diskreta pulser och inte som en kontinuerlig signal så måste transmittorsubstanserna i synapserna snabbt brytas ned mellan signalerna/pulserna. Denna livsviktiga nedbrytning/-deaktivering utförs av colinesteraszymer. Nervstridsgas (fosforsyrastrar) förhindrar denna nedbrytning genom att blockera enzymerna och som leder först till långsammare signalöverföring och senare till att nervsignal blir kontinuerlig till muskler vilket i sin tur leder till kramp och slutligen till döden på grund av kramp i andningsmuskulaturen (ECETOC, 1998).

Kvalité

Colinesterashämning har framgångsrikt använts som biomarkör för pesticidexponering men anses inte vara tillräckligt väl undersökt för att kunna användas för miljöriskbedömning. Framför allt krävs mer kunskap om skillnader i olika arters känslighet för acetylcolinesterashämning (van der Oost 2003).

7.6 Genotoxiska effekter

Skador på organismers arvs massa kan ha långtgående effekter på såväl individnivå som population då genetiska skador kan nedärvas. Skadorna sker i cellkärnan, direkt på DNA-strängen, där gener kan muteras eller genuttryck förändras. Förändrade gener kan exempelvis leda till tumörer. Vid skador på DNA i könsce ll sproducerande organ kan effekten bli reproduktionsproblem och hos avkomman kan ärftliga förändringar uppkomma.

Det finns ett flertal biomarkörer för genotoxiska effekter och de kan antingen påvisa exponering av genotoxiska ämnen exempelvis genom en aktivering av de försvarssystem som finns i cellen (exempelvis P450-systemet) eller påvisa effekter som föroreningen kan leda till. Det finns alltså markörer som påvisar både exponering och effekt. Biomarkörer som påvisar effekter av cancerogena ämnen finns i två typer och båda påvisar effekter på DNA i cellkärnan. Den ena typen påvisar effekt på molekylär nivå och den andra påvisar effekt på kromosomal nivå. Båda dessa skador kan leda till mutationer på DNA som i sin tur kan leda till exempelvis cancer och/eller reproduktionsstörningar.

Det finns olika metoder för att mäta skador på kromosomal nivå, de vanligaste är ”chromosome abberation test”, ”sister chromatid exchange test” och ”mikrokärntest”. ”Chromosome abberation test” och ”sister chromatid exchange test” genomförs på embryon/larver har inte använts i någon större utsträckning. Mikrokärntest har använts på burfisk i förorenat område med blandat resultat. (Bechmann 2002)

7.6.1 EROD

Genotoxiska organiska ämnen binder ofta till den s.k. Ah-receptorn, även kallad dioxinreceptorn. När denna receptor blivit aktiverad binder den med hjälp av ett visst protein (Arnt) till specifika delar av DNA-kedjan. En av dessa specifika delar innehåller CYP 1A1-gener som reglerar produktionen av enzymet P450 1A1. När denna gen (CYP 1A1) aktiveras ökar produktionen av detta enzym som sedan bidrar till metabolismen av främmande ämnen i cellen. En ökad produktion av P450 1A1 kan påvisas genom tillsats av 7-etoxyresorufin som med hjälp av P450 1A1 omvandlas till resorufin genom en deetylering. Resorufin är fluorescerande och kan därför mätas med stor noggrannhet. Analys av EROD-aktiviteten i en organism kan alltså användas som ett mått på exponering av ämnen som inducerar P450-systemet ämnen såsom dioxin, PAH och plana PCB.

Se även 7.2.3.

7.6.2 DNA-addukter

Mekanism

Reaktiva ämnen kan verka direkt på DNA och orsaka skador. Ett exempel är PAH som aktiverar CYP 1A1 och metaboliseras av dess enzym P450. Metaboliterna är mer vattenlösliga ämnen som cellen lättare ska kunna utsöndra. De är också mer reaktiva och kan binda till DNA och bilda s.k. DNA-addukter. Dessa är kovalenta strukturer och kan, om cellens reparationssystem inte fungerar, leda till mutationer och tumörer. DNA-addukter kan bildas i all vävnad och vid kronisk exponering för cancerogena substanser kan förekomsten av DNA-addukter nå jämvikt i exempelvis levern som är ett målorgan för cancerogena substanser. En stor förekomst av addukter tyder på påverkan av genotoxiska ämnen.

Kvalitetsaspekter

DNA-addukter verkar inte uppkomma vid naturlig stress såsom svält, hypoxi eller temperaturförändringar utan är specifika för cancerogena substanser och dess metaboliter. Framförallt är det PAH som studerats i samband med DNA-addukter. (ICES 2007) Addukterna uppkommer framförallt efter kronisk exponering och de kan finnas kvar i flera månader efter att de bildats. De kan alltså påvisa effekt lång tid efter exponeringen och lämpar sig därför väl för användning i långsiktiga övervakningsprogram. Ökad förekomst av DNA-addukter har påvisats hos fisk exponerade för framförallt PAH och förekomst av DNA-addukter har även i fältstudier kopplats till förhöjda halter. Även i bakgrundslokaler utan känd påverkan av PAH har förhöjd frekvens DNA-addukter påvisats. (van der Oost m.fl., 2003)

Om en cell inte kan reparera den skada addukten gör kan tumörer utvecklas. Dessa tumörer används ibland som ett ytterligare mått på påverkan av genotoxiska ämnen. Dessa påvisas dock oftare i äldre åldersgrupper av fisk jämförs med de yngre grupperna trots jämförbar förekomst av DNA-addukter. Förekomst av DNA-addukter verkar alltså inte påverkas av ålder. (Pinkney et al 2003)

Det finns ett flertal sätt att kvantifiera förekomst av addukter, immunological assays, fluorescence tekniker, kromatografi/masspektrometri och inmärkning av ^{32}P . Inmärkning av ^{32}P har hittills visats vara den mest känsliga och kan mäta DNA-addukter med en känslighet ner till en addukt på 10^9 nukleotider. Denna metod är dock dyr och tidskrävande. En immunologisk metod där antikroppar används föreslås istället av van der Oost, denna metod är mindre känslig men är avsevärt enklare att genomföra. (van der Oost et al 2003)

Fältundersökningar

Att genotoxiska ämnen såsom PAH inducerar uppkomst av DNA-addukter har påvisats i ett flertal studier både i fält och på laboratoriet. Även korrelation mellan DNA-addukt-koncentration och föroreningsgrad har påvisats. DNA-addukter har även påvisats i referensstationer, dock i markant lägre grad jämfört med de stationer där föroreningspåverkan konstaterats. (Hansson et al 2006b, Pinkney et al 2003, Wirgin et al 1994 och van der Oost m.fl., 2003)

Hansson m.fl. (2006b) påvisade förhöjd förekomst av DNA-addukter i honlig abborre provtagen i lokaler längs en föroreningsgradient från centrala Stockholm till kontrollstation i mellanskärgården och ut till Östersjön. Halt addukter ökade både ju närmare Stockholm lokalen låg men även ut mot Östersjön. De lägsta halterna addukter påträffades i prov från kontrollstationen. Förekomsten av addukter stämde överens med de halter av föroreningar som uppmättes i provtagen abborrmuskel och sediment. Uppmätta föroreningar var i detta fall PCB men förmodligen påverkar även förekomst av exempelvis PAH. (Hansson m.fl. 2006b)

I en studie med atlantisk frostfisk (*Microgadus tomcod*) från olika floder längs nordöstra Nordamerika påvisades samband mellan föroreningshalt av PAH och förekomst av DNA-addukter. (Wirgin m.fl. 1994).

7.6.3 DNA-brott (strand break)

Mekanism

Detta är, liksom DNA-addukter, en biomarkör som påvisar effekter på molekylär nivå och är alltså en mycket tidig markör för exponering av genotoxiska föroreningar. Genotoxiska ämnen kan orsaka direkta skador på DNA-strängen som kan leda till att DNA fraktioneras eller att långa strängar frigörs. De vanligaste metoderna för att kvantifiera DNA-brott är den s.k. ”alkaline unwinding” metoden samt ”kometsvansmetoden” (Comet assay). Kometsvansmetoden mäter förekomst av fragmenterat DNA som vid elektrofores vandrar från cellkärnan. (Bechmann 2002) Förekomst av fragmenterat DNA tyder på en DNA-skada som kan härröra från genotoxiska substanser.

Kvalitetsaspekter

DNA-brott påvisat med kometsvansmetoden verkar inte påverkas av ålder eller kön. (Yang m.fl. 2006) Den är enkel att använda och har testats på både fisk och evertebrater. I fisk och mussla har påvisats högre frekvens DNA-skador i förorenade områden jämfört med referensstationer. Van der Oost föreslår metoden för regelbunden in situ övervakning av fisk p.g.a. dess simplicitet. (van der Oost m.fl. 2003 och Bechmann 2002)

Fältundersökningar

Kometsvansmetoden har använts för att påvisa effekter från förorenade områden i flera studier. I en studie med malfisk (*Ameiurus nebulosus*) i Nordamerika uppvisades signifikant mer DNA-skador i ett industripåverkat område jämfört med referensstationen. (Yang m.fl. 2006) Även i studier med mussla har signifikanta korrelationer mellan DNA-skador och föroreningsgrad påvisats (Bechmann

2002) Det har dock varit svårare att finns studier med påvisad korrelation mellan föroreningsgradient och förekomst av DNA-skador.

7.6.4 Mikrokärntest

Mekanism

Genotoxiska störningar vid mitosen kan leda till att fragment eller hela kromosomer avskiljs. Dessa fragment eller kromosomer kan sedan bilda en ”ny” kärna i cytoplasman, en s.k. mikrokärna. Förekomst av sådana mikrokärnor kan tyda på en yttre störning i form av en genotoxisk förorening. (Bechmann 2002)

Kvalitetsaspekter

En svårighet med denna biomarkör kan vara att skilja mikrokärnorna från andra intracellulära organeller. Endast de celler som genomgått celledelning används i denna test och därför krävs en urskiljning av dessa celler, även denna urskiljning kan vara en svårighet med detta test. Metoden är annars enkel att genomföra, den är dock inte specifik utan skadorna kan uppkomma både från genotoxiska substanser samt andra stressorer.

Fältundersökningar

Metoden har använts på både fisk och evertebrater. Resultaten är dock ej entydiga och bör därför tolkas med försiktighet. I en jämförande studie mellan nio fältförsök framkom att vid fem av försöken fanns skillnader i mikrokärnförekomst mellan de fiskar som vistats i förorenade områden jämfört med fiskar från referensstationer. Ett försök med fisk utsatt i bur vid ett PAH-förorenat område visade dock ingen förhöjd förekomst av mikrokärnor trots en förhöjd halt PAH i fisken. (Bechmann 2000)

7.7 Allmänna effekter

7.7.1 Leversomatiskt index

LSI definieras som kvoten av: leverns vikt/(fiskens vikt x 100). Storleken på LSI är beroende av fiskens kön. Detta mått ger ett mått på belastningen på avgiftningssystem. Levern anpassar sig till belastningen genom att öka sin kapacitet genom att öka sin volym i relation till kroppsvikten. En ökad halt av giftiga ämnen i fiskens livsmiljö kan alltså ge ett högre LSI.

Påverkan kunde påvisas i burexponerad fisk i PAH kontaminerat område. Den kemiska parametern FACs (fluoriserande aromatiska föreningar i gallprover) indikerade också i detta fall en PAH-exponering (Beyer m.fl. 1996).

Abborre var påverkat i sjöar som exponerats för lakvatten från avfallsupplag uppvisade påverkan i form av avvikande LSI. I sjöar exponerade för avfallsupplag kunde man påvisa i en del fall ett ökat LSI och i andra fall en minskad LSI. (Noaksson m.fl. 2005).

7.8 Sammanfattning av olika biomarkörer

Det finns många biomarkörer som förefaller relevanta och lovande, men relativt få har använts i ett stort antal studier. Av den vetenskapliga litteraturen framgår att intresset och innovationstakten inom biomarkörer är stort, men att det kan ta tid innan nyare metoder är tillräckligt testade för att kunna rekommenderas i långsiktiga program. Väldigt få studier är dessutom inriktade på sötvatten. Övergripande finns ett behov av metodstandardisering, och fler dokumenterade fallstudier i sötvatten skulle också underlätta möjligheten att rekommendera biomarkörer till det limniska programmet. Sötvatten är ofta mer dynamiska än marina miljöer. Effekten av denna dynamik på biomarkörernas respons är till stora delar okänd.

För att studera påverkan på immunförsvaret finns flera metoder. Relativt sett föreligger ganska få studier av hur kemikalier påverkar immunförsvaret, särskilt i naturliga populationer. De metoder som förefaller mest etablerade och samtidigt relevanta är fagocytos, respiratory burst och lysozymal aktivitet. Dessa aspekter ingår i det medfödda immunförsvaret vilket innebär att de inte är beroende av föregående exponering för t.ex. virus eller bakterier. Immunförsvarets respons mot kemikalier är mycket känsliga parametrar men ibland motsägelsefulla. Därför kan det vara svårt att jämföra olika lokaler om de varierar i flera avseenden såsom typ av föroreningar, temperatur, art mm. Jämfört med andra typer av effekter är immunotoxicitet en ganska ny vetenskap och antalet fältstudier mycket begränsat. Många metoder förefaller relativt komplicerade att använda. Eftersom immunförsvaret är komplicerat och består av flera komponenter bör man alltid använda flera olika biomarkörer. De nämnda biomarkörerna bör kompletteras med mer ospecifika markörer såsom synliga tecken på sjukdom, gälskador, organsomatiska index mm för att stärka beviskedjan.

Effekter av genotoxiska ämnen undersöks relativt ofta i miljöövervakning. Dessa effekter kompliceras av att olika organismer har olika förmåga att reparera genskador. Denna förmåga är även kopplad till exempelvis generellt hälsotillstånd och immunförsvaret. De mest använda markörerna är förekomst av DNA-addukter och påvisande av DNA-skador. Förekomst av DNA-addukter har framförallt använts som en indikator på exponering av PAH medan påvisande av DNA-skador inte är specifik utan indikerar exponering av genotoxiska ämnen i stort. Addukter uppkommer framförallt efter kronisk exponering och addukterna finns kvar lång tid, upp till månader, efter exponering för PAH. Det gör den därför lämplig att använda i långsiktiga övervakningsprogram. Förekomst av andra DNA-skador är troligen en mer kortlivad indikator som sannolikt repareras fortare efter exponerings slut. Vid användning av enbart addukter som indikator för genotoxiska ämnen är dock risken att missa kortare exponeringstillfällen större då induktionstiden är längre än för exempelvis andra DNA-skador. Rekommendation av endast en av dessa två indikatorer för genotoxiska ämnen är inte möjlig inom ramen för detta projekt då andra faktorer såsom användarvänlighet, ekonomiska aspekter och praktisk tillämpbarhet inom ramen för miljöövervakningen måste utredas ytterligare.

Som indikatorer för reproduktionsstörningar har vi tagit upp steroidnivåer, vitellogenin, GSI och intersex. Bäst används dessa indikatorer tillsammans eftersom man får en mer nyanserad bild av exponeringen. Metoderna är väl dokumenterade och metodiken väl beprövad i miljöövervakning. Vitellogenin som biomarkör i hanfisk är relativt ny och här krävs en del forskning för rätta ut frågetecken kring förekomst och halter av proteinet i olika arter av fisk.

Xenobiotika kan förorsaka en ökad bildning av syreradikaler som är giftiga för cellerna. Cellernas skydd mot oxidativ stress eller förmåga att hantera bildade syreradikaler kan användas som ett mått på exponering. Man har använt sig av glutathion S-transferas, superoxid dismutas, catalas och glutathionreduktas. Även biokemiska indikatorer har använts. Generellt sett har dessa biomarkörer en

begränsad användbarhet på grund av låg känslighet (cataklas, glutathionreduktas) eller att de inte är så väl undersökta att de kan användas i miljöövervakning.

P450 är en exponeringsindikator för PAH, plana klorerade aromater. Testsystem som bygger på avgiftningssystemet P450 är ett väl beprövat mycket känsligt och relevant test vars respons är relaterad till halten xenobiotika (dos-respons relation). P450 är intimt kopplat till oxidativ stress och DNA-addukter. Vidare finns en koppling till reproduktionsstörningar eftersom hormonbalansen kan påverkas av en förhöjd aktivitet i detta enzystem. Metoden anses vara mogen för att användas i miljöövervakning och screening (Lehtonen m.fl., 2006; van der Oost m.fl. 2003)

Bioindikatorer baserade på ”Omics” nya biomarkörer som är en vidareutveckling av befintliga markörer. Metodiken kan ge bättre kunskap om mekanismerna som styr cellernas reaktion på exponering för xenobiotika. För att uppnå detta krävs emellertid mycket forskning vilket betyder att metoderna i dag inte kan användas i screeningundersökningar.

I tabell 9 har en översiktlig rangordning gjorts för de olika biomarkörer som diskuteras i kapitel 7, med avseende på potential och lämplighet för limnisk miljöövervakning. Oftast saknas specifika uppgifter om metodernas kostnader, och rangordningen är baserad på ett allmänt intryck av metodens komplexitet. I rangordningen anges 1 som bäst och 3 som sämst.

Tabell 9. Översiktlig rangordning av olika biomarkörer som diskuteras i kapitel 7.

Biomarkör	Relevans	Tillgänglig metodik	Tillgänglig kompetens	Kostnad (relativt)
EXPONERING				
EROD	1	1	1	
ALLMÄN HÄLSOSTATUS				
Organsomatiska index	2	1	1	
Övriga parametrar som används inom Kust och Hav	2	1	1	?
REPRODUKTIONSTÖRNING				
Vitellogenin	2	1	1	2
Intersex	1	2	2	2
Gonadsomatiskt index	1	1	1	1
IMMUNFÖRSVARET				
Makrofagcenter	2/3	1	1	1
Lysozymal aktivitet	2	2	2/3	2
Fagocytos	1	2	?	?
”Respiratory burst”	1	2/3	?	?
GENOTOXISKA EFFEKTER				
DNA-addukter	1	1	1	3?
DNA-strängbrott	1	2?	?	3?

8 Implementering i den limniska miljöövervakningen

Biomarkörer av de slag som föreslås i denna rapport ger indikationer om exponering eller effekter på individnivå. Många av dessa effekter, t.ex. påverkan på reproduktionen eller immunförsvaret kan ge effekter även på populationsnivå. De exponeringsrelaterade biomarkörerna ger i bästa fall ett mått på den verkliga exponeringen av kemiska ämnen. Däremot säger de flesta biomarkörerna relativt lite om vilka ämnen som orsakar den biokemiska eller fysiologiska responsen. Biomarkörerna kan ses som en länk mellan den kemiska övervakningen och undersökningar av fiskpopulationernas utveckling. Många giftiga ämnen (t.ex. PAH) bioackumuleras endast svagt och i sådana fall är också biomarkörer ett nödvändigt komplement till kemiska mätningar. Sammantaget bör biomarkörer därför användas i en övergripande strategi tillsammans med biologiska och miljökemiska undersökningar.

En övergripande strategi kan vara att med miljökemiska mätningar, biomarkörer och biologiska undersökningar följa utvecklingen över tid. Om dessa system indikerar förändringar över tid, eller betydande regionala avvikelser, kan sambanden mellan olika parametrar undersökas. De miljökemiska mätningar i sötvattenfisk som bedrivs f.n. genomförs huvudsakligen som återkommande mätningar vart 3:e år. Provbanksningen möjliggör dock förtätande retrospektiva undersökningar, varigenom man i efterhand kan studera eventuella samband mellan vissa miljögifter och påvisade effekter. De miljökemiska analyserna kan vid sådana situationer även intensifieras genom t.ex. utökning av antal ämnen för att utröna eventuella orsaksamband.

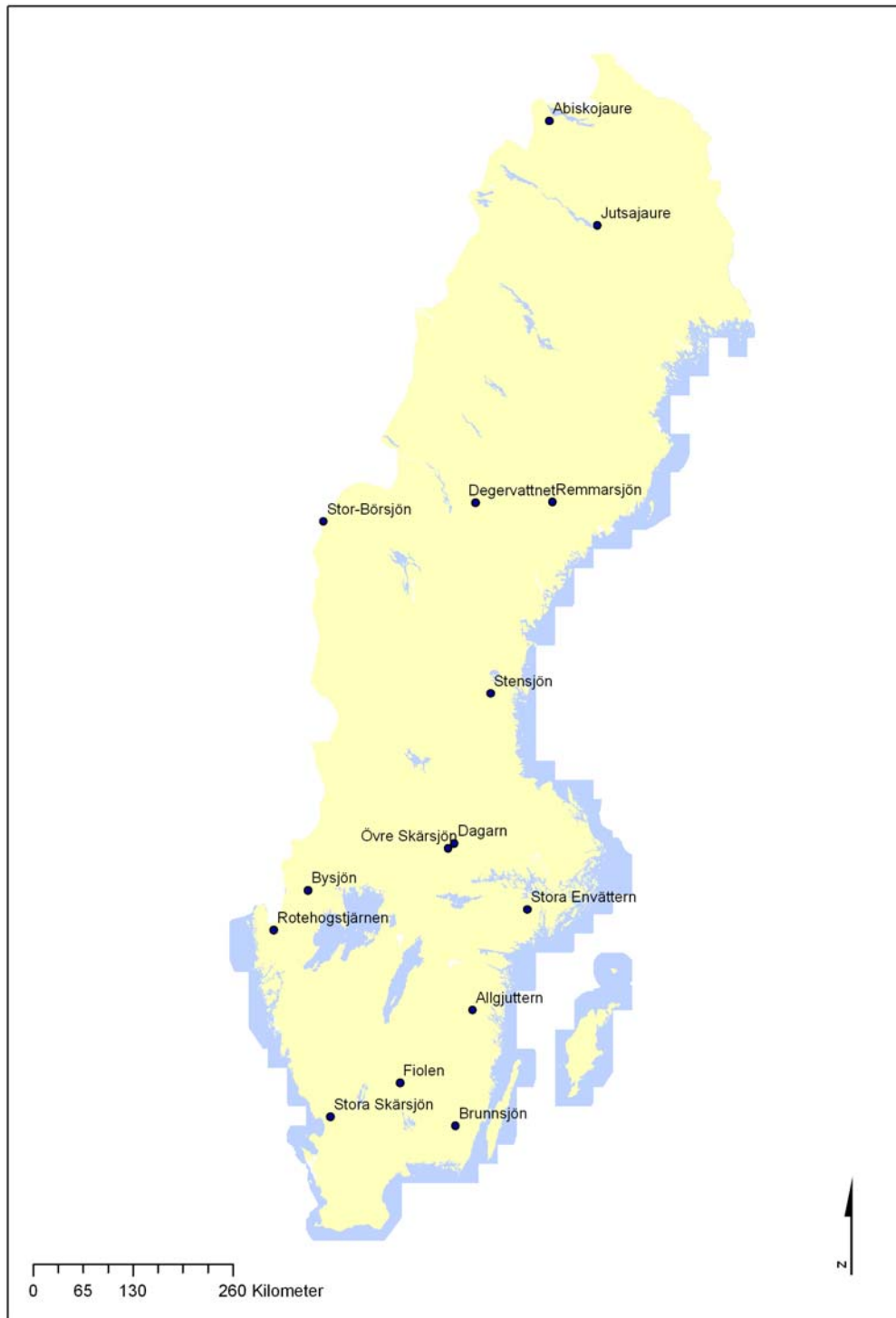
En implementering av biomarkörer inom nationell miljöövervakning av sötvatten syftar till att

1. följa utvecklingen i olika bakgrundsområden
2. utgöra nationella referensnivåer till mätningar i mer påverkade områden.

De biomarkörer som vi rekommenderat i kapitel 7 bör kunna implementeras genom koppling till Fiskeriverkets årliga provfisken. På så vis kan biomarkörerna utvärderas tillsammans med populationsutvecklingen av olika fiskbestånd. Den välkända effekten av mellanårsvariationer gör att årlig provtagning är en förutsättning för att kunna bedöma utvecklingen över tiden. Inom den nationella miljöövervakningen kommer Fiskeriverket framöver att provta 15 sjöar årligen (figur 4) Sjöarna är spridda över nästan hela landet och ger en mycket god möjlighet att belysa fiskens hälsotillstånd i regioner med olika klimat och varierande storskalig föroreningsbelastning.

För att kunna använda biomarkörer som indikatorer på regionala och nationella skillnader i miljögiftspåverkan krävs att man känner till hur andra parametrar påverkar biomarkörerna. Det kan förväntas att biomarkörernas basnivåer varierar mellan olika sjöar, bl.a. beroende på klimat, deras olika miljöbetingelser (pH, näringsstatus) och diffus belastning (t. ex atmosfärisk deposition). Därför bör man inledningsvis vara försiktig i tolkningar av regionala skillnader. Om övervakningsprogrammet även innefattade några mer påverkade lokaler skulle man lättare kunna bedöma vad som är naturliga variationer i biomarkörernas basnivåer, och vad som är respons på ökad antropogen kemisk påverkan.

Abborre bedöms som en lämplig art eftersom den förekommer allmänt i nästan hela Sverige och dessutom är en populär matfisk. Flertalet av de sjöar som ingår i den nationella miljöövervakningen (figur 4) har känd och stabil förekomst av Abborre (Fiskeriverket, 2007). I Abiskojaure finns bara Röding och för Stor-Björnsjön, Degervattnet och Bysjön saknas uppgifter i fiskeriverkets rapport.



Figur 4. Sjöar som inom den nationella miljöövervakningen undersöks årligen för fiskbestånd.

9 Sammanfattning och rekommendation

I existerande långsiktiga miljöövervakningsprogram i andra länder eller inom internationella organisationer finns en viss dominans av fysiologiska biomarkörer (organsomatiska index, gälskador mm), vilka inte är särskilt specifika för organiska föroreningar. Trots omfattande litteratursökningar har endast några få exempel hittats där data från långsiktiga undersökningar av biomarkörer utvärderas. Det nordamerikanska programmet BEST är det enda exempel på långsiktiga mätningar i sötvatten.

En rekommendation om biomarkörer i limnisk övervakning utgå från två principfrågor:

1. Vilka föroreningar vill vi kunna följa?
2. Vilka biologiska effekter vill vi kunna indikera?

Många inducerade toxiska effekter påverkas av både organiska ämnen och metaller. Generellt är det därför sällan möjligt att använda *effektrelaterade* biomarkörer som är specifika enbart för organiska ämnen. Många *exponeringsrelaterade* biomarkörer är mer specifika för oorganiska ämnen. Vi föreslår, i enlighet med andra studier och övervakningsprogram, att ett flertal biomarkörer används och att man minskar kravet på att biomarkörerna bara ska återspegla organiska ämnen.

Avsikten är att biomarkörerna ska återspegla effekter på individer, och att detta är effekter som kan vara av stor betydelse på populationsnivå. Slutsatsen från föreliggande litteraturstudie är att det är relevant att använda biomarkörer som belyser:

- påverkan på immunförsvaret
- reproduktionsstörningar
- genotoxiska effekter
- allmän hälsostatus
- exponering

Det kan vara svårt att avgöra orsaken till biomarkörers variation i rummet eller tiden och det finns sällan absoluta utvärderingskriterier för enskilda biomarkörer. För att tolka kemiska orsaker och biologiska/ekologiska konsekvenser av biomarkörers förändring krävs en samlad bredare utvärdering ("weight-of-evidence"), där biomarkörer integreras med biologiska undersökningar och kemiska mätningar.

Här rekommenderas biomarkörer som har en ekologisk relevans och som bör vara möjliga att användas i limniska ekosystem i Sverige. För några av biomarkörerna finns det dock frågetecken kring hur de kommer att fungera i praktiken och vid vilka föroreningsituationer som de ger respons. Nästa steg är att testa metoderna i några utvalda sjöar. I en sådan test vore det värdefullt om någon mer förorenad lokal ingick. Genom att inkludera en påverkad lokal i ett övervakningsprogram skulle man lättare kunna bedöma vad som är naturliga variationer i biomarkörernas basnivåer, och vad som är respons på kemisk påverkan.

Utifrån slutsatserna från föreliggande litteraturgenomgången kan följande generella rekommendationer ges för miljöövervakning med biomarkörer i limniska ekosystem:

1. För att kunna spåra exponering och effekter av föroreningar behövs flera olika biomarkörer för att fånga in tidiga varningssignaler. Ett sådant system kan indikera effekter på individnivå.

2. För att bedöma den ekologiska relevansen krävs normalt kompletterande undersökningar av t.ex. beståndsutvecklingen, ålderssammansättningen eller artsammansättningen.
3. Biomarkörer bör användas i ett integrerat program med kemiska och biologiska undersökningar. Ett s.k. weight-of-evidence koncept krävs ofta för att kunna tolka biomarkörerna avseende orsak (kemi) och konsekvenser på högre organisationsnivåer (biologi)
4. De geografiska, klimatologiska och biologiska skillnaderna mellan Sveriges insjöar kan försvåra jämförelsen av biomarkörer mellan sjösystem i olika regioner. Det är därför viktigare att fokusera på temporala variationer och trender inom respektive lokaler. Om man vill jämföra större regionala områden måste man skapa en regional "baseline" att basera jämförelsen på.
5. Det är angeläget att få mer kunskap om normalvariationen (baseline levels) och responsen för olika biomarkörer för föroreningar i olika organismer. Det är först med den kunskapen som en biomarkör kan bli ett effektivt instrument för att följa den biologiska statusen i ett ekosystem.
6. Ny metodik inom molekylärbiologin utvecklas för närvarande i snabb takt t ex ecotoxicogenomics och proteomics. Denna teknik kan ge oss nya känsliga biomarkörer i framtiden. Emellertid är dessa metoder i dag bara på forskningsstadiet och kan därför bara utföras på några få speciallaboratorier.

10 Referenser

- Adielsson, S., Törnquist, M. & Kreuger, J. (2006) Bekämpningsmedel i vatten och sediment från typområden och åar, samt i nederbörd under 2005. Ekohydrologi 94. Avdelningen för vatten-
vårdslära, SLU.
- Al-Arabi, S. A. M., Adolfsson-Erici, M., Waagbø, R., Ali, M. S. and Goksøyr, A., 2005,
Contaminant accumulation and biomarker responses in caged fish exposed to effluents from
anthropogenic sources in the Karnaphuly river, Bangladesh. *Environ. Toxicol. Chem.*, 24:8,
1968-1978.
- Allard, A.-S., M. Remberger, m.fl. (1987) Bacterial O-methylation of halogen-substituted phenols.
Appl. Environ. Microbiol. 53, 839-845.
- AMAP (2000) The AMAP trend and effects programme 1998-2003.
- AMAP (2004) AMAP assessment 2002: persistent organic pollutants in the Arctic.
- Andersson, J., A. Woldegiorgis, m.fl. (2006). Results from the Swedish National Screening
Programme 2005, Subreport 1: Antibiotics, anti-inflammatory substances and hormones.
IVL Swedish Environmental Research Institute Report B1689.
- Andersson, T. och L. Förllin (1992) Regulation of the cytochrome P450 enzyme system in fish.
Aquat. Toxicol. 24, 1-20.
- Arcand-Hoy, L. D. and W. H. Benson (1998). "Fish reproduction: an ecologically relevant indicator
of endocrine disruption." *Environ. Toxicol. Chem.* 17(1): 49-57.

- Balmer, M. E., T. Poiger, et al. (2004). "Occurrence of Methyl Triclosan, a Transformation Product of the Bactericide Triclosan, in Fish from Various Lakes in Switzerland." *Environ. Sci. Technol.* 38(2): 390-395.
- Bechmann, R.K. (2002) Biomonitoring of genetic damage, A literature review. Report AM-2002-010. RF-Akvamiljö.
- Bernes C. (1998) Organiska Miljögifter – ett svenskt perspektiv på ett internationellt problem. Naturvårdsverket Monitor 16.
- Beyer, J., Morten Sandvik, m.fl. (1996) Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus L.*) and Atlantic cod (*Gadus morhua L.*) exposed by caging to polluted sediments in Sorfjorden, Norway. *Aquatic Toxicol.* 36, 75-98.
- Bignert A. (2005) Utvärdering av analyser av ämnen prioriterade inom vattendirektivet och direktiv 76/464/EEG i miljöprover - Preliminär sakrapport. Rapport från Naturhistoriska Riksmuseet, 2005-07-08.
- Bols, N.C., Brubacher, J.L., Ganassin, R.C., Lee, L.E.J. (2001) Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 853–873.
- Bradlee, C. A. and P. Thomas (2003) Aquatic Toxicity of Phthalate Esters. *The Handbook of Environmental Chemistry: Phthalate esters.* C. A. Staples. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, Germany: 263-298.
- Broeg, K. (2003) Acid Phosphatase activity in liver macrophage aggregates as a marker for pollution induced immunomodulation of the non-specific immune response in fish, Helgoland Mar. Res. 57, 166–175.
- Broeg K., Renault T., Auffret M. och Gagnaire B. (2005) Effects of contaminants on the immune system of fish and shellfish. Annex 7 i ICES WGPDMO Report 2005.
- Chen, G., A. Konstantinov, B. G. Chittim, E. M. Joyce, N. C. Bols and N. J. Bunce (2001). "Synthesis of polybrominated diphenyl ethers and their capacity to induce CYP1A by the Ah receptor mediated pathway." *Environ. Sci. Technol.* 35(18): 3749-3756.
- David, R., M. och G. Gans (2003). Summary of Mammalian Toxicology and Health Effects of Phthalate Esters. *The Handbook of Environmental Chemistry: Phthalate Esters.* C. A. Staples. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag: 299-316.
- Dorval, J., Leblond, V., m.fl. (2004). Oxidative stress and endocrine endpoints in White Sucker (*Catostomus Commersoni*) from a river impacted by agricultural chemicals. *Environ. Tox. And Chem.* 24: 1273-1280.
- Drahl, C. (2007). "Science diet. The maturing field of metabolomics is taking steps toward guiding personalized nutrition." *Chem & Engenering News* 10: 12-17.
- ECETOC, 1998, Organophosphorus pesticides and long-term effects on the nervous system. ECETOC technical report No. 75.
- Enane N.A., Frenkel K., O'Connor J.M., Squibb K.S. och Zelikoff J.T. (1993) Biological markers of macrophage activation: applications for fish phagocytes. *Immunology* 80, 68-72.
- Eriksson, S., P.-O. Darnerud, m.fl. (2001). Syntetiska myskföreningar i bröstmjölk och fisk., Livsmedelsverket.
- Fiskeriverket (2007) Redovisning av Sötvattenslaboratoriets nätprovfisken i sjöar år 2006. Magnus Dahlberg.

- Fjeld E., Schlabach M., Berge J.A., Eggen T., Snilsberg P., Källberg G., Rognerud S., Enge E.K., Borgen A. and Gundersen H. (2004) Kartlegging av utvalgte nye organiske miljøgifter – bromerte flammehemmere, klorerte parafiner, bisfenol A og triclosan. NIVA rapport 4809-2004.
- Fournier M., Cyr D., Blakley B., Boermans H. och Brousseau P. (2000) Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics. *Amer. Zool.* 40, 412–420.
- Förlin, L., T. Andersson, m.fl. (1995). Biochemical and physiological effects in fish exposed to bleached kraft mill effluent. *Ecotoxicol. Environ. saf.* 30: 164-170.
- Geist, J., I. Werner, m.fl. (2007). Comparisons of tissue-specific transcription of stress response genes with whole animal endpoints of adverse effect in striped bass (*Morone saxatilis*) following treatment with copper and esfenvalerate. *Aquatic Toxicol.* 85(1): 28-39.
- Hagger J.A., Jones M.B., Leonard P., Owen R. och Galloway T.S. (2006) Biomarkers and integrated environmental risk assessment: are there more questions than answers? *Int. Environ. Ass. Man.* 2, 312–329.
- Haglund, P. and A. Marklund (2004). Organofosfater i svensk miljö. Ett screeninguppdrag från Naturvårdsverket. Umeå, UMeå universitet Miljökemi, Miljöövervakningsenheten Dnr 721-911-01Mm: 33.
- Haglund, P. and U. Olofsson (2005). Miljöövervakning av slam. Redovisning av resultat från 2004-2005 års provtagningar., Umeå universitet Naturvårdsverket Kntr. 21904143.
- Halling-Sørensen, B. Nors Nielsen, S., Lanzky P.F., Ingerslev, Holten H.C., Lutzhoft and Jörgensen, S.E. (1998) Occurrence, Fate and Effects of Pharmaceuticals in the Environment- A Review. *Chemosphere*, Vol.36 No.2 pp, 357-393, 1998.
- Hansson T., Lindesjö E., Förlin L., Balk L., Bignert A., Larsson Å. (2006a) Long-term monitoring of the health status of female perch in the Baltic Sea shows decreased gonad weight and increased hepatic EROD activity. *Aquat. Tox.* 79, 341-355.
- Hansson T., Schiedek D., Lehtonen K.K., Vuorinen P.J., Liewenborg B., m.fl. (2006b) Biochemical biomarkers in adult female perch (*Percu fluviatilis*) in a chronically polluted gradient in the Stockholm recipient (Sweden). *Mar. Poll. Bull.* 53 451–468.
- Harford A.J., O'Halloran K., och Wright P.F.A. (2007) Effect of in vitro and in vivo organotin exposures on the immune functions of murray cod (*Maccullochella peelii peelii*). *Environ. Tox. Chem.* 26, 1649–1656.
- Hellström A. and Kreuger J. (2005) Litteraturstudie av veterinärmedicinska produkter inför screeningen 2006. Rapport 2005:23. Institutionen för miljöanalys, SLU.
- Hellström, D., Jonsson, L., Sjöström, M., 2003, Bra små avlopp, slutrapport. Stockholm Vatten R nr 13-2003.
- Helmfrid, H., P. Jönsson, et al. (2006). Läkemedel i miljön. Läkemedelsflödet i Östergötaland och Jönköpings län samt stora sjöarna Vättern, Vänern och Mälaren., Yrkes- och miljömedicinska centrum rapport 2006:1.
- Hileman B. (1996). Environmental hormone disrupters focus of major research initiative. *C&EN* may 13: 28-35.

- Hinck J.E., Blazer V.S. m.fl. (2007) Chemical contaminants, health indicators, and reproductive biomarker responses in fish from the Colorado River and its tributaries. *Sci. Tot. Environ.* 378, 376-402.
- Hoff, P. T., Van de Vijver, K., Van Dongen, W., Esmans, E. L., Blust, R. and De Coen, W. M., 2003, Perfluorooctane sulfonic acid in bib (*Trisopterus luscus*) and plaice (*Pleuronectes platessa*) from the western scheldt and the belgian north sea: distribution and biochemical effects. *Environ. Toxicol. Chem.*, 22:3, 608–614
- Holmgren K. (2007) Fiskfaunans variation inom och mellan sjöar av olika karaktär. Fiskeriverket 2007:1.
- Hung, H., P. Blanchard, et al. (2004). "Spatial variations in the seasonality of organochlorine pesticides (OC) i artic air." *Organohalogen compounds* 66: 2169-2173.
- Hylland K. och Thain J.E. (2007) The status of biological effects methods in the context of integrated chemical and biological monitoring – a position paper. OSPAR working group on concentrations, trends and effects of substances in the marine environment (sime). Hamburg: 6-8 march 2007
- ICES (2004a) Report of the Working Group on Biological Effects of Contaminants (WGBEC) 22–26 March 2004, Ostend, Belgium
- ICES (2004b) Biological effects of contaminants: Measurement of lysosomal membrane stability. By M.N. Moore, D. Lowe, and A. Köhler. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences*, No. 36. 31 pp.
- ICES (2005a) Report of the working group on pathology and diseases of marine organisms (wgpdm). ICES WGPDMO Report 2005. ICES CM 2005/F:02
- ICES (2005b) Report of the ICES Advisory Committee on Fishery Management, Advisory Committee on the Marine Environment and Advisory Committee on Ecosystems, 2005. ICES ADVICE 2005.
- ICES (2007) Report of the ICES/OSPAR Workshop on Integrated Monitoring of Contaminants and their Effects in Coastal and Opensea Areas (WKIMON III). ICES/OSPAR WKIMON III Report 2007, 16–18 January 2007. ICES Advisory Committee on Marine Environment. ICES CM 2007/ACME:01.
- Jobling S., Nolan M., Tyler C.R., Brighty G. och Sumpter J.P. (1998) Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ. Sci. Technol.* 32, 2498-2506.
- Kaj, L. and B. Dusan (2004). Screening av organiska miljögifter i fisk - HCBd och klorbensener., IVL Swedish Environmental Research Institute, Report B 1557.
- Kaj, L., J. Andersson, m.fl. (2005). Results from the Swedish National Screening programme 2004. Subreport 4: Siloxanes., IVL Swedish Environmental Research Institute, Report B 1643.
- Kaj, L., Y. Ekheden, m.fl. (2007). Screening 2004 - uppföljningsprojekt. Analys av oktaklorstyren, flyktiga metylsiloxaner, vissa fenoler och endosulfan., IVL Swedish Environmental Research Institute, Report B 1745.
- Kallerborn, R., U. Berger, m.fl. (2004). Perfluorinated alkylated substances (PFAS) in the nordic environment., <http://www.sft.no/miljoreferanse/37635.aspx>.
- Leadly, T. A., L. D. Arcand-Hoy, et al. (1999). "Fluorescent aromatic hydrocarbons in bile as a biomarker of exposure of brown bullheads (*Meiurus nebulosus*) to contaminated sediments." *Environ. Toxicol. Chem.* 18(4): 750-755.

- Kidd, K., P. J. Blanchfield, K. H. Mills, V. Palace, R. E. Evans, M. Lazorchak and R. W. Flick (2007). Collapse of fish population after exposure to a synthetic estrogen. PNAS www.pnas.org/misc/reprints.shtml.
- Kierkegaard, A., L. Balk, m.fl. (1999). Dietary uptake and biological effects of decabromodiphenyl ether in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environ. Sci. Technol. 33(10): 1612-1617.
- Kolpin, Dana W., Furlong Edward T., Meyer Michael T., Thurman Michael E., Zaugg Steven D., Barber Larry B. Buxton Herbert T. (2002) Pharmaceuticals, Hormones and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. Environmental Sci. Technol. 2002, 36, 1202-1211.
- Lattier, D. L., D. A. Gordon, m.fl. (2001). Vitellogenin gene transcripts: A relative quantitative exposure indicator of environmental estrogens. Environ. toxicol. chem. 20(9): 1979-1985.
- Lindberg, R. H., P. Wennberg, et al. (2005). "Screening of human antibiotic substances and determination of weekly mass flow in five sewage treatment plants in Sweden." Environ. Sci. Technol. 39(10): 3421-3429.
- Lindström, A., P. T. Buerge I.J., et al. (2002). "Occurrence and environmental behavior of the bactericide triclosan and its methyl derivative in surface waters and waste water." Environ. Sci. Technol. 36(11): 2322-2329.
- Ledin A., Eriksson E. m.fl. (2005) CHIAT – Chemical Hazard Identification and Assessment Tool. En metodik för utvärdering av kemiska risker i samband med hantering av dag- och avloppsvatten. VA-forsk 2005-9.
- Lehtonen, K. L., D. Schiedek, A. Köhler, T. Lang, P. J. Vuorinen, L. Förlin, J. Baršienė, J. Pempkowiak and J. Gercken (2006). The BEEP project in Baltic Sea: overview of results and outline for regional biological effects monitoring strategy. Mar. Poll. Bull. 53, 523-537.
- Lie O., Evensen O., Sörensen A. och Frøysadal E. (1989) Study on lysozyme activity in some fish species. Dis. Aquat. Org. 6, 1-5.
- Luebke R.W., Hodson P.V., Faisal M., Ross P.S., Grasman K.A. och Zelikoff J. (1997) Aquatic pollution-induced immunotoxicity in wildlife species. Fund. Appl. Tox. 37, 1-15.
- Luster M.I. och Rosenthal G.I. (1993) Chemical Agents and the immune response. Environ. Health Persp. 100, 219-236.
- Läkemedelsverket (2004). Miljöpåverkan från läkemedel samt kosmetika och hygieniska produkter. Rapport från Läkemedelsverket. Augusti Uppsala.
- Martyniuk, C. J., E. R. Gerrie, m.fl. (2007). Microarray analysis in the zebrafish (*Danio rerio*) liver and telencephalon after exposure to low concentration of 17 α -ethinylestradiol. Aquatic Toxicol. 84(1): 38-49.
- Maule A.G., Jørgensen E.H., Vijayan M.M. och Killie J.E. (2005) Aroclor 1254 exposure reduces disease resistance and innate immune responses in fasted arctic charr. Environ. Tox. Chem., 24, 117-124.
- Meucci, V. and Arukwe A. (2006). Transcriptional modulation of brain and hepatic estrogen receptor and P450arom isotypes in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) after waterborne exposure to the xenoestrogen, 4-nonylphenol. Aquatic Toxicol. 77(2): 167-177.
- Morgensen, B.-B., G. Pritzl, m.fl. (2004). Musk compounds in the nordic environment., TemaNord 2004:503.

- Morris, S., Allchin C. R., m.fl. (2004). Distribution and Fate of HBCD and TBBPA Brominated Flame Retardants in North Sea Estuaries and Aquatic Food Webs. *Environ. Sci. Technol.* 38, 5497-5504.
- Naturvårdsverket (2006) Hälsotillstånd hos kustfisk - biologiska effekter på subcellulär och cellulär nivå. Handbok för Miljöövervakning, programområde Kust och Hav. Version 1:1, 2006-02-10.
- Naturvårdsverket (2007) Kust och hav – revision av nationell miljöövervakning 2006. Rapport 5718.
- Noaksson, E., M. Linderöth, m.fl. (2005). Toxicological effects and reproductive impairments in female perch (*Perca fluviatilis*) exposed to leachate from Swedish refuse dumps. *Aquatic Toxicol.* 75(2): 162-177.
- Oakes K.D., Sibley P., K., Martin, J. W., MacLean, D. D., Solomon, K. R., Mabury, S. A., Van Der Kraak, G. J., (2005), Short-term exposures of fish to perfluorooctane sulfonate: Acute effects on fatty acyl-coa oxidase activity, oxidative stress, and circulating sex steroids. *Environ Tox and Chem* 24:5, 1172-1181.
- OSPAR (1997) JAMP Guidelines for General Biological Effects Monitoring (OSPAR Agreement 1997-7). OSPAR Convention for the protection of the marine environment of the north-east atlantic.
- OSPAR (2003) JAMP guidelines for contaminant specific biological effects monitoring. OSPAR Convention for the protection of the marine environment of the north-east atlantic.
- OSPAR (2005) Assessment of data collected under the Co-ordinated Environmental Monitoring Programme (CEMP). OSPAR Convention for the protection of the marine environment of the north-east atlantic.
- OSPAR (2007) Working group on concentrations, trends and effects of substances in the marine environment (SIME). OSPAR Convention for the protection of the marine environment of the north-east atlantic.
- Palace, V., R. E. Evans, K. Wautier, C. L. Baron, L. Vandenbyllardr, W. Vanersteen and K. Kidd (2002). Induction of vitellogenin and histological effects in wild Fathead Minnows from a lake experimentally treated with the synthetic estrogen, ethinylestradiol. *Water Qual. res. J. Canada.* 37(3): 637-650.
- Palm Cousins, A., M. Remberger, m.fl. (2005). Results from the Swedish national screening programme 2004., IVL Swedish Environmental Research Institute, Report B 1641.
- Palm, A., J. Sternbeck, m.fl. (2002). Screening av pentaklorfenol (PCP) i miljön, IVL Swedish Environmental Researc Institute, Rapport B 1474.
- Palm-Cousins, A., M. Remberger, m.fl. (2007). Results from the Swedish national screening program 2006. Subreport 1: Phthalates. Stockholm, IVL Swedish Environmental Research Institute, Report B1750.
- Park, B. J. and K. Kidd (2005). Effects of the synthetic estrogen ethinylestradiol on early life stage of mink frogs and green frogs in the wild and in situ. *Environ. Toxicol. Chem.* 24(8): 2027-2036.
- Parkinson A. (1996) Biotransformation of xenobiotics. kapitel 6 i Casarett & Doull's *Toxicology* 5th ed.
- Parkman, H. and M. Remberger (1994). Phtalates in Swedish Sediment. Stockholm, IVL Swedish Environmental Reseach Institute, Report B 1167.

- Petrivalsky M., Machala M., Nezveda K., Piačka V., Svobodova Z. och Drábek P. (1997) Glutathione-dependent detoxifying enzymes in rainbow trout liver: search for specific biochemical markers of chemical stress. *Environ. Tox. Chem.*, 16, 1417-1421.
- Pinkney, A.E. m.fl. (2003). Tumor prevalence and biomarkers of exposure and response in Brown Bullhead (*Ameiurus nebulosus*) from the Anacostia River Washington, DC and Tuckahoe River, Maryland, USA. *Environ. toxicol chem.* 23(3): 638-647.
- Poynton, H. C., J. R. Varshavsky, m.fl. (2007). *Daphnia magna* Ecotoxicogenomics Provides Mechanistic Insights into Metal Toxicity. *Environ. Sci. Technol.* 41(3): 1044-1050.
- Quirós, L., D. Raldúa, m.fl. (2007). A noninvasive test of exposition to toxicants: quantitative analysis of cytochrom P4501A expression in fish scales. *Environ. Toxicol. Chem.* 26(10): 2179-2186.
- Remberger, M., A. Woldegiorgis, m.fl. (2006). Subreport 2. Biocides. Stockholm, IVL Swedish Environmental Research Institute, Rapport B1700.
- Remberger, M., J. Andersson, m.fl. (2005). Results from the National screening programme 2004. Subreport 1: Adipates. Stockholm, IVL Swedish Environmental Research Institute, Report B1645.
- Remberger, M., J. Sternbeck, m.fl. (2004a). The environmental occurrence of hexabromocyclododecane in Sweden, *Chemosphere* 54(1): 9-21.
- Remberger, M., L. Kaj, m.fl. (2004b). Screening tertiary butylphenols, methylphenols, and long-chain alkylphenols in the Swedish environment, IVL Swedish Environmental Research Institute, Report B1594.
- Reynaud S. och Deschaux P. (2006) The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: a review. *Aquat Toxicol.* 77, 229-38.
- Ronisz D., Lindesjö E., Larsson Å., Bignert A., och Förlin L. (2005) Thirteen years of monitoring selected biomarkers in Eelpout (*Zoarces viviparus*) at reference site in the Fjällbacka Archipelago on the Swedish West Coast. *Aquatic Eco. Health & Man.* 8, 175–184.
- Samuelsson, L. M., L. Förlin, m.fl. (2006). Using NMR metabolomics to identify responses of an environmental estrogen in blood plasma of fish. *Aquatic Toxicol.* 78(4): 341-349.
- Sandström, O., Å. Larsson, J. Andersson, M. Appelberg, A. Bignert, H. Ek, L. Förlin and M. Olsson (2005). Three decades of Swedish experience demonstrates the need for integrated long-term monitoring of fish in marine coastal areas. *Water Qual. Res. J.* 40(3): 233-250.
- Schmitt CJ, Hinck JE, Blazer VS, Denslow ND, Dethloff GM, Bartish TM (2005) Environmental contaminants and biomarker responses in fish from the Rio Grande and its U.S. tributaries: spatial and temporal trends. *Sci Total Environ* 35;:161–93.
- Schmitt, C. J. (2002) Biomonitoring of environmental status and trends (BEST) Program: Environmental contaminants and their effects on fish in the Mississippi River basin. Biological Science Report, USGS/BRD/BSR—2002-0004, June 2002.
- Schmitt, C. J. and G. M. Dethloff. editors. (2000) Biomonitoring of Environmental Status and Trends (BEST) Program: selected methods for monitoring chemical contaminants and their effects in aquatic ecosystems. U.S. Geological Survey, Biological Resources Division, Columbia, (MO): Information and Technology Report USGS/BRD-2000--0005. 81 pp.
- Skouras A., Broeg K., Dizer H., von Westernhagen H., Hansen P.-D. och Steinhagen D. (2003a) The use of innate immune responses as biomarkers in a programme of integrated biological

- effects monitoring on flounder (*Platichthys flesus*) from the southern North Sea. Helgoland Mar. Res. 57, 190-198.
- Skouras A., Lang T., Vobach M. .m.fl. (2003b) Assesment of some innate immune responses in dab (*Limanda limanda*) from the north sea as part of an integrated biological effects monitoring. Helgoland Mar.Res. 57, 181-189.
- Soimasuo, R., Ilmari Jokinen, m.fl. (1995). Biomarker responses along a pollution gradient: Effects of pulp and paper mill effluents on caged whitefish. Aquatic Toxicol. 31(4): 357-358.
- Staples, C. A., Adam W.J., m.fl. (1997). Aquatic Toxicity of Eighteen Phthalate Esters. Environ. Toxicol. Chem. 15: 875-981.
- Sternbeck J. (2000) Upptredande och effekter av koppar i vatten och mark. IVL B1349.
- Sternbeck J. (2007) Bisphenol A in fish – results of a screening study. WSP report 10060856.
- Sternbeck, J. and Persson J. (2005). Utvärdering av kriterier för tidsövervakning av miljögifter. , WSP uppdrag 10063994.
- Sternbeck, J., Brorström-Lundén E., m.fl. (2003). WFD Priority substances in sediments from Stockholm and the Swedish coastal region. Stockholm, IVL Swedish environmental research institute, Report B 1538: 82.
- Sternbeck, J., Fäldt J., m.fl. (2006). Screening of organotin compounds in the Swedish environment. WSP uppdrag 100608570.
- Sturve J., Berglund Å., Balk L., Broeg K. m.fl. (2005) Effects of dredging in Göteborg harbor, Sweden, assessed by biomarkers in eelpout (*Zoarces viviparus*). Environ. Tox. Chem. 24, 1951–1961.
- Sundin, P., J. Kreuger, m.fl. (2002). Undersökningar av bekämpningsmedel i sediment i jordbruksbackar år 2002., Sveriges Lantbruksuniversitet: 14.
- Swartz, C. H., S. Reddy, et al. (2006). "Steroid Estrogens, Nonylphenol Ethoxylate Metabolites, and Other Wastewater Contaminants in Groundwater Affected by a Residential Septic System on Cape Cod, MA." Environ. Sci. Technol. 40(16): 4894-4902.
- SWECO (2007). Nationwide screening of WFD priority substances. , SWECO Report 2007:1.
- Tesfalidet S. (2003) Screening of organotin compounds in the Swedish marine environment. Analytical Chemistry, Umeå University. April 2003.
- Thibaut, R., S. Schnell, m.fl. (2006). The Interference of Pharmaceuticals with Endogenous and Xenobiotic Metabolizing Enzymes in Carp Liver: An In-Vitro Study. Environ. Sci. Technol. 40(16): 5154-5160.
- Van der Oost R., Beyer J., Vermeulen N. P.E. (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ Tox Pharma 13: 57-149.
- van der Ven, K., D. Keil, m.fl. (2006). Effects of the antidepressant mianserin in zebrafish: molecular markers of endocrine disruption. Chemosphere 65: 1836-1845.
- Van Veld, P. A., Rutan B. J., m.fl. (2005). A universal assay for vitellogenin in fish mucosa and plasma. Environ. toxicol. chem. 24(12): 3048–3052
- Vine, E., J. Shears, van Aerle, R., Tyler, C. R., Sumpter, J. P., (2005). "Endocrine (sexual) disruption is not a prominent feature in the pike (*Esox lucius*), a top predator, living in english waters." Environ. Toxicol. Chem. 24(6): 1436-1443.

- Walker C.H., Hopkin S.P., Sibly R.M: och Peakall D.B. (2006) Principles of ecotoxicology. 3rd ed. Taylor and Francis.
- Werner, I., V. Palace, K. G. Wautier, K. H. Mills, S. M. Chalanchuk and K. Kidd (2006). Reproductive fitness of lake trout (*Salvelinus namaycush*) exposed to environmentally relevant concentrations of potent estrogen ethynylestradiol (EE2) in a whole lake exposure experiments. *Scienza Marina* 70S2(59-66).
- Weigel, S., V. Kuhlmann, et al. (2002). "Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: occurrence and distribution of clofibric acid, coffeine and DEET in the North Sea." *Sci. Tot. Environ.* 295(131-141).
- Winter, M. J., Frank Verweij E. G., Ceradini S., McKenzie D.J., Williams M.A., Taylor E.W., Butler P.J., van der Oost R. och Chipman J.K. (2005). Tissue levels and biomarkers of organic contaminants in feral and caged chub (*Leuciscus cephalus*) from rivers in the West Midlands, UK. *Aquatic Toxicol.* 73, 394-405.
- Wirgin, I.I, et al (1994). A biomarker approach to assessing xenobiotic exposure in Atlantic Tomcod from the North American Atlantic coast. *Environ. Health Perspect.* 102:764-770.
- Woldegiorgis, A., Andersson J., m.fl. (2006). Results from the Swedish national screening programme 2005. Subreport 3: Perfluorinated alkylated substances (PFAS). IVL Swedish Environmental Research Institute, Report B 1698.
- Woldegiorgis, A. Green, J., Remberger, M., Kaj, L., Brorstöm-Lundén, E., IVL, Dye, C., Schlabach, M., NILU, 2007, Results from the Swedish screening 2006 Sub report 4: Pharmaceuticals IVL Swedish Environmental Research Institute, Report B1751.
- WSP (2004). Bisfenol i den Svenska miljön, WSP.
- Wu R.S.S., Siu W.H.L. och Shin P.K.S. (2005) Induction, adaption and recovery of biological responses: implications for environmental monitoring. *Mar. Poll. Bull.* 51, 623-634.
- Yang Zegers, B. N., A. Mets, m.fl. (2005). Levels of Hexabromocyclododecane in Harbor Porpoises and Common Dolphins from Western European Seas, with Evidence for Stereoisomer-Specific Biotransformation by Cytochrome P450. *Environ. Sci. Technol.* 39, 2095-2100.
- Zelikoff J.T., Raymond A. m.fl. (2000) Biomarkers of immunotoxicity in fish: from the lab to the ocean. *Tox. Letters* 112-113, 325-331