



Aqua reports 2019:13

Miljöövervakning av miljöfarliga ämnen i fisk

Hälsoparameterar hos skrubbskädda - algtoxiner, tiamin och PFAS

Elin Dahlgren, Dennis Lindqvist och Lillemor Asplund



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Department of Aquatic Resources

Miljöövervakning av miljöfarliga ämnen i fisk - Hälsoparameterar hos skrubbskädda - algtoxiner, tiamin och PFAS

Elin Dahlgren¹, Dennis Lindqvist² och Lillemor Asplund²

¹**Sveriges lantbruksuniversitet (SLU)**, Institutionen för akvatiska resurser, Stångholmsvägen 2, 178 93 Drottningholm

²Department of Environmental Science and Analytical Chemistry, Stockholms universitet

september 2019

Aqua reports 2019:13
ISBN: 978-91-576-9681-6 (elektronisk version)

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

Rapportens innehåll har granskats av:
Ann-Britt Florin, **Sveriges lantbruksuniversitet**, Institutionen för akvatiska resurser
Helena Strömberg, **Sveriges lantbruksuniversitet**, Institutionen för akvatiska resurser

Vid citering uppge:
Dahlgren, E. (2019). Miljöövervakning av miljöfarliga ämnen i fisk. Hälsoparameterar hos skrubbskädda - algtoxiner, tiamin och PFAS. Aqua reports 2019:13. Institutionen för akvatiska resurser, **Sveriges lantbruksuniversitet**, Drottningholm Lysekil Öregrund. 25 s.

Nyckelord:
fiskhälsa, miljöfarliga ämnen

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

Finansiär:
Havs- och vattenmyndigheten, Dnr 2172-19 (SLU-ID: SLU.aqua.2019.5.2-172)

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: Skrubbskädda fotograferad på Baltic Sea Science Center. Foto: Elin Dahlgren

Sammanfattning

Skrubbskädda insamlad från västra Hanöbukten i slutet på augusti 2018 har undersökts för hälsoparametrar samt förekomst av miljöfarliga ämnen (bromfenoler, tiamin, mikrocystin, nodularin och perfluorerade alkylsyror (PFAS)). Resultaten från statistiska analyser indikerade att många av de effekt- och exponeringsfunktioner som ingår i undersökningar av skrubbskäddans hälsotillstånd samvarierade signifikant med halter av bromfenoler, tiamin och vissa PFAS.

Exponering för toxiska substanser indikerades genom påverkan på leverenzymerna katalas och glutationsreduktas vilka samvarierade med halter av tiamin respektive bromfenol 6-OHBDE-47. Leverstorlek samvarierade med ökande halter av bromfenol, 2,4,6-TBP. Ökande nivåer av outvecklade röda blodceller samvarierade med halter av bromfenol, 2,4,6-TBP och leverhalter av tiamin. Detta indikerar en påverkan på fiskens syretransport och blodbildning. Påverkad kolhydratmetabolism indikerades genom glukoshalter som samvarierade med halter av bromfenol, 6-OHBDE47. Påverkan på immunförsvaret indikerades genom minskande antal granulocyter vilka samvarierade med ökande halter av perfluorerade substanser PFNA, PFOS och PFUnDA i fiskarna.

Summary

European flounder (*Platichthys flesus*) collected from the western parts of the Hanö Bay area in the Baltic Sea, was investigated for health parameters along with the levels of some hazardous substances (bromophenols, thiamine, microcystine, nodularin, and perfluorinated alkyl acids (PFAS)). Statistical analyses indicate that several effect- and exposure symptoms part of the investigated health parameters, covaried significantly with levels of bromophenols, thiamine, and certain PFAS.

An exposure of toxic substances was indicated by increased levels of liver enzymes. Catalase and glutathione reductase covaried with levels of thiamine and bromophenol 6-OHBDE-47, respectively. Liver size index covaried with increasing levels of bromophenol 2,4,6-TBP. Effects on fish transport of oxygen and regeneration of blood cells was indicated by increased levels of undeveloped red blood cells (iRBC) that covaried with levels of bromophenol 2,4,6-TBP and thiamine levels in the liver. Effects on the carbohydrate metabolism was indicated by levels of glucose that covaried with levels of bromophenol, 6-OHBDE-47. Effects on the immune system was indicated by decreased number of granulocytes which covaried with increasing levels of PNA, PFOS, and PFUnDA in the fish.

Syfte och målgrupp

Inom svensk nationell miljöövervakning observeras symptom som bland annat kopplar till försämrad energimetabolism och påverkan på immunförsvar hos ett flertal marina arter. Dessa effekter går idag inte att fullt ut förklara med parametrar som ingår i de nationella övervakningsprogrammen. Kunskapsläget gällande effekter av algtoxiner och tiamin, enskilt och i samverkan är kraftigt eftersatt. Rapporten är en ansats till att överföra forskningsresultat till redskap som kan tillämpas inom svensk miljöövervakning. Havs- och vattenmyndigheten är initiativtagare och finansierar till rapporten. Undersökningar av fiskhälsa i skrubbskädda samfinansierades av Havs- och vattenmyndigheten och Naturvårdsverket. Kemiska analyser samfinansierades av Naturvårdsverket och Vattenvårdsförbundet för Västra Hanöbukten.

1 Inledning

Under de senaste åren har rapporter om problem hos kustfisk, sjöfågel samt förekomsten av brunt illaluktande vatten uppmärksammats i Hanöbukten. Havs- och vattenmyndigheten (HaV) har genom två regeringsuppdrag arbetat för att utreda bakgrund och orsak till problematiken. Med syftet att undersöka eventuella samband mellan miljöfarliga ämnen och fiskhälsa, samt orsak till uppkomst av sårskadad fisk i området, genomfördes undersökningar i västra Hanöbukten under 2015-2017. Rapporten, Undersökningarna av Miljön i Hanöbukten 2015-2017 (Havs- och vattenmyndighetens rapport 2018:10), sammanfattar resultat som påvisar en fiskhälso-problematik som varierar mellan år.

Analyser av miljöfarliga ämnen i skrubbskädda och torsk visade inte på några generellt förhöjda halter av miljöfarliga ämnen i Västra Hanöbukten under 2015-2016 i jämförelse med referensstationerna. Däremot fann man att vitmärslans reproduktion i norra delen av Hanöbukten var påverkad. Frekvensen av missbildade och membranskadade embryon och andel honor med skadade embryon var hög vilket indikerar en miljögiftsproblematik. Det gick dock inte att koppla de vanligaste miljögifterna till de observerade effekterna hos vitmärslan. Vid uppföljande studier, genom så kallad non-target screening, identifierades molvikter som skulle kunna tolkas som att tillhöra bromerade aromatiska föreningar med naturligt ursprung (pers. komm. Lillemor Asplund). Som komplement till rapporten, Undersökningarna av Miljön i Hanöbukten 2015-2017, skrevs även en inlaga gällande ett tiaminbristscenario som stämmer överens med de fysiologiska effekter som observerats hos skrubbskäddan i Hanöbukten (HMI underlagsrapport 2017). Som del av undersökningarna av Miljön i Hanöbukten 2015-2017, noterades även olika miljöfaktorer så som uppvallning av näringsämnen i området samt stora mängder lösdrivande rödalger under studieperioden.

En slutsats från undersökningarna av miljön i Hanöbukten 2015-2017 är förekomst av episodiska förändringar av fiskens hälsotillstånd som indikerar exponering och avgiftning, påverkan på kolhydratmetabolism, syretransport och blodbildning

samt påverkan på immunförsvaret (Tabell 1). Utifrån ovan beskrivna problematik har följande substanser identifierats som intressanta att undersöka vidare med avseende på fiskhälsa; bromfenoler, cyanotxin och mikrocystin, tiamin samt PFAS. En kombination av vitaminbrist och exponering för miljögifter (naturliga såväl som antropogena) skulle kunna orsaka effekter som påverkad energiproduktion och immunförsvaret hos fisk. Immunförsvaret kan även påverkas negativt av nedsatt energimetabolism och hormonstörande ämnen.

Tabell 1. Några av de skillnader som observerades i skrubbskädda från Västra Hanöbukten jämfört med referenslokaler var större leverar, en högre andel omogna röda blodceller (iRBC) och glukoshalter i plasman år 2017. 2015 var andelen lymfocyter högre samt halterna av klorid, natrium och kalcium signifikant högre i plasman hos skrubbskädda från Västra Hanöbukten jämfört med referensstationen Kvädöfjärden. Plasmans kalciumhalter var signifikant högre i Västra Hanöbukten jämfört med referenslokalerna både i 2015 och 2016 års undersökningar, men däremot inte 2017. Aktiviteten av antioxidantenzymet glutationtransferas (GST) var högre i Västra Hanöbukten jämfört med referenslokaler både 2015 och 2017. Enzymet katalas var påverkat de tre åren. För 2015 visar resultaten att oxidantförsvaret är mer aktiverat hos fisken från Västra Hanöbukten jämfört med Kvädöfjärden (HaV 2018).

Mätvariabel	År
Förstorad lever	2015, 2017
Högre andel iRBC och glukoshalter	2017
Högre andel lymfocyter	2015
Påverkan jonbalans	2015, 2016
EROD	2015
Högre halter GST	2015, 2017
Mer aktiverat oxidantförsvaret	2015

Bromfenoler kan vara av antropogent ursprung, men bildas även naturligt av alger och cyanobakterier. Hydroxylerade polybromerade difenyletrar, OH-PBDEer har toxiska effekter som påverkar hormonsystemet och stör den oxidativa fosforyleringen (OXPHOS). Höga halter kan vara akuttoxiskt men även vid låga halter leder exponering till ett underskott av tillgänglig energi och avmagring (Legradi et al. 2014). Halter av bromfenoler i Östersjöfisk har ökat signifikant sedan 80-talet (Faxneld 2014) och miljöfaktorer kopplade till övergödning av havet bidrar till algernas utbredning samt produktion av bromerade föreningar (Dahlgren et al. 2015).

Cyanotoxiner som nodularin och mikrocystin ackumuleras i organ hos fisk som exponeras för algblomningar. Nodularin är vanligast förekommande och utgör upp till 90% av alla de cyanotoxiner som syntetiseras naturligt av algerna i Östersjön (Kankaanpää et al. 2009). Exponering för mikrocystin och nodularin kan leda till OXPHOS samt cancerogena effekter (Lankoff et al., 2002, Chen 2016). Halter av

cyanotoxiner kan variera stort mellan områden och över tid vilket är kopplat till intensitet, lokalisering av algblomning och en snabb nedbrytning av substanserna.

Tiamin (vitamin B1), produceras av primärproducenter och transporteras vidare i näringsväven. Tiamin behövs för grundläggande ämnesomsättning och brist leder till en rad olika symptom som förändrat beteende, nedsatt immunförsvar och reproduktionsstörningar (Balk 2016). Tillgång på tiamin/tiaminbrist uppvisar episodiska variationer, vilket tydligt observeras i samband med reproduktionssjukdomen M74 hos lax (Bengtsson et al. 1999).

Perflourerade alkylsyror (PFAS) når miljön från flera källor, huvudsakligen från industriell produktion. Beroende på hur långa tidsserier man tittar på, visar PFAS i strömning på ökande halter för vissa substansgrupper, men minskande eller oförändrade för andra (Bignert et al. 2017). Det finns belägg för immunotoxicitet och cancerogena effekter till följd av exponering för PFAS (Grandjean och Clapp 2015).

Denna studie, bör ses som en pilot studie vars syfte är att undersöka möjliga samband mellan hälsoparametrar hos skrubbskädda från Hanöbukten och förekomst av algtoxiner (bromfenoler, nodularin och mikrocystin), tiamin och PFAS. Målsättningen är att överföra forskningsresultat till redskap som kan tillämpas inom svensk miljöövervakning.

2 Metod

Undersökningarna av fiskhälsa hos skrubbskädda har genomförts av Jari Parkkonen och Lars Förllin, vid Institutionen för biologi och miljövetenskap, Göteborgs universitet. Kemiska analyser av bromfenoler, genomfördes av Dennis Lindqvist, institutionen för miljövetenskap och analytisk kemi, Stockholms universitet. Tiamin analyserades av Lennart Balk, Hanna Gustavsson och Josefin Engelhardt, institutionen för miljövetenskap och analytisk kemi, Stockholms universitet. Analys av nodularin och mikrocystin genomfördes av Hanna Mazur-Marzec, institute of Oceanography, University of Gdańsk, Polen. Analyser av PFAS genomfördes av Ingrid Ericson Jogsten, School of Science and Technology, Örebro Universitet.

2.1 Fiskhälsundersökningar

Undersökningarna av fiskhälsa har gjorts på skrubbskäddor som infångats 2018 nära Yngsjö/Åhus i Hanöbukten. Denna lokal ligger inte nära något känt lokalt utsläpp utan är vald för att kunna representera en generell påverkan/situation i Västra Hanöbukten.

Fångst och sumpning av fiskarna sköttes av yrkesfiskare enligt de standardiserade föreskrifter som finns för kustfiskundersökningar. Provtagning, provberedning och analyser gjordes enligt beskrivningar i undersökningstyp "Hälsotillstånd hos kustfisk – biologiska effekter på subcellulär och cellulär nivå (Naturvårdsverket, 2006-02-10). En sammanställning av de variabler som ingår i hälsoundersökningar som genomförs vid Göteborg universitet anges i tabell 2 (resultat från hälsoundersökningar på detta material är ännu ej sammanställt). Resterande material skickades till Naturhistoriska riksmuseet för långtidslagring i museets miljöprovbänk. Materialet provtogs sedan för vidare analys av PFAS, bromerade fenolära substanser, nodularin och mikrocystin samt tiamin.

Tabell 2. Effekt- och exponeringsvariabler/indikatorer som ingår i undersökningen av fiskens hälsotillstånd (Larsson och Förlin, 2006 ur HaV 2018).

Funktion	Mätvariabel / Biomarkör
Energilagring, tillväxt, kondition	Total kroppsvikt, somatisk vikt, längd, ålder, somatiskt konditionsfaktor
Fortplantning, hormonstörning	Gonadsomatiskt index (GSI), vitellogenin i blodplasma
Leverfunktion, avgiftning, oxidativ stress	Leversomatiskt index (LSI), EROD-aktivitet, aktiviteterna av glutathionreduktas (GR), glutathion S-transferas (GST) och katalas Blodglukos
Kolhydratmetabolism/stress Syretransport, blodbildning Immunförsvar, vävnadsskador Saltbalans, cellskador Exponeringsindikator	Hematokrit, omogna röda blodceller, hemoglobin
Energilagring, tillväxt, kondition	Vita blodceller: lymfocyter, granulocyter, trombocyter
Fortplantning, hormonstörning Leverfunktion, avgiftning, oxidativ stress	Klorid, natrium, kalium och kalcium i blodplasma
Kolhydratmetabolism/stress Syretransport, blodbildning Immunförsvar, vävnadsskador Saltbalans, cellskador Exponeringsindikator	EROD-aktivitet, GR-aktivitet, GST-aktivitet, och katalasaktivitet
Fortplantning, hormonstörning Leverfunktion, avgiftning, oxidativ stress	Gonadsomatiskt index (GSI), vitellogenin i blodplasma Leversomatiskt index (LSI), EROD-aktivitet, aktiviteterna av glutathionreduktas (GR), glutathion S-transferas (GST) och katalas Blodglukos

2.2 Kemiska analyser

2.2.1 Bromfenoler

Hydroxylerade och metoxylerade bromerade difenyletrar tillsammans med bromfenoler och bromanisoler extraherades från strax under ett gram plasma med hjälp av vätske-vätske extraktion. Surrogatstandarder för både fenolära samt neutrala substanser tillsattes innan extraktionen påbörjades. Efter extraktion separeras neutrala och fenolära ämnen. De fenolära ämnena derivatiserades genom metylering innan analys. Metodblankprover kördes parallellt med extraktionerna och all data blankkorrigerades. Analyserna utfördes med gaskromatografi masspektrometri (GC-MS). Masspektrometern arbetade i "electron capture negative ionization mode" (ECNI) och bromidjonerna m/z: 79 och 81 detekterades i "selective ion monitoring" (SIM). Alla halter uttrycks på färskvikt. För bromfenoler analyserades endast tio prov (jämfört med 20 för övriga ämnen). Anledningen var att man som del av denna pilot ville

begränsa antalet analyser eftersom man inte vet om bromfenoler är lämpliga att analysera i fisk som insamlats på hösten då nivåerna av dess substanser antas vara låga.

2.2.2 Tiamin

Tiamin analyserades i enlighet med metoder beskrivna i Balk et al. 2016. Halter anges på färskvikt.

2.2.3 Perfluorerade alkylsyror (PFAS)

De ämnesgrupper som inkluderats i studien är perfluorerade karboxylsyror (PFCAs, såsom perfluorerad oktansyra, PFOA), perfluorerade sulfonsyror (PFSA, såsom perfluorerad oktansulfonsyra, PFOS), perfluorerade telomersyror (FTSAs), omättade och mättade perfluorerade karboxylsyror (FTUCA och FTCA) samt nyare ersättningskemikalier (F53B och perfluoretylcyklohexansulfonsyra). Omkring 0.25 g muskelvävnad (färskvikt) från skrubbskädda användes för extraktion av PFAS-ämnen med hjälp av jonparsextraktion. Blankprover och kvalitetskontrollprov analyserades samtidigt med övriga prover. Innan extraktion tillsattes 13C-märkta standarder för att beräkna utbyte av extraktionen. Vätskekromatografi (LC) kopplat till tandemmasspektrometri (MS/MS) användes för instrumentell analys. Proverna analyserades i två omgångar. Till varje omgång analyserades även två blankprover samt två kvalitetskontrollprover. Blankerna användes för att beräkna metoddetektionsgränsen (medelvärde +3 standardavvikelse).

2.2.4 Nodularin och mikrocystin

Fiskproverna frystorkades och homogeniserades med mortel innan extraktion. Nodularin och mikrocystin extraherades med ultraljudassisterad extraktion med metanol. Extraktionen upprepades ytterligare en gång innan det sammanslagna extraktet evaporerades med rullindunstare. Det indunstade extraktet löstes sedan upp i 75% metanol och centrifugerades 15 min på 14 000 rpm innan analys. Analyserna utfördes med ”reversed phase” (C18) elektropray LC-MS/MS med en hybrid trippel quadrupole/linear ion trap masspektrometer. Analyterna detekterades i ”multiple reaction monitoring mode” (MRM).

3 Resultat och diskussion

3.1 Statistisk bearbetning

För värden under detektionsgräns beräknas halter genom följande beräkning, Detektionsgräns/ $\sqrt{2}$. Vissa substanser återfanns i mycket låga halter och i de fall mer 50 % av proven hade halter under detektionsgräns uteslöts datat från statistiska analyser. Detta gäller mikrocystin och PFOA, PFNA, PFOS, PFDA, samt PFUnDA. Statistiska samband undersöktes med linjära modeller i R 3.5.1. Alla hälsovariabler som anges i tabell 2 ingick i analyserna.

3.2 Bromfenoler

Generellt var koncentrationerna av bromfenoler låga (tabell 3). Halter av 6-OHBDE-47 låg på 48,68 pg/g färskvikt. Som jämförelse kan nämnas att tidigare analyser i plasma från skrubbskädda insamlade vid Askö i månadsskiftet juni/juli hade 50-70 ggr högre koncentration av fenolära substanser än dessa skrubbor (muntligen Dennis Lindqvist). Denna skillnad beror troligen inte på lokal, utan på säsong, d.v.s. hur nära produktionstoppen av bromfenoler som proverna är tagna. Materialet i denna studie är insamlat i slutet av augusti. Säsongvariationer av bromerade fenolära substanser i blåmusslor har tidigare visat att halterna kan variera med upp till nästan 100 ggr över sommaren (Dahlberg et al. 2016).

En förändrad aktivitet av leverenzymmer kan påvisa om det föreligger en ökad oxidativ stress hos fisk samt indikerar exponering för miljögifter. I den här studien minskade aktiviteten av lever enzymet glutationsreduktas (Gr) signifikant med ökande halter av 6-OHBDE-47 (figur 1, tabell 4).

Halten glukos i blodet ger en uppfattning om energimetabolismen är påverkad. Här observeras signifikant minskande nivåer av glukos med ökande halter av 6-OHBDE-47 (figur 1, tabell 4). Från 2017 års undersökningar i Hanöbukten visade

resultat högre glukoshalter i plasman hos fisken i Västra Hanöbukten jämfört med referensen Torhamn vilket kan tyda på en påverkan av glukosomsättningen (Havs- och vattenmyndighetens rapport 2018:10). En sådan förändring av glukoshalterna är inte unik för skrubbskädda i Västra Hanöbukten utan har även rapporterats hos fiskar vid andra lokaler i Östersjön (Ericson 2017).

Leverförstoring kan vara ett tecken på påverkan av miljöfarliga ämnen. I den här studien observeras minskande nivåer av leversomatiskt index (LSI) med ökande halter av 2,4,6- TBP (figur 1, tabell 4). I 2015 och 2017 års undersökning i Hanöbukten observerades större leverar hos skrubbskädda i Västra Hanöbukten jämfört med referenslokaler (Havs- och vattenmyndighetens rapport 2018:10).

Andelen outvecklade röda blodceller (iRBC) indikerar nivå av blodbildning. Möjligen kan det även vara kopplat till hormonstörande effekter via en påverkan på sköldkörteln (Gao et al. 2017). Här syntes samvariation mellan ökande halter av 6-OHBDE-47 och iRBC (figur 1, tabell 4). Vid de tidigare undersökningarna i Hanöbukten observerades en högre andel iRBC hos fisken från Västra Hanöbukten jämfört med referensstationerna under 2017, men ej under 2015 och 2016 (Havs- och vattenmyndighetens rapport 2018:10).

Innehållsförteckning

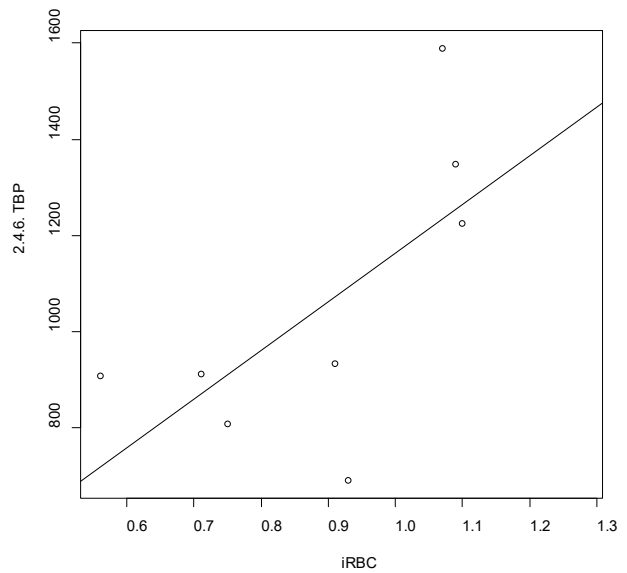
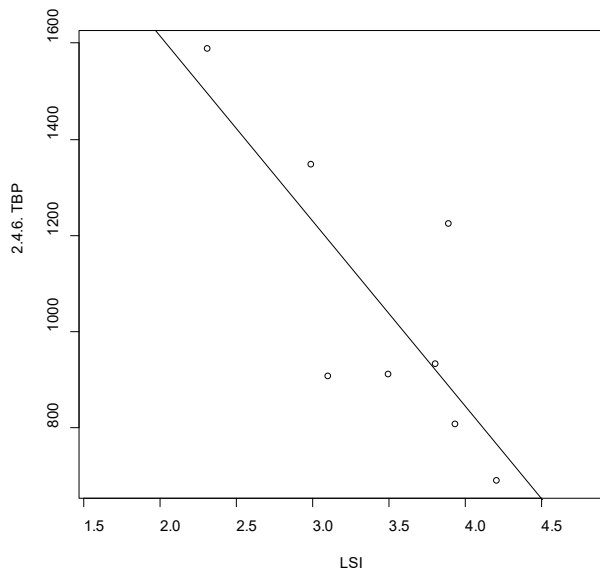
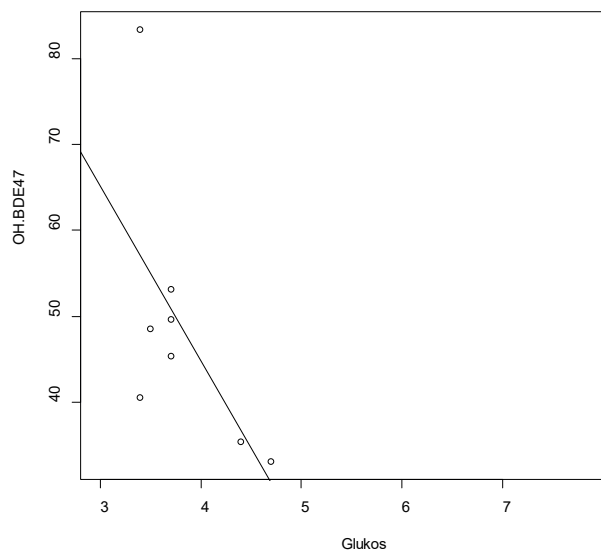
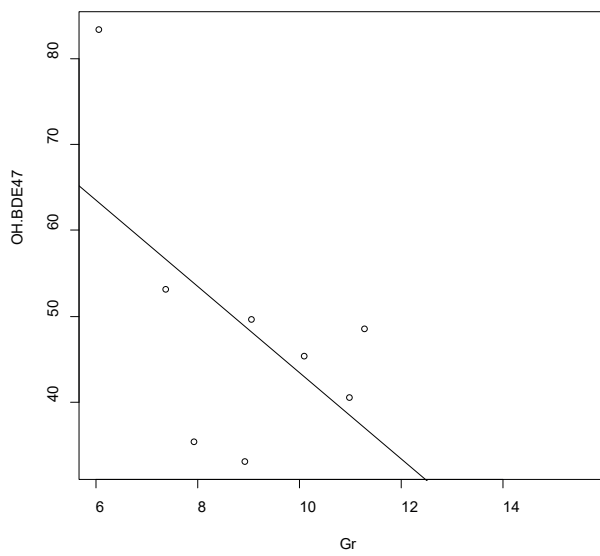
1	Inledning	6
2	Metod	9
2.1	Fiskhälsundersökningar	9
2.2	Kemiska analyser	10
2.2.1	Bromfenoler	10
2.2.2	Tiamin	11
2.2.3	Perflourerade alkylsyror (PFAS)	11
2.2.4	Nodularin och mikrocystin	11
3	Resultat och diskussion	12
3.1	Statistisk bearbetning	12
3.2	Bromfenoler	12
3.3	Tiamin	17
3.4	Nodularin och mikrocystin	19
3.5	Perflourerade alkylsyror (PFAS)	19
4	Slutsats	22
5	Erkännanden	23
6	Referenser	24

Tabell 3. Halter av bromfenoler i skrubbskädda från Hanöbukten insamlade 2018. Halter anges som pg/g färskvikt.

	2,4,6-Tri- bromfenol	6'-OH- BDE49	2'-OH- BDE68	6-OH- BDE47	6-OH- BDE90	6-OH- BDE99	2,4,6-Tri- bromani- sol	2'-MeO- BDE68	6-MeO- BDE47	Sum TBP/TBA	Sum OH- BDE	Sum MeOH- BDE	Sum ME/OH- BDE
Mean	1052,33	8,24	15,67	48,68	14,8	14,77	260	25	22	1312	98	46	145
SD	304,59	1,24	2,33	15,67	3,33	2,79	105	3	15	307	16	16	16
SE	107,69	0,44	0,82	5,54	1,36	0,98	37	2	5	109	6	6	6
n	8	8	8	8	6	8	8	8	8	8	8	8	8

Tabell 4. Signifikanta resultat mellan resultat från fiskhälsoundersökningar i skrubbskädda och PFAS, tiamin, bromfenoler och nodularin.

Ämnesgrupp	Substans	Variabel	Estimate	Std. Error	t	Pr(> t)
PFAS	PFNA	Intercept	0,13	0,04	3,5	0,003**
		Granulocyter	-0,09	0,04	-2,32	0,03*
	PFOS	Intercept	0,24	0,056	4,23	>0,01***
		Granulocyter	-0,12	0,06	-2,26	0,04*
	PFNA	Intercept	0,13	0,04	3,5	>0,01**
		Granulocyter	-0,09	0,04	-2,32	0,03*
PFOS	Intercept	0,24	0,06	4,23	>0,01***	
	Granulocyter	-0,13	0,06	-2,23	0,04*	
Tiamin	Brain Sum T	Intercept	21,15	2,61	8,11	>0,01***
		Katalas	-0,03	0,01	-2,48	0,02*
	Liver Sum T	Intercept	4,41	2,01	2,2	0,04*
		iRBC	7,08	1,93	3,67	>0,01**
Bromfenoler	6-OHBDE-47	Katalas	-0,03	0,01	-4,18	>0,01***
		Intercept	193,9	27,12	7,15	>0,01***
		Gr	-6,01	1,49	-4,03	0,01*
	2,4,6-TBP	Glukos	-23,97	5,63	-4,26	>0,01**
		Intercept	1493,04	273,45	5,46	>0,01**
		LSI	-346,24	57,14	-6,1	>0,01**
	iRBC	852,23	179,02	4,76	>0,01**	



Figur 1. Samband mellan de bromerade halogenerade föreningarna, OH-BDE47 och 2,4,6-TBP samt ett antal hälsovariabler mätta i skrubbskädda. Halter anges som pg/g färskvikt. OH-BDE 47 och a) glutationsreduktas (Gr, nmol/mg protein x minut) och b) glukos (nmol/l) samt summa TBP och c) leversomatiskt index (LSI) och d) andel omogna röda blodceller (iRBC).

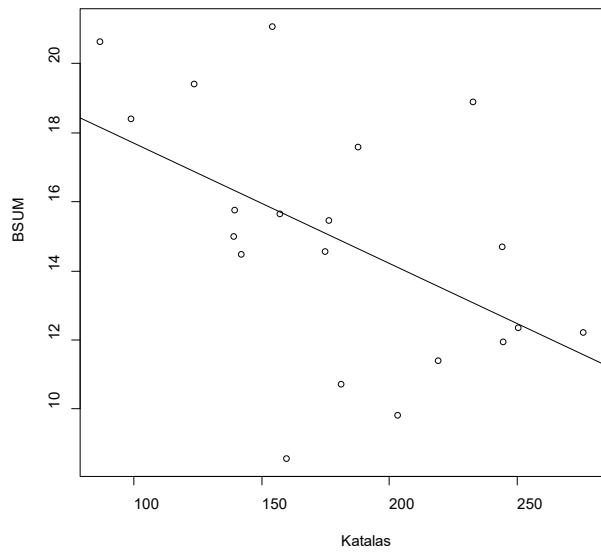
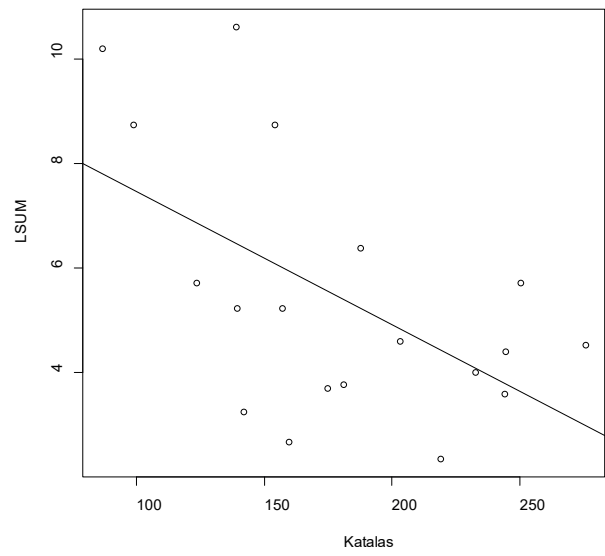
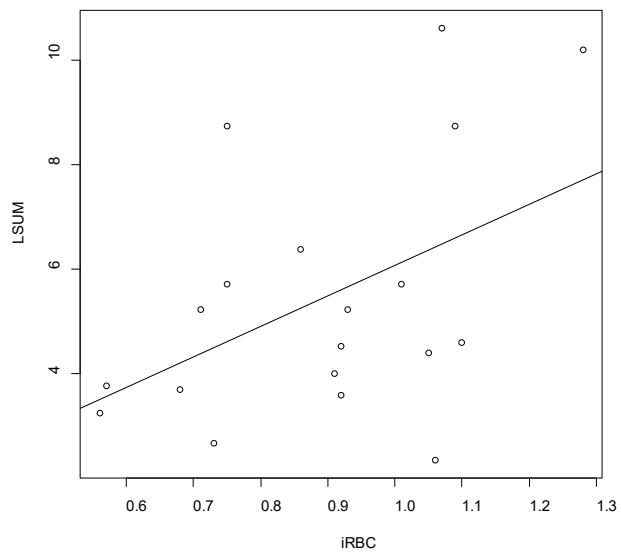
3.3 Tiamin

Halterna av tiamin (T), tiamin monofosfat (TMP), tiamin difosfat (TDP) och summa (T+TMP+TDP) var generellt högre i hjärna än i lever (tabell 5). Halter av tiamin har inte undersökts i skrubbskädda vid denna tid på året tidigare så det är svårt att dra någon slutsats om relativa halter.

I den här studien syns en ökad aktivitet av leverenzymet katalas som samvarierar med minskande halter av tiamin (figur 2, tabell 4). En ökad enzymaktivitet till följd av någon form av stimuli som t.ex en ökande belastning av främmande ämnen tyder på att fisken är utsatt för oxidativ stress. Tidigare studier på skrubbskädda från Hanöbukten (HaV 2018) visade att aktiviteten av antioxidantenzymet glutationtransferas (GST) var högre i Västra Hanöbukten jämfört med referenslokaler både 2015 och 2017. Enzymet katalas var mer eller mindre påverkat under de tre åren. En ökad aktivitet av leverenzymerna, glutationsreduktas och katalas har tidigare noterats hos abborre från referensstationer inom det nationella miljöövervakningsprogrammet för fiskhälsa vid lokalerna Torhamn, Holmöarna och Kvädöfjärden (Ericson 2017).

Tabell 5. Halter av tiamin (T), tiamin monofosfat (TMP), tiamin difosfat (TDP) och summa (T+TMP+TDP), angivet i nmol/g i lever och hjärna hos skrubbskädda från Hanöbukten insamlad i augusti 2018.

Matris	Lever					Hjärna				
	Vikt (mg)	T (nmol/g)	TMP (nmol/g)	TDP (nmol/g)	SUM (T+TMP+TDP) (nmol/g)	Vikt (mg)	T (nmol/g)	TMP (nmol/g)	TDP (nmol/g)	SUM (T+TMP+TDP) (nmol/g)
Mean	199,13	0,01	0,90	4,54	5,44	146,28	1,09	2,65	11,19	14,93
SD	5,98	0,01	0,56	1,93	2,45	25,62	0,53	0,72	2,45	3,60
SE	1,37	0,00	0,13	0,44	0,56	5,88	0,12	0,16	0,55	0,81
n	19	11	19	19	19	19	20	20	20	20



Figur 2. Samband mellan summahalter av tiaminhalt i lever (LSUM) och i hjärna (BSUM). LSUM plottat mot (a) iRBC och (b) katalas. BSUM plottat mot (c) katalas. Halter av tiamin anges i nmol/g.

3.4 Nodularin och mikrocystin

Nodularin detekterades i 10 prov. Halterna varierade från 20 till 42,80 ng/g torrsvikt med en medelvikt på 16,56 ng/g torrsvikt i fiskmuskel (tabell 6). Halterna i muskel anses låga och kan till viss del förklaras av att nodularin vanligen analyseras i lever där det uppmäter högre halter. I en studie av halter av nodularin i skrubbskädda från Finska viken, uppmättes halter av nodularin i muskel till 30-70 ng/kg (torrsvikt) och de högsta halterna återfanns i lever på 140 ng/kg (torrsvikt). Ingen av de mikrocystin som analyserades för detekterades i proven.

Tabell 6. Halter av nodularin (ng/g torrsvikt) i skrubbskädda från Hanöbukten insamlade 2018. Nodularin (ng/g torrsvikt) Mean 16,56 SD 12,25 SE 3,87 n 10

	Nodularin (ng/g torrsvikt)
Mean	16,56
SD	12,25
SE	3,87
n	10

3.5 Perfluorerade alkylyror (PFAS)

Det vanligast förekommande ämnet var perfluornonansyra (PFNA) som uppmättes i samtliga prov. PFOS detekterades i 19 av proverna och perfluorundekansyra (PFUnDA) i 17 prover. Uppmätta koncentrationer varierade från låga pg/g-koncentrationer till 0.36 ng/g muskelvävnad för PFOS som var den högsta koncentrationen som uppmättes. Summan av de uppmätt ämnen varierade mellan 0.02 och 0.95 ng/g färsksvikt i muskel.

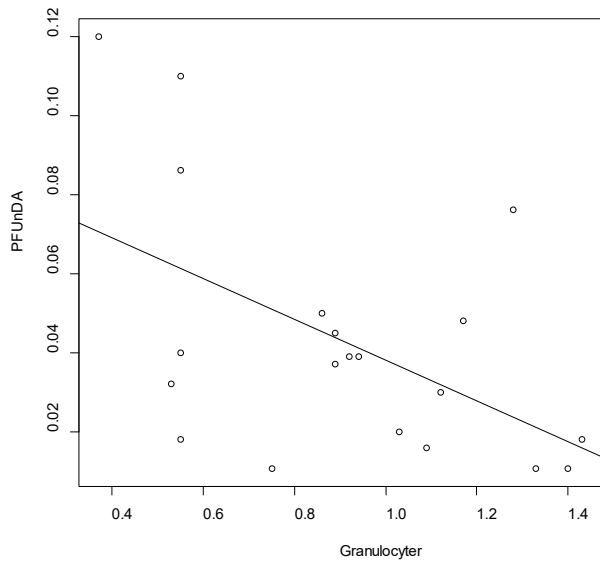
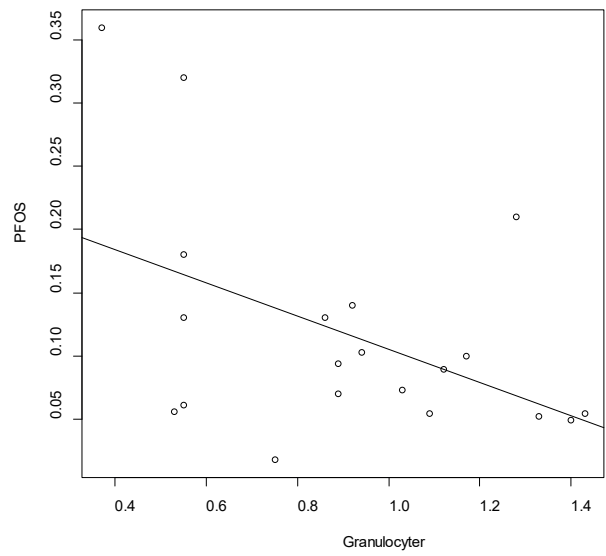
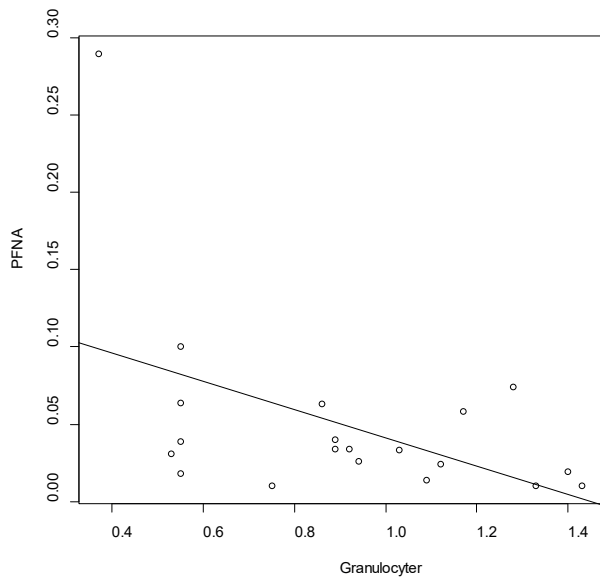
I fiskmuskel från skrubbskädda kunde sju av 30 analyserade PFAS-ämnen mätas i något av de 20 analyserade proverna (tabell 7). Perfluornonansyra (PFNA) var det enda ämne som kunde mätas i samtliga prov. Därefter förekom mätbara halter PFOS i 19 prov och perfluorundekansyra PFUnDA i 17 prov. Den högsta uppmätta koncentrationen var för PFOS (0.022-0.36 ng/g färsksvikt muskel). Koncentrationen av PFNA var 0.010-0.29 ng/g och för PFDA 0.006-0.17 ng/g. Vidare uppmättes perfluordekansyra (PFDA) i 14 prov i koncentrationer mellan 0,006 och 0,17 ng/g), perfluoroktansyra (PFOA) i 10 prov (0,0004-0,04 ng/g) och perfluorhexansulfonsyra i sex prov (0.004-0.013 ng/g). Perfluordodekansyra (PFDoDA) uppmättes i tre av proverna. Övriga analyserade ämnen kunde inte detekteras över detektionsgränsen för respektive ämne som varierade mellan 0.001 och 0.12 ng/g. Summan av de uppmätta ämnena varierade mellan 0.02 och 0.95 ng/g färsksvikt i muskel. De uppmätta halterna är lägre än vad som tidigare uppmätts i matfisk från Östersjön

utanför den fiska kusten. I dessa prover från 2009-2010 (ref) var PFOS det ämne som uppmättes i högst koncentration mellan 0.31-46 ng/g.

Halter av PFNA, PFOS och PFUnDA var signifikant kopplade till minskande värde för granulocyter (tabell 7, figur 3).

Tabell 7. Halter av PFAS (ng/g torrsvikt) i skrubbskädda från Hanöbukten insamlade 2018.

Halter ng/g färskvikt				
	PFNA	PFOS	PFDA	PFUnDA
Mean	0,05	0,12	0,04	0,04
SD	0,06	0,09	0,04	0,03
SE	0,01	0,02	0,01	0,01
<i>n</i>	20	20	19	20



Figur 3. Samvariation mellan granulocyter och a) PFNA, b) PFOS och c) PFUnDA i skrubbskädda. Halter av PFAS anges i ng/g torrvtkt.Slutsats

4 Slutsats

Trots generellt låga halter av algtoxiner och PFAS visar resultaten i den här studien att majoriteten av de effekt- och exponerings funktioner som ingår i undersökningar av skrubbskäddans hälsotillstånd i Hanöbukten 2018 samvarierade med halter av bromfenoler, tiamin och PFDA. Däribland exponeringsindikatorer, immunförsvar, leverfunktion, avgiftning och oxidativ stress, syretransport och blodbildning samt kolhydratmetabolism/stress.

Symptom som avmagring (energiupplagring), nedsatt immunförsvar och fortplantningsstörningar har observerats hos flera olika arter i Östersjön (Aneer, 1987, Bengtsson et al. 1999, Österblom et al. 2001, Bäcklin et al. 2005, Waldeck et al. 2013, Mörner et al. 2017). Det gäller populationsminskningar och även förändrad artsammansättning och funktion i ekosystemet. Sannolikt är detta ”problemkomplex” kopplat till ekosystemeffekter. Det finns inte endast en faktor utan flera samverkande faktorer som inkluderar klimatförändringar, saltvatteninträngning, överfiske, övergödning, miljöfarliga ämnen (miljögifter, naturprodukter och bristsymptom). Det finns ett behov av samverkan över ett flertal ämnesdiscipliner för att närmare identifiera orsaker och föreslå åtgärder.

Av de substanser som ingår i studien, ingår endast PFAS i löpande miljöövervakning. För att öka möjligheten att kunna koppla orsak och verkan vid biologisk effektövervakning är det önskvärt att inkludera mätning av bromfenoler och tiamin i de nationella övervakningsprogrammen.

5 Erkännanden

Vi vill tacka Lennart Balk, Lars Förlin, Henrik Dahlgren, Ann-Britt Florin och Helena Strömberg för många värdefulla kommentarer på rapporten.

6 Referenser

- Aneer, G. 1987. High natural mortality of Baltic herring (*Clupea harengus*) eggs caused by algal exudates? *Marine Biology* 94: 163-169.
- Balk, L. et al. 2016. Widespread episodic thiamine deficiency in Northern Hemisphere wildlife. *Sci. Rep.* 6, 38821.
- Bengtsson, B-E., Hill, C., Bergman, Å., Brandt, I., Johansson, N., Magnhagen, C., Södergren, A., and Thulin, J. 1999. Reproductive disturbances in Baltic fish: a synopsis of the FIRE project. *Ambio* 28:2–8.
- Bignert, A., Danielsson, S., Ek, C., Faxneld, S., Nyberg, E. 2017. Comments Concerning the National Swedish Contaminant Monitoring Programme in Marine Biota, 2017 (2016 years data), 10:2017, Swedish Museum of Natural History, Stockholm, Sweden.
- Bäcklin, B-M. and Bergman, A. 2005. Increased prevalence of intestinal ulcers in Baltic grey seals. Symposium on Biology and Management of Seals in the Baltic area, 15–18 February 2005 Helsinki, Finland.
- Chen, L., Chen, J., Zhang, X., Xie, P. 2015. A review of reproductive toxicity of microcystins. *J. Hazard. Mater.*, 301:381-399.
- Dahlberg, A. K.; Chen, V. L.; Larsson, K.; Bergman, A.; Asplund, L. 2016. Hydroxylated and methoxylated polybrominated diphenyl ethers in long-tailed ducks (*Clangula hyemalis*) and their main food, Baltic blue mussels (*Mytilus trossulus* x *Mytilus edulis*) *Chemosphere*, 144: 1475– 1483.
- Dahlgren, E., Enhus, C., Lindqvist, D., Eklund, B., Asplund, L. 2015. Induced production of brominated aromatic compounds in the alga *Ceramium tenuicorne*. *Env. Sci. Pollut.* 22:18107-18114.
- Ericson, Y mfl. 2017. Faktablad från integrerad kustfiskövervakning 2017.
- Faxneld, S, Helander, B., Bäcklin, BM., Moraeus, C., Roos, A., Berger, U., Egebäck, AL., Strid, A., Kierkegaard, A., Bignert, A. 2014. Biological effects and environmental contaminants in herring and Baltic Sea top predators. *Naturhistoriska Riksmuseet, Rapport nr 6:2014.*
- Gao, X., Lee, H., Li, W., Jeffrey, R., Barrasa, M.I., Ma, Q. 2017. Thyroid hormone receptor beta and NCOA4 regulate terminal erythrocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 114: 10107–10112.
- Grandjean P, Clapp R. 2015. Perfluorinated alkyl substances: Emerging insights into health risks. *New Solut* 25(2):147–163.
- HaV 2018. Havs- och vattenmyndighetens rapport 2018:10. Miljön i Hanö-bukten 2015-2017 – finns det ett samband mellan tillståndet för fisken, dess hälsa och belastningen av miljöfarliga ämnen?

- HMI 2017, underlagsrapport. Hansson, T och Balk, L. Sannolik tiaminbrist i Hanöbukten. Sipiä, V., Kankaanpää, H., Lahti, K., Carmichael, W.W., Meriluoto, J., 2001a. Detection of nodularin in flounders and cod from the Baltic Sea. *Environ. Toxicol.* 16, 121–126. 6 Referenser
- Kankaanpää, H., Sjövall, O., Huttunen, M., Olin, M., Karlsson, K., Hyvärinen, K., Sneitz, L., Harkonen, J., Sipiä, V.O., Meriluoto, J.A.O., 2009. Production and sedimentation of peptide toxins nodularin and microcystin in the northern Baltic Sea. *Environ. Pollut.* 157 (157), 1301–1309.
- Lankoff, A., Banasik, A., Nowak, M., 2002. Protective effect of melatonin against nodularin-induced oxidative stress in mouse liver. *Arch. Toxicol.* 76 (3), 158–165.
- Legradi, J., Dahlberg, AK., Cenijn, p., Marsh, G., Asplund, L., Bergman, A., Legler, J. 2014. Disruption of oxidative phosphorylation (OXPHOS) by hydroxylated polybrominated diphenyl ethers (OH-PBDEs) present in the marine environment. *Environ. Sci. Technol.* 148: 14703-14711.
- Mörner, T., Hansson, T., Carlsson, L., Berg, A.-L Ruiz Muñoz, Y., Gustavsson, H., Mattsson, R., Balk, L. 2017. Thiamine deficiency impairs common eider (*Somateria mollissima*) reproduction in the field. *Sci. Rep.* 7: 14451.
- Waldeck, P and Larsson, K. 2013. Effects of winter water temperature on mass loss in Baltic blue mussels: Implications for foraging sea ducks. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 444, 24–30
- Österblom, H., Bignert, A., Fransson, T., Olsson, O. 2001. A decrease in fledging body mass in common guillemot *Uria aalge* chicks in the Baltic Sea. *Mar Ecol Prog Ser* 224: 305–309.

