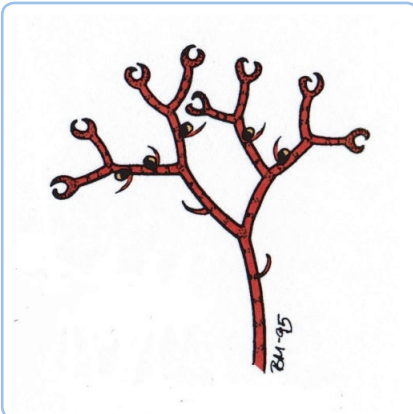


Utvärdering av biologiska tester gjorda på svenska skogsindustriavlopp 2001-2007

RAPPORT 6304 • OKTOBER 2009



Utvärdering av biologiska tester gjorda på svenska skogsindustri- avlopp 2001-2007

Rapport 6304

Bengt-Erik Bengtsson, Magnus Breitholtz, Britta Eklund och Tomas Viktor

NATURVÅRDSVERKET

Beställningar

Ordertel: 08-505 933 40

Orderfax: 08-505 933 99

E-post: natur@cm.se

Postadress: CM Gruppen AB, Box 110 93, 161 11 Bromma

Internet: www.naturvardsverket.se/bokhandeln

Naturvårdsverket

Tel: 08-698 10 00, fax: 08-20 29 25

E-post: registrator@naturvardsverket.se

Postadress: Naturvårdsverket, SE-106 48 Stockholm

Internet: www.naturvardsverket.se

ISBN 978-91-620-6304-7.pdf

ISSN 0282-7298

© Naturvårdsverket 2009

Elektronisk publikation

Omslag: illustration: Bibbi Mayrhofer (ovan till vänster), Göte Göransson (ovan till höger) och Bengt-Erik Bengtsson (nedan till höger)

Förord

Projektet har genomförts som ett samarbete mellan Institutionen för Tillämpad Miljövetenskap (ITM) vid Stockholms universitet och IVL Svenska Miljöinstitutet.

Projektet har finansierats med medel från SSVL, Stiftelsen Skogsindustriernas Vatten- och Luftvårdsforskning och Naturvårdsverket.

Naturvårdsverket har inte tagit ställning till innehållet i rapporten. Författarna svarar ensamma för innehåll, slutsatser och rekommendationer.

Innehåll

FÖRORD	3
INNEHÅLL	4
SAMMANFATTNING	6
SUMMARY	7
BAKGRUND OCH SYFTE	8
TESTARTER OCH METODER	10
Makroalgen <i>Ceramium tenuicorne</i>	10
Testmetoder - <i>Ceramium</i>	10
Reproduktionstest - <i>Ceramium</i>	11
Tillväxthämningstest – <i>Ceramium</i>	12
Kräftdjuret (harpacticoiden) <i>Nitocra spinipes</i>	12
Testmetoder – <i>Nitocra</i>	12
Sebrafisk (<i>Danio rerio</i>)	14
Testmetoder - Sebrafisk	14
Aktuella försöksbetingelser	15
Lekprocedur	16
Embryo/ungelttest	16
Flergenerationstest	16
Exponering av embryo/ungel	17
Provtagning	17
Vitellogeninanalys	18
Gonadmorfologisk analys	18
STATISTISKA UTVÄRDERINGSMETODER (ALLA TESTER)	19
<i>Ceramium</i>	19
Repetierbarhet och reproducerbarhet av <i>Ceramium</i> tillväxthämningstest	19
<i>Nitocra</i>	19
Sebrafisk	20
Repetierbarhet och reproducerbarhet för embryo/ungelttester	20
RESULTAT OCH DISKUSSION	21
<i>Ceramium</i>	21
<i>Nitocra</i>	22
Sebrafisk	25

Allmänt	25
Validering av försöksmetodiken	25
Tillväxt	26
Reproduktionstester	30
Påverkan på två generationer fisk av avloppsvatten före behandling	35
Endokrina störningar hos första och andra generationens fiskar	37
Sammanfattning - Sebrafisk	41
ÖVERGRIPANDE DISKUSSION OCH REKOMMENDATIONER	43
ERKÄNNANDEN	48
REFERENSER	49

Sammanfattning

Det primära syftet med föreliggande utvärdering var att bedöma tillförlitligheten och tolkbarheten av resultat från biologiska karakteriseringar av 14 avloppsvatten från svensk massaindustri. Det sekundära syftet var att undersöka i vilken utsträckning metoderna kan godkännas för fortsatt användning, om de behöver modifieras, eventuellt kan förenklas eller behöver ersättas av helt nya metoder. Testerna har omfattat enstaka eller kombinationer av subletala tester med de inhemska arterna rödalgen *Ceramium tenuicorne*, kräftdjuret *Nitocra spinipes* samt den tropiska Sebrafisksen (*Danio rerio*). Merparten av undersökningarna är utförda som uppdrag inför nya tillståndsprövningar, t ex i samband med utbyggnad av produktionskapacitet eller modifiering/nybyggnad av extern vattenrening. Jämförelser av olika vedråvaror, processer och reningssystem har inte ingått i uppdraget.

Utvärderingen visar att samtliga tre testarter och testsystem genomgående har fungerat väl och har kunnat visa att renade avloppsvatten har låg eller ingen toxicitet. Därmed har det kunnat fastslås att genomförda reningsåtgärder haft avsedd effekt och att efter normal utspädning av avloppsvattnet i recipienten ingen allvarlig miljöpåverkan bör förväntas. Det framgår också att utrymme för förenkling av använda tester kan göras, utan att känsligheten och tolkbarheten minskar. Det framgår således att *Ceramium*-reproduktion, kan ersättas med *Ceramium*-tillväxthämning, att *Nitocra*-livscykeltest kan ersättas med *Nitocra*-larvdöd/larvutveckling och att Sebrafiskstestet kan kortas genom att 2-generationstestet ersätts med ett 1-generationstest.

Detta medför enklare testförfarande, kortare testtider och lägre kostnader. Det är av stor vikt att även forstsättningsvis tester genomförs på flera trofinivåer, d v s på både växter, kräftdjur och fisk, för att så bra som möjligt kunna bedöma eventuella giftigheter hos avloppsvattnen.

Summary

The prime purpose with the present evaluation was to judge reliability and interpretation of results from biological characterizations of 14 waste streams from Swedish pulp mill industries. A further purpose was to investigate to what extent the methods can be considered qualified for continuous use or whether they need to be modified or replaced by other methods. The biological tests have included single or combinations of sublethal tests with the native red alga *Ceramium tenuicorne*, the native harpacticoid copepod *Nitocra spinipes* and the tropical zebra fish (*Danio rerio*). The majority of the investigations have been conducted as assignments from the concerned industries as a prerequisite for rewriting or extension of existing effluent permits as required by national environmental protection authorities. Comparisons of toxic contributions from mill-specific factors, e.g. raw (wood) material qualities, pulping processes and waste water treatment systems are not included in the present evaluation.

All three species and the applied biological test systems have functioned well and showed that all treated effluents had low or no toxicity. It has thus been possible to demonstrate that the installed waste water treatment systems are functional and this, in combination with the existing dilution conditions in the receiving water bodies, indicate a very low or practically no risk for environmental damage. It was also shown that there is room for simplification of the used tests without losing sensitivity and ability to interpret the results. Accordingly, future tests of pulp mill effluents may be modified as follows: the *Ceramium*-reproduction test may be replaced by a *Ceramium*-growth inhibition test, the *Nitocra*-life cycle test may be replaced by a *Nitocra*-larval mortality/larval development test; and the zebrafish-2-generation test may be replaced by a 1-generation test. This altogether will yield faster results, simplified test conditions and lower costs per test.

It is concluded that the concept used in the present project, i.e. to use sublethal endpoints to test organisms from three different trophic levels (i.e. plant, crustacean and fish), remains very relevant to estimate potential risks to the environment from waste water effluents.

Bakgrund och syfte

Under 2001 tog Naturvårdsverkets (NV) skogsindustrienhet beslut om att tillämpa ett biologiskt testpaket för testning av skogsindustriavlopp baserat på tre trofinivåer, nämligen alg (primärproducent), kräftdjur (primärkonsument) och fisk (sekundärkonsument), och att reproduktionseffekter skulle utgöra den centrala effektvariabeln åtminstone för kräftdjuret och fisken. De praktiska förutsättningarna för detta förelåg i form av att relativt väl etablerade testmetoder med makroalgen *Ceramium tenuicorne*, kräftdjuret, *Nitocra spinipes* (hoppkräfta) och sebrafisk (*Danio rerio*) fanns tillgängliga inom landet och var för sig hade visat sig kunna fungera vid tester av komplexa avloppsvatten. Redan då beslutet togs vid NV nämndes också behovet av en kommande utvärdering av resultaten, när tillräcklig testerfarenhet av det nya testpaketet erhållits. Föreliggande rapport utgör en sådan utvärdering, baserad på 6 års erfarenhet från totalt 14 olika avloppsvatten där de tre i paketet ingående organismgrupperna utnyttjats i större eller mindre utsträckning (Tab. 1).

Tabell 1. Undersökta skogsindustriella avloppsvatten under åren 2001-2005 med flergenerationstester med sebrafisk (S) och *Nitocra spinipes* (N) samt *Ceramium* tillväxt (Ct) respektive reproduktion (Cr).

Fabrik	Tid för provtagn	Testarter	Avloppsvatten	Recipient
Iggesund	23-26/8 00	S	Utg. bef. biologisk rening	Bottenhavet
Iggesund	20-23/7 00	S	Utg. med förstärkt luft	Bottenhavet
Mönsterås	9/2 2001	CrCtNS	Efter bef. luftad damm	Östersjön
Kvarnsveden	17/5 2001	NS	Utg. efter biologisk beh	Dalälven
Smurfit kappa	okt 2001	CtNS	Tot. avlopp före biopilot	Piteälvens delta
Smurfit kappa	okt 2001	CtNS	Tot. avlopp efter biopilot	Piteälvens delta
Skärblacka	sept 2002	S	Efter bef. luftad damm	Glan
Munksund	okt 2002	CtNS	Tot. avlopp före biopilot	Piteälvens delta
Munksund	okt 2002	CtNS	Tot. avlopp efter biopilot	Piteälvens delta
Mörum	juli 2003	CtNS	Nybyggd bioreaktor	Östersjön
Vallvik 03	april 2005	CtS	Efter sedimentering	Bottenhavet
Vallvik 05	april 2005	CtS	Efter sedimentering	Bottenhavet
Östrand	april/maj 05	S	Nybyggd bioreaktor	Bottenhavet
Värö	apr 2005	CtN	Efter bioreaktor	Västkusten

Utvärderingsarbetet har utförts på uppdrag av dels NV, dels SSVL, som bidragit med SEK 50 000 vardera till ITM, samt ett bidrag från SSVL till IVL på SEK 100 000.

Efterfrågan på de aktuella testerna för klassificering av skogsindustriavlopp har varit låg på senare tid, bl a beroende på överklaganden till Miljödomstolen (MD), men stora testbehov kan förväntas framöver. Det kan därför vara av stort värde för berörda myndigheter (NV, MD, Lst) samt industrin att inför kommande testbehov en utvärdering av föreliggande slag kommit till stånd och som, förhoppningsvis, resulterar i en samsyn på vad testerna hittills har givit och hur testerna bör se ut i framtiden.

Följande personer har medverkat i utvärderingen:

Bengt-Erik Bengtsson, koordinator, professor i akvatisk ekotoxikologi - särskilt biotester vid ITM, Stockholms universitet. Expert inom Ecotoxicology Task Force i ECVAM (European Center for Evaluation of Alternative Methods), Ispra, Italien
Magnus Breitholtz, docent i tillämpad miljövetenskap vid ITM, svensk expert på kräftdjurstester inom OECD's standardiseringsarbete

Britta Eklund, docent i tillämpad miljövetenskap vid ITM, svensk expert på algtester inom SIS och ISO's standardiseringsarbete

Tomas Viktor, biotestsakkunnig vid IVL, Svenska Miljöinstitutet, utförare och utvärderare av de aktuella sebrafisktesterna

Testarter och Metoder

Makroalgen *Ceramium tenuicorne*

Ceramium tenuicorne är en fintrådig röd makroalg (Rhodophyta) som tillhör familjen Ceramiaceae. Algen blir som mest ca 1 dm lång och den växer på sten, klippor och på andra större algar i det kustnära ekosystemet. Den är viktig i detta ekosystem genom att den är en primärproducent och utgör föda för flera evertebra-ter som i sin tur utgör föda för fisk högre upp i näringskedjan. *Ceramium* är även underlag för strömmingen att lägga sina ägg på liksom att den tillsammans med andra makroalger utgör det tredimensionella livsutrymme som fungerar som upp-växtmiljö för ett stort antal andra organismer som olika kräftdjur, snäckor och upp-växande fiskyngel.

C. tenuicorne är en kosmopolitisk art som är vanligt förekommande i tempererade vatten både på norra och södra jordklotet. Tidigare var arten uppdelad i en marin art och en brackvattensart för Östersjön (Rueness 1978, Rueness & Kornfeldt 1992). Senare systematiska studier har visat att det är samma art men olika former (kloner), där båda numera ska heta *Ceramium tenuicorne* (Gabrielsen *et al.* 2003). I Sverige finns arten längs med hela kusten från norska gränsen upp till Bottenviken och kallas på svenska för Ullsleke.

Testmetoder - *Ceramium*

För *Ceramium* finns det två olika testmetoder utvecklade, dels ett reproduktions-test, dels ett tillväxthämningstest. Reproduktionstestet utvecklades först och har använts huvudsakligen innan sekelskiftet (Eklund 1993, 1998, Eklund *et al.* 1996). Reproduktionstestet fungerar i salthalter över 20 ‰. Med brackvattensklonen blev befruktningens frekvens aldrig tillräckligt hög för att medge bra statistisk bearbetning av resultaten. Av denna anledning utvecklades istället ett tillväxthämningstest med både den marina klonen och brackvattensklonen. Detta test är något enklare att hantera och uppvisar samma känslighet (Tab. 2 nedan).

Inverkan av olika omgivningsfaktorer, såsom temperatur, ljus, typ av saltvatten etc. på tillväxt hos *Ceramium* har undersökts och publicerats i en vetenskaplig artikel (Eklund 2005).

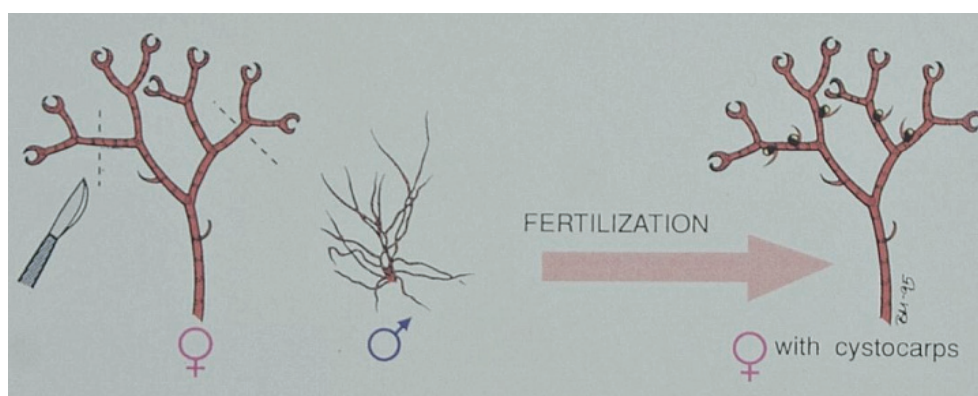
Tillväxthämningstestet fördes fram av Sverige som ett "New Working Item" inom International Standardisation Organisation (ISO) för tre år sedan. Flera länder var intresserade och ett ringtest med sex deltagande laboratorier har utförts (Eklund 2006). Vid det senaste ISO-mötet i april 2008 gick testet vidare och det beräknas finnas en färdig standard om två år.

Tabell 2. Jämförelse av känslighet i reproduktionstest och tillväxthämningstest med *Ceramium tenuicorne*. Tabellen visar EC50-värden med standardavvikelse (SD%) och variationskoefficient (CV%) på tester utförda med olika substanser. Jämförelser har gjorts med ett antal substanser som har testats med *Ceramium* tillväxthämningstest i 7 respektive 20 ‰ och *Ceramium* reproduktionstest i 20 ‰ salthalt.

Testsubstans	Mätvariabel	Klon och salthalt	Test (n)	EC50	SD%	CV%
Koppar, µg Cu ²⁺ /l	Växthastighet	Brackvattenklon, 7 ‰	4	2,8	0,85	30
	Växthastighet	Marin klon, 20 ‰	4	9,6	3,0	32
	Reproduktion	Marin klon, 20 ‰	7	13	2,1	16
Zink, µg Zn ²⁺ /l	Växthastighet	Brackvattenklon, 7 ‰	4	24	5,9	24
	Växthastighet	Marin klon, 20 ‰	4	44	8,7	20
	Reproduktion	Marin klon, 20 ‰	5	99	7,8	7,9
Krom, mg Cr ⁶⁺ /l	Växthastighet	Brackvattenklon, 7 ‰	3	0,90	0,20	22
	Växthastighet	Marin klon, 20 ‰	5	4,7	0,89	19
	Reproduktion	Marin klon, 20 ‰	5	4,5	2,3	51
Fenol, mg/l	Växthastighet	Brackvattenklon, 7 ‰	5	38	6,4	17
	Växthastighet	Marin klon, 20 ‰	5	46	7,0	15
	Reproduktion	Marin klon, 20 ‰	4	41	19	47
3,5-diklorofenol, mg/l	Växthastigh.	Brackvattenklon, 7 ‰	3	2,3	0,56	24
	Växthastighet	Marin klon, 20 ‰	4	2,0	0,21	10
	Reproduktion	Marin klon, 20 ‰	4	1,4	0,62	44

Reproduktionstest - *Ceramium*

I detta test används hon- och hanplantor av den marina klonen av *C. tenuicorne*. I testet sammanförs han- och honplantor under ett dygn i olika koncentrationer av det som ska testas. Efter exponeringsdygnet förs honplantorna över till nytt medium där resultaten av befruktningen, s.k. cystokarper, får växa till (Fig. 1). Efter sex dagars tillväxt räknas antalet bildade cystokarper i de olika testkoncentrationerna och ett EC50 värde, d v s den koncentration som medför 50 % reduktion av antalet cystokarper, beräknas (Eklund 1993, 1995).

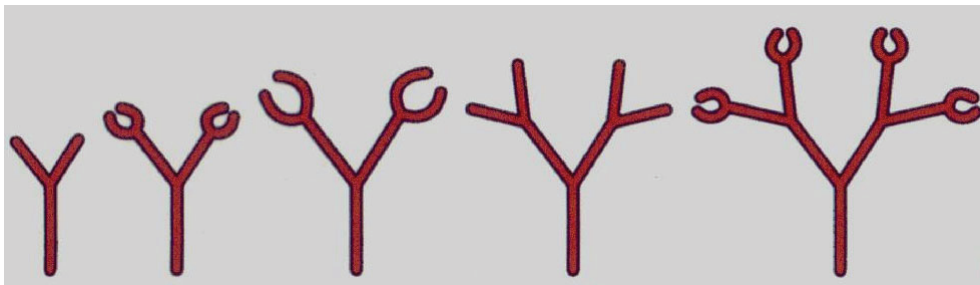


Figur 1. Principen för reproduktionstest med *Ceramium tenuicorne*.

Principen för *Ceramium*-reproduktionstestet är att ju giftigare testsubstans desto sämre fungerar befruktningen och ju färre antal cystokarper bildas.

Tillväxthämningstest – *Ceramium*

I detta test används endast honplantor av algen eftersom dessa växer snabbt och har ett mycket regelbundet växtsätt (Fig. 2). Metoden är beskriven i ITM-rapport 132 (samt i Bruno & Eklund 2003, Eklund & Ek 2004). Toppbitar av algerna skärs av och exponeras i olika koncentrationer under en vecka. Längdökningen mäts och tillväxthastigheten i de olika testkoncentrationerna beräknas. Den procentuella växthämningen jämförs med kontrollen och EC50 värden beräknas. Den marina klonen kan användas i salthalter mellan 12 och 32 ‰ och brackvattensklonen mellan 4 och 12 ‰ (Eklund 2005). Detta möjliggör testning vid relevant salthalt för större delen av den svenska kusten, dvs mellan 4 och 32 ‰.



Figur 2. Bilden visar principen för hur algen *Ceramium tenuicorne* växer. Tillväxten sker från topparna där nya kloliknande skott bildas allteftersom algen tillväxer.

Principen för testet är att ju giftigare testsubstans/avloppsvatten desto sämre växer algen.

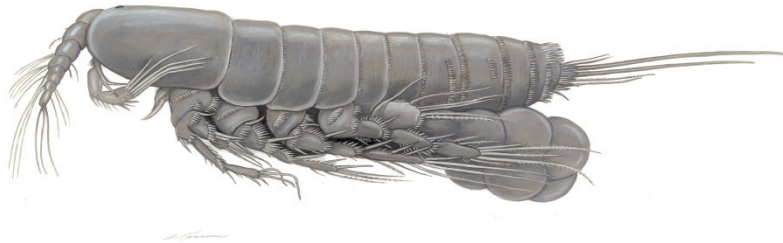
Kräftdjuret (harpacticoiden) *Nitocra spinipes*

Nitocra spinipes är ett litet kräftdjur (Fig. 3) hörande till gruppen harpacticoida hoppkräftor. Det fullvuxna djuret är knappt en millimeter långt och är vanligt förekommande på grunda mjukbottnar längs med hela Sveriges kust. Tillsammans utgör harpacticoider genom sin ofta höga numerär, ofta flera hundra tusen individer/kvm (Kotwicki *et al.* 2005), en viktig grupp i den marina näringskedjan och bidrar starkt till den snabba tillväxten hos t ex unga plattfiskar på grunda bottenar (Bregnballe 1961). *N. spinipes* genomgår 6 hudömsningar som naupliuslarv (påminner om en liten fästing i formen) och därefter 5 hudömsningar som copepodit (liknar det vuxna djuret i formen) innan den blir könsmogen. Arten har sexuell fortplantning och utvecklar därmed alltid både honor och hanar i ungefär lika stort antal (50:50). Under de förhållanden som vi erbjuder i laboratoriet uppnås könsmognad efter drygt 2 veckor från födsel.

Testmetoder – *Nitocra*

Förutom ett inledande standardiserat (SS028106) letalitetstest, där den dödliga vattenkoncentrationen efter 96 timmars exponering bestäms, genomför vi ett reproduktionstest över längre tid och mäter även andra effekter (Fig.4). Dessa inkluderar dödlighet, reproduktionsframgång (antal ägg/ungar per hona), larvutvecklingskvot

samt könskvot. Bestämning av könskvoter kan vara särskilt intressant då det rör sig om vatten som befaras innehålla substanser med hormonstörande egenskaper.



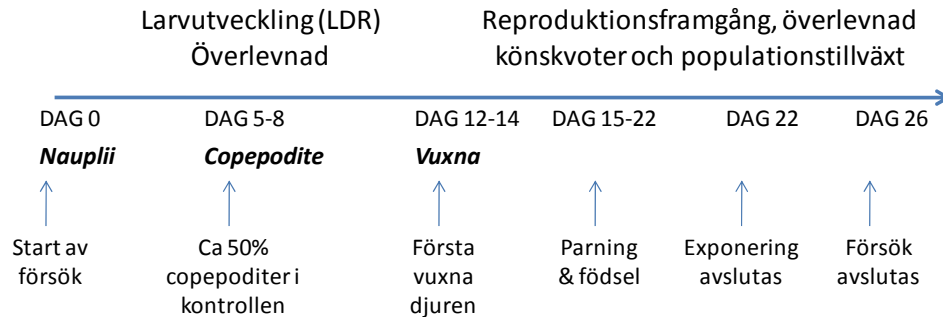
Figur 3. Hona av *Nitocra spinipes* med äggsäck (ill. Göte Göransson)

Nyfödda djur (inom 24-36 timmar) fördelas slumpmässigt; 10-15 djur per replikat och 8 replikat per koncentration/spädning. *N. spinipes* har som nämnts ovan 11 juvenila utvecklingsstadier, uppdelade på 6 nauplii- och 5 copepodit-stadier. Det 6:e nauplii-stadiet och 1:a copepodit-stadiet utgör två morfologiskt tydligt urskiljbara stadier. Efter 6-8 dagars exponering har ca 50 % av kontroldjuren övergått till ett copepodit-stadium. Kvoten mellan antalet copepoditer och de djur som finns i slutet av testet i varje replikat beräknas och utgör en subkronisk effektvariabel som vi tidigare kallat larvutvecklingshastighet (i.e. larval development rate (LDR)) men som numera benämns larvutvecklingskvot (t ex Breitholtz *et al.* 2007), dock med samma akronym som tidigare (LDR).

Efter drygt två veckor har en del djur blivit köns mogna och befruktade/äggbärande honor syns i skålarna. Dessa honor flyttas över till separata skålar och de ungar som föds räknas. Efter ca 22 dagar avbryts exponeringen och de djur som inte är äggbärande konserveras i formalin för senare könsbestämning. Äggbärande honor som har isolerats tillåts dock att föda fram till dag 26. Följande effektvariabler studeras för att kunna beräkna populationstillväxthastigheten:

- Antal dagar det tar en hona att föda sin första kull
- Sannolikhet för en hona att överleva till första kullen har fötts
- Andel honor som blivit äggbärande av totala antalet honor
- Könskvoter
- Antalet ungar som varje hona föder

Testvariabler



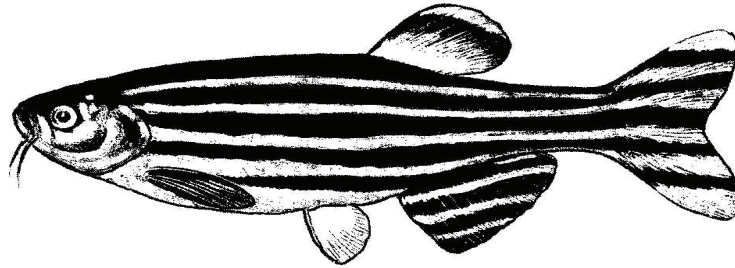
Figur 4. Översikt av livscykeltest med kräftdjuret *Nitocra spinipes*. Tillvägagångssättet för beräkning av populationstillväxthastighet - the intrinsic rate of natural increase (r_m) - finns beskrivet i Breitholtz *et al.* (2003).

Sebrafisk (*Danio rerio*)

Sebrafisken tillhör familjen Cyprinidae (d v s samma som t ex mört och löja) och är en liten (högst 3.7 cm lång) tropisk sötvattensfisk (Fig. 5) med ursprunglig hemvist på den indiska subkontinenten. I naturen lever arten i stillastående eller svagt strömmande vatten, t ex i anslutning till risfält, där den äter maskar, små kräftdjur och insektslarver. Fortplantningen äger rum året runt och rommen släpps fritt i vattnet under leken. I och med sin popularitet som akvariefisk har den även kommit att spridas till och utveckla livskraftiga populationer i andra tropiska och subtropiska områden där betingelserna är lämpliga, t ex om vattentemperaturen ligger mellan 18 och 24°C (www.fishbase.se).

Testmetoder - Sebrafisk

Sebrafisken har använts inom embryologisk/ekotoxikologisk forskning sedan 1930-talet (Oppenheimer 1936). Vid IVL Svenska miljöinstitutets laboratorium har sebrafisken använts som standardfisk sedan 1977 (Neilson *et al.* 1984, Landner *et al.* 1985), såväl för försök rörande akut toxicitet (Sörensen & Landner 1978) och för reproduktionsstudier (Neilson *et al.* 1992). Fokuseringen har under senare decennier mest riktats mot reproduktionsstörningar uttryckta som försämrad livskraft hos avkomma i första ledet (F1-generationen) efter exponering för framförallt industriella avloppsvatten (Granmo *et al.* 1986).



Figur 5. Sebrafisk, *Danio rerio* (ill. B.-E. Bengtsson).

Vid IVL studerades under åren 1994-1998 fem på varandra följande generationer sebrafisk. Försöken var ett led i utvecklandet av tekniken att erhålla en god yngelöverlevnad (> 70 %) under 28 dygn som de förlängda embryo/yngeltesterna i OECD's guideline 210 stipulerar. Studierna inkluderade även optimeringar av foder samt matningsstrategier för nykläckta yngel. Den normala reproduktionen under flera generationer studerades för att om möjligt utröna de faktorer som ger en optimal äggproduktion. Ett annat syfte var att studera om eventuella inavelseffekter kunde beläggas som t ex en ökad frekvens ryggsträngsskador som rapporterats (Newsome & Piron 1982). Inga förhöjda frekvenser av deformerade fiskar eller andra avvikelser kunde registreras efter fem generationers avel på IVL's laboratorium.

Aktuella försöksbetingelser

Till de försök som här utvärderas införskaffades ca 300 blivande föräldrafiskar från Singapore via Akvarium Kallhäll som kvalitetsgranskare. Fiskarna, som levererades i en sändning, var ca 9 månader gamla när de anlände till IVL's laboratorium i Stockholm. Avkomma från dessa fiskar har sedan använts till nio olika flergenerationstester. För att minska risken för inavelseffekter importerades en ny sändning om 300 fiskar som fick ligga till grund för de kommande fem försöken. Gamla och nya fiskar sattes till lek så att rom från båda sändningar användes för att föda upp nya avelsdjur. Alla fiskar acklimatiserades under minst 2 veckor till de förhållanden som råder på laboratoriet. Förhållandena görs så optimala som möjligt vad gäller vatten, föda och ljus. Allt spädvatten som används vid de olika försöken tillverkas på laboratoriet enligt standardföreskrifter i Svensk Standard (SS 028193). Alla försöken utfördes i tempererade rum med en ljusperiod på 12 timmar. Innan exponeringen av embryon startade valdes slumpmässigt 60 fiskar ut för provlek. Provleken utfördes för att kontrollera att äggproduktionen, befruktnings- och kläckningsfrekvens samt överlevnad för embryo/yngel låg inom stipulerade gränser angivna i SS 028193.

Lekprocedur

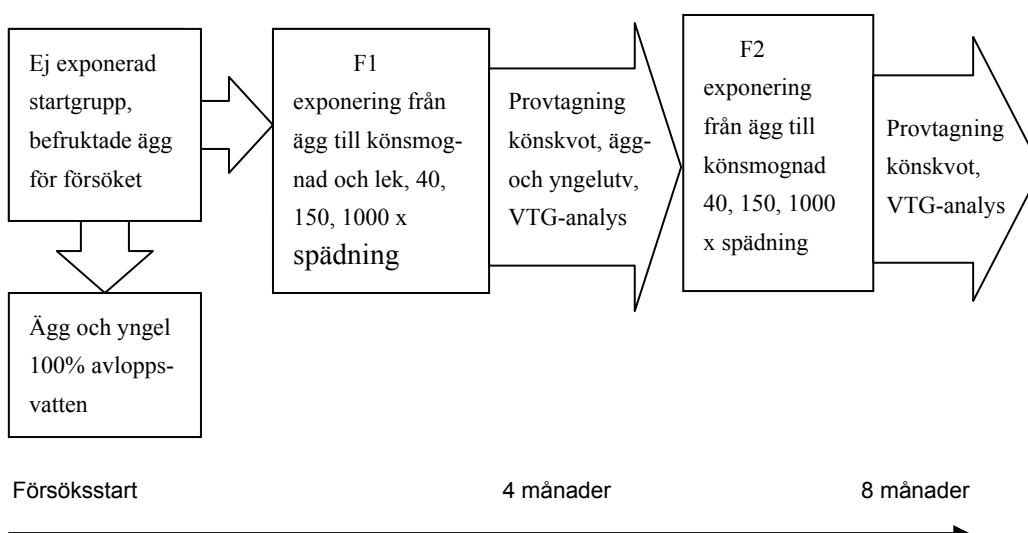
På kvällen, dagen före planerad lek, överflyttas 20 hannar och 10 honor till var sin lektratt med samma avloppsvattenkoncentration som tidigare. Fiskarnas äggläggning registreras dagligen under sju dygn.

Embryo/ungeltest

Exponeringen av ägg/ungel ägde rum i petriskålar av glas. 30 st befruktade ägg överfördes till skålar innehållande 50 ml spädvatten alternativt olika spädningar av avloppsvatten. Behandlat avloppsvattnen undersöktes i 6 olika koncentrationer inom intervallet 60 till 100 vol%. De två obehandlade avloppsvattnen som ingått i undersökningarna undersöktes i 8 olika koncentrationer inom intervallet 100 till 20 vol% avloppsvattenkoncentration. Efter 24 timmar räknades de levande embryona och 20 st av dessa överfördes för vidare examinering av kläckningsfrekvens/tid samt överlevnad. Testlösningarna vid embryo/ungeltesterna förnyades dagligen i samband med att avläsning av antalet levande/döda embryo/ungel genomfördes. Testlösningarna bereddes genom att tempererat, pH-justerat och syrgasmättat avloppsvatten blandades med det av standarden föreskrivna spädvattnet. Effektivariab-lerna som låg till grund för bedömningen av avloppsvattnens effekt var: kläckningsfrekvens hos embryon, mediankläckningstid, medianöverlevnad för embryo/ungelstadier och deformationsfrekvens hos utkläckta yngel.

Flergenerationstest

I Fig. 6 presenteras schematiskt längs en experimentell tidsaxel de olika försöken som utförts med sebrafisk.



Figur 6. Schematisk översikt av de olika försöken med sebrafisk.(VTG = vitellogenin, ett gulkroppshormon)

Rom efter den spontana leken från oexponerade föräldradjur samlades upp och okulärbesiktades. Ungefär 300-450 befruktade embryon från varje grupp överfördes till petriskålar av glas innehållande den koncentration avloppsvatten-/ köns-hormon alt. renavatten de skulle exponeras för. De olika avloppsvattnen undersöktes vid de subletala koncentrationerna 2,5 (högdos=HD), 0,67 (mellandos=MD), 0,1 (lågdos=LD) och 0 (Kontroll =KO) vol% inblandning av respektive avloppsvatten. Detta motsvarar 40, 150 respektive 1000 gångers utspädning av avloppsvattnen. Embryona delades upp i tre olika replikat per exponeringsgrupp. Testlösningarna förnyades dagligen genom att samtliga levande embryon/ungel överfördes till nyberedda lösningar med flamberade (= steriliserade) pasteurpipetter. I och med att utfodringen startat flyttades ynglen över till 3-liters glasakvarier innehållande 2 liter testlösning. Testlösningarna förnyades varannan dag genom att ca 75 % av lösningen byttes ut och färska tempererade pH-justerade testlösningar tillsattes. Ynglen flyttades över till glasakvarier innehållande 5 liter testlösning under andra levnadsveckan. Testlösningarna förnyades till 80 % ca 3 ggr/vecka. När ynglen var ca 4 veckor flyttades de över till 25 l glasakvarier och vid 8 veckors ålder till 50 l dito. Ynglen nådde könsmognad efter ca 14 veckor och sattes till lek för att producera nästa generations avkomma (se avsnitt Lekprocedur ovan). Efter fullbordad lek vidtog provtagningen.

Exponering av embryon/ungel

Exponeringen för avloppsvatten och könshormoner (som positiva kontroller) startade mellan 2-4 timmar efter befruktningen för generation F1. Denna generation exponerades under hela livet samt under leken vilket innebar att F2 generationen exponerades kontinuerligt från befruktning till provtagning. Tre olika koncentrationer avloppsvatten undersöktes 2,5 (HD), 0,67 (MD) och 0,1 (LD) vol. % avloppsvattenkoncentration vilket motsvarar 40, 150 och 1000 gångers utspädning. För att erhålla könshormoninducerade effekter användes 17 α -ethinylöstradiol (EE2) som positiv östrogen honkontroll och 17 α -metyltestosteron (MT) som positiv androgen hankontroll. EE2 är den syntetiska hormonformen som är den aktiva substansen i p-piller vilken visat sig mer stabil i vattenlösning än östradiol. Exponeringen för EE2 utfördes vid 10 ng/l vilket är en koncentration som ger en signifikant förhöjd vitellogeninkoncentration (VTG) i fiskarna och en signifikant förskjutet könskvot (ca 70 % honor). Den androgena positiva kontrollen MT undersöktes i 50 ng/l vilket är en koncentration som ger signifikant förskjutet manlig könskvot (ca 80 % hannar) (Örn *et al.* 2000).

Provtagning

Provtagningar av fiskar från F1-generationen utfördes efter fullbordad lek när de uppnått ca 6 månaders ålder. De enskilda individerna bedövades först med ett lätt slag mot huvudet varefter ryggsträngen dekapiterades. En okulär besiktning av varje individ utfördes i samband med att vikt och längd mättes. Fiskarna öppnades därefter snabbt och könsbestämdes. Hanar för VTG-analys placerades i Eppendorfrör som sänktes ned i flytande kväve. Honorna fixerades i neutralbuffrad formalin

för histologiska analyser. När erforderligt antal hannar tagits för VTG-analys fixerades resterande som ovan. För gonadmorfologiska studier fixerades 30-40 individer per grupp. Dessa fiskar öppnades ej utan könsbestämdes senare vid den histologiska examineringen av preparerade snitt. Provtagningen av F2-generationens fiskar utfördes på identiskt sätt med undantag av att de ej öppnades för könsbestämning. Könsbestämning gjordes på de snittade individerna samt på de fiskar som avlivades och öppnades vid försökens slutförande. Analyserna utfördes på IVL's laboratorium i Stockholm.

Vitellogeninanalys

För en fullständig metodbeskrivning hänvisas till Tema Nord 2000:555. Analyserna är utförda på Reproduktionsbiologiskt centrum vid SLU i Uppsala under ledning av Prof. Leif Norrgren. Kortfattat utfördes VTG-analyserna enligt följande. Könsbestämda hannar ur de olika grupperna från F1-generationen analyserades. Ett helkroppshomogenat preparerades fram via mortling i flytande kväve. Analyserna utfördes sedan med ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) med antikroppar specifikt framtagna för VTG-analyser av sebrafiskhannar. Detektionsnivån på helkroppsbas uppgick till ca 4 ng VTG /g fisk. Analyserna på F2-generationens fiskar utfördes på ca 10 veckor gamla fiskar vars könsdifferentiering var fullständig. VTG-halterna i honor börjar stiga till normala nivåer först när de börjar producera ägg efter ca 3 månader.

Gonadmorfologisk analys

De gonadmorfologiska analyserna utfördes på SLU i Uppsala under ledning av Prof. Leif Norrgren. Efter fixering och dehydrering, inbäddades 7-10 fiskar tillsammans i varje paraffinblock. Materialet snittades och infärgades med haematoxylin-eosin (HE). Varje snitt utvärderades genom ljusmikroskopisk undersökning, avseende könsbestämning av fiskarna och eventuella utvecklingsskador av gonaden, t ex dubbelkönighet (intersex).

Statistiska utvärderingsmetoder (alla tester)

Ceramium

Tillväxten av algen är nästan linjär under den vecka som testet tar (Eklund 2005) och data behandlas med linjär regression (längden dag 7 minus längden dag 0 delat med antalet testdagar) antingen grafiskt eller med dataprogrammet RegTox 6.6 som har utvecklats av Eric Vindimian (<http://eric.vindimian.9online.fr>). I programmet görs en optimerad kurvpassning genom successiva iterationer och effektvärden (10-90 %) beräknas med 95 % konfidensintervall.

Repetierbarhet och reproducerbarhet av *Ceramium* tillväxthämningstest

I processen att bli ett internationellt standardiserat biologiskt test har ITM ansvarat för en ringtestning av *Ceramium* tillväxthämningstest. Av de åtta ursprungliga intresserade laboratorierna deltog slutligen sex stycken i det ringtest som utfördes hösten och vintern 2006-2007. Från ITM skickades alger, testmanual och två referenssubstanser, zinksulfat ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) och diklorfenol ($Cl_2C_6H_3OH$), till de olika deltagande laboratorierna, tre i Tyskland, ett i Kanada, ett i Norge och ITM i Sverige. För att testa repeterbarheten ombads varje laboratorium testa varje substans två gånger. Inget av laboratorierna hade tidigare erfarenhet av testet. De sammanlagda resultaten redovisas i Tab. 3 nedan och en mer utförlig redovisning finns att läsa i Eklund (2006).

Tabell 3. Resultaten av ett internationellt ringtest med *Ceramium* tillväxthämningstest som utfördes 2006-2007. Ringtestet utfördes med den marina klonen av rödalgen *Ceramium tenuicorne* i 20 % salthalt.

Testsubstans	Antal lab	Antal godkända test	Outliers	EC50 mg/L	r CV inom laboratorierna %	R CV mellan laboratorierna %
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	6	9	2	0,049	46	48
3,5-diklorofenol	6	10	0	2,3	25	25

Nitocra

Akut toxicitet (d v s 96h-LC50) testades med Probit Analysis Software (Version 2.3, Naturvårdsverket). Dödlighets- och larvutvecklingsdata anses allmänt följa en binomialfördelning. Fisher's test (2-vägs) användes således för att analysera möjliga skillnader mellan behandlingar och kontroll. För att korrigera för multipla jämförelser mot samma kontroll korrigerades p-värdet med en Bonferroni-korrektion. Denna korrektion innebär att p-värdet för respektive signifikansnivå delas med antalet jämförelser mot samma kontroll. Då skillnader mellan replikat inom behandling eller kontroll är naturliga analyserades alla reproduktionsrelaterade effektvariabler med det icke-parametriska Kruskal-Wallis test (ett rankingtest). För

att studera skillnader mellan specifika behandlingar och kontroll användes Mann-Whitney. För dessa enskilda jämförelser korrigerades likaledes p-värdet med en Bonferroni-korrektion.

Sebrafisk

Embryo/ungel-tester utvärderades enligt standardmetoder med probitanalys enligt Litchfield & Wilcoxon. VTG-analyserna utvärderades med Kruskal-Wallis one-way analysis of variance (ANOVA) för icke normalfördelade serier. Fysiologiska effektvariabler för generation F1 och F2 analyserades med t-test för grupper med olika varianser. Könsvoterna jämfördes med kontrollerna med χ^2 -test. Äggproduktion och fertilitet analyserades med den icke parametriska Mann-Whitney U-test metoden. Signifikansnivåer avseende skillnader gentemot kontrollen anges med symboler: * 0,05 >p>0,01; ** 0,01>p>0,001; *** p<0,001.

Repetierbarhet och reproducerbarhet för embryo/ungeltester

Innan embryo/ungeltesten med sebrafisk upphöjdes till Svensk Standard genomfördes en nordisk ringtest för att bedöma testens tillförlitlighet. Ringtesten utfördes under 1985 (Dave 1986) och följde ett protokoll som den svenska ISO-gruppen (International Standardization Organization) utarbetat. Laboratorier från Danmark, Finland, Norge och Sverige deltog i ringtesten som utfördes som två oberoende tester med de två olika metallsalterna $K_2Cr_2O_7$ och $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$.

Tabell 4. I tabellen redovisas de resultaten av en nordisk ringtest med sebrafisk.

Testsubstans	Antal lab	Antal godkända test	Outliers	EC50 mg/L	r CV inom laboratorierna %	R CV mellan laboratorierna %
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	5	10	0	55	20	49
$K_2Cr_2O_7$	5	9	1	83	25	58

De deltagande laboratorierna lyckades väl med genomförandet av upprepade embryo/ungeltester med sebrafisk (Tab.4). Endast ett test underkändes på grund av för hög spridning inom försöksserien. Variationerna för variabeln överlevnad var överlag låga och variationskoefficienterna (CV) inom laboratorierna varierade inom intervallet 20-25 %. Mellan laboratorierna var resultatens spridning även fullt godtagbar och variations-koefficienter på mellan 49-58 % beräknades på alla rapporterade resultat för variabeln överlevnad.

Resultat och Diskussion

Ceranium

I Tab. 5 nedan redovisas samtliga resultat från tester utförda med *Ceranium tenuicorne* på avloppsvatten från olika skogsindustrier mellan 1999 och 2005.

Tabell 5. Tillväxthämning presenterad som EC10 och EC50 av rödalgen *Ceranium tenuicorne* vid växt i en vecka i avloppsvatten från olika skogsindustrier med 95%-igt konfidensintervall (95%CI).

Fabrik	År	EC10 avlopps- vatten	95% CI	EC50 avlopps- vatten	95% CI
Mönsterås /repr.test*	99			20	2 – 63
Mönsterås /tillväxttest*	99			61	52 – 67
Smurfit kappa (före rening)	01	0,3	0,14 – 0,51	4,7	3,5 – 5,8
Smurfit kappa (efter rening)	01	12	9,3 - 15	30	26 – 33
Munksund (före rening)	02	5,2	3,6 – 7,5	19	16 – 22
Munksund (efter rening)	02	29	23 – 34	47	43 – 51
Mörrum	03	13	12 – 18	37	33 – 40
Karlsborg (Billerud)	04	7,8	4,2 - 12	27	21 - 32
Vallvik (03)	05	6,4	4,3 – 8,9	23	19 – 27
Vallvik (05)	05	7,5	5,2 – 10	28	24 – 32
Värö	05	7,0	5,3 – 8,7	23	21 – 26

* Detta avloppsvatten är från samma process som användes då avloppsvatten från fabriken testades med *Nitocra* och sebrafisk 2001.

Enligt *Ceranium*-testet och de värden som medför en 50-procentig tillväxthämning av makroalgen var det ingen stor skillnad mellan de olika utgående avloppsvatten från de undersökta fabrikena. Munksunds vatten var minst giftigt med ett EC50 på 47 % medan Vallvik (003) och Värö hade de giftigaste vattnen, med EC50 på 23 %. Detta innebär att avloppsvatten med en inblandning av mellan 23 och 47 % medför en halverad växt hos *Ceranium*. Motsvarande siffror för en 10 procentig hämning av växt hos *Ceranium* innebär en inblandning av de utgående avloppsvattnen på mellan ca 6 och 29 %.

För två av fabrikena, Smurfit kappa och Munksund, har avloppsvattnet testats både före och efter rening. För Munksund medförde reningen en halvering av toxiciteten och reningen för Smurfit kappa medförde ca sex gångers förbättring enligt EC50 värdena. Detta visar att den rening som fanns på Smurfit kappa hade en mycket större verkan än den rening som fanns i Munksund. Å andra sidan var det ingående avloppsvattnet i Munksund betydligt mindre giftigt vilket totalt medförde ett bättre slutresultat än för Smurfit kappa. För att komma ner i en nivå som högst medför en 10 procentig påverkan så krävs för Smurfit kappas del drygt åtta gångers spädning av avloppsvattnet jämfört med om ingen rening hade utförts då ca 333 gångers spädning hade behövts för att uppnå samma nivå. För Munksunds del är motsvarande siffror tre gångers spädning då rening finns, jämfört med om

ingen rening fanns nästan 20 gångers spädning. Detta är rejäla vinster för miljön, särskilt för recipienten utanför Smurfit kappa.

Från början var det tänkt att reproduktionstestet med *Ceramium* skulle användas vid test av avloppsvattnen från skogsindustrier eftersom effekter på reproduktion oftast är en känsligare variabel än tillväxt. För test av avloppsvattnen från Mönsterås användes både reproduktionstestet och tillväxthämningstestet med *Ceramium* och just i detta i detta fall var reproduktionen känsligare än tillväxthämning (Tab. 5). Ser man istället på de samlade data som finns för båda testerna (Ek-lund 2005) så är de två metoderna mycket likvärdiga. Fördelen med att använda tillväxthämningstestet är att det är något enklare att utföra och att det kan utföras i salthalter mellan 4 och 32 ‰. Reproduktionstestet fungerar endast i salthalter över ca 20 ‰. Genom att testet kan utföras i en salthalt som är relevant för den aktuella recipienten och att arten naturligt finns längs med svenska kusten medför ökad förutsägbarhet för hur ekosystemen utanför fabriken skulle kunna påverkas. Totalt sett visar *Ceramium*-testet att det med god precision går att mäta en förbättring av utförda åtgärder för att minska effekter på en organism som normalt bör finnas i recipienter längs med Sveriges kuster.

Nitocra

Utifrån de livscykeltester som genomförts under de senaste 7 åren har inte i något fall effektvariabler relaterade till reproduktion (se ovan Testmetoder - *Nitocra*) varit känsligare än larvutveckling eller larvöverlevnad. Delvis kan detta bero på att larv- och juvenila stadier har varit mer känsliga (t ex Medina *et al.* 2002) men en annan viktig faktor är säkert också en minskad statistisk styrka allteftersom testet fortgår. Orsakerna till detta är att längre tester som studerar sexuell reproduktion generellt medför ökad komplexitet och ett drastiskt minskat statistiskt urval (p g a högre naturlig dödlighet, skeva könskvoter och misslyckade parningar mellan hanner och honor; Breitholtz *et al.* 2008). I Tab. 6 redovisas resultat från de känsligaste effektvariablerna larvdödlighet, långtidsdödlighet samt larvutvecklingskvot (LDR) för samtliga testade avloppsvatten i form av NOEC (No Observed Effect Concentration) och LOEC (Lowest Observed Effect Concentration). För samtliga avloppsvatten, utom ett (Mörrum), förelåg inga skillnader i känslighet mellan dessa olika effektvariabler. I fallet Mörrum däremot förelåg en stor skillnad så till vida att larvdöd under de 6 första dyggen hade ca 60 ggr lägre NOEC och ca 8 ggr lägre LOEC än motsvarande värden för LDR och långtidsdödlighet.

Tabell 6. Resultat från de känsligaste effektvariablerna från samtliga avloppsvatten testade på *Nitocra spinipes*, nämligen larvutveckling (LDR) och larvdödighet efter 6 dygn samt långtidsdödighet (3veckor). NOEC- och LOEC-värden anger % avloppsvatten.

Fabrik	LDR (6 dygn)		Larvdöd (6 dygn)		Larvdöd (22 dygn)	
	NOEC	LOEC	NOEC	LOEC	NOEC	LOEC
Smurfit (in)	>27	>27	>27	>27	27	>27
Smurfit (ut)	81	>81	81	>81	81	>81
Mörrum	42	>42	0.7	2.6	>42	>21
Karlsborg	33	98	33	98	33	98
Kvarnsveden	30	100	30	100	30	100
Värö	60	>60	60	>60	60	>60
Munksund (in)	6	16	6	16	6	16
Munksund (ut)*	80	100	80	100	80	100

*Testet egentligen ogiltigt pga av att flera replikat i kontrollen var dåliga. Dock påvisades inga negativa effekter av avloppsvattnet, vilket möjliggjorde bedömningen att en minskning av giftighet jämfört med Munksund (in) hade skett.

Tabell 7. Larvutveckling och överlevnad hos kontrollgrupper av *Nitocra spinipes* i tester med massaindustriavloppsvatten. Värdena för LDR avser andelen copepoder som genomgått metamorfos från nauplii till copepodit. I kolumnerna för respektive testvariabel redovisas medelvärde (Medel%), standardavvikelse (SD%), 95% konfidensintervall (95%CI) och variationskoefficient (CV%). n=8; 8-12 djur per replikat.

Fabrik	Larvutveckling (LDR)				Larvöverlevnad			
	Medel%	SD%	95%CI	CV%	Medel%	SD%	95%CI	CV%
Smurfit	53	23	16	43	94	8	6	9
Mörrum	66	16	11	24	97	5	3	5
Karlsborg	65	12	9	19	95	7	5	8
Kvarnsveden	45	7	5	17	91	10	7	11
Värö	71	12	8	16	88	12	9	13
Munksund (in)	67	26	18	39	91	10	7	11
Munksund (ut)*	36	36	25	99	84	14	10	17

*Testet egentligen ogiltigt pga av att flera replikat i kontrollen var dåliga. Dock påvisades inga negativa effekter av avloppsvattnet, vilket möjliggjorde bedömningen att en minskning av giftighet jämfört med Munksund (in) hade skett.

Larvutveckling (LDR) och larvöverlevnad var normala i samtliga kontrollgrupper utom för Munksund efter rening (Tab. 7). Avvikelsen påverkade dock inte tolkbarheten av resultaten i det aktuella fallet. Som jämförelse till resultaten som redovisas i Tab. 7 presenterades i Avfall Sverige (2008) resultat från motsvarande *Nitocra*-undersökningar med lakvåtskor från olika askor. Vi har även erfarenhet från *Nitocra*-tester enligt samma metod tillämpad på två grupper av kemikalier som testats individuellt, nämligen bromerade flamskyddsmedel (Breitholtz & Wollenberger 2003) och syntetiska myskämnen (Breitholtz *et al.* 2003). Som framgår av dessa data är spridningen av kontrollens larvutveckling (LDR) och larvöverlevnad jämförbara med vad som här redovisas för skogsindustriesterna. Jämförelserna visar på hög reproducerbarhet i larvförsöken och att metodiken därför kan tillmätas hög precision för att avslöja avvikelser från kontrollresultaten i närvaro av giftiga substanser. Valet av antalet replikat (n=8) har varit baserat på en kompromiss mellan att erbjuda ett livscykeltest med bl a många reproduktionsvariabler samt så stor

statistisk styrka som möjligt utan att överbelasta personalen. Enligt våra erfarenheter är genomförandet av livscykeltestet mycket krävande och inkluderar även skötsel och avläsning under flera helger i rad. Om vi gör avsteg från livscykeltestet som ett första testalternativ och istället inför ett 1:a screeningsteg (*Nitocra* adult 48-tim LC50) och 2:a screeningsteg (*Nitocra* larvdödlighet och larvutveckling efter ca 1 vecka) ges utrymme för fler replikat (t ex 10-12) och därmed högre precision, utan att personalinsatserna blir alltför krävande. Det hittills utnyttjade livscykeltestet skulle därmed kunna klassas som ett 3:e (“konfirmerande”) steg, som eventuellt kan påkallas av “alarmerande” eller svårtolkade resultat i de tidigare stegen eller om helt nya processer/råmaterial/renings-steg, som inte ingår i föreliggande kunskapsbas om skogsindustriavlopp skall bedömas. Detta 3-stegsförfarande är väletablerad praxis i svensk ekotoxikologisk testning av komplexa avloppsvatten i form av de s.k. KIU-anvisningarna (NV Allmänna Råd 89:5). Vårt förslag är således att vi ersätter det hittills “obligatoriska” livscykeltestet med *Nitocra* med ett “partiellt livscykeltest” (motsvarande steg 2 ovan), beroende på följande fördelar:

- Billigare och mindre arbetskrävande
- Inkluderar letala och subletala effekter på (känsliga) larv/juvenila stadier.
- Bättre statistisk styrka
- Erfarenhetsmässigt fullt tillräckligt för massaindustriavlopp
- Fler utövare som kan utföra testet med mindre dröjsmål som följd

Ett kompletterande alternativ till det tredje och “konfirmerande” steget, exempelvis då det finns anledning att misstänka specifikt hormon- eller enzymstörande karaktär hos avloppsvattnet, är en annan typ av partiellt livscykeltest med samma art, där varje individ följs individuellt i mikroplattor genom hela larv- och delar av den juvenila utvecklingen. Denna metod, som har tagits fram vid ITM under senare år, möjliggör känsliga analyser av biokemiska markörer såsom hormonnivåer (ecdysteroider) och nukelinsyror (RNA, DNA), kopplade till kroppstillväxt (Dahl *et al.* 2006 och Dahl & Breitholtz 2008).

Sebrafisk

Allmänt

De resultat som redovisas i kommande kapitel kommer från 13 olika flergenerationstester med sebrafisk. De olika försöksserierna har startat med totalt 13700 nybefruktade ägg och av dessa har totalt 9622 kläckts och utvecklats till vuxna fiskar. Av dessa har 8207 individer underkastats någon form av analys på IVL's laboratorium på ett antal olika effektvariabler per individ. I medeltal har 687 individer per försöksserie analyserats. Övriga 1415 fiskar har analyserat på SLU i Uppsala och Zoofysiologiska Institutionen vid Göteborgs universitet. Alla försök som redovisas i denna rapport har utförts med övergripande tillstånd från Jordbruksverket/Djurskyddsmyndigheten samt med flera olika tillstånd från Stockholms norra djurförsöksetiska nämnd.

Validering av försöksmetodiken

Med ett så stort antal undersökningar som skall utvärderas och valideras kan statistiska analyser utföras på varje försöksserie och spridningar kan studeras på ett antal olika sätt. I Tab. 8 redovisas den samlade överlevnaden i procent för varje testad koncentration.

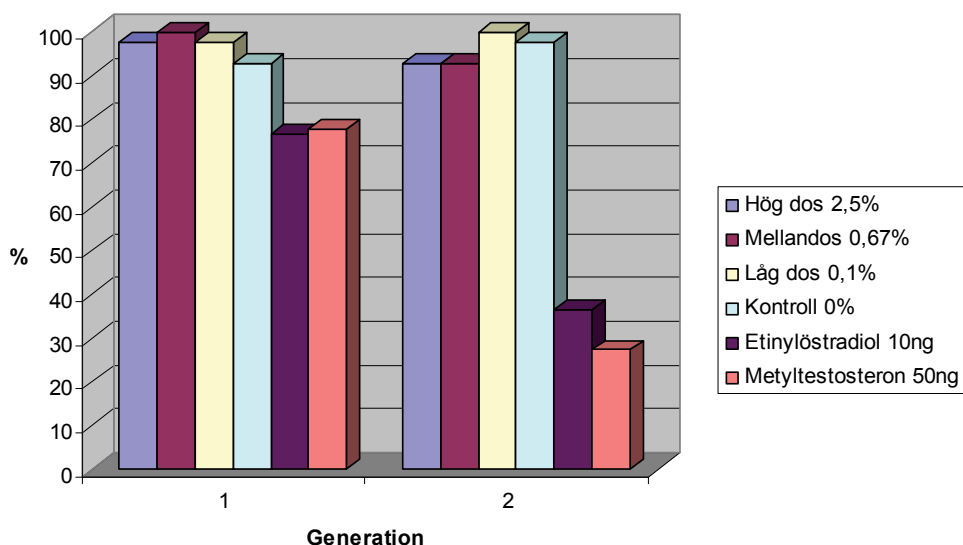
Tabell 8. Samlad överlevnad i procent samt antal/grupp för alla sebrafiskar exponerade för skogsindustriellt avloppsvatten från embryostadiet till könsmogen individ. Som jämförelse anges även överlevnaden till könsmogen ålder för de positiva kontrollerna med syntetiskt kvinnligt (♀) könshormon 17 α -etinylostradiol (EE2) och manligt (♂) könshormon 17 α -metyltestosteron (MT)

Hög 2,5 %	Mellan 0,67%	Låg 0,1%	Kontroll 0%	♀ hormon EE2 10 ng/l	♂ hormon MT 50 ng/l
77,1	85,7	79,0	80,8	34,3	10,3
2083	2400	2195	2327	501	116

Som framgår av Tab. 8 uppnådde mellan 77 och 86 % av de avloppsvattenexponerade fiskarna könsmogen ålder och ingen koncentrationsberoende effekt kunde konstateras. De båda könshormonerna gav signifikant förhöjd dödlighet trots att de testades i låga koncentrationer motsvarande 10 ng/l för etinylostradiol och 50 ng/l för metyltestosteron. Eftersom könshormonerna i de undersökta koncentrationerna ger så kraftiga effekter både på individ- och populationsnivå på flertalet variabler kan resultaten användas som en form av referenstoxikanter för alla de olika genomförda studierna.

I Fig. 7 presenteras andelen replikat inom varje försöksomgång som uppfyller testmanualen OECD 210's krav på en minimiöverlevnad på 70 % till vuxen fisk.

Antal replikat inom varje försöksserie som uppfyller validitetskraven enligt OECD 210



Figur 7. Totala antalet replikat inom varje exponeringskoncentration (n=42/dos och generation) som uppfyller validitetskravet på minst 70 % yngelöverlevnad till fortplantningsduglig individ enligt OECD 210 manualen.

Som framgår av Fig. 7 uppfylls kraven på yngelöverlevnad i mellan 93-98 % av replikaten vid de olika försöken (n=42 per dos och generation) med avloppsvatten som omfattar vardera två generationer sebrafisk. Exponeringen för könshormoner ger en förhöjd dödlighet och ca 75 % av replikaten klarar validitetskraven för första generationens fiskar. Överlevnaden är ännu sämre vid exponeringen av den andra generationen för könshormoner där endast 25-35 % av replikaten uppnår stipulerade testkrav.

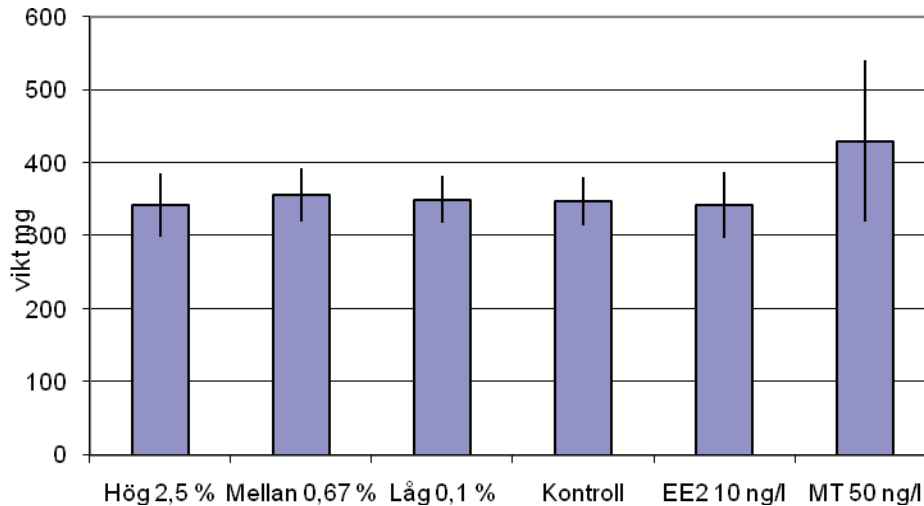
En en-sidig ANOVA-analys utfördes på överlevnadsdata från de olika grupperna och generationerna. För de grupper som exponerats för avloppsvatten kunde ingen signifikant skillnad säkerställas mellan generation F1 och F2 ($p=0,629$) och ej heller någon dosrelaterad skillnad ($p=0,733$).

Tillväxt

FÖRSTA GENERATIONENS SEBRAFISKAR

Effektvariabeln tillväxt används ofta som ett mått på en subletal exponering av t ex skogsindustriellt avloppsvatten (Vuorinen 1986) och kan appliceras på alla fiskarter som undersöks vilket ger ett stort jämförelsematerial (Woltering 1984). I Bilaga 3 redovisas alla tillväxtdata i tabellform. I detta kapitel redovisas vissa valda tillväxtvariabler i figurform. Tillväxten på viktbasis för första generationens sebrafiskhannar som exponerades för olika koncentrationer skogsindustriellt avloppsvatten redovisas i Fig. 8. Som ett sammanvägt mått på fiskens längd/viktsförhållande brukar konditionsfaktorn (CF) beräknas. Den ger ett grovt mått på hur välväxt fisken är i förhållande till sin längd. För sebrafiskens del hamnar konditionsfaktorn

på ca 0,9 för hannar och ca 1,05 för honor när de är i fertil ålder. Konditionsfaktorn beräknas enligt följande formel $\text{vikt (mg)}/\text{längd}^3(\text{mm})\times 100$.

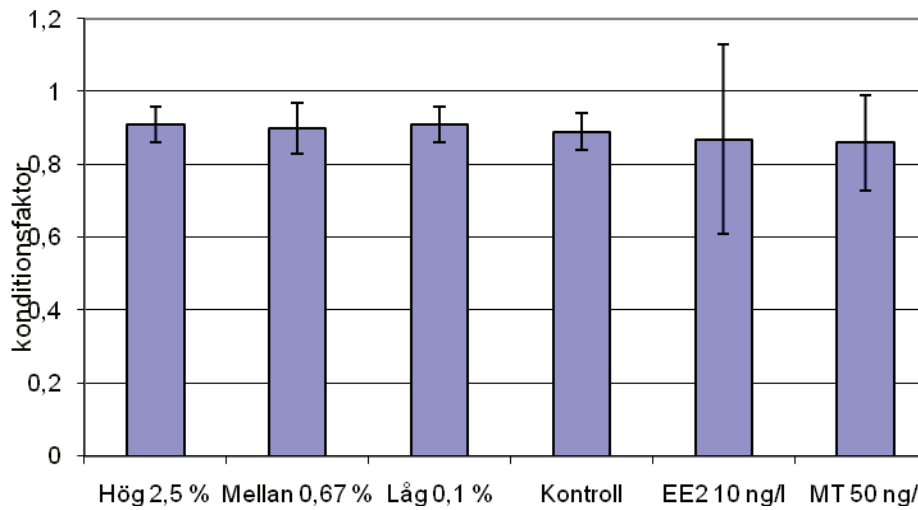


Figur 8. Tillväxten baserat på vikt (mg) som medelvärde med 95 % konfidensintervall för alla hannar av sebrafisk från första generationen (F1) exponerade för skogsindustriellt avloppsvatten under hela livet.

I Fig. 9 redovisas konditionsfaktorn för hannar representerande första generationens fiskar.

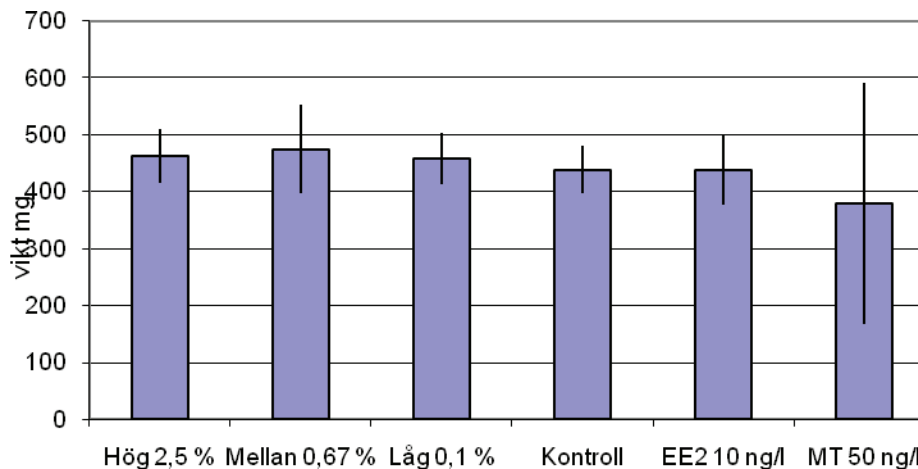
Resultaten från testerna med avloppsvatten visar på en jämförbar tillväxt på viktsbasis oavsett exponeringsbakgrund och spridningen jämfört med kontrollen uppgår till $\pm 2,6$ %. Tillväxten för alla sebrafiskhannar exponerade för högdosen av de båda obehandlade avloppsvatten uppgick till i medeltal 348 mg/individ, d v s exakt samma värde som kontrollen i rent vatten. Hannar av sebrafisk tillväxer helt normalt på viktsbasis vid exponering för de avloppsvattenkoncentrationer av både obehandlat och behandlat avloppsvatten som undersökts i denna studie. En kraftigt stimulerande effekt registrerades för de fiskar som exponerats för det manliga könshormonet metyltestosteron (MT) och en 25 % högre medelvikt uppnås under samma uppväxtperiod vid jämförelse med kontrollen i rent vatten. Detta indikerar att androgena (maskuliniserande) effekter kan detekteras hos sebrafiskar om de exponeras för substanser med den hormonstörande typen av effekt.

Som framgår av Fig. 9 ligger CF-värdet för sebrafiskhannar som exponerats under hela livet väl samlade runt kontrollens värde 0,89. Inga signifikanta skillnader har detekterats vid någon försöksserie.



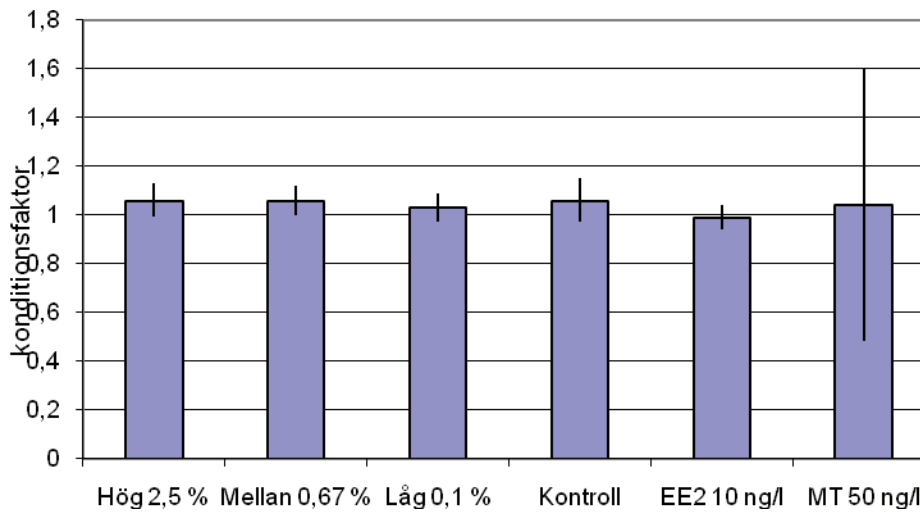
Figur 9. Konditionsfaktor (CF) som medelvärde med 95 % konfidensintervall för alla hannar av sebrafisk från första generationen (F1) exponerade för skogsindustriellt avloppsvatten under hela livet.

I Fig. 10 och 11 redovisas tillväxten på viktsbasis samt CF-värdet för alla sebrafiskhonor representerande generation F1 som exponerats för alla olika skogsindustriella avloppsvatten under hela livet.



Figur 10. Tillväxten baserad på vikt (mg) som medelvärde med 95 % konfidensintervall för alla honor av sebrafisk från första generationen (F1) exponerade för skogsindustriellt avloppsvatten under hela livet.

En svagt stimulerande effekt på tillväxten hos sebrafiskhonor på viktsbasis noterades i försöken med avloppsvatten jämfört med kontrollerna (se Fig. 10). Skillnaderna är inte signifikanta för någon grupp jämfört med kontrollen och spridningen uppgår till som mest 8,4 %. I motsats till resultaten för hannar ökar inte honor i vikt snabbare än kontrollfiskar vid exponering för manligt könshormon. Tillväxten på viktsbasis är identisk med kontrollgruppen som vistats i rent vatten under hela livet.

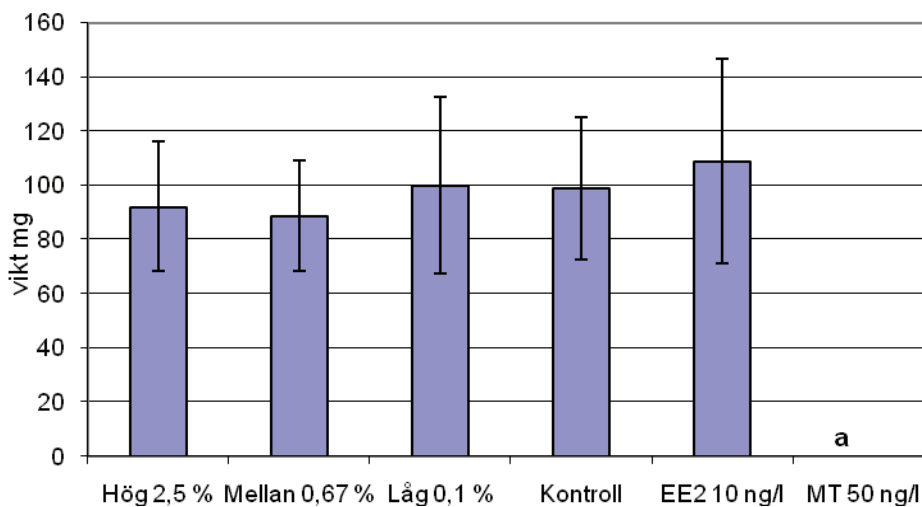


Figur 11. Konditionsfaktorn (CF) som medelvärde med 95 % konfidensintervall för alla honor av sebrafisk från första generationen (F1) exponerade för skogsindustriellt avloppsvatten under hela livet.

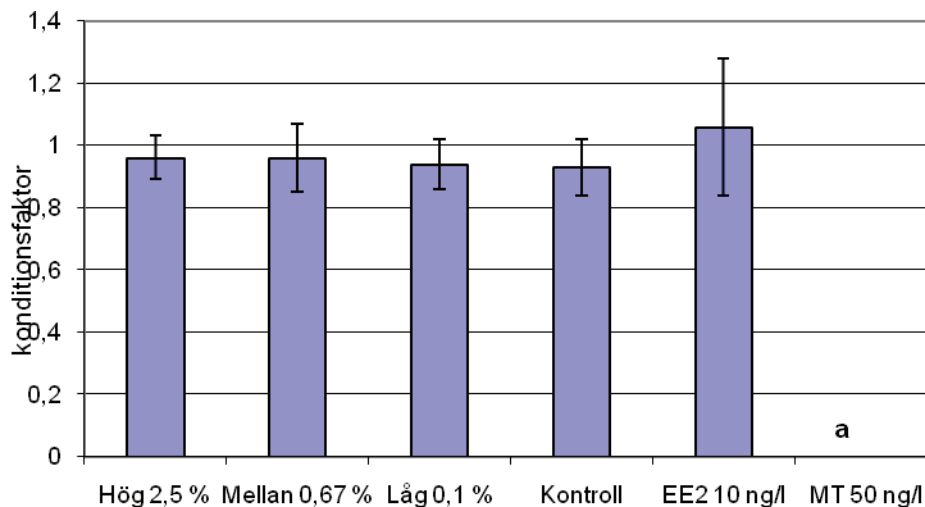
Konditionsfaktorn för sebrafiskhonor (Fig. 11) exponerade under hela livet uppgick till $1,06 \pm 3 \%$ för alla avloppsvattenexponerade grupper. De positiva könshormonskontrollerna visade på lägre men ej signifikant skilda värden. De något lägre värdena visar att fisken är något längre i förhållande till sin vikt vid en jämförelse med kontrollen.

ANDRA GENERATIONENS SEBRAFISKAR

I Fig. 12 och 13 redovisas tillväxtdata för andra generationen sebrafiskar som liksom sina föräldrar exponerats för avloppsvatten, rent vatten eller könshormoner under hela livet. Fiskarna är provtagna efter 2 månader då de nästan uppnått könsmognad men är långt ifrån fullvuxna.



Figur 12. Tillväxten baserad på vikt (mg) som medelvärde med 95 % konfidensintervall för alla sebrafiskar från andra generationen (F2) exponerade för skogsindustriellt avloppsvatten under hela livet.



a) för få fiskar överlevde för analys

Figur 13. Konditionsfaktorn (CF) som medelvärde med 95 % konfidensintervall för alla sebrafiskar från andra generationen (F2) exponerade för skogsindustriellt avloppsvatten under hela livet.

De tillväxtdata som presenteras i Fig. 12 och 13 visar gemensamt på en jämförbar tillväxt för alla de avloppsvattenexponerade fiskarna representerande andra generationen jämfört med kontrollerna i rent vatten. En svag stimulans kan noteras för gruppen exponerade för EE2, skillnaderna är dock ej signifikanta. Den androgena kontrollen med 50 ng/l metyltestosteron gav en förhöjd dödlighet bland ynglen medförande att tillräckligt med fiskar ej uppnådde köns mogen ålder. De få yngel som växte upp analyserades därför med avseende på alternativa effektvariabler.

Reproduktionstester

ÄGGPRODUKTION

Den första effektvariabeln som kan studeras vid reproduktionstester med sebrafisk är om lekmognad inträffar vid samma tidpunkt för alla grupper. Eftersom embryona från den första generationen (F1) är befruktade under i stort sett samma timme kan små förändringar i lekmognad fastställas. Vid optimala uppväxtförhållanden avseende vattenkvalitet, ljus och föda är alla individer lekmogna efter 90 dygn (3 månader). En yttre påverkan orsakad av t ex exponering för xenobiotika kan fördröja köns mognaden.

Av de 13 olika undersökta avloppsvattnen, vilka inkluderar totalt 56 olika lekregimer, uteblev leken efter 3 månader vid tre tillfällen. Två av försöksomgångarna utfördes med obehandlat avloppsvatten och där kunde en fördröjd lekstart konstateras för grupperna Högdos 2,5 % och Mellandos 0,67 % av de båda proverna. Fiskarna lekte vid ca 4 månaders ålder och äggproduktionen och befruktningen var lägre än kontrollernas. Ett biobehandlat avloppsvatten gav en likvärdig fördröjning av lekstarten för fiskar exponerade för Högdos. Vid det aktuella fallet startade leken efter ca 4 månader och den visade på helt normala mängder mogen rom och

en hög befruktningsfrekvens. Detta innebär att de studerade koncentrationerna av behandlat avloppsvatten ej påverkade normal könsognadsutveckling hos individerna och fiskarna lekte i 98 % av fallen efter 3 månaders exponering. Försöken med de positiva könshormonskontrollerna, som utförs med rom från samma lekregimer, visar på de endokrina störningar som kan uppstå om fiskarna exponeras för potenta inducerare under hela uppväxten. Leken för fiskar exponerade för 10 ng/l EE2 inhiberas ofta helt efter 3 månader trots att honorna har fullbildad rom. De få hannar som finns i gruppen beroende på den skeva könsfördelningen som uppstår räcker inte till och befruktningen misslyckas ofta. Likvärdiga effekter får man vid exponering för det manliga könshormonet MT. Detta könshormon påverkar framförallt honornas rombildning som reduceras kraftigt. Befruktningen av de få ägg som produceras under en lek är hög eftersom hannar får en ökad fertilitet i ett initialt skede efter exponering för manliga könshormoner (Örn *et al.* 2003).

Lekförsöken utfördes i speciella lektrattar och mängden producerade ägg räknades varje morgon under 7 dygn. I Tab. 9 redovisas den genomsnittliga produktionen av ägg per dygn från fiskar exponerade för skogsindustriellt avloppsvatten och tillhörande kontroller.

Tabell 9. Den totala äggproduktionen under 7 dygn uttryckt som medelvärde med 95% konfidensintervall per grupp och dygn hos sebrafiskar (F1) exponerade under hela livet för alla behandlade skogsindustriella avloppsvatten.

Hög 2,5 %	Mellan 0,67 %	Låg 0.1%	Kontroll 0 %	♀ hormon EE2 10 ng/l	♂ hormon MT 50 ng/l
113±45	158±48	141±35	139±31	44±14	26±17
n.s	n.s	n.s		p<0,01	p<0,001

Äggproduktionen för alla kontrollgrupper uppgick i medeltal till 139 ägg/dygn. Detta kan jämföras med de omfattande studier av reproduktionen hos sebrafisk, som presenteras av Andersen *et al.* (2000) där kontrollgruppernas äggproduktion i medeltal uppgick till 120 ägg per grupp/dygn. Eftersom det är tio honor i varje lektratt motsvarar det en medelproduktion på 14 ägg/dygn och hona under en veckas lek. Ovariecykeln hos de nyligen köns mogna honorna uppgår till ca 2 veckor vilket betyder att ungefär en hona per dygn deltar i leken. Äggproduktionen för lågdosgruppen uppgick till 141 ägg/dygn vilket är helt jämförbart med kontrollgruppernas. Den intermediära koncentrationen uppvisade i genomsnitt 14% högre äggproduktion. Den stimulerande effekten betecknas ofta hormesiseffekt och uppträder företrädesvis i mellankoncentrationer i t ex en försöks serie med avloppsvatten. Högdosgruppen producerade i genomsnitt något färre ägg än kontrollerna men ingen signifikant skillnad kunde detekteras. En jämförelse av data från alla undersökningar utfördes med en ANOVA-analys. Av de 13 undersökta proverna skilde sig endast äggproduktionen signifikant ($p \leq 0.05$) i de två försök där fiskarna exponerats för avloppsvatten uttagna före en biologisk reaktor. Inga koncentrationer av avloppsvatten från biologiskt behandlat avloppsvatten gav signifikant försämrad äggproduktion. En högradigt signifikant skillnad kunde även registreras när äggproduktionen från fiskar exponerade för avloppsvatten jämfördes mot den positiva

etinylostradiol (EE2)-kontrollen. När äggproduktionen från gruppen exponerad för EE2 inkluderades i en ANOVA-analys blev utfallet starkt signifikant, $p=0.00029$. Utan positiva könshormonskontroller erhålles ett p-värde på 0,36 vilket indikerar att variabeln äggproduktion inte påverkas av avloppsvattenexponeringen i de koncentrationer som undersökts i denna studie.

De positiva kontroller där endokrina störningar induceras genom vattenburen exponering för könshormoner visade på en kraftig påverkan på reproduktionen. Som framgår av Tab. 9 erhålles en höggradigt signifikant ($p<0,001$) försämrad äggproduktion registrerades vid alla försök där delpopulationer exponerades för könshormoner. De resultat som redovisas i Tab. 9 visar total produktionen av rom vid de tillfällen som fiskarna lekte. Äggproduktionens minskning uppgick till 70 % för fiskar exponerade för EE2 och motsvarande minskning var 80 % för MT exponerade fiskar. Resultatet för EE2 baserar sig på 10 lekregimer då lek uteblev vid fyra försöksomgångar. Vid endast fyra lekomgångar av 14 möjliga producerades ägg av fiskar exponerade för det manliga könshormonet MT vid den aktuella nominella koncentrationen 50 ng/l.

BEFRUKTNINGSFÖRMÅGA

För att upprätthålla en god reproduktionskapacitet hos en fiskpopulation krävs att den producerade rommen är av god kvalitet. Honans välbefinnande är ytterst den faktor som styr rommens kvalitet. Djuret utnyttjar en hel del av sin energireserv för att bilda rom och miljögifter bundna i fettvävnad kan lätt omlagras till rommen vid oogenesen (äggbildningen). Rommen kan givetvis även påverkas om honan exponeras för kroppsfrämmande substanser via vatten eller föda under rommens utveckling i romsäckarna. Eftersom sebrafiskan är frilekande, är en god vattenkvalitet vid lektillfället en förutsättning för lyckad lek. Mängden rom som produceras vid lektillfället kan ses som mått på honans fertilitet. Flertal studier utförda med sebrafisk (Bresch 1982, Landner *et al.* 1984) har visat att hannarnas fertilitet störs i högre grad av miljögifter än honornas förmåga att producera ägg. Det är därför av största vikt att inte bara studera mängden rom som sebrafiskar lägger vid lek, utan även hur många ägg som befruktas och har chans att vidareutvecklas till fiskyngel. Studerar man befruktning utfallet vid varje lektillfälle får man ett första mått på föräldrafiskarnas sammantagna fertilitet. I Tab. 10 redovisas den samlade befruktningens frekvensen i % för fiskar exponerade för olika doser från rom till 3 månader efter befruktningen.

Tabell 10. Den totala befruktningens frekvensen under 7 dygn uttryckt som medelvärde med 95% konfidensintervall per grupp och dygn hos sebrafiskar (F1) exponerade under hela livet för alla behandlade skogsindustriella avloppsvatten

Hög 2,5 %	Mellan 0,67 %	Låg 0,1%	Kontroll 0 %	♀ hormon EE2 10 ng/l	♂ hormon MT 50 ng/l
95,4±1,85	96,3±1,41	95,8±1,23	96,4±0,88	52,5±11,7	92,3±3,05
n.s	n.s	n.s		$p<0,001$	n.s

Vid en variansanalys (ANOVA) gav inga av de undersökta koncentrationerna av skogsindustriellt avloppsvatten signifikanta skillnader i befruktningförmåga hos fiskarna efter livslång exponering före leken. När de enskilda försöken skärskådas visar det sig att en signifikant försämrad befruktningförmåga jämfört med kontrollerna registrerades i de båda försöksomgångarna där avloppsvatten före biologisk behandling undersöktes. De båda undersökta könshormonerna gav signifikant försämrad befruktningfrekvens ($p < 0,001$ för EE2 och $p < 0,05$ för MT). Resultaten visar att de undersökta koncentrationerna av de olika behandlade avloppsvattnen ($n=12$) som ingått i alla studier inte påverkar sebrafiskens reproduktion mätt som mängden producerad rom samt dess kvalitet.

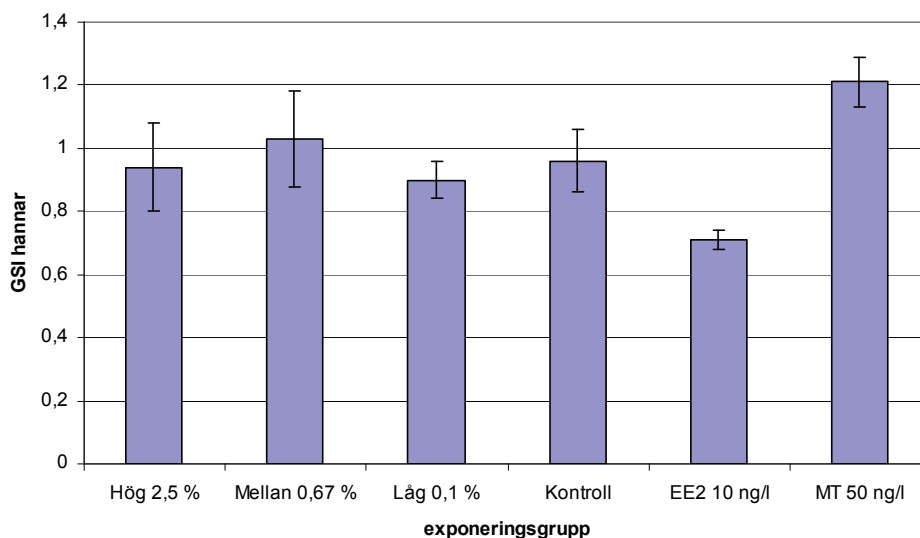
TESTER AV EMBRYO/YNGELS STRESSTOLERANS FÖR VIDARE AVLOPPSVATTENEXPONERING

Att en tillräcklig mängd rom med hög befruktningfrekvens produceras är en förutsättning för att erhålla en god nyrekrytering av fisk. En stark åldersklass av yngel borgar för att en population skall tåla att fiskas på i en nära framtid. Det är viktigt att ynglen i de tidigaste stadierna inte växer upp i en miljö där det finns andra stressfaktorer än t.ex. predation och födokonkurrens. En yttre påverkan som exponering för xenobiotika utgör kan därför försvaga ynglen under uppväxten och det är därför av stort intresse att kontrollera att yngel från exponerade föräldrar klarar en stressituation lika bra som kontrollgruppens avkomma. För att bedöma om någon förändrad känslighet hos andra generationens sebrafiskar kunde detekteras utfördes ett stort antal embryo/yngeltester enligt SS028193. Effekter på kläckningen av embryon, överlevnad hos yngel samt eventuella missbildningar som kan härledas till föräldradjurens livslånga exponering för avloppsvatten skulle kunna befaras utgöra ett hot mot fiskpopulationer som lever i närrecipienten till ett massabruk.

Alla de behandlade avloppsvattnen undersöktes i 5 olika koncentrationer inom intervallet 100-60 volym-% inblandning av avloppsvatten. Avkomma från alla olika föräldragrupper undersöktes var för sig genom tester mot samma avloppsvatten som föräldragenerationen exponerats för. Resultaten från alla de 11 olika försöksomgångarna med behandlat avloppsvatten visar att varken kläckning av embryon, ynglens överlevnad eller morfologi påverkas av exponering för 100 % avloppsvattenkoncentration d v s utspätt behandlat avloppsvatten. Detta resultat erhöles från alla grupper oavsett om deras föräldrar exponerats för avloppsvatten under hela livet eller levt i rent vatten.

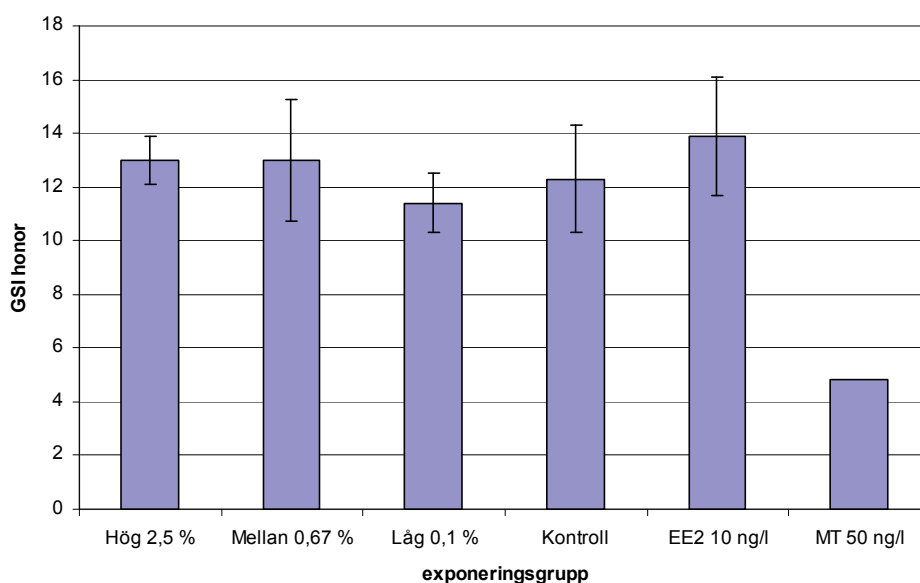
GONADSOMATISKA INDEX

Efter avslutad lek vidtog provtagning av F1-generationens fiskar som producerat en ny F2-generation. I samband med provtagning och könsbestämning vägdes gonaderna på ett antal fiskar från de olika exponeringsgrupperna. Resultatet redovisas som gonadsomatiskt index (GSI) vilket innebär gonadernas vikt i förhållande till fiskens vikt utan inre organ. Resultaten från dessa bestämningar redovisas i Fig. 14 och 15 som hannarnas resp. honornas samlade resultat.



Figur 14. Gonadosomatiskt index (GSI) för sebrafiskhannar representerande första generationen exponerade under hela livet för skogsindustriellt avloppsvatten alternativt positiva kontroller i form av könshormoner.

De gonadosomatiska indexen för sebrafiskhannar exponerade under hela livet ligger väl samlade runt 0,95 % för alla undersökta grupper exponerade för avloppsvatten. Inga signifikanta skillnader föreligger vid jämförelse mellan de olika grupperna. De båda positiva kontrollerna med könshormoner visar som väntat att hannarnas testiklar minskar signifikant i vikt vid exponering för EE2 och man erhåller en signifikant viktökning vid exponering för MT.



Figur 15. Gonadosomatiskt index (GSI) för sebrafiskhonor representerande första generationen exponerade under hela livet för skogsindustriellt avloppsvatten alternativt positiva kontroller i form av könshormoner. Indexet presenteras som medelvärde med 95 % konfidensintervall

Eftersom sebrafisken är en tåtlekande art där honorna i sin mest fertila period lägger ägg var 5:e dag har de stora romsäckar, eftersom det hela tiden nybildas rom (Hisaoaka & Firlit 1962). De avloppsvattenexponerade fiskarnas GSI ligger väl samlat runt kontrollens värde på 12 % och inga signifikanta skillnader kan detekteras. Exponeringen för kvinnligt könshormon bidrar till ett högre index som dock inte skiljer sig signifikant från kontrollgruppernas. Det potenta manliga könshormonet metyltestosteron åstadkommer en 60 %-ig minskning av GSI hos sebrafiskhonor, vilket indikerar att liknande effekter skulle kunna detekteras efter exponering för avloppsvatten om det fanns potenta inducerare i tillräcklig mängd. I denna grupp fanns det endast ett fåtal individer att tillgå för alla analyser, vilket innebär att inget korrekt spridningsmått kunde beräknas.

HISTOLOGISKA UNDERSÖKNINGAR AV GONADER

Resultaten från den ljusmikroskopiska undersökningen av gonader från ca 30 individer från varje försöksserie visade inga skador relaterade till exponeringen för avloppsvatten, oavsett koncentration eller generation. I F1-generationen var testiklarna hos exponerad hanfisk välutvecklade, innehållande en hög andel fullmogna spermier i lumen. Hos honfisk visade inte exponeringen på en förhindrad mognadsutveckling av ägg. Ovarierna innehöll ägg i olika stadier, från primära äggceller till fullmogna ägg, vilket är normalt förekommande för denna typ av tåtlekande art. Liknande resultat kunde ses i F2-generationen, med undantag av att gonaderna hos båda könen inte var lika långt utvecklade i mognadsgrad jämfört med F1-generationen. Initiering av spermiebildning och äggmognad konstaterades i normal omfattning oavsett fiskarnas och deras föräldrars tidigare exponeringsbakgrund.

Påverkan på två generationer fisk av avloppsvatten före behandling

De två försöksserierna som utfördes med prov före behandling i aktivslamanläggning gav en möjlighet att studera hur ”obehandlat” avloppsvatten påverkade två generationer sebrafisk. Resultaten sammanfattas i Tab. 11 där signifikanta skillnader listas för generation F1 och F2 och jämförelser mellan avloppsvatten från Smurfit kapp före och efter aktivslamanläggning redovisas.

Tabell 11. Jämförelse av variabler där signifikanta skillnader gentemot resp. kontroll anges med * vid respektive LOEC-värde (avloppsvattenkoncentration i %) vid tvågenerations test med sebrafisk exponerade för avloppsvatten från Smurfit kapp före och efter aktivslamanläggning.

Avloppsvatten	Tillväxt	Överlevnad	Köns-fördelning	Vitellogenin	Reproduktion
Före	n.s.	0,67*	n.s.	2,5*	2,5*
Efter	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

n.s.) ej signifikant skild från kontroll

Tabell 12. Jämförelse av variabler där signifikanta skillnader gentemot resp. kontroll anges med * vid respektive LOEC-värde (avloppsvattenkoncentration i %) vid tvågenerations test med sebrafisk exponerade för avloppsvatten från Munksund före och efter aktivslamanläggning.

Avloppsvatten	Tillväxt	Överlevnad	Köns-fördelning	Vitellogenin	Reproduktion
Före	n.s.	2,5*	2,5*	2,5*	2,5*
Efter	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

n.s.) ej signifikant skild från kontroll

Bland fiskar representerande första generationen konstaterades en signifikant förhöjd yngeldödlighet i avloppsvattenkoncentrationerna 2,5 och 0,67 % av de båda undersökta proverna före behandling. Detta motsvarar ett LOEC omräknat till TU på 150 respektive 40 för de båda avloppsvattnen baserat på den känsligaste variabeln yngelöverlevnad i flergenerationsstudien. De överlevande fiskarna exponerade för högdosen 2,5 % presterade ett signifikant sämre lekresultat och producerade en svagare och mer stresskänslig yngelgrupp än kontrollen. De fiskar som exponerats för högdos av de obehandlade avloppsvattnen uppvisade även endokrina störningar i form av förhöjda vitellogenin-koncentrationer i lekmogna hannar. Detta visar att hannarna har feminiserats. De ämnen som orsakade alla ovannämnda störningar reducerades i sådan omfattning genom behandlingen att inga av de registrerade effekterna kunde detekteras i prov efter behandling.

Det totala fabriksavloppet från Smurfit kappa före behandling påverkade embryonyngel av sebrafisk. En signifikant försämrad överlevnad registrerades ned till 42 volym % inblandning av avloppsvatten. Även en signifikant förhöjd deformationsfrekvens registrerades i koncentrationer ned till 75 volym % inblandning. Den biologiska behandlingen reducerade mängden komponenter som stör embryonyngelutvecklingen hos sebrafisk. Inga effekter kunde registreras i outspätt behandlat avloppsvatten. Generation F2 representerande avkomma från fiskar som vistats hela livet i avloppsvattenlösningar uppvisade ingen förändrad känslighet för exponering under de tidiga utvecklingsstadierna. Det lägsta LOEC-värdet för grupperna 0,1 och 0 vol/vol % beräknades till 35 vol/vol % inblandning av avloppsvatten dvs i paritet med avkomma från oexponerade föräldradjur. Inga effekter kunde påvisas för avkomma i andra generationen när de exponerades för outspätt behandlat avloppsvatten. Behandlingen har resulterat i ett avloppsvatten där inga effekter kan detekteras i outspädd form (100 vol/vol %) på tidiga utvecklingsstadier hos fisk.

Det totala fabriksavloppet före behandling från Munksund påverkade tidiga utvecklingsstadier hos sebrafisk. De effektvariabler där signifikanta skillnader jämfört med rent vatten kunde detekteras inkluderade både embryo- och yngelstadierna. Den lägsta signifikanta effektnivån registrerades för variablerna överlevnad och deformationer ned till 63 vol/vol % inblandning av avloppsvatten. Den andra generationens avkomma påverkades på likvärdigt sätt som embryonyngel från föräldrar som levte i rent vatten. Ingen förändrad känslighet kunde detekteras beroende på F2 generationens föräldrabakgrund. Den livslånga exponeringen av F1- generationen

har inte lett till skador som manifesterar sig som förändrad stresskänslighet hos den andra generationens fiskar.

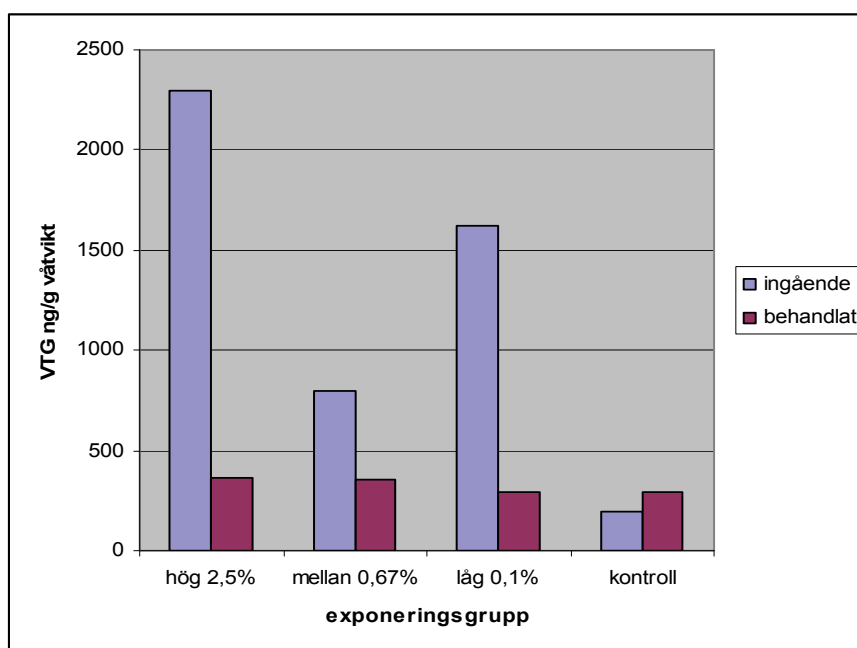
Endokrina störningar hos första och andra generationens fiskar

Den mest påtaliga endokrina störningen som kan uppstå i en fiskpopulation är att andelen av endera kön förändras. Vid försöksavlutningarna bestämdes könet på alla fiskar genom okulär besiktning i mikroskop av öppnade alternativt snittade fiskar. I Tab. 13 redovisas den samlade könskvoterna för alla fiskar representerande F1-generationen.

Tabell 13. Könsfördelning (% hannar) hos alla sebrafiskar representerande generation F1 exponerade för alla olika skogsindustriella avloppsvatten Signifikanta skillnader anges med *.

Hög 2,5 %	Mellan 0,67 %	Låg 0.1%	Kontroll 0 %	♀ hormon EE2 10 ng/l	♂ hormon MT 50 ng/l
53,8±2,31 n=1246	53,5±2,82 n=1461	54,1±1,81 n=1312	52,3±1,78 n=1469	24,9*±3,58 n=387	94,6*±3,14 n=101

En viktig variabel, tillsammans med könskvotsbestämning, för att komplettera informationen om avloppsvattens eventuella östrogena påverkan på fisk är att mäta det honspecifika proteinet vitellogenin (VTG). Proteinet styr bildning av gulekroppen i fiskägget och skall normalt bara kunna detekteras i könsmogna honor. Undersökningar av Örn *et al.*(2006) visar att kvinnligt könshormon och molekyler med liknande stuktur påverkar sebrafiskhanar så att mätbara mängder av VTG kan analyseras i fisken. Bildningen av VTG i hanfiskar, indikerar att de utsatts för exponering av ett kvinnligt könshormon eller en substans som imiterar en sådan substans. Detta ändrar den genetiska koden i fisken från hane till hona vilket i sin tur leder till att könskvoterna förskjuts markant mot en ökad andel i honor i delpopulationen. I Fig. 16 redovisas VTG-koncentrationerna som medelvärden för alla fiskar exponerade för olika koncentrationer avloppsvatten, rent vatten eller könshormoner som en positiv kontroll.



Figur 16. Koncentration av VTG i vuxna hannar (ng/g våtvikt) från första generationen exponerade för skogsindustriavlopp under hela livet. I figuren jämförs medelvärden från de två försöken med obehandlat avloppsvatten med de VTG-nivåer som analyserades i hannar som exponerats för behandlade avloppsvatten.

Ur Tab. 13 framgår att inga av de avloppsvattenexponerade fiskgrupperna uppvisar skeva könsfördelningar. Det sammanlagda könsutfallet varierar mellan 52,3-54,1% hannar i respektive grupp. Exponeringen för EE2 ger en kraftig östrogen effekt och könskvoten förskjuts till 25 % hannar d v s en halvering. Den motsatta effekten erhålles när fiskar exponeras för metyltestosteron där närmare 95 % av fiskarna uppvisar manliga könsorgan trots att, rent statistiskt, hälften av fiskarna har en genetisk kod som säger att de skall utvecklas till honor. Utfallet i båda könshormonsexponerade grupperna är starkt ($p < 0,001$) signifikant skilt från kontrollen i rent vatten. En medelvärdesberäkning av VTG-nivåer i fiskar redovisas i Tab. 14 och ger en grov bild av gruppernas innehåll av det specifika proteinet.

Tabell 14. Vitellogeninkoncentrationer (ng/g helfisk) för sebrafiskar representerande generation F1 exponerade för alla olika skogsindustriella avloppsvatten. Signifikansnivåer anges i raden under.

Hög 2,5 %	Mellan 0,67 %	Låg 0.1%	Kontroll 0 %	♀ hormon EE2 10 ng/l	♂ hormon MT 50 ng/l
713±627	416±206	482±426	275±84,5	778000±384000	710±450
n.s.	n.s.	n.s.		$p < 0,001$	n.s.

Korrekta jämförelser av VTG-koncentrationer bör göras inom samma försöksomgångar eftersom enzymbaserade analyser ofta får skild bakgrundsnivå. De sebrafiskhanar som exponerats för avloppsvatten får signifikant förhöjd VTG-nivå jämfört med respektive kontroll vid två olika koncentrationer. De båda försöken är utförda med obehandlat avloppsvatten. Alla 48 exponeringskoncentrationerna med

behandlat avloppsvatten visar på normala nivåer i paritet med kontrollerna. Den positiva könshormonskontrollen där hannar exponerade för 10 ng/l EE2 visar vilka koncentrationer som kan analyseras i hanfiskar när de utsatts för ett potent feminint könshormon. Nivåerna är ca 3000 gånger högre jämfört med kontrollerna. Sammantaget finns ingen östrogen påverkan mätt som förhöjd VTG-nivå i sebrafiskhannar exponerade för biobehandlat avloppsvatten.

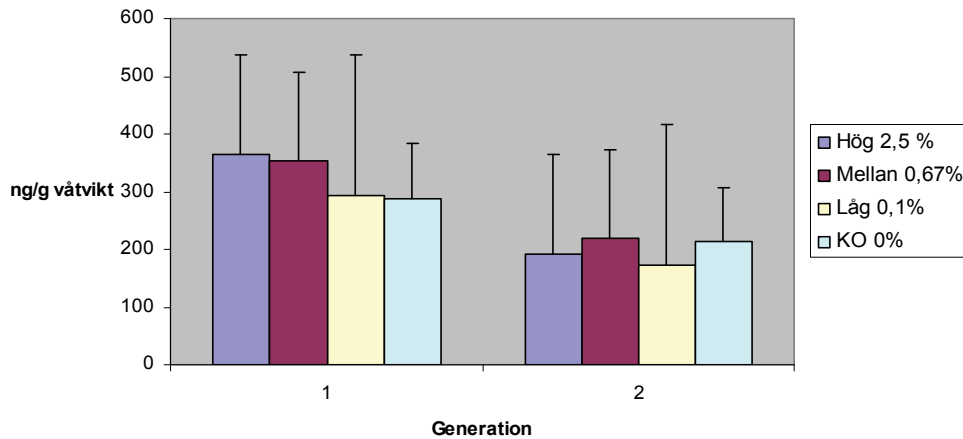
För att tydliggöra eventuella skillnader i VTG-nivåerna i vuxna hannar från första generationens fiskar uppdelat på de olika försöksserierna. Resultat från försök med fabriksavloppsvatten efter biologisk behandling redovisas för sig i Fig. 16. Medelvärden för alla försök är baserade på ca 200 individer per exponeringsgrupp och medelvärdet för biobehandlade avloppsvatten är baserat på ca 150 individer.

Som framgår av Fig. 16 får man en annan bild av VTG-nivån i sebrafiskhannar från första generationen om man väljer att studera resultaten från försök utförda med biobehandlat avloppsvatten. De förhöjningar som kan utläsas ur det samlade materialet kan närmast tillskrivas förhöjda VTG-nivåer hos fiskar exponerade för avloppsvatten före behandling. Resultaten från försöksserierna med behandlat avloppsvatten visar en tendens till ökning i VTG-nivån hos könsmogna hannar från 280 ng/g för kontrollen till 350 ng/g i högdosen där fiskarna exponerats för 2,5 % inblandning av avloppsvatten under hela livet.

Tabell 15. Könsfördelning (% hannar) för sebrafiskar representerande generation F2 exponerade för alla olika skogsindustriella avloppsvatten Signifikanta skillnader anges med *.

Hög 2,5 %	Mellan 0,67 %	Låg 0,1%	Kontroll 0 %	♀ hormon EE2 10 ng/l	♂ hormon MT 50 ng/l
51,9±2,88 n=494	53,0±3,03 n=593	53,4±2,02 n=528	53,0±2,00 n=516	25,5*±1,94 n=100	89,5*±7,45 n=31

Som framgår av Tab. 15 påverkas inte könsfördelningen hos sebrafiskar i andra led (F2) efter livslång exponering av föräldradjur och avkomma för höga relevanta koncentrationer behandlat avloppsvatten. Andelen hannar varierar mellan 51,9-53,4 % för alla undersökta grupper. De undersökta könshormonerna gav däremot kraftiga förskjutningar av andelen hannar och honor i delpopulationerna. I den östrogena ♀-kontrollen utvecklades 25 % av fiskarna till hannar med testiklar och motsvarande resultat för den androgena ♂-kontrollen uppgick till 89 % hannar. Vid en jämförelse mellan de olika generationernas könsfördelning beroende på exponering får man ett starkt signifikant samband ($p < 0,001$) när resultaten för alla grupper undersöks i en ANOVA-analys. När de avloppsvattenexponerade gruppernas könsfördelning undersöks med samma statistiska analys blir resultatet $p=0,96$, vilket innebär att ingen signifikant skillnad kan detekteras.



Figur 17. Sammanställning av alla VTG-analyser utförda på sebrafiskar från två på varandra följande generationer exponerade under hela livet för behandlade skogsindustriella avloppsvatten (n=12). Resultaten presenteras som medelvärden med 95% konfidensintervall.

Fig. 17 visar ett likartat mönster vid jämförelse mellan två på varandra följande generationers innehåll av VTG. Resultaten som presenteras i figuren bygger på analyser av ca 200 fiskar per koncentration från första generationen och ca 150 fiskar/koncentration från andra generationen. För första generationens fiskar kan man skönja en dosberoende effekt efter livslång exponering. För andra generationens fiskar ligger alla VTG-nivåer väl samlade runt kontrollens bakgrundsvärde. Vid en ANOVA-analys av alla VTG-värden från de båda undersökta generationerna får man resultatet $p=0.08$ vilket innebär att det inte finns någon korrelation i resultaten mellan vare sig exponeringskoncentration eller fiskgeneration. Man bör i detta fall ha i minnet att analyserna är utförda på helkroppshomogenat från könsbestämda hannar representerande första generationen och helkroppshomogenat från ej köns mogen fisk från andra generationen. Bakgrundsvärdena för VTG i kontrollgruppens fiskar varierade inom intervallet 275-213 ng/g vilket kan jämföras med 500 ng/g vid en större mätserie rapporterad av Örn et al. (2006).

PÅVERKAN PÅ LEVERNS STORLEK OCH AVGIFTNINGSSYSTEM

Ett grovt mått på att en fisk utsatts för kroppsfrämmande ämnen som den måste omvandla och utsöndra är att leverns storlek förändras i jämförelse med de fiskar som ej exponeras. Oftast ökar levervikten i ett första skede och en hel del fett kan bindas in i vävnaden. Om exponeringen fortsätter och levern påverkas av kroppsfrämmande ämnen under en längre period minskar leverns storlek och en s.k. skrumplever bildas.

Tabell 16. Leversomatiskt index i % (levervikt/ kroppsvikt \times 100) med 95 % konfidensintervall hos sebrafiskar efter livslång exponering för skogsindustriellt avloppsvatten efter biologisk behandling.

Kön	Hög 2,5 %	Mellan 0,67	Låg 0,1%	Kontroll	♀ hormon EE2 10 ng/l	♂ hormon MT 50 ng/l
Hanne	1,53 \pm 0,40	2,06 \pm 0,55	1,91 \pm 0,84	1,46 \pm 0,31	2,69 \pm a	4,27 \pm 1,30
Hona	2,47 \pm 0,43	2,82 \pm 0,84	3,12 \pm 0,35	2,35 \pm 0,48	3,22 \pm 0,54 n.s.	b

n.s. ej signifikant

a) för få individer för att beräkna konfidensintervall

b) inga fiskar utvecklades till funktionella honor

Exponeringen för ett biologiskt behandlat fabriksavlopp visar inga förändringar i leverstorlek efter livslång exponering (Tab. 16). De positiva kontrollerna med könshormoner visar att exponeringen 10 ng EE2 orsakar en 30 % leverförstoring hos honor. Även för hannar registrerades en markant leverförstoring efter exponering för EE2, men endast två individer utvecklades till funktionella hannar så någon statistisk analys kunde inte genomföras. Leverförstoringen efter exponering för metyltestosteron (MT) är än mer markant för hannar och en signifikant skillnad med mer än en fördubbling av LSI registrerades. Exponeringen för MT ger en fullständig maskulinisering och alla fiskar utvecklades till hannar oavsett ursprunglig genetisk kod. Detta innebär att inga funktionella honor fanns att tillgå för provtagning trots att ca 50 % av ynglen var honor under den tidiga yngelperioden, vilket framgår av kontrollvärden i Tab. 13 och 15.

ÖVRIGA ANALYSER SOM HAR UTFÖRTS VID ENSKILDA FÖRSÖK

Som ett komplement till alla de olika effektvariabler som redovisats kan man utföra flera analyser på sebrafiskar som ingår i dessa typer av försök. Vid två försöksomgångar analyserades påverkan på leverns avgiftningssystem (EROD) vilken är en indikator på om det finns plana PCBer eller dioxinliknande molekylstrukturer i ett avloppsvatten. Dessa fiskars blodbild undersöktes även genom att räkna röda och olika typer av vita blodceller på blodstryk från varje individ. Vid en försöksomgång undersöktes ett antal exponerade fiskars glykogenreserv i muskulaturen. Sammantaget visade de olika tilläggsanalyserna inte på någon dos-beroende effekt som kunde kopplas till exponeringen för avloppsvatten.

Sammanfattning - Sebrafisk

De olika undersökningarna på avloppsvatten utförda med flera generationer sebrafisk visade att testsystemet är robust och tillförlitligt och spridningen i resultaten från de olika effektvariablerna var låg. Avloppsvatten uttaget före behandling visade på signifikanta effekter på tillväxt, överlevnad och reproduktion för den första generationens fiskar. Effekter på den andra generationens fiskar konstaterades, men kunde inte knytas till föräldrarnas bakgrund utan till den aktuella exponeringen av de tidiga utvecklingsstadierna. Signifikanta effekter efter livslång exponering för avloppsvatten före behandling, kunde detekteras ned till 2,5 % resp 0,67 % avloppsvattenkoncentration. Dessa effekter uteblev i stort sett helt efter en biologisk

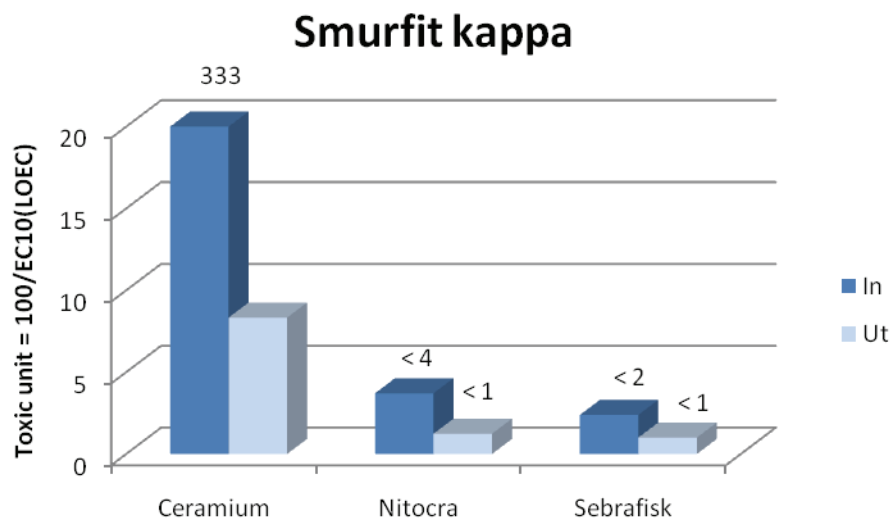
behandling av avloppsvattnen. Effekter kunde inte påvisas i höga till relevanta koncentrationer behandlat avloppsvatten vare sig för den första eller den andra generationens fiskar. Övriga 10-tal avloppsvatten efter behandling som undersökts i höga till relevanta koncentrationer gav inte några signifikanta förändringar i överlevnad, tillväxt eller reproduktionsutfall. Endokrina störningar i form av förhöjda koncentrationer av romproteinet vitellogenin uppmättes hos hannar exponerade för obehandlat avloppsvatten. Exponering för behandlade avloppsvatten visade på normalt låga koncentrationer av romproteiner hos hannar och könskvoterna var fullt normala vid jämförelse med rent vatten. Slutsatsen som kan dras efter utvärderingen av flergenerationstesterna med sebrafisk är:

De fiskar som ingår i testen svarar med önskvärd tydlighet på om det finns komponenter i avloppsvattnet som stör variablerna tillväxt, könsfördelning och fortplantningsförmåga både på individnivå och populationsnivå.

Övergripande Diskussion och Rekommendationer

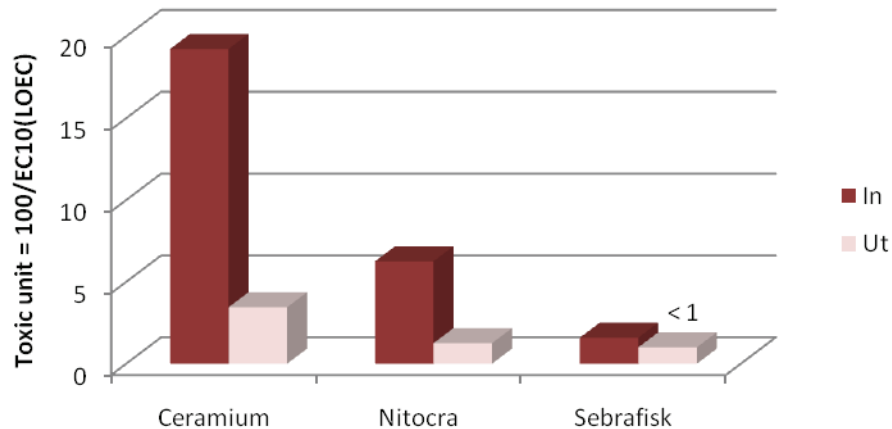
Vid två olika försöksomgångar utfördes undersökningarna på samtliga tre testarter med obehandlat respektive biologiskt behandlat avloppsvatten från respektive anläggning, nämligen Smurfit kappa resp. Munksund. Dessa undersökningar utfördes för att studera hur väl en aktiv-slamanläggning i pilotskala skulle kunna rena de utgående avloppsvattnen från respektive bruk. Det försöksupplägget gav oss möjlighet att studera känsliga subletala effektvariabler före och efter behandling vilket tidigare endast undersökts med korttidstester.

I Fig. 18 redovisas resultat från Smurfit kappa för samtliga tre arter testade före och efter rening. Effektnivåerna är omräknade till "toxic units" (toxic unit = 100/EC10 (LOEC) och hög stapel anger hög toxicitet. Samtliga tre arter visar tydligt att giftigheten blir betydligt lägre efter rening. Rödalgen *Ceramium* uppvisar högst känslighet, särskilt mot det obehandlade vattnet. Fig. 19 redovisar samma sak för avloppsvatten före och efter rening vid Munksund. Resultaten är likvärdiga, men med den skillnaden att det obehandlade vattnet är långt mindre toxiskt för *Ceramium* än motsvarande från Smurfit kappa.



Figur 18. Jämförelse av giftigheten före (IN) och efter rening (UT) gentemot de tre testade organismerna vid massindustrin Smurfit kappa. Giftigheten uttrycks som "toxic units" (= 100/EC10 för *Ceramium*, resp. 100/LOEC för *Nitocra* och Sebrafisk).

Munksund



Figur 19. Jämförelse av giftigheten före (IN) och efter rening (UT) gentemot de tre testade organismerna vid massindustrin Munksund. Giftigheten uttrycks som "toxic units" (= 100/EC10 för *Ceramium*, resp. 100/LOEC för *Nitocra* och Sebrafisk).

Ett tungt vägande skäl till varför reproduktion och utveckling måste anses utgöra viktiga testvariabler för skogsindustriavlopp ligger i det faktum att dessa styrs av hormoner i såväl fiskar, ryggradslösa djur som växter. Många växter, däribland träd som ger virke för massatillverkning, innehåller ämnen som kan påverka hormonernas verkan eller imitera dessa hos andra arter. Dessa ämnen och andra toxiner har genom evolutionen utvecklats som ett led i en form av kemisk krigföring för att konkurrera ut andra växter samt som skydd mot betande ryggradslösa djur (t ex insekter, mollusker) och högre växtätande djur. Det är därför förväntat att massindustrins processande av stora virkesmängder på en och samma plats utgör en potentiell risk för att sådana substanser extraheras och hamnar i den lokala eller regionala miljön, tillsammans med de nya (oönskade) substanser som tillverkningen av papper från vedråvaran kan medföra. Att så sker det vet vi redan, men vad vi primärt som ekotoxikologer är satta att utvärdera gäller huruvida skadan är stor eller försumbar. Valet av testarter och effektvariabler måste därför vara ägnat att studera just det vi med dagens kunskap tror kan vara problemet. Valet av ett testpaket bestående av tre arter är en konsekvens av detta. Fiskar är ryggradsdjur och har hormonsystem som i hög grad liknar människans, medan ryggradslösa djurs hormonsystem bygger på helt andra molekylstrukturer. Växter i sin tur har ytterligare varianter av kemiska lösningar för att klara sin fortplantning, tillväxt och skydd mot toxiner. Av detta följer att dessa tre grupper är mer eller mindre oumbärliga om man vill testa en stor och delvis okänd blandning av kemiska ämnen som avloppen från våra olika massavedsprocesser representerar. Säkert kan man argumentera för att inkludera ytterligare testarter, men det finns också goda skäl för att hålla testningen inom rimliga gränser, både resursmässigt och av tidskäl. I framtagandet av föreliggande material har vi haft hypotesen att om inga eller ringa effekter visade sig i våra tester så skulle vi kunna "frikänna" avloppsvattnet med

avseende på dess potentiella hot avseende toxiska effekter på fisk, kräftdjur och växter. Eftersom vi inte testar (och aldrig kommer att testa) på alla tänkbara organismer och funktioner i recipienterna så finns naturligtvis ingen absolut säkerhet i ett sådant frikännande, men vi har ett bättre prognosinstrument än vi någonsin haft tidigare. Vi har således kunnat påvisa att de undersökta avloppsvattnen som genomgått någon form av rening i kombination med lokala utspädningsförhållanden inte synes utgöra något hot mot respektive recipients biota. Vi har också kunnat påvisa i två fall där vi haft i uppgift att mäta effekter före och efter rening att reningen har fungerat och minskat toxiciteten märkbart. De använda testpaketen måste därför anses ha fungerat väl. När väl detta har konstaterats infinner sig en del andra frågor, t ex: Hur vi kan bli mer kostnadseffektiva? Finns enklare tester som fungerar lika bra? Kan vi öka den ekologiska relevansen? Kan vi tillgodose de skärpta kraven på minskat antal försöksdjur och reducerat lidande?

Hur kan vi bli mer kostnadseffektiva? Vad avser tester med *Ceramium* så har flera förenklingssteg inletts redan innan de nu aktuella skogsindustrivattnen började testas, nämligen att ersätta reproduktionstestet med det mer tillförlitliga tillväxttestet. Detta har inte inneburit minskat känslighet, men enklare testförfarande och högre precision i resultaten. Erfarenheterna från en lång rad tester med olika substanser har inte kunnat påvisa att effekter på reproduktion uppträder vid lägre nivåer än effekter på tillväxt. Därmed är *Ceramium*-testet redan kostnadseffektivt och har hög(-sta) känslighet mot testade blekeriavlopp i denna sammanställning. Metodiken förväntas bli en färdig ISO-standard inom högst 2 år. För kräftdjuret *Nitocra spinipes* har vi utnyttjat ett livscykeltest med flera ingående subletala testvariabler. Testerna har fungerat väl och viktiga ekotoxikologiska mått har använts. Eftersom livscykeltestet är tämligen resurskrävande och andra i testet ingående variabler givit samma känslighetsnivå efter betydligt kortare exponeringstid som krävs för ett helt livscykeltest finns utrymme för förenklingar, anser vi. Som framgår av utvärderingen utgör larvdödighet och larvutveckling efter 6 dygn det känsligaste måtten av alla ingående variabler. Det skulle utgöra en ringa resursvinst att splittra dessa två för att bara utnyttja en av dessa variabler, eftersom båda lätt kan kombineras in i samma test. Man skulle således inte göra någon egentlig tidsvinst på att t ex bara utnyttja larvdödigheten som effektvariabel. Vår bedömning är att *Nitocra*-tester på svenska massaindustriavlopp (av de typer vi här testat) fortsättningsvis kan genomföras som en kombination av larvdödighet och larvutveckling till ca halva kostnaden det krävs för att genomföra ett livscykeltest med samma art. För både *Ceramium* och *Nitocra* föreligger inom kort standardiserade metoder (ISO resp. OECD) med avseende på de förenklade metoderna som beskrivs ovan, varför konkurrerande testlaboratorier kan tillägna sig metodiken och bidra till en marknadsstyrd testkostnad, d v s priskonkurrens kan förväntas.

Vid genomgång av de olika responsvariabler som undersökts med två på varandra följande generationer sebrafisk kan följande konstateras. De omfattande undersökningarna av andra generationens fiskar gav ingen förändrad effektbild vid jämförelse med den första generationen. De biobehandlade avloppsvattnen som undersökts gav ej upphov till t.ex. några reproduktionsstörningar som manifesterade sig i andra generationen. I ett första steg föreslår vi därför att om inga indikatio-

ner på genetiska skador eller andra typer av långsiktiga skador befaras kan fisktesterna för tillståndsprövning utföras med en (1) generation fisk. Alla undersökningar görs då på F1 generationen och deras reproduktionsutfall utgör den sista ”end-pointen”. Detta innebär att försöksperioden kortas med ca 4 månader och kostnaden kan reduceras med 30-50% beroende på vilka tillvalsanalyser (t ex EROD, VTG, LSI) som är aktuella för varje försöksserie.

Vilka nya tester finns “runt hörnet? Det sker en snabb utveckling av testmetoder inom t ex proteomik, där man ges större möjligheter att spåra toxiska orsakssammanhang inom biokemi och fysiologi. För riskbedömningar av miljöeffekter är det dock inte den typen av fördjupning som är mest angelägen, utan frågor av hög ekologisk relevans som t ex möjliga effekter på populationer eller ekosystem. Vi kan därför inte för tillfället se att ny teknik inom den närmaste tiden kommer att ändra bilden av vilka testmetoder som är mest relevanta för bedömning av skogsindustrins toxiska belastning på miljön.

Nya arter? Både *Ceramium tenuicorne* och *Nitocra spinipes* är vanligt förekommande i den svenska miljön och därmed representativa för den marina och bräckta miljön i vår del av världen. För testning av effekter på relevanta växter i svensk sötvattensmiljö finns sedan länge väl beprövade standardiserade metoder mikroalger (t ex *Pseudokirchneriella subcapitata*) och kärlväxter (t ex andmat, *Lemna minor*) som kan användas vid behov. På motsvarande sätt finns även sötvattenslevande kräftdjurstester (t ex med olika arter av släktena *Daphnia* och *Ceriodaphnia*) som är standardiserade och inkluderar (asexuell) fortplantning och larvöverlevnad.

Med sebrafisk förhåller det sig lite annorlunda, eftersom denna tropiska fiskart saknar ekologisk koppling till svenska recipienter. En stark framtida kandidat att utmana sebrafisken utgör storspiggen (*Gasterosteus aculeatus*), som hör till den svenska faunan och påträffas i såväl söt som marin och bräckt miljö, ofta i stort antal. Det gör arten ekologiskt relevant för miljöriskbedömningar i svenska recipienter och medger att observationer av data från vilda populationer i fält kan kombineras med laboratorieförsök. Internationellt pågår omfattande forskning kring storspiggens biologi och artens hela genom (genupsättning) finns numera kartlagt. Vid ITM har vi använt arten för ekotoxikologiska fältstudier och laboratorieförsök under snart 10 år (Hahlbeck 2004, Pettersson et al. 2007) med goda resultat. Från bl a brittiskt håll är trycket starkt att utveckla standardiserade testmetoder med storspigg, särskilt med avseende på att den är överlägsen andra arter vad avser möjlighet att studera störningar i könsutvecklingen.

Försöksdjursetiska aspekter: Redan 1959 lanserade Russel & Burch (1959) begreppet ”de 3 R:n” som står för Replacement, Reduction and Refinement avseende strävan att minska försöksdjursanvändningen i toxikologiska tester och därmed förknippat lidande hos de exponerade djuren. Konceptet avsåg primärt varmblodiga ryggradsdjur (t ex apor, hundar, kattor, gnagare etc.), men omfattar alla ryggradsdjur och därmed också fiskar. Principen är idag i högsta grad levande via EU:s expertorgan ECVAM (European Centre for the Evaluation of Alternative Methods) och finns närmare presenterad i Direktiv 86/609/EEC (EC, 1986). Här beskrivs också på vad sätt foster är undantagna från dessa regler, vilket ger ett visst (mora-

liskt?) stöd för att söka substitut för tester med vuxen i fisk i form av tester med fiskembryon. I Tyskland har detta arbete varit synnerligen aktivt (Schulte & Nagel 1994) och resulterat i nationella regler och tillämpningar. Sådan metodik med sebrafisk är för närvarande föremål för standardisering också inom ISO och OECD och vi har vid ITM funnit att metodiken fungerar även för storspigg. Detta innebär att vi sannolikt kommer att engagera oss i ett internationellt nätverk för utveckling av ett standardiserat fiskembryotest där storspiggen ingår som ett likvärdigt alternativ till sebrafisken. Med tanke på att massindustriavlopp kan ge hormonella störningar hos fisk och nuvarande embryotester inte detekterar dessa, utgör fiskembryotester idag inget alternativ till tester med vuxen eller juvenil fisk. Därför måste strävan att förenkla och reducera antalet försöksdjur åtminstone tills vidare utgöras av smärre modifieringar av befintliga testmetoder och fortfarande med sebrafisk.

I den ständiga strävan att minska antalet försöksdjur i de här använda sebrafisktesterna föreslås att testerna med F2 generationen utgår från en standardtillståndsprövning enligt Miljölagen. Detta innebär en testserie mindre med en (1) generation fisk vilket innebär en stor minskning av försöksdjursåtgången. En testserie där endast exponering av generation F1 ingår gör att ungefär hälften så många försöksdjur behövs för att erhålla adekvata underlag för bedömning av avloppsvattens påverkan på fisk. I genomsnitt har ca 800 fiskar används inom varje försöksserie inkluderande två generationer. En halvering av försöksdjursanvändningen innebär således att endast ca 400 fiskar kommer att ingå i testerna som ligger till grund för tillståndsprövningen.

Erkännanden

Vi vill härmed uttrycka vår stora uppskattning för det omfattande och många gånger mycket krävande laboratorie- och utvärderingsarbete som utförts av våra medarbetare vid ITM i samband med genomförandet av föreliggande tester. Särskilt stort tack riktas till Karin Ek och Margareta Linde för mycket kvalificerat arbete i alla led. Leif Norrgren med personal tackas för alla vitellogeninanalyserna och vissa snittningar och könsbetämningar på sebrafisk.

Referenser

- Avfall Sverige (2008) Metodik för klassificering av H14-kriteriet I Avfallsförordningen. Förslag till biotestbatteri för klassificering av farligt avfall. Ekotoxikologisk testning av bakterie, alg, kräftdjur och fiskembryo. Avfall Sverige Rapport 2008:16U. 77 sidor
- Bregnballe, F. (1961) Plaice and flounder as consumers of the microscopic bottom fauna. Medd. Danm. Fiskeri- og Havunders. (1961)3(6):133-182
- Breitholtz, M., Wollenberger, L. and Dinan, L. (2003) Effects of four synthetic musks on the life cycle of the harpacticoid copepod *Nitocra spinipes*. *Aquatic Toxicology* 63(2):103-118
- Breitholtz, M. and Wollenberger, L. (2003) Effects of three PBDEs on Development, Reproduction and Population Growth Rate (rm) of the Harpacticoid Copepod *Nitocra spinipes*. *Aquatic Toxicology* 64:85-96
- Bresch, H. (1982) Investigation of the long-term action of xenobiotics on fish with special regard to reproduction. *Ecotoxicol. Environ. Safety*. 6:102-112
- Bruno, E., Eklund, B. (2003) Two new growth inhibition tests with the filamentous algae *Ceramium strictum* and *C. tenuicorne* (Rhodophyta). *Environmental Pollution*, 125:287-293
- Dave, G., Damgaard, B., Grande, M., Martelin, J.-E., Rosander, B. and Viktor, T. (1987) Ringtest og an embryo-larval toxicity test with zebrafish (*Brachydanio rerio*) using chromium and zinc as toxicants. *Environ. Tox. and Chem.* 6:61-71
- Dahl, U., Gorokhova, E. and Breitholtz, M. (2006) Application of growth-related sublethal endpoints in ecotoxicological assessments using a harpacticoid copepod. *Aquatic Toxicology* 77(4):433-438
- Dahl, U. and Breitholtz, M. (2008) Integrating individual ecdysteroid content and growth-related stressor endpoints to assess toxicity in a benthic harpacticoid copepod. *Aquatic Toxicology*, 88:191-199
- Eklund, B. (1995) Metodmanual för reproduktionstest med rödalgen *Ceramium strictum*. ITM-rapport nr 40
- Eklund, B. (1993) A seven day reproduction test with the marine red alga *Ceramium strictum*. In: Wilbert Slooff and Hans de Kruijf (Eds), *The Science of the Total Environment, Suppl. 1993, Part I*, 134:749-759
- Eklund, B., M. Linde, and M. Tarkpea, (1996) Comparative assessment of the toxic effects from pulp mill effluents to marine and brackish water organisms. In: Mark R. Servos, Kelly, R. Munkittrick, John H. Carey and Glen J. Van der Kraak (Eds), *Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents*, pp 95-105

Eklund, B. (1998) Reproductive performance and growth response of the red alga *Ceramium strictum* under the impact of phenol. *Marine Ecological Progress Series*, 167:119-126

Eklund, B. and Ek, K. (2004) Metodmanual för tillväxthämningstest med makroalgen *Ceramium tenuicorne* - en vanlig alg i brackvatten och marina kustzoner. ITM report no. 132. ISSN 1103-341; ISRN SU-ITM-R-123-SE

Eklund, B. (2005) Development of growth inhibition test with the marine and brackish water red alga *Ceramium tenuicorne*. *Marine Pollution Bulletin*, 50:921-930

Eklund, B. (2006) Report on pre-validation data from the *Ceramium* growth inhibition test in 2006. Report to ISO TC 147/SC5 WG 5

Gabrielsen, T.M., Brochmann, C. and Rueness, J. (2003) Phylogeny and interfertility of North Atlantic populations of '*Ceramium strictum*' (Ceramiales, Rhodophyta): how many species? *European Journal of Phycology* 38:1-13

Granmo, Å., Ekelund, R., Bengtsson, B.-E., Dave, G., Fischer, S., Lindén, O., Svanberg, O. and Viktor, T. (1985) Toxicity testing of industrial effluents with fish, crustaceans and molluscs. National Swedish Environment Protection Board Report 1733 E (in English)

Hiasoka, K.K. and Firlit, C.F. (1962) Ovarian cycle and eggproduction in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Copeia* 4:788-792

Kotwicki, L., Troch, M. D., Urban-Malinga, B., Gheskiere, T. and Weslawski, J. M. (2005) Horizontal and vertical distribution of meiofauna on sandy beaches of the North Sea (The Netherlands, Belgium, France). *Helgol. Mar. Res.* 59:255-264

Landner, L., Neilson, A.H., Sörensen, L., Tärnholm, A. and Viktor, T. (1985) Short-term test for predicting the potential of xenobiotics to impair reproductive success in fish. *Ecotox. and Environm. Safety* 9:282-293

Medina, M., Barata, C., Telfer, T. and Baird, DJ. (2002) Age- and Sex-Related Variation in Sensitivity to the Pyrethroid Cypermethrin in the Marine Copepod *Acartia tonsa* Dana. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42:17-22

Neilson, A.H., Allard, A-S., Reiland, S., Remberger, M., Tärnholm, A., Viktor, T. and Landner, L. (1984) Tri and tetra-chloroveratrole, metabolites produced by bacterial O-methylation of tri and tetrachloroguaiacol: An assessment of their bio-concentration potential and their effects on fish reproduction. *Can. J. Fish. Aqua. Sci.* 41(10):1502-1512

Neilson, A.H., Allard, A-S., Fischer, S., Malmberg, M. and Viktor, T. (1990) Incorporation of a subacute test with zebrafish into a hierarchical system for evaluating the effect of toxicants in the aquatic environment. *Ecotox. and Environ. Safety* 20:82-97

- Newsome, C.S and R.D. Piron (1982) Aetiology of skeletal deformities in the Zebra danio fish (*Brachydanio rerio*, Hamilton –Buchanan) *J Fish. Biol.* 21:231-237
- Oppenheimer, J.M. (1936) Structures developed in amphibians by implantation of living fish organizer. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 34:461-463.
- Rueness, J. (1978) Hybridization in red algae. In: *Modern approaches to the taxonomy of red and brown Algae.*, Publ. by : Academic Press; London (UK), 1978, pp. 247-262
- Rueness, J. and Kornfeldt, R.A. (1992) Ecotypic differentiation in salinity responses of *Ceramium strictum* (Rhodophyta) from Scandinavian waters. *Sarsia*, 77:207-212
- Svensk Standard SS028193 (1988) Vattenundersökningar- bestämning av toxicitet för embryoner och yngel av sötvattenfisk- Semistatisk metod.
- Sörensen, L. and Landner, L. (1978) The ISO ringtest. on determination of acute toxicity to fish - Summary of results and experiences obtained by IVL. IVL-B-publ. 425.
- Vuorinen, M. and Vuorinen, P.J. (1987) Effects of bleached kraft mill effluent on early life stages of brown trout (*Salmo trutta* L) *Ecotox.and Environ. Safety* 14:117-128
- Woltering, D. (1984) The growth response in fish chronic and early life stage toxicity tests : A critical review. *Aquatic Toxicology* 5:1-21
- Örn, S., Gessbo, Å., Steinholz, Å. and Norrgren L. (2000) Zebrafish (*Danio rerio*) – A candidate to evaluate endocrine disrupting chemicals. *Tema Nord* 2000:555, pp 47-62
- Örn, S., Svensson, A., Viktor, T., Holbech, H. and Norrgren, L. (2006) Male biased sex ratios and vitellogenin induction in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to pulp mill effluent. *Arch. of Environmental Contamination. and Toxicology* 51(3):445-451
- Örn, S., Yamani, S. and Norrgren, L. (2006) Comparison of vitellogenin induction, sex ratio and gonad morphology between zebrafish and Japanese medaka after exposure to 17 α -ethinylöstradiol and 17 β -trenbolone. *Arch. of Environmental Contamination. and Toxicology* 51(2):237-243
- Örn, S., Holbech, H., Madsen, T.H., Norrgren, L. and Pedersen, G. (2003) Gonad development and vitellogenin production in zebrafisk (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone. *Aquatic Toxicology* 65:397-411

Utvärdering av biologiska tester gjorda på svenska skogsindustriavlopp 2001-2007

RAPPORT 6304

NATURVÅRDSVERKET
ISBN 978-91-620-6304-7
ISSN 0282-7298

I rapporten utvärderas tillförlitligheten och tolkbarheten av biologiska karakteriseringar av 14 avloppsvatten från svensk massindustri. Utvärderingen visar att de använda testarterna och testsystemen genomgående har fungerat väl. Det framgår även att testerna kan göras enklare, under kortare tid och till lägre kostnad.

I rapporten dras slutsatsen att det är av stor vikt att tester även fortsättningsvis genomförs på flera trofnivåer, det vill säga på både växter, kräddjur och fisk, för att så bra som möjligt kunna bedöma eventuella giftigheter hos avloppsvattnen.

