



Aqua reports 2020:11

Algtoxiner i Östersjön

En syntes

Elin Dahlgren och Caroline Ek



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Department of Aquatic Resources

Algtoxiner i Östersjön

En syntes

Elin Dahlgren och Caroline Ek

Sveriges lantbruksuniversitet (SLU), Institutionen för akvatiska resurser,
Stångholmsvägen 2, 178 93 Drottningholm

september 2020

Aqua reports 2020:11
ISBN: 978-91-576-9787-5 (elektronisk version)

E-post till ansvarig författare:
elin.dahlgren@slu.se

Rapportens innehåll har granskats av:
Helena Strömberg, **Sveriges lantbruksuniversitet**, Institutionen för akvatiska resurser
Josefin Sundin, **Sveriges lantbruksuniversitet**, Institutionen för akvatiska resurser

Vid citering uppge:
Dahlgren, E., Ek, C. (2020). Algtoxiner i Östersjön. Aqua reports 2020:11. Institutionen för akvatiska resurser, **Sveriges lantbruksuniversitet**, Drottningholm Lysekil Öregrund. 56 s.

Nyckelord:
Algtoxiner, fiskhälsa, miljöfarliga ämnen

Rapporten kan laddas ned från:
<http://pub.epsilon.slu.se/>

Finansiär:
Havs- och vattenmyndigheten, Dnr 783-20 (SLU-ID: SLU.aqua.2020.4.1-63)

Rapporten har tagits fram på uppdrag av Havs- och vattenmyndigheten. Rapportförfattarna ansvarar för innehållet och slutsatserna i rapporten. Rapportens innehåll innebär inte något ställningstagande från Havs- och vattenmyndighetens sida.

Chefredaktör:
Noél Holmgren, prefekt, institutionen för akvatiska resurser, Lysekil

Framsida: Algblomning i Nämndöskärgården. Foto: Elin Dahlgren

Sammanfattning

Ett flertal fiskarter i Östersjön uppvisar idag en ökande hälsoproblematik. Huruvida exponering för naturligt producerade, toxiska substanser från alger och bakterier är kopplad till försämrad fiskhälsa är oklart. Denna syntes har som syfte att verka som en översikt av algtoxiner som kan vara av särskilt intresse för påverkan på hälsa hos fisk i Östersjön. Vidare undersöks eventuella kopplingar mellan data från den nationella miljöövervakningen som kan indikera förekomst och utbredning av algtoxiner samt eventuell påverkan på fiskhälsa.

I Östersjön är det framförallt fintrådiga alger och cyanobakterier som producerar toxiska substanser vilkas förekomst dokumenterats i fisk och exponering kan förväntas leda till allvarliga effekter. De grupper av toxin som inkluderas i denna syntes är halogenerade organiska föreningar, cyanotoxiner, ichthyotoxin, okadasyra och saxitoxin.

Tillgång på data gällande algtoxiner, insamlat inom den nationella miljöövervakningen, är generellt sett låg. Befintliga tidsserier saknar kontinuitet. Forskningsmässigt är däremot kunskapsläget högre vilket medger goda möjligheter till att identifiera kunskapsluckor och behov inom miljöövervakningen. Brist på data begränsar dock möjligheten att genomföra analyser av tidsserier för att etablera eventuella samband mellan fiskhälsovariabler och halter av algtoxiner eller förekomst/produktion av sådana. Trots detta identifieras i denna syntes en samvariation mellan halter av bromerade algtoxin OH-PBDE47/68 och fiskhälsovariabler som indikerar påverkan på fiskarnas kondition och immunförsvar.

Säsongsvariation gällande förekomst och intensitet av algtoxiner är en försvårande omständighet som påverkar möjligheterna till att använda biologiskt material som samlas inom ramen för löpande nationell miljögiftsövervakning.

För retrospektiva analyser av algtoxiner har abborre från Kvädöfjäden insamlade inom den integrerade kustfiskövervakningen identifierats som en lämplig matris. Eftersom dessa fiskar analyseras för hälsoparametrar finns goda förutsättningar för individuella analyser av algtoxiner. Abborre är dessutom särskilt lämplig för analys av algtoxiner eftersom den exponeras för substanser från kustlevande fintrådiga alger såväl som cyanobakterier och andra mikroalger. Strömning är på grund av sitt pelagiala levnadssätt med begränsad exponering i kombination med sen insamlingsperiod inom miljöövervakningen, ej en lämplig matris för undersökning av exponering och effekter av de algtoxiner som inkluderats i denna undersökning.

Summary

In the Baltic Sea, several fish species display signs of deteriorating health. In this report, algal toxins of special interest to fish health in the Baltic Sea area are compiled. Data from the national monitoring programs of fish health along with parameters reflecting possible exposure to algal toxins are examined. The overall aim is to evaluate if biological samples from previous sampling can be used for the study of potential associations between algal toxins and fish health.

Generally, data on algal toxins within the national monitoring programs are scarce and lack continuity. Seasonal variations regarding occurrence and intensity of the emissions of algal toxins hamper the potential use of biological material collected within national monitoring programs for analyses of algal toxins. Despite this, fish biomarkers indicating alterations in condition and the immune defense system, demonstrate significant associations with brominated compounds, OH-PBDE47/68. For future retrospective analysis of algal toxins, perch collected from Kvädöfjärden was identified as a suitable matrix

Innehåll

1. Bakgrund och uppdragsbeskrivning.....	6
1.1. Uppdrag	6
2. Kunskapssammanställning, algtoxiner i Östersjön.....	8
2.1. Mer vanligt förekommande grupper av algtoxiner i Östersjön.....	11
2.1.1. Halogenerade organiska föreningar	12
2.1.2. Cyanotoxiner	17
2.1.3. Ichthyotoxin	19
2.1.4. Musselförgiftande alger	20
2.2. Produktion av algtoxiner	22
2.2.1. Oxidativ stress	22
2.2.2. Oxidativ fosforylering	24
2.2.3. Spatiotemporal variation	25
2.2.4. Algtoxiner och hälsoeffekter hos Östersjöns biota	25
3. Tidstrendanalyser.....	27
3.1. Data för algtoxiner i Östersjön	27
3.1.1. Befintliga tidsserier.....	27
3.1.2. Kompletterande information från tidigare kemiska analyser.....	30
3.2. Utvärdering av fiskhälsodata och substanser i fisk	31
3.2.1. Metodbeskrivning och statistik.....	32
3.2.2. Ingående modelldata	33
3.2.3. Avgränsning	36
3.2.4. Resultat och diskussion	36
4. Material i miljöprovbank	43
5. Förslag till fortsatta undersökningar.....	45
Tack	46
Referenser.....	47

1. Bakgrund och uppdragsbeskrivning

Ett flertal fiskarter i Östersjön uppvisar idag en hälsoproblematik som är kopplad till avmagring samt påverkan på reproduktion och immunförsvar. Huruvida exponering för naturligt producerade, toxiska substanser från alger och bakterier är kopplad den försämrade fiskhälsan är oklart. Denna syntes har som övergripande syfte att verka som en översikt av algtoxiner som kan vara av särskilt intresse för påverkan på fisk i Östersjön. Vidare undersöks eventuella kopplingar mellan data från den nationella miljöövervakningen som kan indikera förekomst och utbredning av algtoxiner samt eventuell påverkan på fiskhälsa. Tillsammans med andra syntesrapporter med fokus på Östersjölaxens hälsa (Asker 2019) samt tiaminbrist i Östersjöområdet (under sammanställning, Hylander m.fl. 2020), har denna syntes som ambition att höja kunskapsläget gällande fiskhälsa i Östersjön och gynna ett ökat samarbete kring frågor som kopplar till detta. Resultat från syntesen kan användas som underlag för satsningar inom miljöövervakning, forskning och övrig datainsamling.

1.1. Uppdrag

Syntesen har som övergripande syfte att verka som en översikt för naturligt producerade toxiner som kan vara av intresse för de fiskhälsorelaterade problemen som observerats i Östersjön. Syntesen skall också undersöka eventuella kopplingar mellan dessa toxiner och tidsserier från den nationella miljöövervakningen av fiskhälsa.

Uppdraget har omfattat:

1. En kunskapssammanställning över algtoxiner, förekomst och biologiska effekter, avgränsad till Östersjön och dess organismer. Arter och substanser där det finns mer omfattande kunskap har prioriteras.
2. Att utreda om data som genererats inom, eller kopplat till, det nationella övervakningsprogrammet för miljögifter i marin biota, kan användas för att bedöma om algtoxiner ökat i koncentration över tid.

3. Att undersöka om material som finns lagrat i Miljöprovbanken vid Naturhistoriska riksmuseet kan användas för att svara på hur halterna i miljön sett ut de år som man observerat påverkan av algtoxiner på fiskhälsa.
4. En sammanställning över data som kopplar till algtoxiner, produktion, utbredning eller intensitet, som finns tillgänglig i nationella databaser (till exempel SMHI:s SHARK samt algrapportarkivet).
5. En enklare utvärdering av fiskhälsodata kopplat till variationer av algtoxiner över tid (befintliga tidsserier).

2. Kunskapssammanställning, algtoxiner i Östersjön

Östersjön tillförs miljöfarliga ämnen med antropogent ursprung via avrinningsområden, marina aktiviteter och luftburet nedfall. Miljön exponeras även för substanser som produceras naturligt av akvatiska organismer, så som alger och cyanobakterier, dinoflagellater, marina svampar med flera. Trots de senaste årens minskade mängder av tillfört kväve och fosfor, lider nästan hela Östersjön fortfarande av övergödning, och till följd av detta syrefattiga botten (Elmgren m. fl. 2015, HELCOM 2018). Flera studier visar på en utbredd förekomst av naturligt producerade toxiner från arter som gynnas av övergödningen i Östersjön, som cyanobakterier (blågröna alger) och fintrådiga alger (Hallfors m. fl. 1984, Kahru m. fl. 1994).

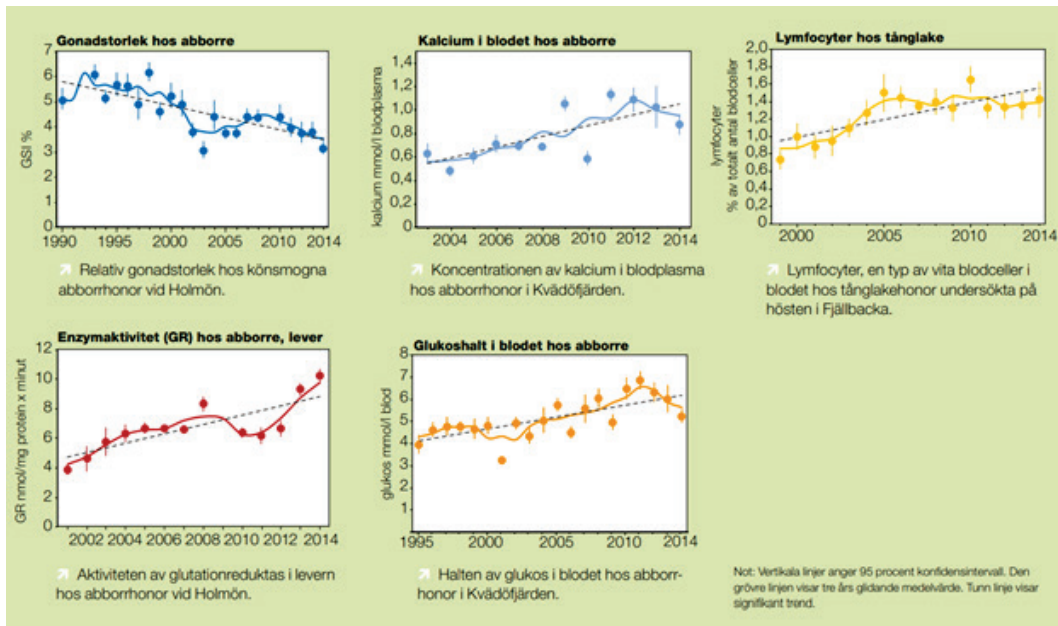
Kunskapsläget gällande förekomst och effekter av naturligt producerade toxiner i Östersjön är generellt sett lågt. Dokumenterade studier domineras av toxiska substanser från framförallt alger och cyanobakterier där halter och effekter på fisk har undersökts. I denna syntes används därför begreppet ”algtoxiner” istället för en bredare term som ”naturligt producerade miljöfarliga ämnen” eller biotoxiner.

Att toxiner från alger i Östersjön kan orsaka förgiftningssituationer som involverar döda boskapsdjur, hundar, fisk och sjöfågel har rapporterats sedan årtionden (för en sammanställning, se Karjalainen m. fl. (2005)). Det som rapporterats mest är effekter från exponering av toxiner från cyanobakterier, där en utbredd påverkan på den marina miljön ofta dokumenterats med kausala samband. Förutom sådana påtagliga negativa effekter kan förekomst och exponering för algtoxiner spela en viktig roll för hälsan hos Östersjöns djurliv.

Ett flertal studier visar på en koppling mellan reproduktionsframgång hos fisk och exponering för algtoxiner. I Stockholms skärgård har dödlighet hos strömmingsägg kopplats till utsöndringar från fintrådiga brunalger i samband med lekperioden (Aneer 1987). Påverkan av epifytiska brunalger på överlevnad hos strömmingsägg har undersökts genom att studera skillnader i utveckling av ägg på algsubstrat jämfört med kontroll. En signifikant högre dödlighet observerades hos de ägg som utvecklades på fintrådiga brunalgen, *Pilayella littoralis* jämfört med de som utvecklades på fintrådiga grönalgen, *Ulva intestinalis* (von Nordheim m. fl. 2020).

År 1999 kopplades en plötslig spiggdöd (*Gasterosteus sp.*) i Finska viken till en kraftig blomning av cyanobakterien *Nodularia spumigena* där höga halter av nodularin i spigg (*Gasterosteus sp.*) uppmättes, 35-170 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Kankaanpää m. fl. 2001). Plötslig fiskdöd i sydvästra Finland 1979 observerades i samband med blomning av dinoflagellaten, *Gonyaulax excavata* (White 1980).

Inom det nationella miljöövervakningsprogrammet, Integrerad kustfiskövervakning, uppvisar flera hälsomarkörer hos abborre (*Perca fluviatilis*) och tånglake (*Zoarces viviparus*) en gradvis försämring (Figur 1, Mustamäki m. fl. (2019)). Övervakningen inkluderar drygt 20 så kallade biomarkörer som beskriver exponering av miljögifter och effekter av miljögifter eller annan stress. I Östersjön ingår lokaler i södra egentliga Östersjön (Torhamn), norra egentliga Östersjön (Kväddfjärden) och Bottenviken (Holmön). För samtliga lokaler visar tidsserier över biomarkörer (2002-2014) på en långvarig förändring och tydlig påverkan på fiskarnas hälsa. Tecken på oxidativ stress, inducerat avgiftningssystem, påverkan på immunförsvaret och ämnesomsättning, är några av de biomarkörer som sticker ut. En nyligen genomförd studie av genuttryck hos abborre som samlats inom ramen för miljöövervakning har visat på en koppling mellan genuttryck som funktion av immunförsvaret och oxidativ stress, till exponering för naturligt producerade bromerade indoler och carbazoler (Hanson m. fl. 2020).



Figur 1. Biomarkörer, som speglar fysiologiska funktioner, har använts sedan 1988 inom kustfiskövervakningen för att spåra förekomst och hälsoeffekter av giftiga ämnen i miljön. Undersökningarna, som görs på abborre och tånglake i utvalda referensområden, ger en tidig signal om miljöpåverkan innan effekter syns på populationsnivå. Figurer hämtade från Larsson m. fl. (2016).

En koppling mellan försämrad fiskhälsa och naturligt producerade substanser har även påvisats för skrubbskädda (*Platichthys flesus*) insamlad från Hanöbukten. Under de senaste åren har rapporter om problem hos kustlevande fisk, sjöfågel samt förekomsten av brunt illaluktande vatten uppmärksammats i Hanöbukten. Undersökningar av miljön i Hanöbukten visar på förekomst av episodiska förändringar av fiskens hälsotillstånd indikerat av, påverkan på kolhydratmetabolism, syretransport och blodbildning samt påverkan på immunförsvaret (Olsson m. fl. 2018). I en uppföljande undersökning av skrubbskädda insamlad från västra Hanöbukten under 2018, kunde effektmarkörer för fiskhälsa relateras till halter av bromerade fenolära substanser samt deras metylerade analoger (anisoler). Dessa substanser samvarierade med flera hälsomarkörer kopplade till leverfunktion och avgiftning, påverkan på immunförsvaret, blodstatus, reproduktion och jonbalans. Även halter av nodularin samvarierade med antalet lymfocyter vilket indikerar en påverkan på immunförsvaret. (Dahlgren m. fl. 2019).

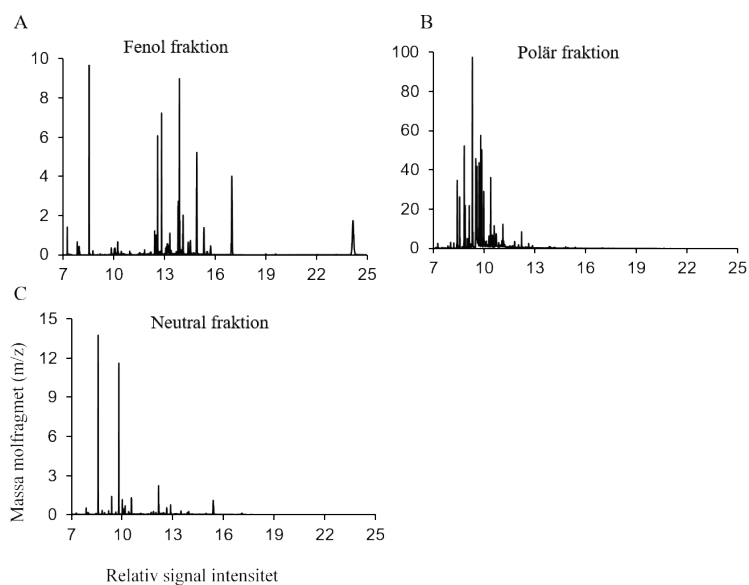
Havsvandrande Östersjö lax är ytterligare en art där en försämrad hälsostatus uppmärksammats de senaste åren. År 2019 skrevs en rapport med fokus att sammanställa kunskapsläget gällande laxdödlighet och relaterade parametrar (Asker 2019). Utgångspunkten var att jämföra ett antal tidslinjer med varandra för att visa på eventuella samband mellan laxdödlighet och andra parametrar samt hitta eventuella geografiska och/eller periodiska mönster. Slutsatsen var att situationen för laxen i Östersjön är mycket allvarlig, och att orsakerna förmodligen är multifaktoriella kopplade till övergödning, flödet av tiamin och astaxanthin genom näringsväven, miljögifter, födotillgång, parasiter för att nämna några. Ett stort antal halogenerade fenolära ämnen (brominerade och/eller klorinerade), däribland OH-PBDEs och MeO-PBDEs med naturligt ursprung har dokumenterats hos lax (Asplund m. fl. 1997, Marsh m. fl. 2004), men några omfattande studier av samband med laxhälsoproblematiken genomfördes inte.

Bestånd av torsk (*Gadus morhua*) i Östersjön uppvisar dålig status och utvecklingen påverkas av en rad faktorer, så som fiske, syrebrist, klimatförändringar, predatorer, parasiter, bottenpåverkan av trålning, förlust av uppväxtmiljöer, födobrist, tiaminbrist och giftiga ämnen (Bryhn m. fl. 2020). De enstaka studier som undersökt halter av algtoxiner i torsk visar på förhöjda halter av bromfenoler (e.g. 6-OHBDE 47, Roszko m. fl. (2015)) samt relativt låga halter av nodularin (Sipiä m. fl. 2001).

2.1. Mer vanligt förekommande grupper av algtoxiner i Östersjön

De flesta substanser som produceras naturligt av alger, cyanobakterier, växtplankton, marina svampar med flera kan anses som ofarliga. Vissa kan dock vara skadliga vid exponering, samt ha en toxisk påverkan på människor och djur. Halter av algtoxiner i den akvatiska födoväven styrs av ett flertal faktorer, så som artförekomst, tidpunkt och intensitet av skadliga algbloomningar, faktorer som styr slutdestination samt inlagring/frisättning av toxinerna (exempelvis sedimentation, nedbrytning och bortspolning). Födovävar kan vara mer eller mindre exponerade för algtoxiner beroende på om de exponeras direkt eller indirekt via vattenmiljön, i nära anslutning till producenter eller från större avstånd.

Alger och bakterier har förmågan att syntetisera ett stort antal substanser av vilka endast ett fåtal är identifierade i dagsläget. För än färre substanser finns kunskap om deras ekotoxikologiska verkan. Substanser som förekommer i blandningar/kombinationer kan samverka med varandra och möjliga biologiska effekter vid exponering kan vara mycket svåra att förutse. I den fintrådiga rödalgen, *Ceramium tenuicorne* insamlad sommartid i Östersjön kan man, beroende på analysmetod och fraktionering, identifiera ett flertal bromerade substanser i olika fraktioner där ämnena i den de vattenlösliga substanserna (polär fraktion) förekommer i högre halter (Figur 2).



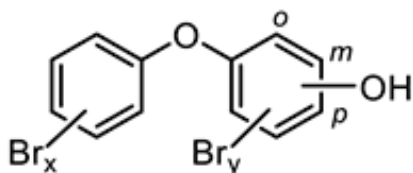
Figur 2. Kromatogram från GC masspektrometer visar dekreterade bromidjoner. Beroende på analysmetod och fraktionering av bromerade substanser kan flera ämnesgrupper detekteras från utsöndringar av *Ceramium tenuicorne* insamlad sommartid i Östersjön. A) fenol fraktion, B) vattenlösliga substanser, polär fraktion, C) neutral fraktion. (Kromatogram inkluderas som bidrag från Dennis Lindqvist, icke tidigare publicerat).

Traditionellt delas naturligt producerade toxiner upp i grupper utifrån toxisk verkan, som exempel hepatoxiner (gifter från cyanobakterier som påverkar levern) eller musselförgiftande alger som kan orsaka magsjuka hos människor. En sådan uppdelning fungerar sämre för substanser vars struktur och ekotoxikologiska verkan liknar klassiska miljögifter som bromerade flamskyddsmedel och dioxiner. I den här syntesen har vi valt att presentera grupper av algtoxiner efter kemisk struktur (halogenerade bromerade föreningar, cyanotoxiner och Ichthyotoxin) tillsammans med den större gruppen musselförgiftande alger, där toxisk verkan styr gruppindelningen (Tabell 1).

2.1.1. Halogenerade organiska föreningar

Förmågan hos marina organismer att producera organiska, halogenerade föreningar har varit känd i över 40 år. Arter med denna egenskap har identifierats inom marina bakterier (*Schizophyta*), blågröna alger (*Cyanophyta*), grönalger (*Chlorophyta*), rödalger (*Rhodophyta*), brunalger (*Phaeophyceae*) samt flera klasser av marina evertebrater som svampar (*Porifera*), mollusker (*Mollusca*), nässeldjur (*Cnidaria*) och maskar (*Annelida*). Halogenider (till exempel klorid, jodid och bromid) finns tillgängligt i havsvatten. Bortsett från jodderivat av tyrosin, är de flesta halogenerade substanser i alger brom- och klorföreningar av olika slag och kan utgöra upp till 9 % av torrsubstansen i en alg. Flera tusentals halogenerade organiska föreningar har isolerats, de flesta inom divisionen rödalger, *Rhodophyta*.

Hydroxylerade polybromerade difenyletrar (OH-PBDE), kan bildas som metaboliter från industriella utsläpp av polybromerade difenyletrar (PBDE), men produceras även naturligt av marina organismer. Beroende på placeringen av hydroxylgruppen, kan man generellt skilja mellan naturligt och antropogent bildade OH-PBDEs (Löfstrand 2011). OH-PBDEs består av två fenylingar sammanbundna av en eterbrygga med en hydroxylgrupp i *ortho*, *meta*, eller *para* position och en till nio bromsubstituenten (Figur 3).



Figur 3. Generell struktur för bromfenoler och OH-PBDEs. Figur hämtad från Lindqvist avhandling 2016.

Tabell 1. Grupperat efter kemisk struktur (halogenerade bromerade föreningar, cyanotoxiner och Ichthyotoxin) samt gruppen musselförgiftande alger där toxisk verkan styr gruppindelning.

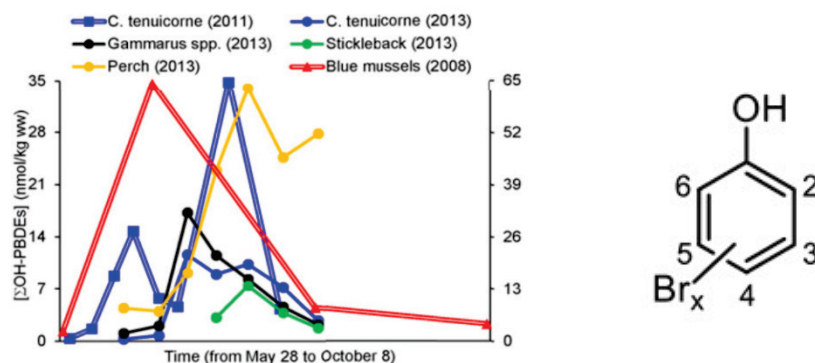
Grupp av toxin	Toxin	Ackumuleras i	Symptom
Halogenerade organiska föreningar	Polybromerade bromfenoler och OH-PBDEs	Hela födoväven	Hormonstörare, stör den oxidativa fosforyleringen, cytotoxisk-, genotoxisk- och neurotoxisk verkan, utvecklingsstörningar hos fiskyngel.
	Polybromerade dioxiner	Hela födoväven	Binder till Ah-receptorn och orsakar dioxinlika effekter. Mortalitet, avmagring, immunotoxicitet och fortplantningsstörningar samt inducering av enzymatisk aktivitet.
Cyanotoxiner	Mikrocystiner	Hela födoväven	Orsakar leverskador (hepatotoxin), celldöd (apoptos), stör forforylering av proteiner, cancerogen, utvecklingsstörningar hos fiskyngel.
	Nodulariner	Hela födoväven	Orsakar leverskador (hepatotoxin) samt neurotoxiskt
	β -methylamino-L-alanin (BMAA)	Hela födoväven	Neurodegenerativa sjukdomar, beteendeförändringar och muskelkramper, hämmar enzymatisk aktivitet.
Ichthyotoxin	Ex. prymnesium	Fisk	Förstör röda blodkroppar (hemolysin) och kan via förändrad gälpermeabilitet påverka jonbalansen och inhibera respirationen hos fisk. Dödlig för fisk men inte människa.
Musselförgiftande alger	Okadasyra	Skaldjur och fisk	Diarrégifter, som okadasyra, orsaka apoptos, tumörbildning, cytotoxisk verkan. Kan påverka regleringen av glykogen syntes
	Saixotoxin	Skaldjur och fisk	Blockerar transport av nervimpulser och kan vara dödligt via andningssvikt.

OH-PBDEs har toxiska egenskaper som innefattar hormonstörande egenskaper (som tyroxin, vilket påverkar basalmetabolismen) (Meerts m. fl. 2001), störare av den oxidativa fosforyleringen (van Boxtel m. fl. 2008), samt cytotoxisk- (An m. fl. 2011), genotoxisk- (Ji m. fl. 2011) och neurotoxisk verkan (Dingemans m. fl. 2008). Vidare har kongenen 6-OH-PBDE47, rapporterats orsaka deformationer hos fisk (Usenko m. fl. 2012). Höga halter kan vara akuttoxiskt men även vid låga halter leder exponering till ett underskott av tillgänglig energi och avmagring (Legradi m. fl. 2014). I Östersjön uppvisar halter av bromfenoler OH-PBDEs stor säsongsvariation med halter som fluktuerar i blåmussla (*Mytilus edulis*) (Löfstrand m. fl. 2011) och *C. tenuicorne* med flera tiopotenser inom några få veckor under sommarsäsongen (Figur 4). De högsta halterna observeras i mitten av juli, vilket indikerar att produktionen är kopplad till utvecklingsstadier hos algen, eller påverkan av yttre miljöfaktorer (Dahlgren m. fl. 2015).

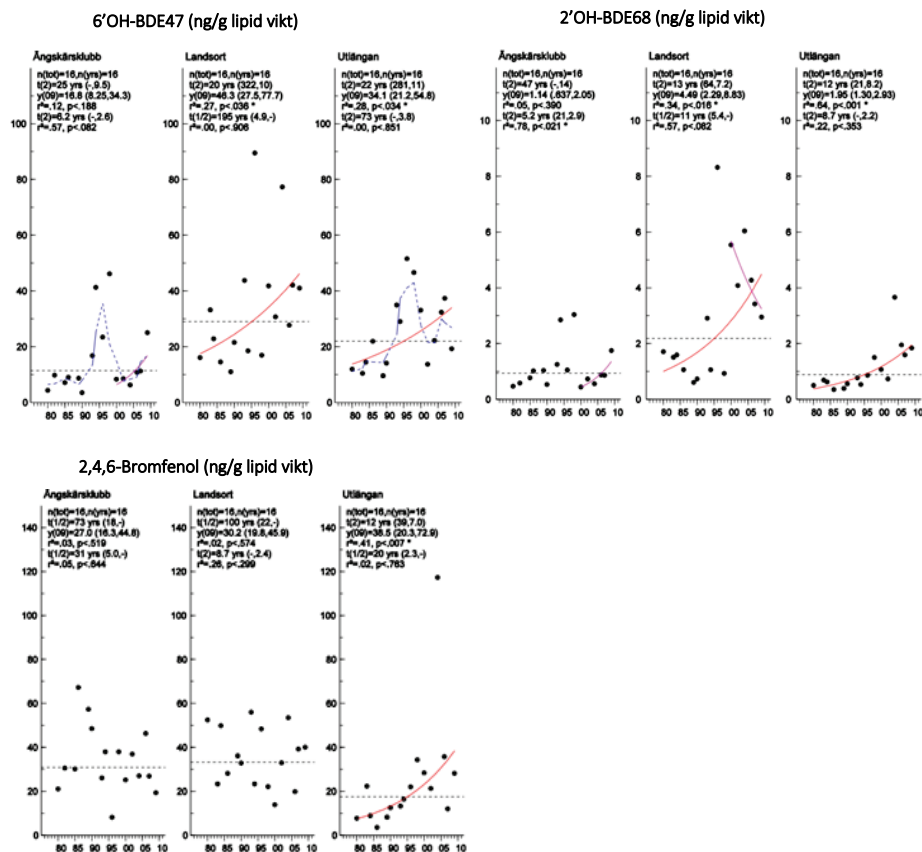
Polybromerade fenoler (BPs) kan ha ett antropogent såväl som naturligt ursprung (Gribble 2009). Ämnena har toxiska egenskaper som innefattar reproduktionsstörningar (Haldén m. fl. 2010) och missbildningar samt negativ påverkan på tillväxt och överlevnad (Deng m. fl. 2010). Generell struktur för polybromerade fenoler visas i Figur 4.

OH-PBDEs och BPs återfinns i alla delar av Östersjöns näringsväv, i cyanobakterier och alger (Malmvärn m. fl. 2005a, Malmvärn m. fl. 2005b, Malmvärn m. fl. 2008), kräftdjur (Dahlgren m. fl. 2016), musslor (Löfstrand m. fl. 2011), fisk (Löfstrand m. fl. 2011), sälar (Routti m. fl. 2009, Lindqvist och Asplund 2019) och fåglar (Nordlöf m. fl. 2012).

Retrospektiva tidstrender i strömning visar att halter av 2,4,6-bromofenol, 6-OH-PBDE47 och 2'-OH-PBDE68 har ökat mellan åren 1980 – 2009 vid Ängskärsklubb, Landsort och Utlängan (Figur 5, Faxneld m. fl. 2014).



Figur 4. T.v. Säsongsvariation av OH-PBDEs i blåmussla och en näringsväv från Stockholms skärgård, insamlat mellan 2008 och 2013. Halter anges som nmol/kg våtvikt. Figuren är hämtad från Lindqvist (2016). T. h. Generell struktur för polybromerade fenoler. Figur hämtad från Lindqvist avhandling 2016.



Figur 5. Retrospektiva tidstrender av a) 2,4,6-bromphenol, b) 6-OH-BDE47 och c) 2'-OH-BDE68 i strömning lever mellan åren 1980 – 2009 vid Ängskärsklubb, Landsort och Utlängan. Grafer hämtade från Faxneld m. fl. 2014.

Polybromerade dibenso-p-dioxiner och dibenso furaner (PBDD/Fs)

Polybromerade dibenso-p-dioxiner och polybromerade dibensofuraner (PBDD/Fs) har både antropogena och naturliga källor. Dessa substanser produceras bl.a. som en biprodukt vid tillverkningen och under förbränning av bromerade flamskyddsmedel varför man räknar atmosfärisk deposition som en viktig källa till Östersjön (World Health Organization 1998). Dock finns det även ett flertal studier som visar att det sannolikt finns en naturlig produktion i Östersjön också från bland annat cyanobakterier, alger och akvatiska svampar (t.ex. Malmvärn m. fl. 2008, Unger m. fl. 2009). Malmvärn m. fl. (2008) kunde påvisa att både insamlade cyanobakterier bestående av främst *Aphanizomenon flos-aquae* och rödalgen *Ceramium tenuicorne* innehöll lågbromerade dioxiner och furaner (tri- till pentaBDD/F). Att dessa prover dominerades av två triBDDs och hade avsaknad av flertal andra kongener som kan bildas vid förbränning av flamskyddsmedel tyder på att det finns en naturlig produktion av lågbromerade dioxiner i alger från Östersjön. Det primära kongenmönstret skiljer sig också då algerna innehöll främst triBDDs medan det är främst tetra-penta PBDDs som bildas vid förbränning av flamskyddsmedel (Buser 1986).

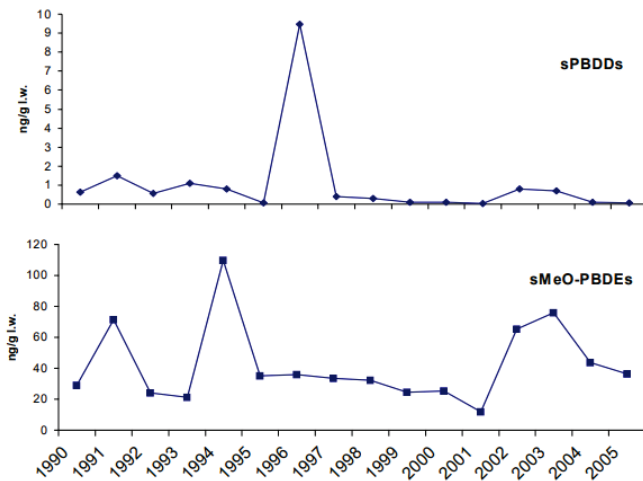
Den toxiska mekanismen för PBDD/Fs påminner om den för motsvarande polyklorerade dibenso-p-dioxiner (PCDD/Fs), och likt dessa binder även PBDD/Fs till Ah-receptorn (aryl hydrocarbon receptor) (Behnisch m. fl. 2003) med effekter så som mortalitet, avmagring, immunotoxicitet och fortplantningsstörningar samt inducering av enzymatisk aktivitet (Ethoxyresorufin-O-deethylase, EROD) (D'silva m. fl. 2004). Då både affiniteten (förmågan att koppla samman) till Ah receptorn och potentialen att inducera Ah hydroxylas kan variera mellan olika bromerade och klorerade kongener utan tydliga mönster (Birnbaum m. fl. 2003) skiljer sig toxiciteten åt beroende på den aktuella kongenen.

I jämförelse med sina klorerade motsvarigheter PCDD/Fs verkar dock inte PBDD/Fs vara lika persistenta. Dels förekommer sannolikt en viss mikrobiell debromering i organismer genom tarmflora (Haglund 2010), medan lågbromerade dioxiner med närliggande väten även kan metaboliseras genom cytokrom P450-enzymatiska system med fas I epoxidering och utsöndring via fas II metabolism (Klaassen 2001). I miljön förekommer sannolikt även mikrobiell nedbrytning i sediment och via fotolys (Haglund 2010).

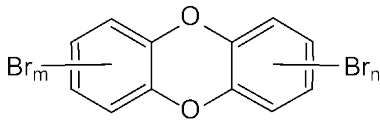
I en studie av Haglund m. fl. (2010) där PBDDs analyserats i abborre insamlad i egentliga Östersjön mellan 1990 till 2005 hade \sum PBDD en betydande mellanårsvariation, vilket indikerar en viss nedbrytbarhet för olika kongener alternativt en skillnad i produktion (Figur 6). För den marina toppredatorn, vikare (*Pusa hispida*), ser man inte heller en tydlig trend av \sum PBDD/Fs utan snarare stor variation mellan år (Bjurlid m. fl. 2018). Då däggdjur generellt har ett väl utvecklat cytokrom P450 system (Ade m. fl. 1984) och därmed kan antas metabolisera naturligt producerade lågbromerade dioxiner kan denna variation tolkas som skillnader i den årliga produktionen. Det finns även säsongsvariation inom året för denna substansgrupp, i en studie där blåmussla samlats in mellan maj-oktober vid Askö under 2008 syntes ökande halter fram till juni (saknas data för juli) för att sedan minska i prover insamlade i augusti och oktober (Löfstrand m. fl. 2011).

Det finns få studier där man tittat på födovävar, men utifrån befintliga data tyder lite på att PBDD/Fs med få brom (ex. triBDD) skulle ackumulera i födoväven. I Karin Löfstrands avhandling (Löfstrand 2011) återfinns två mindre födovävsstudier där man studerat trofisk överföring av PBDD/Fs i Östersjön (cyanobakterier, Östersjömussla, blåmussla, abborre och skrubbskädda) som jämfördes med prover från Nya Zeeland (mussla, ostron och fisk). Båda studierna visar att halter är högst vid lägst trofinivå d.v.s. i cyanobakterier från Östersjön och för filtreraren på Nya Zeeland. Det skall dock tilläggas att vid en exponering för mer högbromerade kongener finns risk för bioackumulation i näringsväven, dock saknas idag belägg för en sådan betydande naturlig produktion.

Den grundläggande kemiska strukturen (Figur 7) för PBDD/Fs är två bensenringar sammanhållna av två syrebryggor och ett varierat antal brom atomer.



Figur 6. Tidserier för koncentrationer (ng/g EOM) av Σ PBDD (över) och Σ MeO-PBDE (under) i abborre från Kvädöfjärden insamlad mellan 1990 till 2005. Grafer hämtade från Löfstrand (2011).

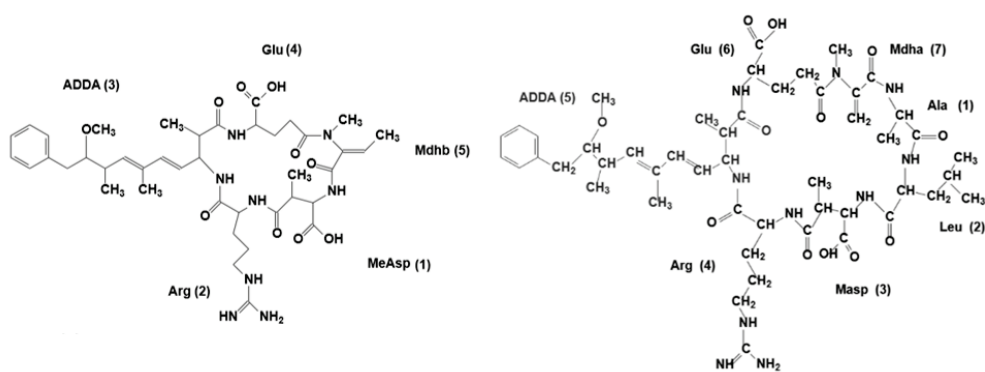


Figur 7. Grundläggande kemisk struktur för polybromerade dibenso-p-dioxiner (PBDD).

2.1.2. Cyanotoxiner

Många arter av cyanobakterier har förmågan att bilda toxiner, som nodularin och mikrocytin. I Östersjön är det framförallt katthårsalgen (*Nodularia spumigena*) som producerar stora mängder av giftet nodularin.

Mikrocystiner och nodulariner har liknande struktur och skiljer sig genom att nodulariner innehåller fem aminosyror och mikrocystiner innehåller sju (Figur 8). Toxinerna är ringformiga peptider som kan variera strukturellt genom exempelvis metylering eller demetylering (SLV 2017). Mikrocystiner och nodulariner har en stor mängd analoger, idag är cirka 100 varianter av mikrocystiner kända samt åtta nodulariner (Buratti m. fl. 2017).



Figur 8. Kemisk struktur nodularin (t.v.), mikrocystin (t.h.). Figurer hämtade från SLV 2017.

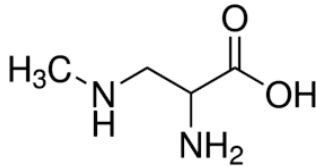
Mikrocystiner och nodulariner är så kallade hepatotoxiner, har levern som första målorgan och verkar genom att hämma enzymaktiviteten, vilket kan påverka levercellers morfologi och orsaka leverskador (Honkanen m. fl. 1991, Ding m. fl. 2000). Exponering för nodularin kan leda till neurotoxicitet (Lehtonen m. fl. 2003) och hos zebrafiskembryos har nodularin visat sig orsaka oxidativ stress och utvecklingsstörningar (Chen m. fl. 2020). Mikrocystiner kan orsaka celldöd (Fladmark m. fl. 1998) och störa fosforyleringen av proteiner (Persson m. fl. 2009) samt kan ge upphov till carcinogena effekter (Chen m. fl. 2016) och påverka fekunditeten (Su m. fl. 2016).

Nodularin återfinns i alla delar av Östersjöns födoväv, sediment, mussla (*Mytilus edulis*) (Mazur-Marzec m. fl. 2007), torsk (*Gadus morhua*) (Sipiä m. fl. 2001), spigg, (*Gasterosteus aculeatus* L.), strömming (*Clupea harengus membras* L.), lax (*Salmo salar* L.) (Sipiä m. fl. 2007) samt ejder (*Somateria mollissima*) (Sipiä m. fl. 2008). I en undersökning av födovävsinteraktioner utanför Polens kust, återfanns högst halter av mikrocystin i planktonätande fisk och filtrerande skaldjur och lägre halter i piscivorer, asätare och bentiska omnivorer (Bukaveckas m. fl. 2017).

Halter av cyanotoxiner kan variera stort mellan områden och över tid vilket är kopplat till intensitet och lokalisering av algblomning i kombination med en snabb nedbrytning av substanserna. De säsongsvariationer som dokumenterats för produktion av nodularin förklaras med miljöförhållanden (Karjalainen m. fl. 2007). Högst halter av nodularin har observerats i förhållanden som gynnar tillväxt hos bakterierna (Repka m. fl. 2004).

β -methylamino-L-alanin (BMAA) produceras av primärproducenter i många olika ekosystem. BMAA återfinns inom samtliga av de stora grupperna av cyanobakterier (Jonasson m. fl. 2010), dinoflagellater (Lage m. fl. 2014) och kiselalger (Jiang och Ilag 2014, Réveillon m. fl. 2016). Av de arter som återfinns i Östersjön, har följande arter av kiselalger påvisats producera BMAA i kliniska studier; *Achnanthes* sp., *Navicula pelliculosa*, *Proboscia inermis*, *Skeletonema*

marinoi, *Thalassiosira* sp., *Ditylum brightwellii* (Jiang och Ilag 2014, Lage m. fl. 2014) och *Chaetoceros* spp. (Tallberg och Heiskanen 1998).



Figur 9. Kemisk struktur β -methylamino-L-alanin (BMAA)

BMAA är en vattenlöslig, polär och icke-lipofil aminosyra (Figur 9). BMAA misstänks orsaka långsamt progressiv neurodegenerativa sjukdomar hos människor som till exempel ALS/PDC (McGeer och Steele 2011). I studier på råttor har BMAA visats interagera med glutamatreceptorer och orsaka beteendeförändringar och muskelkramper (Matsuoka m. fl. 1993). Förutom neurotoxicitet kan BMAA även agera toxiskt genom att hämma enzymatisk aktivitet (Van Onselen och Downing 2018) hos antioxidantenzymerna superoxid dismutas och glutathione-S- transferas (Esterhuizen-Londt m. fl. 2015).

I Östersjön har BMAA detekterats i strömming (*Clupea harengus*), nors (*Osmerus eperlanus*), piggvar (*Psetta maxima*), hornsimpa (*Myoxocephalus quadricornis*) och sik, (*Coregonus maraena*). Inga halter har detekterats i lax (*Salmo salar*), öring (*Salmo trutta*) eller gös (*Sander lucioperca*). Halter av BMAA i Östersjön speglar temporala variationer där högre koncentrationer BMAA påträffas i juli (Jonasson m. fl. 2010).

2.1.3. Ichthyotoxin

Ichthyotoxin (Ichthyo=fisk) kan produceras av olika typer av alger varav flera arter av *Chrysochromulina* och några arter av *Prymnesium* (Haptophyta) förekommer i Östersjön. Orsaken till produktionen tros för vissa arter vara allelopatisk, dvs. att toxinet är avsett att hindra andra algers tillväxt eller/samt immobilisera byten i de fall där algerna är mixotrofa (autotrofa och fagotrofa, exempelvis *Prymnesium parvum* i Skovgaard och Hansen (2003)). Även om dessa alger kan förekomma i stora mängder når de sällan vad vi klassar som blomningar på grund av deras mindre cellstorlek. Genom att flertalet olika alger kan producera dessa toxiner är också verkningsmekanismerna för toxinerna varierande.

Prymnesium parvum producerar både toxiner (Prymnesin-1 och 2) som förstör celler (benämns ibland som hemolysin) och substanser som påverkar permeabiliteten hos fiskarnas gälar vilket påverkar jonbalansen samt inducerar slemproduktion i gälarna, vilket kan leda till syrebrist i blodet och tillslut att fisken

dör (Wasmund 2002). Fisk, men även hela ekosystem kan störas, som vid den stora blomningen av *Chrysochromulina (Prymnesium) polylepis* i Skagerrak och Kattegat 1988 (Rosenberg och Lindahl 1988). Men arterna har också förekommit i mer lokala blomningar i t.ex. Stockholmstrakten med fiskdöd som följd i början på 90-talet. Dödsorsaken tros där ha varit syrebrist. Fiskdöd som en konsekvens av *Dictyocha speculum* förekom även i vatten utanför Danmark på 80-talet (HELCOM 1996, p. 193). Man har även utrett en indirekt koppling mellan ett utbrott av *C. polylepis* i egentliga Östersjön och en nedgång i häckande ejder mellan 2007 och 2008 då blåmusslan, ejderns främsta föda kan ha drabbats med indirekt effekt på ejderns reproduktionsframgång detta år (Larsson m. fl. 2014). Tidigare studier visar att *C. polylepis* kan ha en negativ påverkan på blåmusslan med effekter som reducerat födointag, försenad och minskad reproduktionsframgång samt påverkad juvenil utveckling (Granmo m. fl. 1988, Loo 1989).

Bland dinoflagellater finns också *Karlodinium spp.* som producerar ichtthyotoxinerna karlotoxin 1 och 2 vilka har rapporterats orsaka fiskdöd på andra håll i världen och där effekter som slemproduktion bakom gällock, gälödem, och allvarlig nekros av gälvävnad observerats (Deeds m. fl. 2002). Även om dessa inte är kända för att blomma i Östersjön så kunde *Karlodinium veneficum* kopplas till fiskdöd i Ersöströmmen i finska viken 2015. Vattenprover visade då en brun missfärgning och med hjälp av mikroskopering och DNA teknik kunde man påvisa ovanligt höga koncentrationer (10 miljoner celler L⁻¹) av *K. veneficum* (Finska Miljöministeriet 2016).

2.1.4. Musselförgiftande alger

Musslor och andra filtrerande djur kan ansamlas naturligt producerade toxiner utan att själva ta skada, men kan orsaka flera olika former av sjukdomar hos människor: paralytic shellfish poisoning (PSP), amnesic shellfish poisoning (ASP), diarrhetic shellfish poisoning (DSP), ciguatera shellfish poisoning (CFP) samt azaspiracid shellfish poisoning (AZP). Den här typen av substanser kan produceras av kiselalger, fäсталger, diatomeer och dinoflagellater (För en utförlig sammanställning av producenter, utbredning och ekotoxikologiska effekter se Luckas m. fl. (2005) samt Wasmund (2002). Arter från dinoflagellatsläkte, som *Dinophysis acuminata* och *D. norvegica*, är de vanligast förekommande i Östersjön (Kononen och Niemi 1986). Generellt är kunskapsläget för dessa substanser i Östersjön relativt lågt och endast DSP och PSP inkluderas i denna sammanställning.

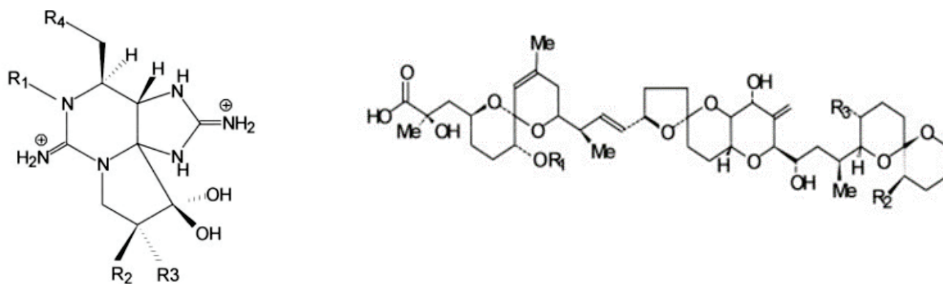
DSP-toxiner (Diarrhetic Shellfish Poisoning)

Dinoflagellater kan producera s.k. diarrégifter, som okadasyra (Figur 11), något som framförallt anses vara ett problem vid human konsumtion av musslor vid

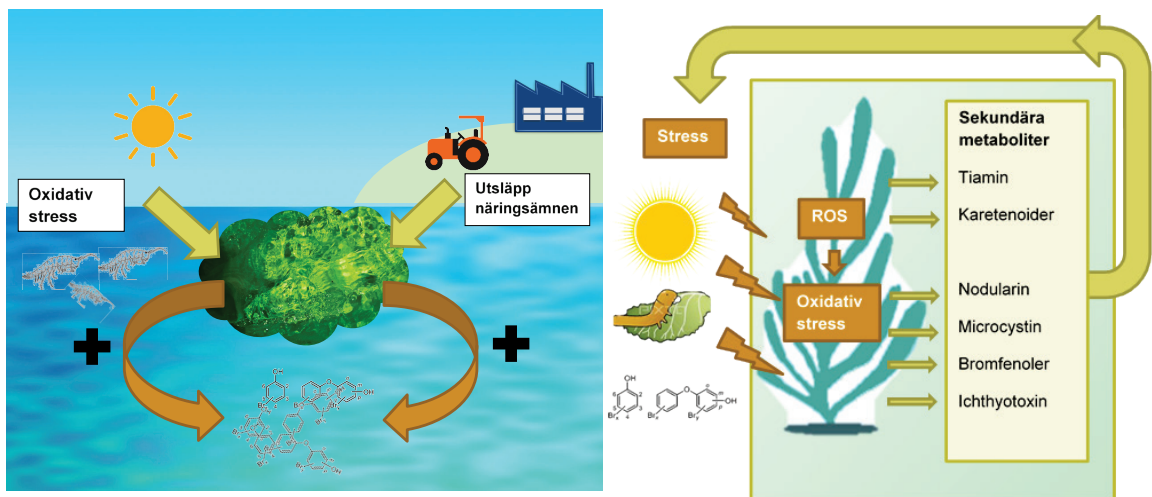
Västerhavet (då blåmusslor i Östersjön inte växer till ätbar storlek). Okadasyra kan orsaka celldöd, apoptos (Bøe m. fl. 1991), tumörbildning (Suganuma m. fl. 1988) och har en dokumenterad cytotoxisk verkan (Fladmark m. fl. 1998). Exponering för okadasyra kan även påverka regleringen av glykogen syntes (Svensson och Förlin 1998). Okadasyra kan föras vidare i näringskedjan och har dokumenterats i mussla och skrubbskädda från Östersjön (Sipiä m. fl. 2000).

PSP-toxiner (Paralytic Shellfish Poisoning)

Under senare år har förekomst av dinoflagellat, *Alexandrium ostenfeldii*, ökat i Östersjön. *A. ostenfeldii* kan producera paralytic shellfish poisoning (PSPs, Figur 11), neurotoxin, där förekomst av gonyautoxin och saxitoxin har bekräftats hos populationer i Östersjön (Kremp m. fl. 2009). PSP orsakas av saxitoxinernas förmåga att blockera transport av nervimpulser och kan vara dödligt via andningssvikt. PSP toxiner återfinns i flera delar av Östersjöns näringsväv, som filtrerare, kräftdjur och fisk med halter som varierar över sommarsäsongen (Setälä m. fl. 2014).



Figur 10. (till vänster) Struktur av DSP toxin. Figur hämtad från Hummert m. fl. (2000).
 Figur 11. (till höger) Struktur av PSP toxin. Figur hämtad från Schantz 1986.



Figur 12. T.v. Produktion av algtoxiner kan påverkas direkt genom situationer av miljöbetingad stress vilket kan inducera en syntes av substanserna hos primärproducenter. Indirekt kan produktionen påverkas genom att skapa förutsättningar för utbredning och artförekomst för primärproducenter. T.h. Då celler utsätts för yttre stress, från miljö eller antropogena substanser, kan sekundära metaboliter bildas i form av antioxidanter och algtoxiner. Dessa substanser kan i sin tur inducera oxidativ stress i andra organismer, motverka ROS, eller ingå i en strategi för att motverka skador av yttre stress.

2.2. Produktion av algtoxiner

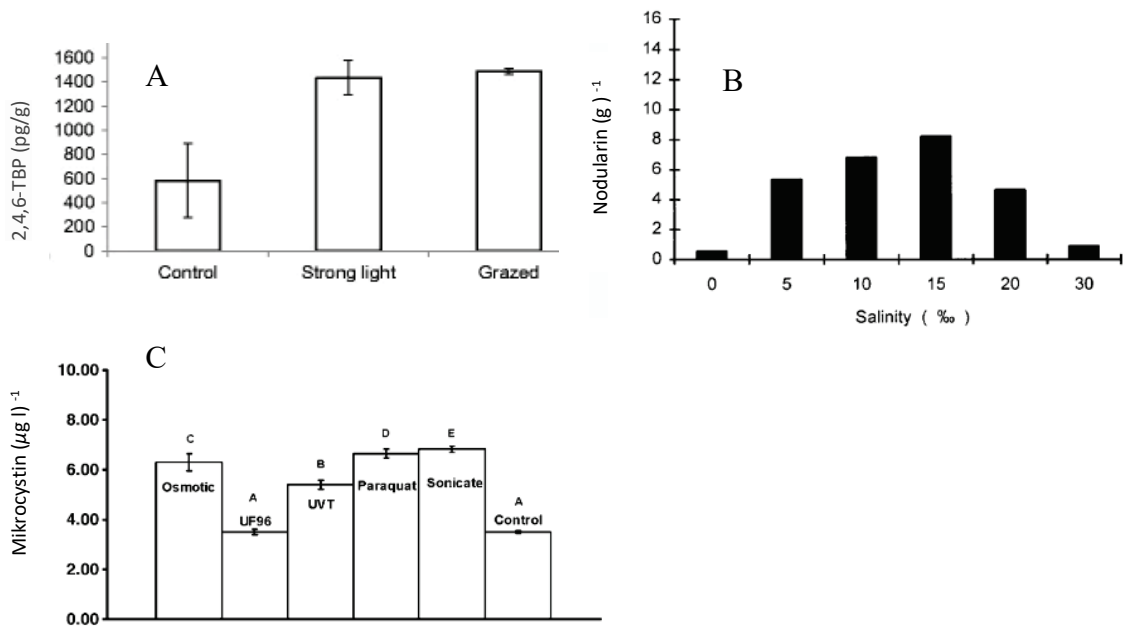
Algtoxiner är så kallade sekundära metaboliter och är inte en del av organismernas primära metabolism (normal tillväxt, utveckling och reproduktion). Sekundära metaboliter produceras inte under cellens hela livscykel, utan kan slås på eller av beroende på cellens behov och kan ha en viktig funktion för interaktioner med andra organismer. Variationer i vatten/miljö förhållanden kan påverka produktion av algtoxiner direkt genom att inducera en syntes av substanserna i producenten, såväl som indirekt, genom att skapa förutsättningar för utbredning och artförekomst för primärproducenter (Figur 12).

2.2.1. Oxidativ stress

Under normal metabolism ackumulerar primärproducenter reaktiva syreföreningar (ROS) som biprodukter av cellens elektrontransport (eg. under fotosyntes och cellandning) (Veljovic-Jovanovic 1998, Baroli och Niyogi 2000). Antioxidanter fungerar som försvarssystem genom att binda till ROS eller genom att oxidera ROS. De kan också binda till redox-cyklare (ämnen som skapar en cyklisk oxidation-reduktions-reaktion genom att tappa och återuppta elektroner). När mängden ROS ökar i en cell mer än mängden antioxidanter, utsätts organismen för oxidativ stress (Figur 12). I dessa situationer skadar ROS viktiga molekyler i cellen, såsom proteiner, lipider och DNA (Finkel och Holbrook 2000). Produktionen av ROS är

generellt låg i organismer som inte upplever stress, men jämvikten mellan produktion och nedbrytning av ROS kan störas vid olika former av miljöbetingad stress.

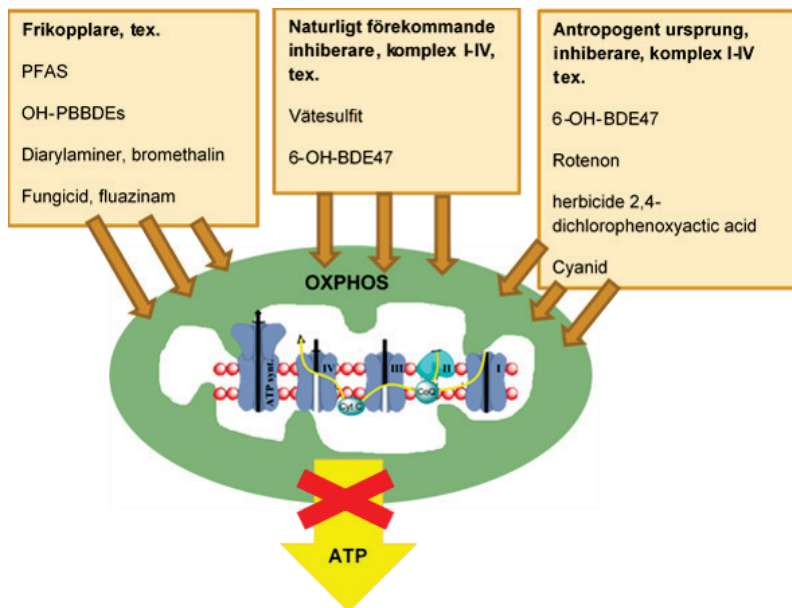
I samband med ROS och oxidativ stress bildas ett flertal sekundära metaboliter, vissa med funktion inom evolutionära anpassningar för att bibehålla organismens fitness, yttre stress till trots. Bromerade fenolära substanser har föreslagits ha en funktion som försvarsmekanism gentemot andra organismer genom att motverka infektioner av mikroorganismer (Goodwin m. fl. 1997) och betesangrepp (Pedersen m. fl. 1996), vara fördelaktigt vid konkurrens om utrymme, samt skydd mot skadliga epifyter (Dworjanyn m. fl. 1999). Hos haptofyta, *Prymnesium parvum* ökar halter av toxin som svar mot ökade näringshalter (Granéli och Johansson 2003) och där ichtiotoxin föreslagits ha en allelopatisk verkan via hemolysin som ökar möjligheter till en fagocytisk livsstil (Skovgaard och Hansen 2003). Generellt induceras produktion av ett flertal algtoxiner som svar mot miljörelaterad stress (Figur 13) och förändrade nivåer av salthalt, ljusinstrålning och temperatur (Lehtimäki m. fl. 1997, Abrahamsson m. fl. 2003, Ross m. fl. 2006, Shibata m. fl. 2006, Dahlgren m. fl. 2015).



Figur 13. Halter av a) 2,4,6-TBP (pg/g våtvikt) mätt i *C. tenuicorne*, exponerade för starkt solljus, bete samt obehandlad kontroll, b) nodularin (g torrvtikt)⁻¹ mätt i *N. spumigea* i olika nivåer av salthalt samt c) mikrocystin (µg l torrvtikt)⁻¹ från celler behandlade med UV strålning. Figurer hämtade från Dahlgren m. fl. 2015, Lehtimäki m. fl. 1997, Ross m. fl. 2006.

2.2.2. Oxidativ fosforylering

Mitokondrien fungerar som cellens kraftstation. På dess inre membran sker den oxidativa fosforyleringen vilket är det sista steget i cellandningen hos eukaryota celler. Den består av elektrontransportkedjan och här syntetiseras ATP (ADP omvandlas till ATP) vilket skapar cellens bränsle. Under normala omständigheter produceras mer än 95% av cellens energi i form av ATP via oxidativ fosforylering (OXPHOS). Störning av OXPHOS kan ske genom inhibering av något av komplexen i andningskedjan eller av en okontrollerad transport av vätejoner över mitokondriens membran vilket på olika sätt leder till låg bildning av ATP (Figur 14). Snabb minskning av ATP kan vara akuttoxiskt, medan lägre nivåer leder till försämrad energimetabolism (avmagring) och ökad termogenes (värmeproduktion). Om en organism har tiaminbrist och exponeras för ämnen som stör OXPHOS bör det ytterligare kunna påverka organismens energistatus negativt. I sin avhandling beskriver Lindqvist (2016) samverkansmekanismer för flera olika substanser med egenskaper som OXPHOS störare, som bromerade fenolära substanser, perfluorerade alkylsyror (PFAS), pesticider, fungicider och vätesulfit.



Figur 14. Då den oxidativa fosforyleringen störs, påverkas cellens ATP produktion vilket kan påverka metabolism och värmeproduktion. Ett flertal OH-PBDEer har visat sig kunna störa OXPHOS. Tiaminbrist stör kolhydratmetabolism och påverkar därigenom energimetabolismen och ATP produktionen negativt.

2.2.3. Spatiotemporal variation

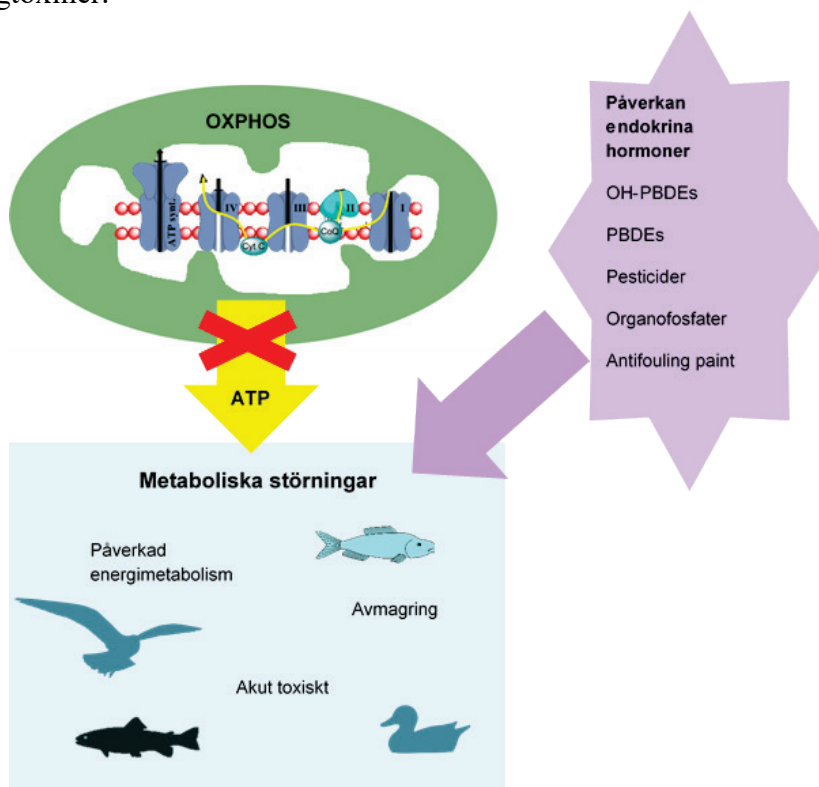
Till skillnad från flera klassiska miljögifter från industriella utsläpp med en stabil förekomst i miljön, uppvisar algtoxiner generellt halter som fluktuerar över säsongen och mellan år (se exempel Figur 5 och Figur 7). I tillägg till en varierande produktion av substanser i relation till miljövariationer som skiljer mellan Östersjöns olika delar, kan ontogenetiska skillnader som livscykel och utvecklingsstadium, påverka produktionen av kemiska substanser (t.ex. Houdan m. fl. 2004). Växter som blir betade av andra organismer upplever ofta olika intensitet i skadenivå samt risk för att bli betad under sin utveckling/tillväxt (Boege och Marquis 2005), något som sammanfaller med fysiologiska och morfologiska förändringar som delar av deras livscykel. Det verkar som att växter har förmågan att optimera sina försvarsmekanismer mot bete genom olika utvecklingsstadier (Boege m. fl. 2007). Troligtvis är en investering i försvarsstrategier extra viktigt för växtens tidiga livsstadier, då unga växter kan ta särskilt stor skada till följd av betesangrepp. Hos fintrådiga rödalgen, *C. tenuicorne* har laboratorieförsök visat att produktion av bromfenoler kan variera mellan algens isomorfa hon-, han- och diploida livsstadier. Kloner från Östersjön producerade signifikant högre halter av 2,4,6-TBP än motsvarande gametofyter från Västkusten. Än högre halter producerades av han-gametofyter och sporofyter från Västkusten (Dahlgren m. fl. 2015).

Förutsättningar för utbredning och artförekomst påverkar förekomsten av olika primärproducenter och därmed förekomsten av algtoxiner. Östersjön skiljer mellan kust och hav, vad gäller näringsförhållanden (N, P), salinitet, klorofyllhalter, siktdjup och biomassa av växtplankton. I Östersjön sker periodvis tillväxt/blomningar av växtplankton och cyanobakterier. Vårblomning av växtplankton domineras av kiselalger, och förutsätter att mängden näring i vattnet byggts upp under vintern, och pågår tills kvävemängderna tryter. Cyanobakterier som kan tillgodogöra sig kväve från luften, har då en konkurrensfördel gentemot andra växtplankton. Cyanobakterier gynnas av god tillgång på biotillgänglig fosfor, låg halt oorganiskt kväve och varmt vatten och tillväxer vanligen kraftigt (algbloomning) under slutet av juli/tidig augusti (Niemi 1979). Exempelvis kan man förvänta sig högre förekomst av *Nodularia spumigena* i havsområden och mer fintrådiga alger och *Microcystis sp.* i kustområden. Även i en nord, sydlig riktning finns en gradient av variationer i vattenförhållanden. Detta är något som leder till skillnader i artsammansättning av primärproducenter mellan dessa områden.

2.2.4. Algtoxiner och hälsoeffekter hos Östersjöns biota

Substanser i Östersjöns miljö med liknande toxikologisk verkan innebär potential för en additiv eller synergistisk verkan. I tillägg kan olika ekotoxikologiska endpoints i sig ha biologiska effekter som samverkar. OXPHOS-störare såväl som

hormonstörande ämnen har potential att påverka metaboliska aktiviteter (Figur 15). En hälsoproblematik som kännetecknas av avmagring (dålig energiupplagring), har observerats hos många fiskarter såsom havsvandrande lax (Asker 2019), torsk som blir mindre och periodvis mager (Bryhn m. fl. 2020), strömming med minskande fetthalt (Faxneld m. fl. 2014) och påverkad hälsa hos kustlevande abborre och tånglake (Larsson m. fl. 2016) och skrubbskädda (Dahlgren m. fl. 2019). I tillägg till fisk uppvisar flera andra djurgrupper i Östersjön relaterade hälsoproblem. Hos gråsäl (*Halichoerus grypus*) dokumenteras minskande späcktjocklek (Faxneld m. fl.), sjöfågel som ejder och alfågel minskar i antal (Skov m. fl. 2011) och ejder som återvänder från sommarvistelser är utmärglade och parasitinfekterade (Torsten Mörner, muntligen). Ejder och gråtrut från Östersjön uppvisar tiaminbrist (Balk m. fl. 2009). För en kunskapssammanställning över tiaminets roll i Östersjön, se Hylander m. fl. (2020). Sannolikt är detta problemkomplex kopplat till ekosystemeffekter och obalansen i Östersjöns ekosystem. Där det inte är enskilda faktorer som påverkar fiskens hälsa utan flera samverkande faktorer som inkluderar klimatförändringar, övergödning, exponering för såväl klassiska miljögifter som algtoxiner.



Figur 15. Schematisk bild som visar på exponering för substanser som leder till störning av OXPHOS och påverkan på hormoner vilket leder till en hälsoproblematik som innefattar avmagring (energiupplagring).

3. Tidstrendanalyser

För att utvärdera om halter av algtoxiner i Östersjön kan anses vara ett problem eller kunna bli ett problem för havslevande organismer, med särskilt fokus på ett fiskhälsoperspektiv är det relevant att studera hur dessa substanser varierar över tid. Denna syntes har som målsättning att identifiera källor till befintliga data för algtoxiner i Östersjön, i publicerad form genom rapporter och vetenskapliga artiklar samt, om möjligt ytterligare data som genererats inom svensk miljögiftsövervakning men inte utvärderats med avseende på eventuella kopplingar till fiskhälsa.

3.1. Data för algtoxiner i Östersjön

Inom det svenska nationella miljöövervakningsprogrammet för miljögifter i marin biota, samlas årligen material vilket medger retrospektiva analyser. Huruvida dessa data kan användas för syntesens övergripande frågeställning har undersökts i form av en inventering av befintliga tidsserier och möjlighet till att utvinna mer information från andra utförda kemiska analyser.

3.1.1. Befintliga tidsserier

När det kommer till befintliga tidsserier finns data för en rad olika bromerade algtoxiner (inkl. 2,4,6-bromfenol som antas vara en modersubstans till en rad bromerade algtoxiner) i ett flertal arter från olika trofnivåer (strömning, abborre, mussla och vikare) (Tabell 2). Däremot saknas i dagsläget tidsserier för bland annat cyanotoxiner, ichthyotoxiner och musselförgiftande toxiner. Inom den nationella miljöövervakningen av miljögifter i marin biota har riktade analyser av 2,4,6-bromfenol 6'-OH-PBDE47 och 2'-OH-PBDE68 analyserats retrospektivt i strömmingslever mellan åren 1980 – 2009 vid tre lokaler (Ängskärsklubb, Landsort och Utlängan, Faxneld m. fl. (2014)). Under denna 30 års period visade data att halter av 2,4,6-bromfenol fördubblades vid stationen Utlängan, medan ingen trend kunde påvisas vid de andra två lokalerna. Halter av 6'-OH-BDE47 och 2'-OH-BDE68 ökade signifikant över tid vid både Utlängan och Landsort. Strömningen som analyserats i denna studie är insamlad under hösten-vinter (mellan vecka 36

till 51 beroende på år och lokal) och är ifrån referensområden som ska anses vara fria från lokala utsläppskällor.

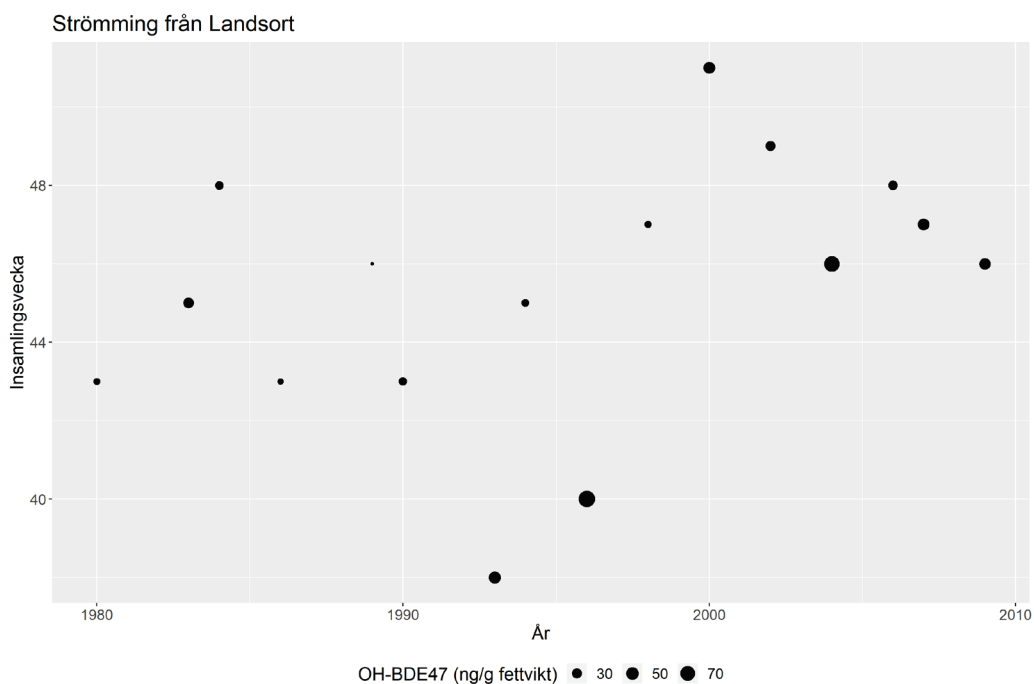
Tabell 2. Sammanställning av befintliga tidsserier för olika algtoxiner i Östersjön. Trend rapporteras som ökande (+), minsakande (-) eller obefintlig (~) och gäller för hela tidsperioden, en trend för enbart de sista 10 åren visas inom parantes. Alla trendanalyser är från citerade källor, inga nya analyser har gjorts.

Ämne	Trend	Art	Enhet	Start	Slut	Antal år	Lokal	Bassäng	Referens
2,4,6-BF	~	Strömning	ng/g fettvikt	1980	2009	16	Ängskärsklubb	Bottenhavet- Norra Ålandshav	Faxneld m. fl. (2014)
2,4,6-BF	~	Strömning	ng/g fettvikt	1980	2009	16	Landsort	Egentliga Östersjön	Faxneld m. fl. (2014)
2,4,6-BF	+	Strömning	ng/g fettvikt	1980	2009	16	Utlängan	Egentliga Östersjön	Faxneld m. fl. (2014)
OH- PBDE47	~ (+ 10 år)	Strömning	ng/g fettvikt	1980	2009	16	Ängskärsklubb	Bottenhavet- Norra Ålandshav	Faxneld m. fl. (2014)
OH- PBDE47	+	Strömning	ng/g fettvikt	1980	2009	16	Landsort	Egentliga Östersjön	Faxneld m. fl. (2014)
OH- PBDE47	+	Strömning	ng/g fettvikt	1980	2009	16	Utlängan	Egentliga Östersjön	Faxneld m. fl. (2014)
OH- PBDE68	(+ 10 år)	Strömning	ng/g fettvikt	1980	2009	16	Ängskärsklubb	Bottenhavet- Norra Ålandshav	Faxneld m. fl. (2014)
OH- PBDE68	+(- 10 år)	Strömning	ng/g fettvikt	1980	2009	16	Landsort	Egentliga Östersjön	Faxneld m. fl. (2014)
OH- PBDE68	+	Strömning	ng/g fettvikt	1980	2009	16	Utlängan	Egentliga Östersjön	Faxneld m. fl. (2014)
∑MeO- PBDE	~	Abborre	pg/g våtvikt	1990	2005	16	Kvädöfjärden	Egentliga Östersjön	Haglund m. fl. (2010)
∑PBDDs	~	Abborre	pg/g våtvikt	1990	2005	16	Kvädöfjärden	Egentliga Östersjön	Haglund m. fl. (2010)
∑PBDDs	+	Blåmussla	ng/g våtvikt	1995	2003	6	.	Information saknas	Haglund m. fl. (2007)
∑PBDDs/Fs	~	Vikare	pg/g fettvikt	1974	2015	21	.	Bottenviken- Egentliga Östersjön	Bjurlid m. fl. (2018)

^a BF, bromfenol; OH-PBDE, hydroxylerade polybromerade difenyletrar; MeO-PBDE, metoxylerade polybromerade difenyletrar; PBDDs/Fs, polybromerade dibenso-p-dioxiner och dibenso furaner.

Generellt gäller att majoriteten av alla befintliga tidsserier visar en positiv trend eller en avsaknad av trend. Man ska vara medveten om att OH-PBDE:er även kan härstamma från antropogent producerade flamskyddsmedel men sannolikt kommer den största delen OH-PBDE i fisken från naturliga källor. Användningen av Penta-PBDE (ex. PBDE-47) som flamskyddsmedel begränsades i mitten på 2004 (Kemikalieinspektionen 2003) och det är först efter den tidpunkten man kan följa om halter av OH-PBDE:er som ett resultat av naturlig produktion ökar, minskar eller förblir stabilt. Då majoriteten av tidsserierna maximalt sträcker sig fram till år 2009 är det svårt att på enbart fem år kunna detektera en signifikant förändring som inte är av betydande storlek då nedbrytning av stabila miljögifter generellt är en långsam process. Från den nationella miljöövervakningen för miljögifter i marin biota antas att för organiska ämnen är en relativ årlig förändring på 10 % möjlig att detektera med en styrka på 80 % först under en tidsperiod på ca 8-12 år (Bignert m. fl. 2017). Vid intresse av att utvärdera den naturliga produktionen av OH-PBDE, kan förslagsvis redan befintliga tidsserier utökas med fler analyserade år enligt ovan. En annan möjlighet för att särskilja en naturlig produktion från antropogena källor är genom att studera kongenmönster då placeringen av OH-gruppen och Br generellt skiljer sig mellan naturprodukterna och PBDE metaboliterna. Dock så kräver en sådan studie standarder som hitintills inte använts i de kemiska analyserna inom miljöövervakningen och därmed krävs nya retrospektiva studier där dessa inkluderas.

Insamlingsperiod av material för kemiska analyser kan påverka tolkningen av data. För att illustrera denna problematik presenteras en figur över OH-PBDE47 i strömning från Landsort där tidserien illustreras med hänsyn till både insamlingsvecka och koncentration (Figur 16). Tidsserien visar att koncentrationen av OH-PBDE47 ökar över tid men även att insamlingsvecka generellt ökar (bortsett från år 1993 och 1996) vilket innebär att strömningarna i slutet av tidsserien är insamlade längre ifrån den tidpunkt där man förväntar sig högst koncentrationer men trots det har högre halter. Slutsatsen av detta är att halterna i slutet av tidsperioden teoretiskt skulle kunna vara ännu högre och därmed har man underskattat den ökande trenden över tid. Det ska tilläggas att kunskapen kring dessa ämnens absorption, fördelning, metabolism och utsöndring i fisk är låg vilket medför en viss osäkerhet i ovan slutsats och i dagsläget bör man därför ta hänsyn till insamlingstillfälle. För att komma runt denna problematik kan man inför en trendanalys justera data för insamlingsperiod, men det förutsätter att man inte har en betydande mellanårsvariation vilket då skulle kunna skapa stor osäkerhet i justerat data. Inför framtida analyser av algtoxiner bör man även ta hänsyn till den säsongsvariation som finns för dessa substanser (se Säsongsvariation).



Figur 16. Tidserie över OH-PBDE47 i strömning insamlad i Landsort mellan 1980 och 2009. Figuren visar insamlingsveckan och koncentrationen av OH-PBDE47 (storleken på prickarna) per år.

3.1.2. Kompletterande information från tidigare kemiska analyser

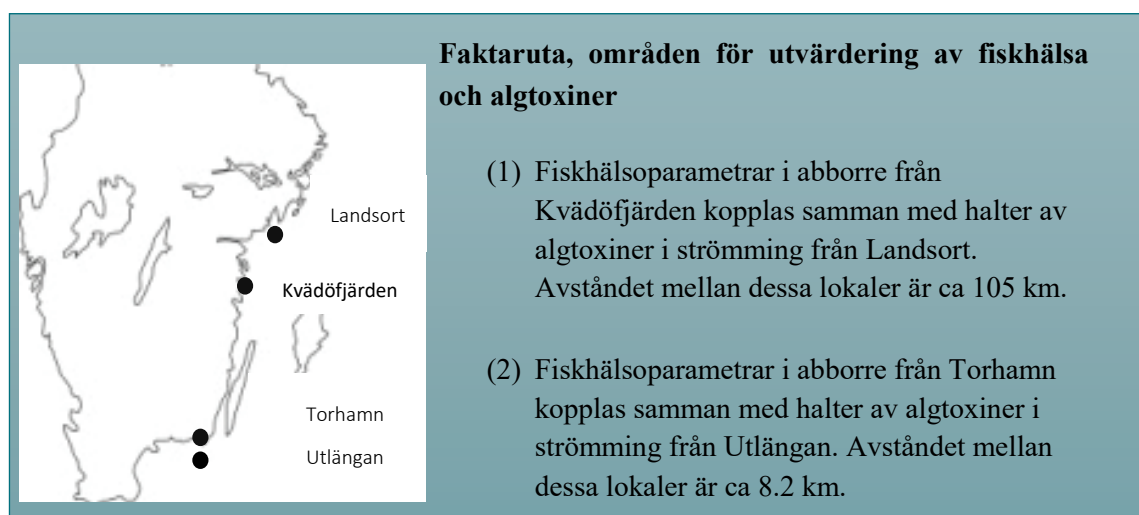
Från det material som årligen samlas och analyseras inom det svenska nationella miljöövervakningsprogrammet för miljögifter i marin biota, vore analyser av grupperna bromerade flamskyddsmedel och klorerade dioxiner intressanta för att uppskatta produktion av olika algtoxiner. Däremot visar en närmare undersökning att det inte är möjligt att få fram kunskap om naturligt producerade föreningar från dessa analyser.

För de klorerade dioxiner som likt de tyngre, bromerade dioxinerna, upparbetas identiskt, är körningar på gaskromatografi/masspektrometri (GC/MS) inte densamma. Dels används olika GC-kolonner för att optimera analysen, i tillägg är retentionstiderna annorlunda då bromerade dioxiner är tyngre och därmed har längre retentionstider. Detta innebär att man inte kan studera samma kromatogram som för klorerade dioxiner. Som ett alternativ skulle man kunna använda sig av upparbetade prover med rätt körning på GC/MS men då man saknar matchande standarder blir kvantifieringen inte optimal och rekommenderas därför inte (Lisa Lundin vid Umeå universitet, muntligen).

För OH-PBDE och MeO-PBDE finns flera orsaker till att man inte kan använda sig av information från tidigare PBDE analyser. I analysmetoden för PBDE användes koncentrerad svavelsyra för att ta bort fett vilket inte är kompatibelt med analys av fenolära substanser t.ex. OH-PBDE. Vid analys av bromfenoler separerar man istället neutrala och fenolära substanser från varandra med t.ex. lut. Däremot kan man analysera MeO-PBDE och PBDE i samma prov, dock behövs standarder för att identifiera toppar i GC kromatogram eftersom retentionstiderna ändras men också för att kvantifiera substanserna. Under en kortare tidsperiod (cirka fem år) kördes MeO-BDE47 och MeO-BDE68 parallellt PBDE standarder men det har inte skett de senaste tio åren (Lillemor Asplund vid Stockholms universitet, muntligen).

3.2. Utvärdering av fiskhälsodata och substanser i fisk

För att undersöka möjligheten att förekomst av algtoxiner i Östersjön kan anses vara ett problem ur ett ekotoxikologiskt perspektiv bör man koppla halter till mått på fiskhälsa. Inför sådana analyser har data över halter av algtoxiner samt parametrar som kan vara kopplade till förekomst av dessa sammanställts från nationella databaser (till exempel SMHI:s SHARK). Tillgängliga data har sedan utvärderats i relation till variationer av algtoxiner över tid (exempelvis befintlig tidsserie för bromfenoler).



Figur 17. Lokaler för insamling av material inom forskning och miljöövervakning, Landsort, Kvädöfjärden, Torhamn och Utlängan.

3.2.1. Metodbeskrivning och statistik

Inför en utvärdering av fiskhälsodata och algtoxiner i fisk har två ”områden” identifierats som lämpliga för att samköra data mellan fiskhälsomarkörer och data insamlad från andra delar av nationell miljöövervakning (Figur 17). Det är viktigt att påpeka att analyserna baseras på data som sträcker sig över betydande områden vilket kraftigt försvårar möjligheter att kunna detektera signifikanta förhållanden. Syftet med de statistiska analyserna är primärt att försöka koppla halter av algtoxiner till fiskhälsomarkörer. I tillägg kommer eventuell samvariation mellan fiskhälsa och halter av algtoxiner med olika abiotiska och biotiska faktorer undersökas. Detta för att belysa vad som kan påverka förekomsten och nivåer av algtoxiner i Östersjön och därmed fiskhälsa. Vidare har även publicerad data för Σ MeO-PBDE och Σ PBDD (Haglund m. fl. 2010) i abborre från Kvädöfjärden utvärderats gentemot fiskhälsa i abborre från Kvädöfjärden.

För att besvara frågeställningarna ovan används två olika strategier. För att koppla förekomst av algtoxiner till specifika fiskhälsoparametrar utvärderas gruppvisa fiskhälsoparametrar (som indikerar relevanta effekter för de algtoxiner där data finns tillgängligt) med hjälp av principalkomponentanalys (PCA) och efterföljande korrelationsanalys vid indikation på samband. För att utvärdera hur algtoxiner och fiskhälsa kan påverkas av abiotiska och biotiska faktorer används PLSR-modellering (PLSR, Partial Least Squares Regression to Latent Structures) som är en robust multivariat metod för att finna samband mellan uppsättningar av variabler (X, förklarande variabler och Y, beroende variabler) (Wold m. fl. 2001). Metoden används för att finna de variabler som bäst förklarar Y och är byggd för att optimera modellens förklarande och prediktiva kapacitet. Metoden fungerar väl för korrelerade X-variabler samt för en eller fler Y-variabler och kan hantera både kvalitativa och kvantitativa data. PLSR beräknar antal komponenter (i fallande förklaringsgrad) för att maximera kovariationen mellan komponenter i X- och Y-rymden. För att maximera den prediktiva kapaciteten (Q^2) i en modell används korsvalidering för att säkerställa att ytterligare komponenter tillför prediktiv styrka genom att utesluta observationer och prediktera Y. Förklaringsgraden (R^2Y) indikerar hur stor del av Y som är modellerat och kommer att öka för varje komponent medan Q^2 enbart ökar fram tills modellen är överanpassad p.g.a. för många komponenter.

För X-variabler har vi valt att använda oss av alla tillgängliga data inom ett begränsat område (se avgränsningar) och därmed beräknat årsmedelvärden för insamlad data från ibland olika lokaler mellan år till skillnad från att exempelvis välja ut enbart en specifik station som skulle vara representativ. Med detta tillvägagångsätt ämnar vi få fram mer kontinuerliga tidsserier vilket underlättar PLSR modellering.

Ingående data i modellerna är log-transformerade för att nå normalfördelning för alla variabler, utom för abundansdata som transformerats genom roten ur två. Normalfördelning kontrollerades med hjälp av Shapiro Wilks normalitetstest. Univariata analyser av fiskhälsoparametrar har delats upp i grupper utifrån deras biologisk effekt (Mustamäki m. fl. 2019) vilket genererade totalt 22 separata PLSR modeller. Vidare analyserades även algtoxiner 2,4,6-bromfenol, OH-PBDE47 och OH-PBDE68 (totalt 3 separata modeller). Utvärdering av PLSR modeller har gjorts enligt Lundstedt m. fl. (1998), där en modell av hög kvalitet kan antas när $R^2Y=0,7$ och $Q^2=0,4$. Då dessa värden sannolikt kommer vara svåra att uppnå med ingående data i våra modeller är ett alternativt tillvägagångssätt att titta på mönster mellan modeller. För att finna den bästa modellen filtrerades ingående X-variabler med hänsyn till VIP värden (variable importance in PLS projection) och där de två till tre mest betydelsefulla variablerna selekterades fram genom en stegvis eliminering av de variabler med lägst VIP värden (Mehmood m. fl. 2020). För att underlätta tolkning av X-variablers viktning användes endast en eller två principalkomponenter och bestämdes utifrån Q^2 värdet.

3.2.2. Ingående modelldata

För sammanställning av hälsotillståndet hos kustfisk samlas årligen data över abborre, tånglake och de senaste åren även skrubbskädda inom miljöövervakningsprogrammet Integrerad kustfiskövervakning. Undersökningarna omfattar mätning av cirka 25 biokemiska, fysiologiska och histologiska mätvariabler, så kallade biomarkörer, som beskriver viktiga fysiologiska funktioner hos fisken (Tabell 3). För denna del har endast fiskhälsodata för abborre valts ut.

Tabell 3. Sammanfattning av ingående Y-variabler till PLSR modellering. Y-variabler kommer från miljöövervakningsprogrammet Integrerad kustfiskövervakning (årligen samlas data på hälsotillstånd hos bl.a. abborre in; biokemiska, fysiologiska och histologiska mätvariabler, så kallade biomarkörer, som beskriver viktiga fysiologiska funktioner hos fisken) samt retrospektiva studier av algtoxiner (halogenerade organiska föreningar) i strömning.

PLSR modell - Indikator	Y-variabler	Förklaring
Reproduktion och endokrina störningar	Gonad	Fiskens totala gonadvikt
	Vtg	Vitellogenin
Blodstatus och jonreglering	Ht	Hematokrit, mängd röda blodceller i helblod
	Hb	Hemoglobin i helblod
	iRBC	Omogna röda blodceller, % av totalt antal blodceller
	Joner (Cl ⁻ , Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺)	Joner i plasma
Immunförsvar	Lymfocyter	% av totalt antal blodceller
	Granulocyter	% av totalt antal blodceller
	Trombocyter	% av totalt antal blodceller
	WBC	Vita blodceller, % av totalt antal blodceller
Leverfunktion	LSI	Leversomatiskt index (levervikt / somatisk vikt)
	EROD	EROD-aktivitet
	GR	Glutation-reduktas aktivitet
	GST	Glutation-S-transferas
	Katalas	Katalas
	Metallothionein	Metallothionein
Tillväxt, energilagring och metabolism	Konditionsindex	$(100 \times \text{Tot_vikt i gram}) / \text{längd i cm}^3$
	Leverstorlek	Fiskens totala levervikt
	Glukos	Glukos i helblod
	Blodlaktat	Blodlaktat
Algtoxiner	2,4,6-BF	Halter av naturligt producerade bromerade föreningar i strömning.
	OH-PBDE47	
	OH-PBDE68	

Variabler som representerar förekomst av naturligt producerande toxiner har valts ut för att de kan representera 1) förekomst av primärproducenter, vilka producerar toxiner naturligt samt 2) halter av naturligt producerade toxiner, då förändring av dessa variabler har en dokumenterad effekt på produktion av bromfenoler och andra naturligt producerande toxiner (Abrahamsson m. fl. 2003, Granéli och Johansson 2003). Variabler som valts ut för att kunna svara på detta och som har extraherats

ut ur SMHIs databas Sharkwebdata för marinbiologiska data (<https://sharkweb.smhi.se/>) alternativt långtidsmätningar av UV-strålning i Norrköping (<https://www.smhi.se/>) anges i Tabell 4 nedan. Då PLSR analysen kräver fullständig information för alla ingående år kan vissa modeller sakna variabler till förmån för ett reducerat antal år där fullständig information finns för fler variabler.

Tabell 4. Sammanfattning av ingående X-variabler till PLSR modellering. Variabler som representerar förekomst av primärproducenter, närsalter, temperatur, salinitet, syre, ljusintensitet och abundans av betare.

Motivering	X-variabler	Förklaring och enhet
Förekomst/Abundans av arter som kan tänkas producera algtoxiner alternativt påverka fiskhälsa:	<i>Växtplankton</i>	
	Chl a	Klorofyll a. Mått på den totala produktionen i vattenkolumnen. [$\mu\text{g/L}$]
	Haptofyter	Abundans av växtplankton ur stammen haptofyta som bl.a.producerar Ichthyotoxin. [ind./L]
	Cyanobakterier	Abundans av växtplankton ur stammen cyanobacteria som producerar en rad olika algtoxin b.la. OH-PBDE och PBDDs [ind./L]
	<i>Filamentösa alger</i>	
	Rhodomelaceae	
	Ceramiaceae	
	Chordariaceae, Pylaiellaceae	
Närsalter som proxy för algblomning	SiO_3	Kiseltrioxid i vattenkolumnen
	H_2S	Vätesulfid i vattenkolumnen
	Tot-N	Totalkväve i vattenkolumnen
	TOC	Totalkol i vattenkolumnen
	Tot-P	Totalfosfor i vattenkolumnen
Variabler som har dokumenterad förmåga att inducera miljöbetingad stress (ROS) hos primärproducenter av algtoxiner	Salinitet	Salinitet i vattenkolumnen
	Syre	Syrehalt i vattenkolumnen
	UV-strålning /Ljusintensitet	UV mätningar från Norrköping
	Temperatur	Temperatur i vattnet
	<i>Betare</i>	Abundans, summa av fler arter. [ind./m^2]. <i>Saknas data för den aktuella tidsperioden juli-augusti.</i>
	Märkräftor (<i>Gammarus sp.</i>)	
	Havsgråsugga (<i>Idothea sp.</i>)	
Östersjöbåtsnäcka (<i>Theodoxus fluviatilis</i>)		

3.2.3. Avgränsning

Den geografiska avgränsningen för data som kan kopplas till strömming är givet litteraturdata där små pelagiska fiskar (som strömming) anses kunna ha ett födosökområde kring 50 kilometer (Bergström m. fl. 2007). Detta innebär att vi tillåtit ± 25 kilometer från insamlingslokalen. Då insamlad miljödata uteslutande finns i havsområden inom en nautisk mil blev avgränsningen enbart i nord-sydlig riktning. Som tillägg till den geografiska avgränsningen bör nämnas att det finns begränsad information kring strömmingens födosöksområde som därför skulle kunna vara betydligt mindre vilket bidrar till osäkerhet i denna analys. Man ska även vara medveten om att vattnets rörelse inte getts hänsyn i denna avgränsning. För abborren, som uppskattats ha ett område på cirka en kilometer eller mindre (Ahlbeck Bergendahl m. fl. 2017) blir denna strategi för avgränsning alltför begränsande för mängden tillgänglig data och vi har därför valt att använda samma avgränsning som för strömmingen.

- 1) Fiskhälsa i abborre från Kvädöfjärden och algtoxiner i strömming från Landsort

Då de geografiska områdena skiljer sig men med visst överlapp har utdrag av variabler från Shark webdata för grupp 1 avgränsats till fyra specifika ”typområden” enligt SVAR (svenskt vattenarkiv):

- Östergötlands och Stockholms skärgård. Mellankustvatten. Norra
- Östergötlands och Stockholms skärgård. Mellankustvatten. Södra
- Östergötlands inre kustvatten
- Östergötlands yttre kustvatten

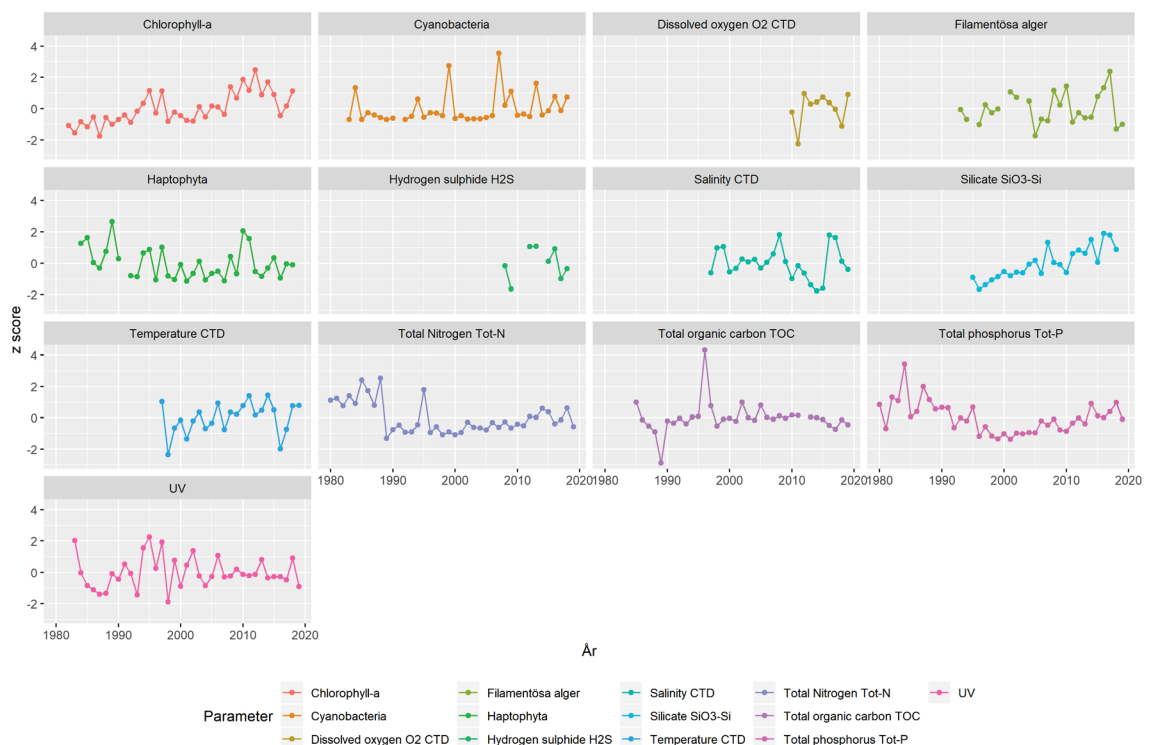
Tidsperioden för utdrag var 1980-2020 och initialt alla månader. Sekundära avgränsningar som gjorts är månaderna juli-augusti (hög algblomningsintensitet), djup 0-20 meter (den fotiska zonen dit ljuset sträcker sig och möjliggör fotosyntes och därmed produktion av algtoxiner).

3.2.4. Resultat och diskussion

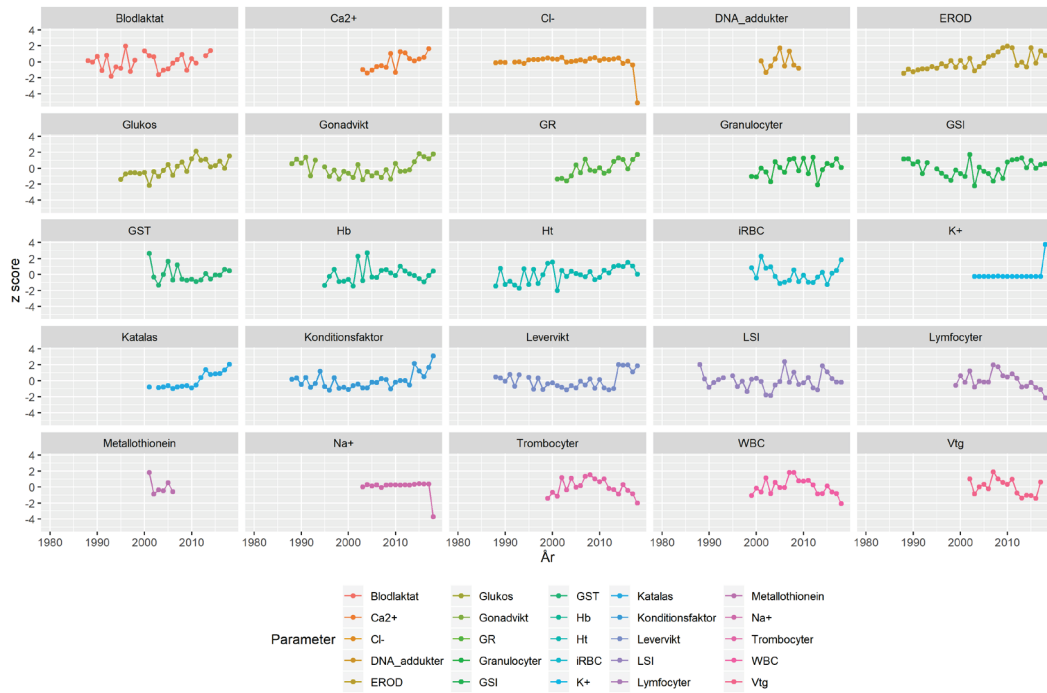
Ingående tidserier tillgängliga för PLSR analys och korrelationsanalyser uppdelade på miljöfaktorer (abiotiska och biotiska), fiskhälsoparametrar och algtoxiner visualiseras i Figur 18 - Figur 20 och är z-transformerade då det är stora skillnader i enheter mellan olika variabler. För miljöfaktorer saknas längre tidsserier för vissa parametrar som därför exkluderats ur analysen till fördel för ett större antal år ($n =$ provstorlek) (Figur 18). För fiskhälsoparametrar kan man för vissa tidsserier (Na^+ , K^+ , Cl^- och Ca^{2+}) se tydliga extremvärden i slutet på tidsserien som inte inkluderats i analysen då dessa sannolikt är felrapporterade data (Figur 19). För tidsserier över

algtoxiner kan man se att tidserierna på inget sätt är kontinuerliga (stundtals analyser vartannat år) vilket innebär att PLSR analyser innehåller ett lägre antal år (n) trots att tidsserien sträcker sig över en lång tidsperiod vilket försvårar möjligheten att finna en bra modell.

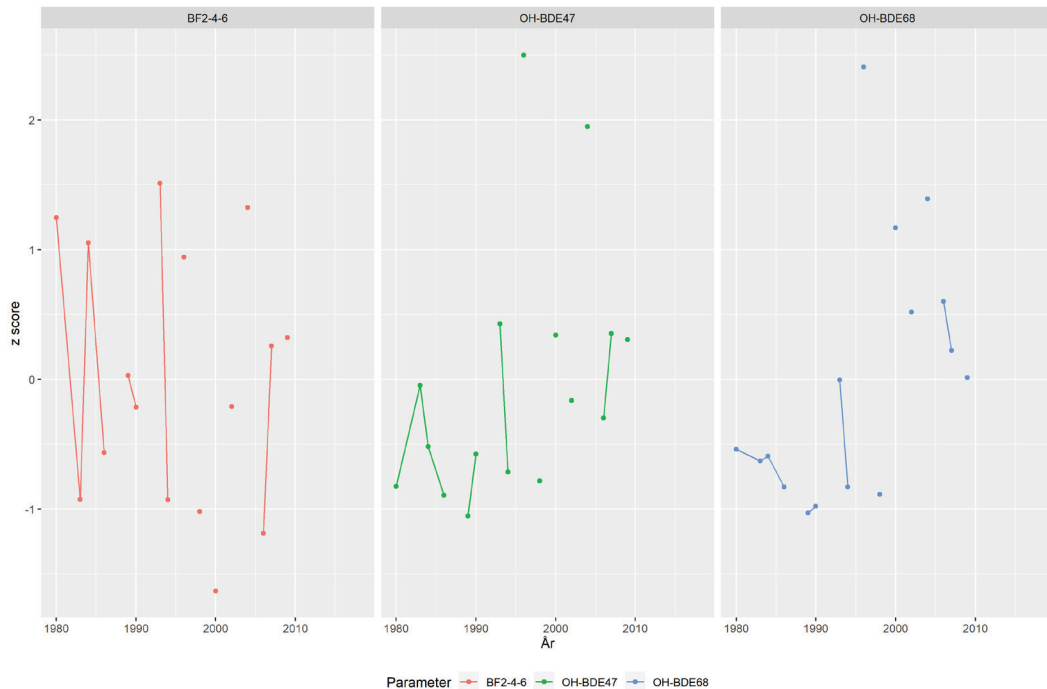
Generellt är PLSR modellerna svårtolkade då valideringen av majoriteten av modellerna visar på dålig förklarande och prediktiv kapacitet (Tabell 5). Detta kan innebära att ingående parametrar inte förklarar de responsvariabler som testats, alternativt, att vi i denna undersökning har för grov uppskattning (med hänsyn till både tid- och rumslig upplösning) av intressanta parametrar, eller att det inte går att detektera tydliga mönster utifrån befintlig data. Vi ser därför denna del som enbart en visualisering av tillgänglig data och att man i framtiden bör angripa denna typ av frågeställning med mer riktad data. Vi väljer därför att inte utföra en liknande sammanställning och analys för Torhamn-Utlängan (Grupp 2) där tidsserien för fiskhälsa dessutom är betydligt kortare än för Kvädöfjärden.



Figur 18. Tidstrender för miljöparametrar från Stockholms och Östergötlands kustvatten. Årsmedelvärden, för djup 0-20 m mellan juli och augusti. För mer information om avgränsningar se avsnitt Avgränsning och Tabell 3 för beskrivning av de olika parametrarna.



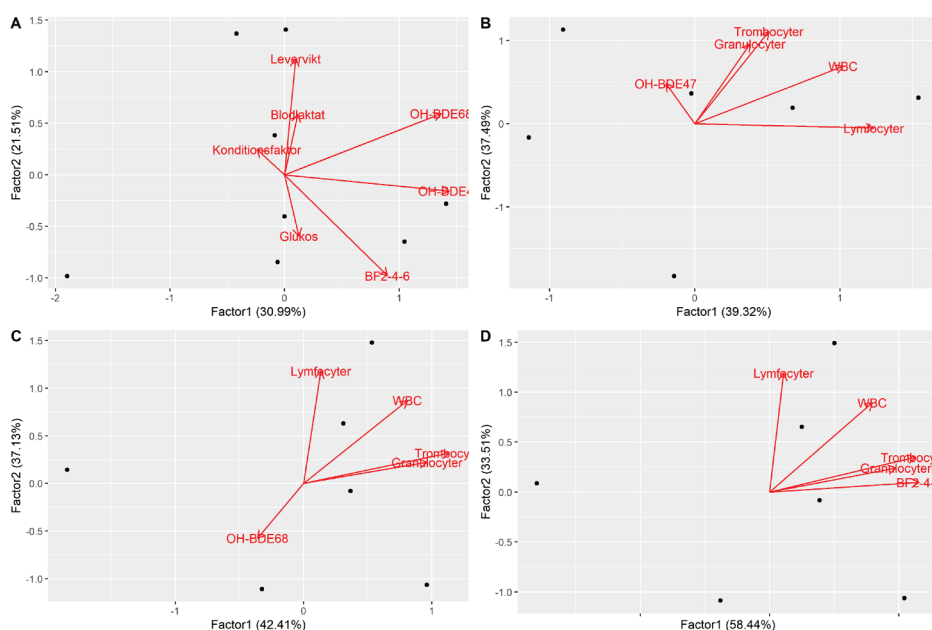
Figur 19. Tidstrender för fiskhälsoparametrar i abborre insamlad vid Kvädöfjärden, Egentliga Östersjön. Se Tabell 2 för beskrivning av de olika parametrarna.



Figur 20. Tidstrender för algtoxiner i strömning insamlad vid Landsort, Egentliga Östersjön. Se Tabell 2 för beskrivning av parametrarna.

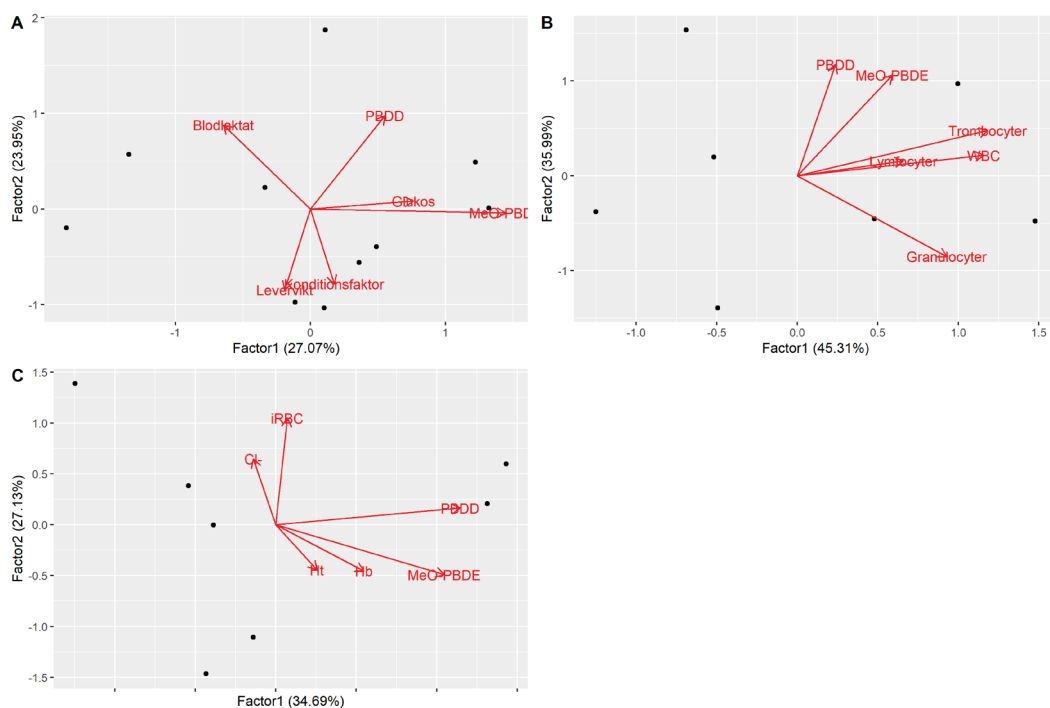
För att studera kopplingar enbart mellan fiskhälsoparametrar och algtoxiner är det endast två grupper av fiskhälsoparametrar som går att utvärdera med hjälp av PCA, tillväxt samt immunologi. För de andra grupperna av fiskhälsoparametrar varierar antal analysår i stor utsträckning. Samkörning med befintlig algtoxindata innebär därför stundtals en för låg provstorlek, vilket påverkar analysens utfall. En slutsats från detta är därför att data inte finns i tillräcklig utsträckning för att kunna göra utforskande analyser av kopplingen mellan algtoxiner och olika typer av biologiska effekter. Dock så är det ändå effekter på tillväxt och metabolism samt immunotoxicitet som kan förväntas (D'silva m. fl. 2004, van Boxtel m. fl. 2008, Dahlgren m. fl. 2019) och där vi i dagsläget har tillräcklig data. När det kommer till tillväxt så visar en faktoranalys (PCA; Figur 21A) att PC1 främst drivs av de tre algtoxinerna medan PC2 har positiv laddning för levervikt och negativ laddning för BF-2,4,6. Dock är förklarandegraden för PC2 låg. Trots låg provstorlek hos denna PCA (n=8 för 8 parametrar inkl. algtoxiner) valdes att utvärdera eventuella associationer mellan kondition, som var den fiskhälsoparameter som bäst separerade PC1 mot algtoxiner. Pearsons korrelationstest visade att det fanns en nära signifikant negativ korrelation med OH-PBDE47 ($r(10) = -0,56$; $p = 0,6$) och OH-PBDE68 ($r(10) = -0,50$; $p < 0,1$) men inte för BF-2,4,6 ($r(10) = -0,1$; $p = 0,8$). För immunologi gjordes tre separata PCA:er (Figur 21 B-D) för de tre olika algtoxinerna då provstorleken var mycket låg (n = 6 för 5 parametrar inkl. 1 algtoxin). För OH-PBDE47 drevs PC1 främst av lymfocyter och vita blodkroppar medan PC2 drevs av trombocyter och granulocyter (Figur 21 C). För OH-PBDE68 hade granulocyter och trombocyter störst vikt för PC1 medan PC2 separerades främst av lymfocyter och vita blodkroppar. För BF-2,4,6 (Figur 21 D) PC1 hade BF-2,4,6, trombocyter och granulocyter högst viktning och för PC2 lymfocyter och vita blodkroppar. Dessa positiva samband med både trombocyter och granulocyter kunde också säkerställas statistiskt (trombocyter: $r(4) = 0,92$; $p < 0,01$; granulocyter: $r(4) = 0,82$, $p < 0,05$). Utifrån tidigare kunskap om påverkan på fiskhälsoparametrar testades även direkt befintliga associationer mellan algtoxiner och EROD (D'silva m. fl. 2004). Dock fanns inget tecken på signifikanta korrelationer vilket skulle kunna indikera att OH-PBDE47, OH-PBDE68 och BF-2,4,6 inte kan användas som proxy för exempelvis bromerade dioxiner, en ämnesgrupp med samma ursprung och med förmåga att inducera EROD. Det bör dock även nämnas att data för algtoxiner i strömming och fiskhälsoparametrar inte är helt kompatibla då abborren är en kustnära art som till högre utsträckning exponeras för filamentösa, fintrådiga alger medan strömmingen som är en mer pelagisk fiskart som sannolikt har en större exponering från mikroalger och cyanobakterier ute till havs. Vidare är insamlingen av strömming under sen höst inte nödvändigtvis representativ för de effekter man ser i fiskhälsa vid de tidpunkter då produktion av algtoxiner är som högst.

För Grupp 2 som kopplar samman fiskhälsodata i abborre från Torhamn med algtoxindata i strömning från Utlängan överlappar tidsserierna åtta år varav endast fem år är analyserade för både algtoxiner och fiskhälsa. Med hänsyn till den begränsade mängd data genomfördes inga PCA. Däremot undersöktes associationer mellan konditionsfaktor och algtoxiner samt mellan algtoxiner och trombocyter och granulocyter för att se om mönstret för Grupp 1 var konsekvent. Inga signifikanta associationer kunde detekteras mellan algtoxiner och konditionsfaktorn i abborre ($r = ,01$; $0,51$ och $0,39$ samt $p = 0,98$, $0,38$ och $0,52$ för BF2-4-6, OH-PBDE68 och OH-PBDE47). För associationer med immunologiska variabler visade korrelationsanalyserna enbart ett signifikant förhållande mellan OH-PBDE47 och granulocyter ($r = -0,90$; $p = 0,04$). Vidare fanns även ett signifikant samband mellan BF-2,4,6 och EROD ($r = -0,92$; $p = 0,03$) dock med en negativ association, det vill säga att vid högre halter av BF-2,4,6 minskar EROD vilket är tvärtom vad man skulle förvänta sig om BF-2,4,6 var en proxy för bromerade dioxiner som inducerar EROD. Dock skulle även ett motsatt förhållande kunna existera då BF-2,4,6, är en modersubstans till bromerade dioxiner och där halten av modersubstansen initialt är hög men övergår till olika bromerade algtoxiner, som bromerad dioxiner, vilka då ökar och inducerar EROD. För kopplingen mellan fiskhälsoparametrar och Σ MeO-PBDE och Σ PBDD i abborre insamlad vid Kvädöfjärden var möjligheten för utforskande analys av variabler större och kunde förutom för tillväxt/metabolism och immunologi även utföras för blodstatus med undantag för kalium, natrium och kalcium joner (K^+ , Na^+ och Ca^{2+}).



Figur 21. Principalkomponentanalys (PCA) för PBDE-47, PBDE-68 samt för BF-2,4,6 i strömning från Landsort kopplade till fiskhälsoparametrar för abborre insamlad i Kvädöfjärden. (A) tillväxt och metabolism för samtliga algtoxiner, (B) immunologi för PBDE-47 (C) immunologi för PBDE-68 och (D) immunologi för BF-2,4,6. För beskrivning av fiskhälsoparametrar se Tabell 3.

För tillväxt – metabolism (Figur 22A) så drivs PC1 (Factor1) av främst Σ MeO-PBDE i positiv riktning och blodlaktat med en svagare negativ riktning. PC2 (Factor2) drivs främst av Σ PBDD i positiv riktning samt konditionsfaktor och levervikt i negativ riktning. Eftersom tidigare analyser visat på ett samband mellan algtoxiner och konditionsfaktor valdes därför konditionsfaktor ut som en variabel att testa mot både Σ MeO-PBDE och Σ PBDD, dock var ingen association statistiskt signifikant. För immunologi (Figur 22B) drivs PC1 starkt i positiv riktning av trombocyter och vita blodkroppar (WBC) medan Σ MeO-PBDE endast har en svagare positiv laddning. För PC2 är det främst Σ MeO-PBDE och Σ PBDD som har starka positiva laddningar och granulocyter svagare negativ laddning. Utifrån dessa resultat testades associationer mellan Σ MeO-PBDE och vita blodkroppar, trombocyter och granulocyter samt mellan Σ PBDD och granulocyter. Bland dessa korrelationer var det endast en nära signifikant koppling mellan trombocyter och Σ MeO-PBDE ($r(5) = -0,22$; $p = 0,06$). För blodstatus var det främst Σ MeO-PBDE och Σ PBDD och hemoglobin (Hb) som drev PC1 medan PC2 främst drevs av omogna röda blodkroppar (iRBC). En korrelations analys mellan Σ MeO-PBDE och hemoglobin visade på en nära signifikant positiv association ($r(9) = 0,58$; $p = 0,06$). Då PBDD är känd för att kunna inducera EROD testades även denna association separat för PBDD och för MeO-PBDE som en proxy, dock fanns inga signifikanta korrelationer (PBDD: $r(14) = -0,11$; $p = 0,7$ och MeO-PBDE: $r(14) = -0,08$, $p=0,8$).



Figur 22. Principalkomponentanalys (PCA) för Σ MeO-PBDE och Σ PBDD kopplade till fiskhälsoparametrar (A) tillväxt och metabolism, (B) immunologi och (C) blodstatus för abborre insamlad i Kvädöfjärden. För beskrivning av fiskhälsoparametrar se Tabell 3.

Tabell 5. PLSR modeller för att utvärdera förhållande mellan fiskhälsa och algtoxiner (Y-variabler) för Grupp 1 (Landsort-Kväddöfjärden) med övrig marin övervakningsdata (X-variabler) för att förklara vilka parametrar som styr förekomst av algtoxiner och effekter på fiskhälsa. PC, antal principalkomponenter i modellen; R²Y, förklarande kapacitet för modellen; Q², prediktiv kapacitet för modellen. Värden anger loadings för modellens 3 bästa förklarande variabler. För förklaring av parametrar se Tabell 3 (Y-variabler) och Tabell 4 (X-variabler). Chl a, klorofyll a; Fil. alg. filamentösa alger; SiO₃, kiseltrioxid; H₂S, vätesulfid; Tot-N, total kväve; TOC, totalt organiskt kol; Tot-P, total fosfor; Sal., salinitet; Temp., temperatur.

		PC	R ² Y	Q ²	Chl a	Hapto-fyta	Cyano-bakterier	Filament-alger	SiO	H ₂ S	Tot-N	TOC	Tot-P	Salinitet	Syre	UV	Temp.
Reproduktion	Gonad	1	0,626	0,418				0,569			0,649		0,504				
	Vtg	1	0,368	0,065							-0,710		-0,534	0,459			
Blodstatus	Ht	1	0,275	0					0,673		0,526		0,520				
	Hb	1	0,213	0,012								0,785					0,620
	iRBC	1	0,287	<0				0,590								0,583	-0,559
	Cl-	1	0,269	<0					-0,680			0,733					
	K+	1	0,442	0,234		-0,420	0,816									0,397	
	Na+	2	0,723	0,252			-0,481	0,671			0,565						
	Ca ²⁺	1	0,431	0,220					0,594			-0,544	0,593				
Immunologi	Lymfocyter	1	0,312	0,036							-0,602	0,578	-0,551				
	Trombocyter	1	0,383	<0							-0,472	0,695				0,542	
	WBC	2	0,447	<0							-0,599	0,629				0,496	
	Granulocyter	1	0,495	0,213				0,473						0,421		-0,774	
Lever	GR	1	0,635	0,523					0,562		0,551		0,617				
	Katalas	1	0,685	0,554					0,533		0,611		0,585				
	LSI	1	0,285	0,079	0,562								0,615				0,554
	EROD	1	0,254	0,053	0,577	0,817											
	GST	1	0,373	0,099	-0,538	-0,567											-0,623
Tillväxt	Kondition	1	0,752	0,674							0,681		0,732				
	Levervikt	1	0,588	0,504							0,683		0,730				
	Glukos	1	0,496	0,291	0,600				0,567				0,564				
	Blodlaktat	1	0,166	<0							0,843		0,538				
	OH-BDE47	1	0,782	0,409		-0,718										0,696	
Algtoxiner	OH-BDE68	1	0,338	<0		-0,380						0,765		-0,519			
	2,4,6-BF	1	0,310	<0			-0,569	0,592									-0,571

4. Material i miljöprovbank

För att studera huruvida halter av algtoxiner i Östersjön förändras över tid eller undersöka eventuella kopplingar mellan algtoxiner och fiskhälsa, behövs tidsserier över halter av dessa föreningar. Till skillnad från persistenta organiska föreningar, är naturligt producerande toxiner inte lika enkla att analysera retrospektivt i lagrat material. Det ställs vissa krav på förvaring av materialet. För retrospektiva tidstrendsanalyser av bromfenoler och bromdioxiner bör materialet ha förvarats i åtminstone -20°C . Material som förvarats i etanol, formalin eller torkats är inte lämpligt (muntligen Dennis Lindqvist). Den största begränsande faktorn till att genomföra retrospektiva tidsanalyser av algtoxiner är när på säsongen som det biologiska materialet samlats in. Som redovisades i avsnittet om spatiotemporal variation, bryts många algtoxiner ned fort i algen, metaboliseras och utsöndras i högre organismer.

För att studera maxhalter av algtoxiner som kan ha en negativ påverkan på akvatiska organismer behöver man mäta halter med hög frekvens under vår till höst. För att studera tidstrender är man inte lika beroende av att känna till maxhalter, men analys av material insamlat under senare delen av hösten (då halter av naturprodukter hunnit utsöndras eller brytas ned), riskerar att missa substanser som funnits i höga halter och inte länge går att detektera.

Miljöprovbanken (MPB), förlagd till Naturhistoriska riksmuseet är en central del för övervakningen av miljögifter i svensk miljö. I banken finns biologiska material tillgängligt för vetenskapligt bruk. Majoriteten av det material som samlas in och lagras inom den nationella miljöövervakningen, samlas in under höstsäsongen (september, oktober). Ett undantag är den integrerade kustfiskövervakningen där insamlingen generellt sker tidigare. Det material som till vår kännedom är det enda som samlats in före september och förvarats på lämpligt vis för att medge retrospektiva tidsanalyser av algtoxiner som nodularin och bromfenoler, är abborre från Kvädöfjäden. Materialet är insamlat under tidsperioden 1995-2020 mellan 8 och 22 augusti. Här finns ca 20 – 100 individer insamlade per år. Materialet är lagrat i frys, -25°C .

En möjlig svårighet med att använda fisk från den integrerade kustfiskövervakningen för analys av algtoxiner är att det kan vara problematiskt att

få fram lämpliga delar/organ. Provtagningen inom fiskhälsoövervakningen genomförs inte med syftet att material ska analyseras för miljögifter vilket gör att organen inte alltid sparas eller förvaras på optimalt vis för sådana analyser.

5. Förslag till fortsatta undersökningar

För framtida fortsatta riktade satsningar med avseende på algtoxiner, förekomst och effekter på organismer i Östersjön föreslås:

- Att skapa tidsserier av data genom retrospektiva analyser av relevanta algtoxiner (förslagsvis bromerade fenolära substanser, bromerade dioxiner och nodularin) i abborre från Kvädöfjärden insamlat i augusti (1995-2020).
- Fortsätta undersökningar av kopplingen mellan algtoxin och fiskhälsovariabler i abborre från Kvädöfjärden (individuella prov).
- Genomföra högupplösta säsongundersökningar av algtoxiner sommartid (augusti) för att få klarhet i maxkoncentrationer.
- Inkludera studier av biomarkörer som del av framtida insamlingar gällande halter och effekter av algtoxiner.
- Inkludera undersökningar av algtoxiner i de fall där fiskhälsa är aktuellt, som hos lax, torsk och skrubbskädda. Detta motiveras ytterligare av att det för dessa arter finns kunskap om fiskhälsa över en längre tidsperiod.
- Fortsätta analyser för att etablera samband gällande samvariation mellan halter av algtoxiner och övrig miljöövervakningsdata som ligger på Sharkweb.

För att ta ett helhetsgrepp gällande algtoxiner och samband med fiskhälsa samt eventuella samverkans effekter med antropogena miljögifter, vore det bra att se över möjligheterna till en integrerad form av miljöövervakning som inkluderar flera programområden inom programområde Kust och hav. Kompetenser som vore lämpliga att inkludera i ett sådant nätverk är analytisk kemi, ekotoxikologi, marin växtekologi, och fiskfysiologi.

Tack

Stort tack till Lillemor Asplund och Dennis Lindqvist på Stockholms universitet för faktagranskning inom miljökemi och diskussion kring förslag till framtida satsningar. Värdefulla bidrag till textens utformning och innehåll kommer även från Josefin Sundin och Helena Strömberg på SLU Aqua.

Referenser

- Abrahamsson, K.; Choo, K.-S.; Pedersén, M.; Johansson, G.; Snoeijs, P. Effects of temperature on the production of hydrogen peroxide and volatile halocarbons by brackish-water algae. *Phytochemistry* 64 (3), 725-734. 2003
- Ade, P.; Soldaini, M. B.; Castelli, M.; Chiesara, E.; Clementi, F.; Fanelli, R.; Funari, E.; Ignesti, G.; Marabini, A.; Orunesu, M. Biochemical and morphological comparison of microsomal preparations from rat, quail, trout, mussel, and water flea. *Ecotoxicology and environmental safety* 8 (5), 423-446. 1984
- Ahlbeck Bergendahl, I.; Holliland, P. B.; Hansson, S.; Karlöf, O. Feeding range of age 1+ year Eurasian perch *Perca fluviatilis* in the Baltic Sea. *Journal of fish biology* 90 (5), 2060-2072. 2017
- An, J.; Li, S.; Zhong, Y.; Wang, Y.; Zhen, K.; Zhang, X.; Wang, Y.; Wu, M.; Yu, Z.; Sheng, G. The cytotoxic effects of synthetic 6-hydroxylated and 6-methoxylated polybrominated diphenyl ether 47 (BDE47). *Environmental toxicology* 26 (6), 591-599. 2011
- Aneer, G. High natural mortality of Baltic herring (*Clupea harengus*) eggs caused by algal exudates? *Marine Biology* 94 (2), 163-169. 1987
- Asker, N. Östersjölagens hälsa. (Göteborgs universitet). 2019.
- Asplund, L.; Athanasiadou, M.; Eriksson, U.; Sjödin, A.; Börjeson, H.; Bergman, A. Mass spectrometric screening for organohalogen substances (OHs) in blood plasma from Baltic salmon (*Salmo salar*). *Organohalogen Compd* 33, 355-359. 1997
- Balk, L.; Hägerroth, P.-Å.; Åkerman, G.; Hanson, M.; Tjärnlund, U.; Hansson, T.; Hallgrimsson, G. T.; Zebühr, Y.; Broman, D.; Mörner, T. Wild birds of declining European species are dying from a thiamine deficiency syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (29), 12001-12006. 2009
- Baroli, I.; Niyogi, K. K. Molecular genetics of xanthophyll-dependent photoprotection in green algae and plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 355 (1402), 1385-1394. 2000
- Behnisch, P. A.; Hosoe, K.; Sakai, S.-i. Brominated dioxin-like compounds: in vitro assessment in comparison to classical dioxin-like compounds and other polyaromatic compounds. *Environment International* 29 (6), 861-877. 2003

- Bergström, L.; Korpinen, S.; Bergström, U.; Andersson, Å. Essential fish habitats and fish migration patterns in the Northern Baltic Sea. BALANCE Interim Report No. 29. 2007.
- Bignert, A.; Danielsson, S.; Ek, C.; Faxneld, S.; Nyberg, E. Comments Concerning the National Swedish Contaminant Monitoring Programme in Marine Biota. rapport nr. 4:2017. (Monitoring, D. o. E. R. a., Swedish Museum of Natural History), Swedish Environmental Protection Agency, Stockholm, Sweden. 2017. pp. 339.
- Birnbaum, L. S.; Staskal, D. F.; Diliberto, J. J. Health effects of polybrominated dibenzo-p-dioxins (PBDDs) and dibenzofurans (PBDFs). *Environment international* 29 (6), 855-860. 2003
- Bjurlid, F.; Roos, A.; Jogsten, I. E.; Hagberg, J. Temporal trends of PBDD/Fs, PCDD/Fs, PBDEs and PCBs in ringed seals from the Baltic Sea (*Pusa hispida botnica*) between 1974 and 2015. *Science of the Total Environment* 616, 1374-1383. 2018
- Boege, K.; Dirzo, R.; Siemens, D.; Brown, P. Ontogenetic switches from plant resistance to tolerance: minimizing costs with age? *Ecology Letters* 10 (3), 177-187. 2007
- Boege, K.; Marquis, R. J. Facing herbivory as you grow up: the ontogeny of resistance in plants. *Trends in ecology & evolution* 20 (8), 441-448. 2005
- Bryhn, A.; Vitale, F.; Königson, S.; Ovegård, M.; Lundström, K.; Bergström, U.; Valentinsson, D.; Sköld, M.; Dahlgren, E.; Ek, C. Kunskapsunderlag om möjliga icke-torskfiskerelaterade åtgärder för att torskbestånd ska bevaras och återhämta sig i svenska vatten. (Institutionen för akvatiska resurser, Sveriges lantbruksuniversitet). 2020.
- Bukaveckas, P. A.; Lesutienė, J.; Gasiūnaitė, Z. R.; Ložys, L.; Olenina, I.; Pilkaitytė, R.; Pūtys, Ž.; Tassone, S.; Wood, J. Microcystin in aquatic food webs of the Baltic and Chesapeake Bay regions. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 191, 50-59. 2017
- Buratti, F. M.; Manganeli, M.; Vichi, S.; Stefanelli, M.; Scardala, S.; Testai, E.; Funari, E. Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Archives of toxicology* 91 (3), 1049-1130. 2017
- Buser, H. R. Polybrominated dibenzofurans and dibenzo-p-dioxins: thermal reaction products of polybrominated diphenyl ether flame retardants. *Environmental science & technology* 20 (4), 404-408. 1986
- Bøe, R.; Gjertsen, B. T.; Vintermyr, O. K.; Houge, G.; Lanotte, M.; Døskeland, S. O. The protein phosphatase inhibitor okadaic acid induces morphological changes typical of apoptosis in mammalian cells. *Experimental cell research* 195 (1), 237-246. 1991
- Chen, L.; Chen, J.; Zhang, X.; Xie, P. A review of reproductive toxicity of microcystins. *Journal of hazardous materials* 301, 381-399. 2016
- Chen, X.-D.; Liu, Y.; Yang, L.-M.; Hu, X.-Y.; Jia, A.-Q. Hydrogen Sulfide Signaling Protects *Chlamydomonas reinhardtii* Against Allelopathic

- Damage From Cyanobacterial Toxin Microcystin-LR. *Frontiers in Plant Science* 11, 1105. 2020
- D'silva, K.; Fernandes, A.; Rose, M. Brominated organic micropollutants—igniting the flame retardant issue. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 34 (2), 141-207. 2004
- Dahlgren, E.; Enhus, C.; Lindqvist, D.; Eklund, B.; Asplund, L. Induced production of brominated aromatic compounds in the alga *Ceramium tenuicorne*. *Environmental Science and Pollution Research* 22 (22), 18107-18114. 2015
- Dahlgren, E.; Lindqvist, D.; Asplund, L. Miljöövervakning av miljöfarliga ämnen i fisk. *Aqua Reports*, rapport nr. 2019: 13. (Swedish University of Agricultural Sciences). 2019.
- Dahlgren, E.; Lindqvist, D.; Dahlgren, H.; Asplund, L.; Lehtila, K. Trophic transfer of naturally produced brominated aromatic compounds in a Baltic Sea food chain. *Chemosphere* 144, 1597-1604. 2016
- Deeds, J. R.; Terlizzi, D. E.; Adolf, J. E.; Stoecker, D. K.; Place, A. R. Toxic activity from cultures of *Karlodinium micrum* (= *Gyrodinium galatheanum*) (Dinophyceae)—a dinoflagellate associated with fish mortalities in an estuarine aquaculture facility. *Harmful Algae* 1 (2), 169-189. 2002
- Deng, J.; Liu, C.; Yu, L.; Zhou, B. Chronic exposure to environmental levels of tribromophenol impairs zebrafish reproduction. *Toxicology and applied pharmacology* 243 (1), 87-95. 2010
- Ding, W.-X.; Shen, H.-M.; Ong, C.-N. Microcystic cyanobacteria extract induces cytoskeletal disruption and intracellular glutathione alteration in hepatocytes. *Environmental Health Perspectives* 108 (7), 605-609. 2000
- Dingemans, M. M.; de Groot, A.; van Kleef, R. G.; Bergman, Å.; van den Berg, M.; Vijverberg, H. P.; Westerink, R. H. Hydroxylation increases the neurotoxic potential of BDE-47 to affect exocytosis and calcium homeostasis in PC12 cells. *Environmental health perspectives* 116 (5), 637-643. 2008
- Dworjanyn, S.; De Nys, R.; Steinberg, P. Localisation and surface quantification of secondary metabolites in the red alga *Delisea pulchra*. *Marine Biology* 133 (4), 727-736. 1999
- Elmgren, R.; Blenckner, T.; Andersson, A. Baltic Sea management: Successes and failures. *Ambio* 44 (3), 335-344. 2015
- Esterhuizen-Londt, M.; Wiegand, C.; Downing, T. G. β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) uptake by the animal model, *Daphnia magna* and subsequent oxidative stress. *Toxicon* 100, 20-26. 2015
- Faxneld, S.; Helander, B.; Bäcklin, B.-M.; Moraeus, C.; Roos, A.; Berger, U.; Egeback, A.-L.; Strid, A.; Kierkegaard, A.; Bignert, A. Biological effects and environmental contaminants in herring and Baltic Sea top predators. rapport nr. 6:2014. (Swedish Museum of Natural History). 2014.

- Finkel, T.; Holbrook, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408 (6809), 239-247. 2000
- Finska Miljöministeriet. Last summer's fish kill was caused by a toxic dinoflagellate: emerging algal toxins in coastal Finnish waters. 2016. <https://www.ymparisto.fi/en-US>
- Fladmark, K. E.; Serres, M. H.; Larsen, N. L.; Yasumoto, T.; Aune, T.; DØskeland, S. O. Sensitive detection of apoptogenic toxins in suspension cultures of rat and salmon hepatocytes. *Toxicon* 36 (8), 1101-1114. 1998
- Goodwin, K. D.; Lidstrom, M. E.; Oremland, R. S. Marine bacterial degradation of brominated methanes. *Environmental science & technology* 31 (11), 3188-3192. 1997
- Granéli, E.; Johansson, N. Increase in the production of allelopathic substances by *Prymnesium parvum* cells grown under N-or P-deficient conditions. *Harmful algae* 2 (2), 135-145. 2003
- Granmo, Å.; Havenhand, J.; Magnusson, K.; Svane, I. Effects of the planktonic flagellate *Chrysochromulina polylepis* Manton et Park on fertilization and early development of the ascidian *Ciona intestinalis* (L.) and the blue mussel *Mytilus edulis* L. *Journal of experimental marine biology and ecology* 124 (1), 65-71. 1988
- Gribble, G. W. Naturally occurring organohalogen compounds-a comprehensive update. (Springer Science & Business Media). 2009, vol. 91.
- Haglund, P. On the identity and formation routes of environmentally abundant tri- and tetrabromodibenzo-p-dioxins. *Chemosphere* 78 (6), 724-730. 2010
- Haglund, P.; Löfstrand, K.; Malmvärn, A.; Bignert, A.; Asplund, L. Temporal variations of polybrominated dibenzo-p-dioxin and methoxylated diphenyl ether concentrations in fish revealing large differences in exposure and metabolic stability. *Environmental science & technology* 44 (7), 2466-2473. 2010
- Haglund, P.; Malmvärn, A.; Bergek, S.; Bignert, A.; Kautsky, L.; Nakano, T.; Wiberg, K.; Asplund, L. Brominated dibenzo-p-dioxins: a new class of marine toxins? *Environmental science & technology* 41 (9), 3069-3074. 2007
- Haldén, A. N.; Nyholm, J. R.; Andersson, P. L.; Holbech, H.; Norrgren, L. Oral exposure of adult zebrafish (*Danio rerio*) to 2, 4, 6-tribromophenol affects reproduction. *Aquatic Toxicology* 100 (1), 30-37. 2010
- Hallfors, G.; Kangas, P.; Niemi, A. Recent changes in the phytal at the south coast of Finland. *Ophelia* 3, 51-59. 1984
- Hanson, N.; Larsson, Å.; Parkkonen, J.; Faxneld, S.; Nyberg, E.; Bignert, A.; Henning, H. E.; Bryhn, A.; Olsson, J.; Karlson, A. M. Ecological changes as a plausible explanation for differences in uptake of contaminants between European perch and eelpout in a coastal area of the Baltic Sea. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 103455. 2020
- HELCOM., HELCOM Thematic assessment of eutrophication 2011-2016. *Baltic Sea Environment Proceedings No. 156*. 2018.

- Honkanen, R.; Dukelow, M.; Zwiller, J.; Moore, R.; Khatra, B.; Boynton, A. Cyanobacterial nodularin is a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *Molecular Pharmacology* 40 (4), 577-583. 1991
- Houdan, A.; Bonnard, A.; Fresnel, J.; Fouchard, S.; Billard, C.; Probert, I. Toxicity of coastal coccolithophores (Prymnesiophyceae, Haptophyta). *Journal of plankton research* 26 (8), 875-883. 2004
- Hummert, C.; Kastrup, S.; Reinhardt, K.; Reichelt, M.; Luckas, B. Use of gel permeation chromatography for automatic and rapid extract clean-up for the determination of diarrhetic shellfish toxins (DSP) by liquid chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia* 51 (7-8), 397-403. 2000
- Ji, K.; Choi, K.; Giesy, J. P.; Musarrat, J.; Takeda, S. Genotoxicity of several polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and hydroxylated PBDEs, and their mechanisms of toxicity. *Environmental science & technology* 45 (11), 5003-5008. 2011
- Jiang, L.; Ilag, L. L. Detection of endogenous BMAA in dinoflagellate (*Heterocapsa triquetra*) hints at evolutionary conservation and environmental concern. *PubRaw Sci* 1 (2), 1-8. 2014
- Jonasson, S.; Eriksson, J.; Berntzon, L.; Spáčil, Z.; Ilag, L. L.; Ronnevi, L.-O.; Rasmussen, U.; Bergman, B. Transfer of a cyanobacterial neurotoxin within a temperate aquatic ecosystem suggests pathways for human exposure. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (20), 9252-9257. 2010
- Kahru, M.; Horstmann, U.; Rud, O. Satellite detection of increased cyanobacteria blooms in the Baltic Sea: natural fluctuation or ecosystem change? *AMBIO: A Journal of the Human Environment* 23, 469-472. 1994
- Kankaanpää, H. T.; Sipilä, V. O.; Kuparinen, J. S.; Ott, J. L.; Carmichael, W. W. Nodularin analyses and toxicity of a *Nodularia spumigena* (Nostocales, Cyanobacteria) water-bloom in the western Gulf of Finland, Baltic Sea, in August 1999. *Phycologia* 40 (3), 268-274. 2001
- Karjalainen, M.; Engström-Öst, J.; Korpinen, S.; Peltonen, H.; Pääkkönen, J.-P.; Rönkkönen, S.; Suikkanen, S.; Viitasalo, M. Ecosystem consequences of cyanobacteria in the northern Baltic Sea. *AMBIO: A Journal of the Human Environment* 36 (2), 195-202. 2007
- Karjalainen, M.; Reinikainen, M.; Spoof, L.; Meriluoto, J. A. O.; Sivonen, K.; Viitasalo, M. Trophic transfer of cyanobacterial toxins from zooplankton to planktivores: Consequences for pike larvae and mysid shrimps. *Environmental Toxicology* 20 (3), 354-362. 2005
- Kemikalieinspektionen. Bromerade flamskyddsmedel – förutsättningar för ett nationellt förbud. rapport nr. 4/03. 2003.
- Klaassen, C. D. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. (McGraw-Hill, ed. 6). 2001.

- Kononen, K.; Niemi, Ä. Variation in phytoplankton and hydrography in the outer Årchi? elago at the entrance to the gulf of Finland in 1968—1975. *Finnish Mar. Res* 253, 35-51. 1986
- Kremp, A.; Lindholm, T.; Dreßler, N.; Erler, K.; Gerds, G.; Eirtovaara, S.; Leskinen, E. Bloom forming *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) in shallow waters of the Åland archipelago, Northern Baltic Sea. *Harmful Algae* 8 (2), 318-328. 2009
- Lage, S.; Costa, P. R.; Moita, T.; Eriksson, J.; Rasmussen, U.; Rydberg, S. J. BMAA in shellfish from two Portuguese transitional water bodies suggests the marine dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* as a potential BMAA source. *Aquatic toxicology* 152, 131-138. 2014
- Larsson, K.; Hajdu, S.; Kilpi, M.; Larsson, R.; Leito, A.; Lyngs, P. Effects of an extensive *Prymnesium polylepis* bloom on breeding eiders in the Baltic Sea. *Journal of Sea Research* 88, 21-28. 2014
- Larsson, Å.; Förlin, L.; Hansson, N.; Parkkonen, J. Kustfisk – hälsa. HAVET 2015/2016. 2016.
- Legradi, J.; Dahlberg, A.-K.; Cenijn, P.; Marsh, G. r.; Asplund, L.; Bergman, Å.; Legler, J. Disruption of oxidative phosphorylation (OXPHOS) by hydroxylated polybrominated diphenyl ethers (OH-PBDEs) present in the marine environment. *Environmental science & technology* 48 (24), 14703-14711. 2014
- Lehtimäki, J.; Moisander, P.; Sivonen, K.; Kononen, K. Growth, nitrogen fixation, and nodularin production by two Baltic Sea cyanobacteria. *Applied and environmental microbiology* 63 (5), 1647-1656. 1997
- Lehtonen, K. K.; Kankaanpää, H.; Leiniö, S.; Sipiä, V. O.; Pflugmacher, S.; Sandberg-Kilpi, E. Accumulation of nodularin-like compounds from the cyanobacterium *Nodularia spumigena* and changes in acetylcholinesterase activity in the clam *Macoma balthica* during short-term laboratory exposure. *Aquatic toxicology* 64 (4), 461-476. 2003
- Lindqvist, D. Hydroxylated polybrominated diphenyl ethers in the Baltic Sea biota. Doctoral thesis, Stockholm University, Stockholm. 2016.
- Lindqvist, D.; Asplund, L. Determination of hydroxylated polybrominated diphenyl ethers in blood from Baltic grey seals. *Journal of Analysis and Testing* 3 (4), 287-294. 2019
- Loo, L.-O. Nyrekryteringen av *Mytilus edulis* efter *Chrysochromulina polylepis* blomningen sommaren 1988. (Zoologiska Institutionen, Göteborgs Universitet). 1989.
- Luckas, B.; Dahlmann, J.; Erler, K.; Gerds, G.; Wasmund, N.; Hummert, C.; Hansen, P. Overview of key phytoplankton toxins and their recent occurrence in the North and Baltic Seas. *Environmental Toxicology: An International Journal* 20 (1), 1-17. 2005
- Lundstedt, T.; Seifert, E.; Abramo, L.; Thelin, B.; Nyström, Å.; Pettersen, J.; Bergman, R. Experimental design and optimization. *Chemometrics and intelligent laboratory systems* 42 (1-2), 3-40. 1998

- Löfstrand, K. Trends and exposure of naturally produced brominated substances in Baltic biota-with focus on OH-PBDEs, MeO-PBDEs and PBDDs. Stockholm University. 2011.
- Löfstrand, K.; Liu, X.; Lindqvist, D.; Jensen, S.; Asplund, L. Seasonal variations of hydroxylated and methoxylated brominated diphenyl ethers in blue mussels from the Baltic Sea. *Chemosphere* 84 (4), 527-532. 2011
- Malmvårn, A.; Zebuhr, Y.; Kautsky, L.; Bergman, A.; Asplund, L. Hydroxylated and methoxylated polybrominated diphenyl ethers and polybrominated dibenzo-p-dioxins in red alga and cyanobacteria living in the Baltic Sea. *Chemosphere* 72 (6), 910-916. 2008
- Malmvårn, A.; Marsh, G.; Kautsky, L.; Athanasiadou, M.; Bergman, Å.; Asplund, L. Hydroxylated and methoxylated brominated diphenyl ethers in the red algae *Ceramium tenuicorne* and blue mussels from the Baltic Sea. *Environmental science & technology* 39 (9), 2990-2997. 2005a
- Malmvårn, A.; Zebühr, Y.; Jensen, S.; Kautsky, L.; Greyerz, E.; Nakano, T.; Asplund, L. Identification of polybrominated dibenzo-p-dioxins in blue mussels (*Mytilus edulis*) from the Baltic Sea. *Environmental science & technology* 39 (21), 8235-8242. 2005b
- Malmvårn, A.; Zebühr, Y.; Kautsky, L.; Bergman, Å.; Asplund, L. Hydroxylated and methoxylated polybrominated diphenyl ethers and polybrominated dibenzo-p-dioxins in red alga and cyanobacteria living in the Baltic Sea. *Chemosphere* 72 (6), 910-916. 2008
- Marsh, G.; Athanasiadou, M.; Bergman, Å.; Asplund, L. Identification of hydroxylated and methoxylated polybrominated diphenyl ethers in Baltic Sea salmon (*Salmo salar*) blood. *Environmental science & technology* 38 (1), 10-18. 2004
- Matsuoka, Y.; Zoltan, R.; Ezio, G.; Dean, N. L- β -methylamino-alanine-induced behavioral changes in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 44 (3), 727-734. 1993
- Mazur-Marzec, H.; Tymińska, A.; Szafranek, J.; Pliński, M. Accumulation of nodularin in sediments, mussels, and fish from the Gulf of Gdańsk, southern Baltic Sea. *Environmental Toxicology: An International Journal* 22 (1), 101-111. 2007
- McGeer, P. L.; Steele, J. C. The ALS/PDC syndrome of Guam: potential biomarkers for an enigmatic disorder. *Progress in neurobiology* 95 (4), 663-669. 2011
- Meerts, I.; Letcher, R. J.; Hoving, S.; Marsh, G.; Bergman, A.; Lemmen, J. G.; van der Burg, B.; Brouwer, A. In vitro estrogenicity of polybrominated diphenyl ethers, hydroxylated PDBEs, and polybrominated bisphenol A compounds. *Environmental health perspectives* 109 (4), 399-407. 2001
- Mehmood, T.; Sæbø, S.; Liland, K. H. Comparison of variable selection methods in partial least squares regression. *Journal of Chemometrics*, e3226. 2020

- Mustamäki, N.; Olsson, J.; Franzén, F.; Förlin, L.; Larsson, Å.; Parkkonen, J.; Faxneld, S.; Danielsson, S.; Ek, C. Fjällbacka, Västerhavet, 1989–2018. Faktablad från integrerad kustfiskövervakning, rapport nr. 2019:1. 2019.
- Niemi, A. Blue-green algal blooms and N: P ratio in the Baltic Sea. *ACTA BOT. FENN.* 110. 1979.
- Nordlöf, U.; Helander, B.; Eriksson, U.; Zebühr, Y.; Asplund, L. Comparison of organohalogen compounds in a white-tailed sea eagle egg laid in 1941 with five eggs from 1996 to 2001. *Chemosphere* 88 (3), 286-291. 2012
- Olsson, J.; Jonsson, A. L.; Duberg, J.; Lingman, A.; Naddafi, R.; Förlin, L.; Parkkonen, J.; Larsson, Å.; Asker, N.; Sturve, J. Miljön i Hanöbukten 2015-2017–finns det ett samband mellan tillståndet för fisken, dess hälsa och belastningen av miljöfarliga ämnen? , rapport nr. 2018:10. (Havs och vattenmyndigheten), Göteborg. 2018.
- Pedersén, M.; Collén, J.; Abrahamsson, K.; Ekdahl, A. Production of halocarbons from seaweeds: an oxidative stress reaction? *Scientia Marina* 60, 257-263. 1996
- Persson, K.-J.; Legrand, C.; Olsson, T. Detection of nodularin in European flounder (*Platichthys flesus*) in the west coast of Sweden: Evidence of nodularin mediated oxidative stress. *Harmful algae* 8 (6), 832-838. 2009
- Repka, S.; Meyerhöfer, M.; von Bröckel, K.; Sivonen, K. Associations of cyanobacterial toxin, nodularin, with environmental factors and zooplankton in the Baltic Sea. *Microbial Ecology* 47 (4), 350-358. 2004
- Réveillon, D.; Séchet, V.; Hess, P.; Amzil, Z. Production of BMAA and DAB by diatoms (*Phaeodactylum tricorutum*, *Chaetoceros* sp., *Chaetoceros calcitrans* and *Thalassiosira pseudonana*) and bacteria isolated from a diatom culture. *Harmful Algae* 58, 45-50. 2016
- Rosenberg, R.; Lindahl, O. Silent spring in the sea. *Ambio* 17 (4), 289-290. 1988
- Ross, C.; Santiago-Vázquez, L.; Paul, V. Toxin release in response to oxidative stress and programmed cell death in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic toxicology* 78 (1), 66-73. 2006
- Roszko, M.; Szymczyk, K.; Rzepkowska, M.; Jędrzejczak, R. Preliminary study on brominated dioxins/furans and hydroxylated/methoxylated PBDEs in Baltic cod (*Gadus morhua*) liver. Comparison to the levels of analogue chlorinated co-occurring pollutants. *Marine pollution bulletin* 96 (1-2), 165-175. 2015
- Routti, H.; van Bavel, B.; Letcher, R. J.; Arukwe, A.; Chu, S.; Gabrielsen, G. W. Concentrations, patterns and metabolites of organochlorine pesticides in relation to xenobiotic phase I and II enzyme activities in ringed seals (*Phoca hispida*) from Svalbard and the Baltic Sea. *Environmental Pollution* 157 (8-9), 2428-2434. 2009
- Setälä, O.; Lehtinen, S.; Kremp, A.; Hakanen, P.; Kankaanpää, H.; Erler, K.; Suikkanen, S. Bioaccumulation of PSTs produced by *Alexandrium ostenfeldii* in the northern Baltic Sea. *Hydrobiologia* 726 (1), 143-154. 2014

- Shibata, T.; Hama, Y.; Miyasaki, T.; Ito, M.; Nakamura, T. Extracellular secretion of phenolic substances from living brown algae. *Journal of Applied Phycology* 18 (6), 787-794. 2006
- Sipiä, V.; Kankaanpää, H.; Lahti, K.; Carmichael, W. W.; Meriluoto, J. Detection of nodularin in flounders and cod from the Baltic Sea. *Environmental Toxicology: An International Journal* 16 (2), 121-126. 2001
- Sipiä, V.; Kankaanpää, H.; Meriluoto, J.; Høisæter, T. The first observation of okadaic acid in flounder in the Baltic Sea. *Sarsia* 85 (5-6), 471-475. 2000
- Sipiä, V.; Kankaanpää, H.; Peltonen, H.; Vinni, M.; Meriluoto, J. Transfer of nodularin to three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.), herring (*Clupea harengus* L.), and salmon (*Salmo salar* L.) in the northern Baltic Sea. *Ecotoxicology and environmental safety* 66 (3), 421-425. 2007
- Sipiä, V. O.; Neffling, M.-R.; Metcalf, J. S.; Nybom, S. M.; Meriluoto, J. A.; Codd, G. A. Nodularin in feathers and liver of eiders (*Somateria mollissima*) caught from the western Gulf of Finland in June–September 2005. *Harmful Algae* 7 (1), 99-105. 2008
- Skovgaard, A.; Hansen, P. J. Food uptake in the harmful alga *Prymnesium parvum* mediated by excreted toxins. *Limnology and Oceanography* 48 (3), 1161-1166. 2003
- Su, Y.; Li, L.; Hou, J.; Wu, N.; Lin, W.; Li, G. Life-cycle exposure to microcystin-LR interferes with the reproductive endocrine system of male zebrafish. *Aquatic Toxicology* 175, 205-212. 2016
- Suganuma, M.; Fujiki, H.; Suguri, H.; Yoshizawa, S.; Hirota, M.; Nakayasu, M.; Ojika, M.; Wakamatsu, K.; Yamada, K.; Sugimura, T. Okadaic acid: an additional non-phorbol-12-tetradecanoate-13-acetate-type tumor promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85 (6), 1768-1771. 1988
- Svensson, S.; Förlin, L. Intracellular effects of okadaic acid in the blue mussel *Mytilus edulis*, and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Marine environmental research* 46 (1-5), 449-452. 1998
- Tallberg, P.; Heiskanen, A.-S. Species-specific phytoplankton sedimentation in relation to primary production along an inshore—offshore gradient in the Baltic Sea. *Journal of Plankton Research* 20 (11), 2053-2070. 1998
- Unger, M.; Asplund, L.; Haglund, P.; Malmvärn, A.; Arnoldsson, K.; Gustafsson, O. r. Polybrominated and mixed brominated/chlorinated dibenzo-p-dioxins in sponge (*Ephydatia fluviatilis*) from the Baltic Sea. *Environmental science & technology* 43 (21), 8245-8250. 2009
- Usenko, C. Y.; Hopkins, D. C.; Trumble, S. J.; Bruce, E. D. Hydroxylated PBDEs induce developmental arrest in zebrafish. *Toxicology and applied pharmacology* 262 (1), 43-51. 2012
- van Boxtel, A. L. v.; Kamstra, J. H.; Ceniijn, P. H.; Pieterse, B.; Wagner, M. J.; Antink, M.; Krab, K.; Burg, B. v. d.; Marsh, G.; Brouwer, A. Microarray analysis reveals a mechanism of phenolic polybrominated diphenylether

- toxicity in zebrafish. *Environmental science & technology* 42 (5), 1773-1779. 2008
- Van Onselen, R.; Downing, T. BMAA-protein interactions: A possible new mechanism of toxicity. *Toxicon* 143, 74-80. 2018
- Wasmund, N.; Harmful algal blooms in coastal waters of the south-eastern Baltic Sea. In *Baltic Coastal Ecosystems*; Springer: 2002, 93-116.
- Veljovic-Jovanovic, S. Active oxygen species and photosynthesis: Mehler and ascorbate peroxidase reactions. *Iugoslav Physiol Pharmacol Acta* 34, 503-522. 1998
- White, A. W. Recurrence of kills of Atlantic herring (*Clupea harengus harengus*) caused by dinoflagellate toxins transferred through herbivorous zooplankton. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 37 (12), 2262-2265. 1980
- Wold, S.; Sjöström, M.; Eriksson, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 58 (2), 109-130. 2001
- von Nordheim, L.; Kotterba, P.; Moll, D.; Polte, P. Lethal effect of filamentous algal blooms on Atlantic herring (*Clupea harengus*) eggs in the Baltic Sea. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 2020
- World Health Organization Polybrominated Dibenzo-p-Dioxins and Dibenzofurans-Environmental Health Criteria 205. 1998.

