



STOCKHOLMS UNIVERSITET
INSTITUTET FÖR TILLÄMPAD MILJÖFORSKNING (ITM)
Laboratoriet för akvatisk ekotoxikologi (ITMx)

Undersökning av kemikalier med biologisk aktivitet i Örserumsviken

Slutrapport mars 2003



**Henrik Sundberg, Ulla Tjärnlund, Gun Åkerman, Rasha Ishaq, Birgitta Liewenborg,
Yngve Zebühr, Maria Linderoth, Dag Broman och Lennart Balk**

Undersökning av kemikalier med biologisk aktivitet i Örserumsviken, Slutrapport mars 2003

Rapport till Västerviks kommun

Författare Henrik Sundberg*, Ulla Tjärnlund, Gun Åkerman,
Rasha Ishaq, Birgitta Liewenborg, Yngve Zebühr, Maria
Linderoth, Dag Broman och Lennart Balk

Adresser Laboratoriet för akvatisk ekotoxikologi
Institutet för tillämpad miljöforskning, ITM
Stockholms universitet

106 91 Stockholm

* 08-674 77 66, Henrik.Sundberg@itm.su.se

Uppdrag inom Projekt Örserumsviken
(www.vastervik.se/miljo/orserum/)

Beställare Västerviks kommun
Miljö- och byggnadskontoret
593 80 Västervik

Ombud Mariann Teurnell Söderlund
0490-888 71

Projektledare Kjell Hansson, Empirikon AB
08-511 733 10

Delprojektledare Projektering Pär Elander, Envipro Miljöteknik AB
013-35 72 76

Delprojektledare Miljökontroll Christer Ramström, Västerviks kommun
0490-888 93

Projektstöd Tommy Hammar, Länsstyrelsen Kalmar
0480-822 19

Sammanfattning och slutsatser	3
1 Inledning	5
1.1 Miljögifter i Örserumsviken	5
1.2 Andra kemikalier i Örserumsviken än PCBer och Hg har potential att orsaka mest skada	5
1.3 Strategi för att finna de mest potenta miljögifterna.....	6
1.4 Relevans för saneringsarbetet i Örserumsviken.....	7
2 Material och metoder	7
2.1 Prover	7
2.1.1 Biologiska prover	7
2.2 Extraktion och fraktionering av organiska kemikalier	9
2.2.1 Beredning av exponeringslösningar.....	10
2.3. Biomarkörer.....	11
2.3.1. Nanoinjektion.....	11
2.3.2 Histopatologi	11
2.3.3 Etoxyresorufin O-deetylerings (EROD) aktivitet	11
2.3.4 DNA-addukter.....	12
2.4 Kemisk analys av PAHer	12
2.4 Statistik	12
3 Resultat	13
3.1 Toxiska effekter i regnbåge orsakade av de isolerade exponeringslösningarna.....	13
3.2 DNA-addukter i vildlevande fisk.....	20
3.3 Kemisk analys	21
4 Diskussion	22
4.1 Hur giftigt är det i Örserumsviken?	22
4.2 Vilka kemikalier ger de toxiska effekterna vi ser?.....	23
4.3 Var kommer dessa giftiga kemikalier ifrån?	25
4.4 Hur påverkar detta saneringen av Örserumsviken?.....	26
5. Referenser	26
6 Erkännanden.....	28

Sammanfattning och slutsatser

Området kring och i Örserumsviken är kraftigt förorenat av miljögifter. Totalt beräknas det finnas mellan 500 kg och 1000 kg var av kvicksilver (Hg), ΣPCB och vissa PAHer i området. Av dessa typer av miljögifter beräknas ca 20% finnas i Örserumsvikens bottensediment. Westerviks Pappersbruk som 1915-1980 hade sin verksamhet i den inre delen av viken misstänks vara orsaken till de höga halterna av miljögifter. På grund av den höga halten av dessa kemikalier i bottensedimentet läcker de konstant ut i den akvatiska miljön och kan orsaka skada på bland annat fisk i området. En tidigare undersökning har visat att andra kemikalier än de ovan nämnda har mest potential att orsaka skada på fisk. Under hösten 1999 inleddes därför detta forskningsprojekt där målen var att identifiera dessa okända kemikalier, samt att undersöka om de var unika för Örserumsviken. Genom denna undersökning erhålls ett bättre beslutsunderlag rörande vilka typer av kemikalier som skall saneras från vår miljö. Dessutom, för att i så hög utsträckning som möjligt förebygga spridning av de mest giftiga kemikalierna under ett saneringsarbete, kan reningstekniken anpassas till dessa kemikaliers fysio-kemiska egenskaper.

Föreliggande slutrapport summerar denna undersökning där vi undersökt toxiska effekter på fisk orsakade av de kemikalier som finns i Örserumsviken. De biologiska effekter vi undersökt är utvecklingsskador och dödlighet på nykläckta regnbåglarver. Larverna har blivit exponerade som nybefruktade ägg för organiska Totalextrakt och fraktioner därav från bottensediment insamlat i Örserumsviken, Slingsviken (referens, sydväst om Örserumsviken) och sjön Flögen (referens, utanför Vetlanda). Vidare har förändringar i aktivitet för en viss grupp av leverenzym analyserats i dessa regnbåglarver genom en metod som kallas EROD-aktivitet. En ökad EROD-aktivitet speglar en ökad exponering av bland annat PCBer och PAHer och ger därmed ett indirekt mått på subletala (ej direkt dödande) effekter. Även vildlevande gädda och abborre från Örserumsviken och Trosa skärgård (referensområde) har insamlats. Permanenta skador på DNA i dessa fiskars lever har undersökts genom att mäta så kallade DNA-addukter. Parallellt med undersökningar av dessa biologiska effektvariabler har även kemiska analyser utförts på de isolerade fraktionerna från bottensedimentens Totalextrakt.

Följande kemikalier i Örserumsviken kan orsaka skador på fisk:

Hg. Användes som fungicid i rören under driften av pappersbruket, vilket ledde till att stora mängder släpptes ut i Örserumsviken. Halterna av Hg är för låga för att ge de skador vi har undersökt, dessutom har MAF-fraktionen, den fraktion som skall innehålla Hg låg toxisk potential. Trots detta finns det ändå en övervägande risk att Hg kan orsaka utvecklingskador på vildlevande fisk i området.

PCBer. Självkopierande papper innehållande PCB gick ej att återvinnas på pappersbruket och istället dumpades dessa restfibrer i viken, vilket ledde till de höga halterna av PCBer i området. Endast en mindre del av de utvecklingskador vi observerat orsakas av PCBer. Ungefär hälften, eller strax därunder, av vissa av de undersökta subletala effekterna såsom ökad EROD-aktivitet, kan förklaras av halten PCBer i området. De DNA-skador vi observerat hos vildlevande gädda och abborre i området orsakas ej av PCBer.

18 analyserade PAHer. Troliga förklaringar till de höga PAH-halterna i området är deponerad aska som bildades i ett koleldat värmekraftverk vid pappersbruket och bitumenpapper (asfaltspapper) som ej gick att återvinnas, samt diffusa källor såsom trafik och Östersjön. En väldigt liten del av de utvecklingskador vi observerat och ungefär 10% av den ökade EROD-aktiviteten orsakas av de 18 PAHerna. Hur stor del av de DNA-skador vi observerat i vildlevande fisk som orsakas av dessa PAHer är idag ej klargjort, dock pågår vidare undersökningar.

Flera, troligtvis hundratals, polycykliska aromatiska föreningar (PAF). Huvuddelen av de skador vi studerat orsakas av andra typer av PAF än de 18 analyserade PAHerna. Källorna till dessa PAF är troligtvis samma som för de 18 analyserade PAHerna, dvs deponerad aska från det koleldade värmeverket, bitumenpapper, trafik, samt utifrån Östersjön. Vidare undersökningar är dock nödvändig för att ytterligare bringa klarhet i denna fråga.

Hur unik är Örserumsviken? Eftersom de mest giftiga kemikalierna, PAF, högst sannolikt kommer från trafik och annan användning av fossilt bränsle är det knappast troligt att föroreningarna i Örserumsviken är unika. Jämförs den toxiska potentialen med de referensområden (Slingsviken och sjön Flögen) vi valt för denna undersökning är Örserumsviken ca 10-30 gånger mer potent. Å andra sidan är Örserumsvikens bottensediments förmåga att orsaka skada hos organismer jämförbar med bottensediment utanför Stockholm.

1 Inledning

1.1 Miljögifter i Örserumsviken

Kvicksilver (Hg) är mest giftigt i metylerat tillstånd (Met-Hg), vilket också är den form av Hg som finns i fisk (Fjeld *et al.*, 1998). Hg orsakar neurologiska skador främst på hjärna, vilket även observerats i människa. I Minamatakatastrofen, Japan 1950 drabbades människor som ätit stora mängder Met-Hg kontaminerad fisk. 1970 dog hundratals människor varav tusentals insjuknade i Irak på grund av att de åt bröd bakat på sädeslag som blivit behandlat för svampangrepp (fungicid) med Met-Hg (Castoldi *et al.*, 2001).

Polyklorerade bifenyler (PCBer) är en grupp av antropogena miljögifter som användes inom bland annat elektriska komponenter på grund av dess värmebeständighet och låga ledningsförmåga. PCBer har potential att orsaka en rad olika skador på fisk, bland annat skador på immunsystemet (Dunier & Siwicki, 1993) och utvecklingskador (Walker *et al.*, 1991 och 1996b).

Polycykliska aromatiska kolväteföreningar (PAHer) är en annan substansgrupp som bland annat finns i fossila bränslen (kol, olja och gas) och även bildas vid ofullständig förbränning av dessa (det vill säga jämt). PAHer kan bland annat skada DNA, vilket sedermera kan leda till mutationer och tumörer (Ericson *et al.*, 1998 och 1999) samt skador på immunsystemet (Dunier & Siwicki, 1993).

Beräkningar utförda i två oberoende undersökningar (Axelman *et al.*, 1998 och Palm *et al.*, 2001) visar att halten Hg i området är totalt 700 kg, varav ca 100 kg är finns i bottensediment. Ungefär 1% av den totala halten Hg i området existerar som Met-Hg, den mest giftiga formen. För PCB är halterna mellan 600 kg och 1000 kg totalt i området, varav 80 till 120 kg finns i bottensedimentet. Motsvarande siffror för PAH, dvs de 18 analyserade, drygt 500 kg totalt och ungefär 100 kg i bottensedimentet.

1.2 Andra kemikalier i Örserumsviken än PCBer och Hg har potential att orsaka mest skada

Vid en tidigare PCB- och kvicksilverundersökning (Axelman *et al.*, 1998) isolerades tre fraktioner från Totalextrakt av olika abiotiska matriser i Örserumsviken. De tre fraktionerna bestod av 1) Alifatiska och Monocykliska Aromatiska Föreningar (MAF-fraktion) 2) Dicykliska Aromatiska Föreningar (DAF-fraktion) och 3) Polycykliska Aromatiska

Föreningar (PAF-fraktion). Den mest toxiska fraktionen rörande utvecklingskador hos fisk och EROD-induktion var PAF-fraktionen, vilket betyder att de observerade effekterna ej kunde förklaras av PCBer. Vilka kemikalier som var mest giftiga i PAF-fraktionen kunde dock ej förklaras.

1.3 Strategi för att finna de mest potenta miljögifterna

I miljön och följdaktligen även i Örserumsviken föreligger giftiga kemikalier såsom mycket komplexa blandningar där endast en bråkdel av dessa är både kemiskt och toxikologiskt karakteriserade. För att finna de mest toxiska kemikalierna använder vi oss av en flerstegsstrategi som går ut på att dela upp det komplexa miljöprovet i olika kemiskt väldefinierade fraktioner. De isolerade fraktionerna exponeras för ett biologiskt system där den relativa toxiska potentialen kan utvärderas. De/n fraktion/er som är mest toxisk delas upp ytterligare varefter den toxiska potentialen i dessa sub-fraktioner utvärderas. Denna fraktionerings- och exponeringsmetodik upprepas tills en så toxikologiskt väldefinierad fraktion som möjligt är isolerad och de kemikalier som orsakar mest toxiska effekter därmed kan identifieras och karakteriseras med större säkerhet. I dag utövas denna strategi och varianter av den över hela världen för att identifiera de mest potentiellt toxiska kemikalierna vi släpper ut i miljön (Burgess, 2000; Grifoll *et al.*, 1992; Marvin *et al.*, 1994).

Organiska kemikalier som dagligen släpps ut i vår miljö anses idag utgöra det största ekotoxikologiska hotet. För det första är organiska kemikalier fettlösliga vilket betyder att de kan passera biologiska membran (de är biotillgängliga) och därefter orsaka skada i organismer. För det andra är många relativt stabila i miljön vilket medför att de inte bryts ned i organismerna i samma utsträckning som de utsöndras utan istället biomagnifieras i näringskedjor, dvs de organismer högst upp i näringskedjan exponeras för högsta doserna. I den akvatiska miljön finns den största andelen av organiska kemikalier bundet till bottensediment, dock kan de frigöras genom biologiska (t ex bioturbation) och abiotiska faktorer (t ex vågor) och därigenom bli tillgängliga för organismer. För att vara så säker som möjligt på att alla dessa tusentals organiska kemikalier utvärderas är därför bottensediment en utmärkt matris att använda när undersökningar med hjälp av denna fraktionerings- och exponeringsstrategi skall utföras.

Vi har använt oss av regnbåge (*Onchoryncus mykiss*) som biologiskt system för att extrapolera de effekter vi ser till miljön. Regnbåge är dessutom en vetenskapligt mycket väl undersökt art som också är kommersiellt lättillgänglig.

1.4 Relevans för saneringsarbetet i Örserumsviken

Genom att karakterisera vilka kemikalier i vår miljö som har potential att orsaka störst skada kan vi lättare övervaka dessa och på så sätt erhålla bättre beslutsunderlag för hur stor del av t.ex gamla industritomter som behöver saneras för att uppnå en så giftfrimiljö som möjligt. Vidare erhålls information om vilka källor som skall tas bort. Eftersom vi idag ej vet vilka de mest giftiga kemikalierna är i miljön är det viktigt att identifiera dem för att erhålla information om hur dessa kemikalier kommer att bete sig vid ett saneringsprojekt för att ej förvärra situationen. Även om fullständig identifiering av ansvariga kemikalier ej alltid kan uppnås ger identifieringsarbetet i sig vägledande information om vilka kemikalier, eller substansgrupper det kan röra sig om.

2 Material och metoder

2.1 Prover

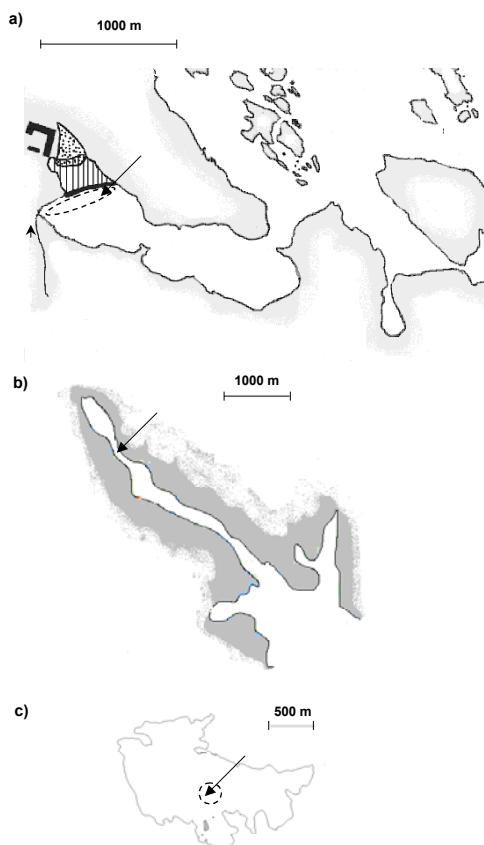
2.1.1 Biologiska prover

Gädda (*Esox lucius*) och abborre (*Perca fluviatilis*) fiskades med nät under våren 2001 i Örserumsviken och i Trosa skärgård. Abborre insamlades även under sommaren 2002 i Örserumsviken. Under de båda provtagningsomgångarna, dissekerades leverprover ut i vilka DNA-addukter (se sektion 2.3.4) sedermera analyserades.

Ägg och mjölke från regnbåge har köpts från Kälarne fiskeriförsöksstation, Kälarne och Älvdalslax, Älvdalen. Äggen befruktades och exponerades för de isolerade exponeringslösningarna (se sektion 2.2.1) genom nanoinjektion (se sektion 2.3.1).

2.1.2 Abiotiskt material

Bottensediment har insamlats med hjälp av Kayak hämtare från tre lokaler Örserumsviken, Slingsviken (referensvik ca 14 km fågelvägen sydväst om Örserumsviken) och Flögen (referenssjö ca 4 km fågelvägen väst om Vetlanda). Från Örserumsviken hämtades tio stycken prover (0-10 cm), i Slingsviken togs sju stycken bottensedimentprover (0-10 cm) och från Flögen hämtades och tio stycken prover (0-5 cm), se figur 1.



Figur 1. Schematiska kartor över de tre lokaler där bottensediment insamlats. Pilar och streckade områden illustrerar var i varje lokal som insamlingen skedde. Från a) Örserumsviken insamlades tio stycken bottensediment (0-10 cm), i b) Slingsviken insamlades sju stycken bottensediment (0-10 cm) och från c) Flögen hämtades tio stycken bottensedimentprover (0-5 cm).

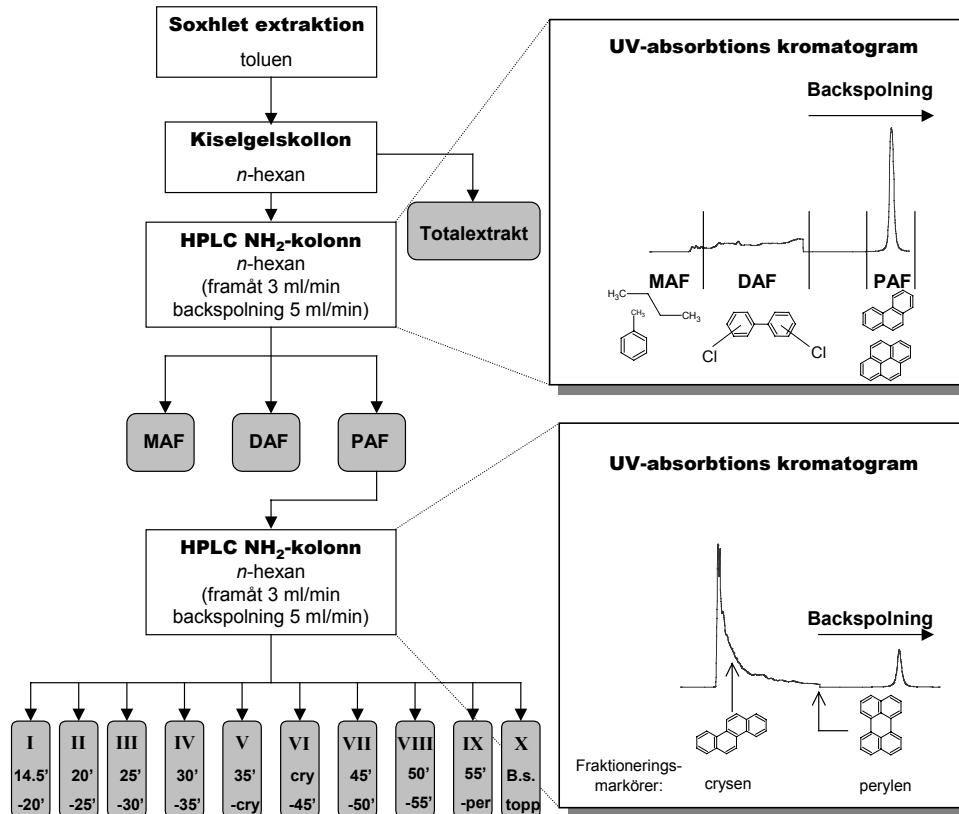
2.2 Extraktion och fraktionering av organiska kemikalier

Se figur 2 för en schematisk bild över extraktions- och fraktioneringsstegen. För en mer detaljerad metodbeskrivning hänvisar vi till Zebühr *et al.* (1993).

Bottensedimentproverna från de tre lokalerna poolades var för sig och organiska föreningar extraherades ut med toluen som lösningsmedel i en Soxhlet-apparat. Toluenextrakten från de tre stationerna har därefter indunstats, varpå extrakten överförs till hexan och hexanextrakten renats upp på kiselgelspelare och med kopparbehandling för att få bort svavel.

Genom att använda ett High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)-system som separerar organiska kemikalier med avseende på aromatisk struktur (Karlesky *et al.*, 1983) isolerades först tre fraktioner av Totalextraktet från Örserumsvikens bottensediment nämligen, a) MAF-fraktion, b) DAF-fraktion och c) PAF-fraktion. Tio sub-fraktioner av en aliquot av PAF-fraktionen isolerades därefter med samma HPLC system.

En Syntetisk PAF-fraktion bereddes, innehållande de 18 st analyserade PAHerna med motsvarande koncentrationer som analyserades i PAF-fraktionen, se sektion 2.4.1. En aliquot av denna Syntetiska PAF-fraktion delades sedan upp i tio sub-fraktioner identiskt som PAF-fraktionen.



Figur 1. Flödesschema över extraktions- och fraktioneringsstegen som är utförda på ett poolat sedimentprov från Örserumsviken, Västervik. Grå boxar illustrerar de isolerade fraktionerna, som är namngivna utefter deras huvudsakliga innehåll. MAF = alifatiska/monocykliska aromatiska föreningar (t ex bensen), DAF = dicykliska aromatiska föreningar (t ex PCBer) och PAF = polycykliska aromatiska föreningar (t ex benso[a]pyren). En alikvot av den Syntetiska PAF-fraktionen (innehåller samma mängder PAHer som analyserades i PAF-fraktionen) fraktionerades på ett identiskt sätt som PAF-fraktionen.

2.2.1 Beredning av exponeringslösningar

Alikvoter av de isolerade Totalextrakten från Örserumsviken, Slingsviken och Flögen, samt fraktioner och sub-fraktioner av Totalextraktet från Örserumsviken och den Syntetiska PAF-fraktionen överfördes till Triolein innan exponering av nybefruktade regnbågsägg genomfördes, se sektion 2.3.1. Som kontroller användes en spädningsserie av dels B[a]P i triolein och dels endast triolein, samt ej injicerade ägg.

2.3. Biomarkörer

2.3.1. Nanoinjektion

Denna exponeringsteknik härmar maternal exponering, dvs gifter överförs från moderdjuret till avkomman under äggens gule-uppbyggnad (Walker *et al.*, 1996a).

Nybefruktade regnbågsägg exponerades som förut beskrivits (Åkerman & Balk, 1995).

Vid kläckning registrerades deformationsfrekvensen hos regnbågs-larver i de larver som exponerats för de högsta doserna av exponeringslösningarna och i kontrollerna. Larverna fick sedan utvecklas tills dess att ca $\frac{2}{3}$ av gulan var förbrukad då exponeringsförsöket avbröts genom att avliva varje larv och dissekera ut varje enskild lever under lupp. Tre individers lever från samma exponeringsgrupp poolades och homogeniserades i 300 μ l 0,25 M sukros lösning. Homogenaten frystes ned i N₂ (l) och förvarades i -140°C tills EROD-aktiviteten analyserades.

2.3.2 Histopatologi

Larver som ej provtogs enligt ovan matades regelbundet under tolv månader varefter regnbågsynglens lever och njurar dissikerades ut och dessa vävnadsprover analyserades för tumörvävnad av Dr. Mark Myers (National Oceanic and Atmospheric Administration, NOAA, Seattle, USA).

Genom att undersöka om dessa ettåriga fiskar utvecklade tumörvävnad får vi ytterligare kunskap om hur toxiska kemikalierna i Örserumsviken är.

2.3.3 Etoxyresorufin O-deetylerings (EROD) aktivitet

Frysta leverhomogenat tinades och EROD-aktiviteten analyserades (duplikat) i dessa enligt en tidigare beskriven metod (Prough *et al.*, 1978). EROD-induktionen beräknades som den procentuella aktiviteten av injektionskontrollernas medelvärden. Dos-respons kurvor för de olika exponeringslösningarna räknades ut med genom regressionsanalys i Excel 2000. De isolerade exponeringslösningarnas förmåga att orsaka EROD-induktion extrapolerades mot B[a]P dos-responskurva för EROD-induktion vilket på sätt gav en uppfattning om de olika exponeringslösningarnas relativa B[a]P-ekvivalenter.

EROD aktivitet induceras i fisk då de exponeras för just PCBer och PAHer som sedemera kan ge toxiska effekter som DNA-skador, immunsystemstörningar med mera. Att undersöka EROD aktivitet ger därför en uppfattning om subletal effekt.

2.3.4 DNA-addukter

DNA-addukter i leverprover från vildlevande abborre och gädda fångad i Örserumsviken och i Trosa skärgård analyserades med ³²P-Postlabeling metoden (Ericson *et al.*, 1998) enligt vissa modifieringar.

Att mäta DNA-addukter på vildlevande fisk ger ett mått på exponering av biotillgängliga kemikalier som förstör DNA genom att kronisk binda (kovalent) till DNA.

2.4 Kemisk analys av PAHer

Halten PAHer analyserades i alikvoter av Totalextrakt från Örserumsvikens, Slingsvikens och Flögens bottensediment enligt tidigare publicerade metoder (Ishaq *et al.*, 1999).

2.4 Statistik

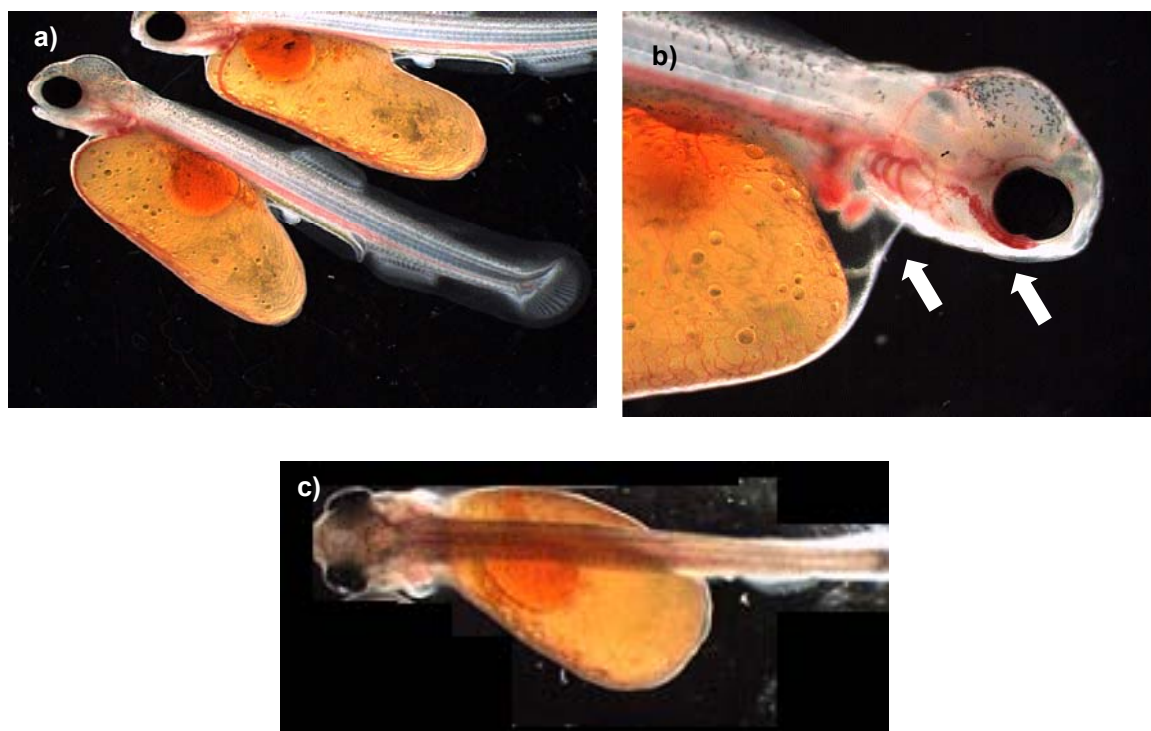
Statistiskt signifikanta skillnader i EROD-aktivitet mellan de olika exponeringsgrupperna analyserades med hjälp av PC-mjukvaran SPSS 10.0. Skillnad mellan de olika exponeringsgruppernas EROD aktivitet analyserades med ANOVA, för att undersöka vilka grupper som skilde sig åt användes ett post hoc test, Tukey HSD. Som gränsvärde för statistisk signifikant skillnad användes $p < 0,05$.

3 Resultat

3.1 Toxiska effekter i regnbåge orsakade av de isolerade exponeringslösningarna

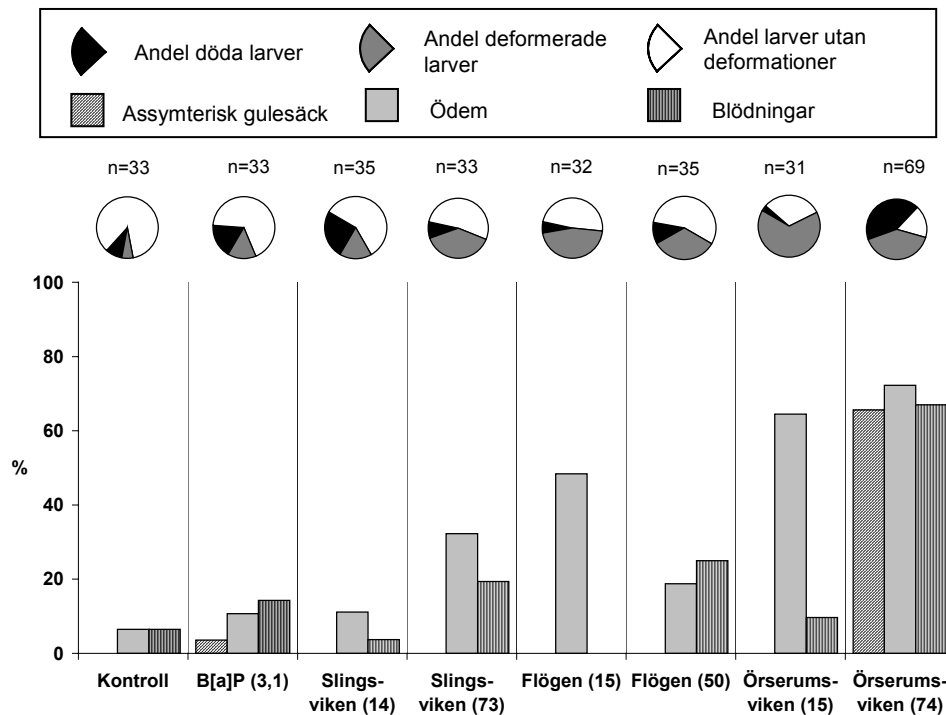
Den histopatologiska undersökningen som utfördes på regnbågsyngel 12 månader efter befruktning visade att de kemikalier regnbåge exponerats för gav inga histopatologiska effekter på lever eller njure.

I figur 3 illustreras några av de utvecklingsskador vi registrerade på nykläckta larver.



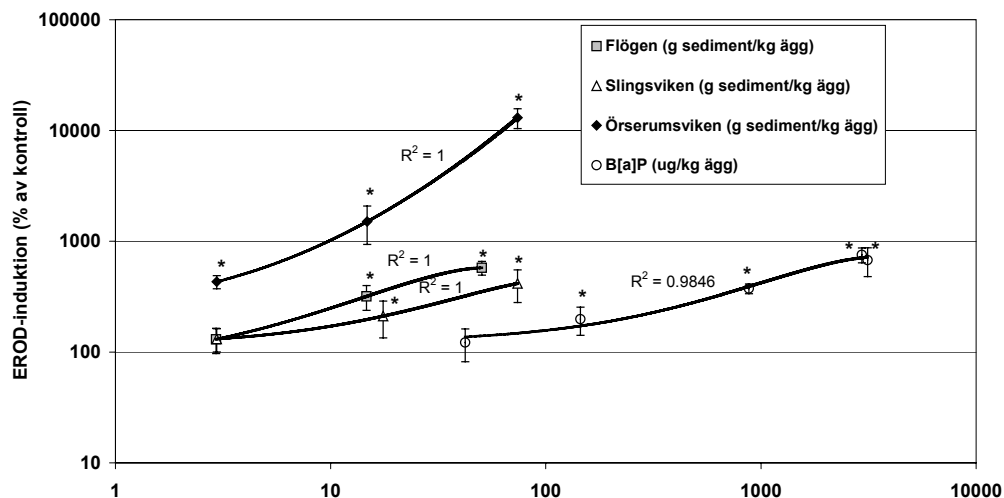
Figur 3. Utvecklingsskador i nykläckta regnbågs-larver. a) Larv utan deformationer, b) larv med blödning under öga och ödem i hjärtsäck, c) larv med assymetrisk gulesäck.

Deformationsfrekvensen i larver exponerade för Totalextraktet från de tre stationernas bottensediment visar att Örserumsvikens bottensediment har störst förmåga att inducera mortalitet och deformationer, samt är dessutom det enda bottensedimentprovet som har förmåga att orsaka assymetrisk gulesäck (Fig. 4). Vidare ses en klar dos-respons effekt för de tre Totalextraktens toxiska potential med avseende på deformationer och mortalitet.



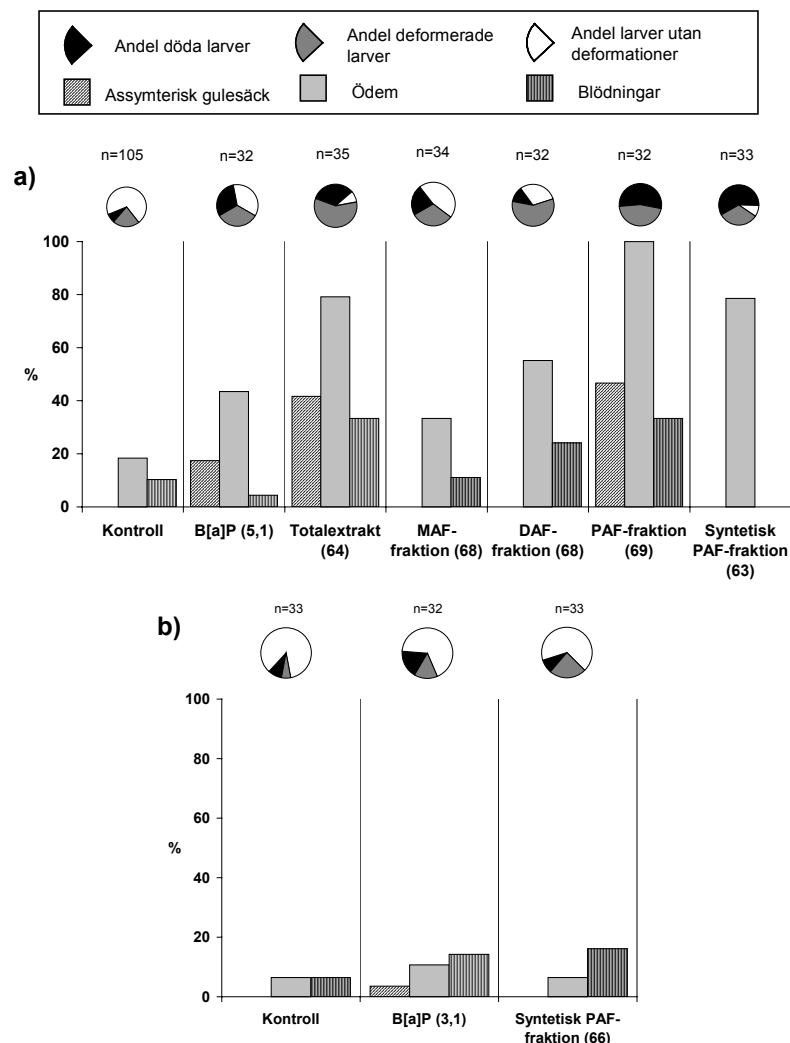
Figur 4. Mortalitet och deformationsfrekvens i larver exponerade för triolein (Kontroll), B[a]P, samt Totalextrakt från Slingsviken, Flögen och Örserumsviken. Siffror i parentes anger dosen som g sediment/kg ägg, eller som mg B[a]P/kg ägg. n anger antal exponerade ägg.

Figur 5 visar dos-respons kurvorna för de tre Totalextraktens förmåga att inducera EROD-aktivitet i regnbågsjarver. I figuren framgår tydligt Örserumsvikens relativt kraftiga potential att orsaka EROD-induktion jämfört med både Flögen och Slingsviken. Den höga toxiska potentialen i Örserumsvikens bottensedimentet framgår även vid jämförelse med modellsubstanten vi använt, B[a]P, där endast den högsta dosen B[a]P (3,1 mg/kg ägg) överskred den EROD-induktion som den lägsta dosen från Örserumsviken gav. Ingen statistisk signifikant skillnad observerades mellan Flögen och Slingsviken.



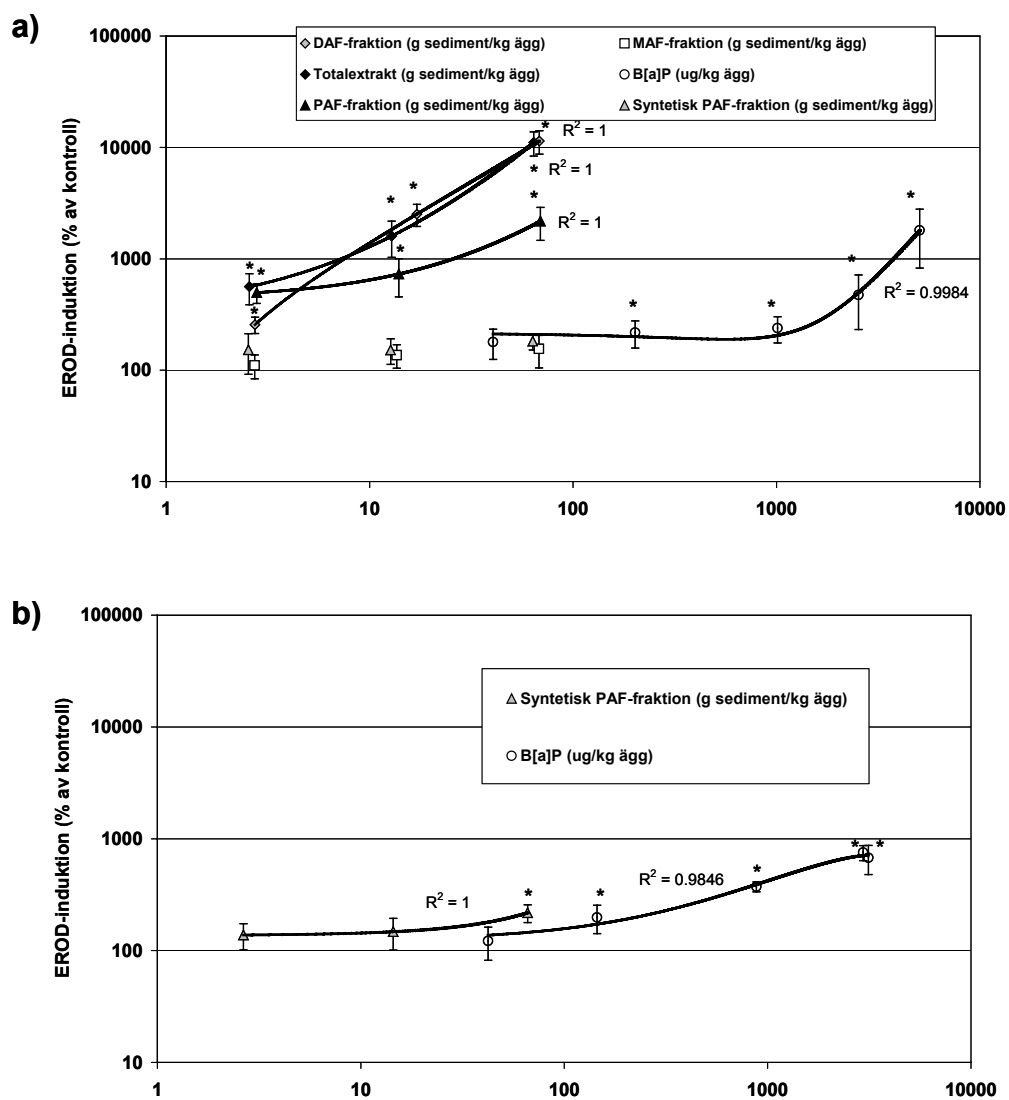
Figur 5. Dos-responskurvor för EROD-induktionen i leverhomogenat från regnbågsjarver exponerade för B[a]P, samt Totalextrakt från Slingsviken, Flögen och Örserumsviken. Observera Log-log skalan. * = EROD-induktionen är statistiskt signifikant skild från kontroller ($p < 0,05$).

Av Totalextraktet och fraktioner därav från Örserumsvikens bottensediment har PAF-fraktionen mest potential att orsaka mortalitet och utvecklingskador. Försöket med den Syntetiska PAF-fraktionen upprepades vilket illustreras i figur 6b). Den Syntetiska PAF-fraktionen orsakar, i båda försöken, en ökning av mortalitet och utvecklingskador i regnbåge. I försök a) verkar de 18 PAHerna, dvs. de som finns i den Syntetiska PAF-fraktionen, orsaka en stor del av mortalitets och utvecklingskadorna som orsakas av PAF-fraktionen. När försöket med den Syntetiska PAF-fraktionen upprepades b) var dessa 18 PAH'er ej lika toxiska. Dock uppvisar även kontrollerna (larver exponerade för antingen triolein eller B[a]P) vid upprepningsförsöket avsevärt lägre toxisk potential. I och med ej fullständig överensstämmelse mellan de två försöken bör ett nytt upprepningsförsök utföras.



Figur 6. Mortalitets och deformationsfrekvensen i larver exponerade för triolein (Kontroll), B[a]P, samt Totalextrakt från Örserumsvikens bottensediment och fraktioner därav. I b) illustreras upprepningsförsöket med den Syntetiska PAF-fraktionen. n anger antal exponerade ägg.

Figur 7 visar förmågan att inducera EROD-aktivitet i regnbågs-larver för de exponeringslösningarna som redovisades i figur 6. PAF-fraktionens dos-responskurva är mer flack än både DAF-fraktionens och Totalextraktet. Å andra sidan är PAF-fraktionen mer potent vid lägsta dosen än vad DAF-fraktionen är. Den Syntetiska PAF-fraktionens EROD-induktionspotential är likvärdig i båda försöken.

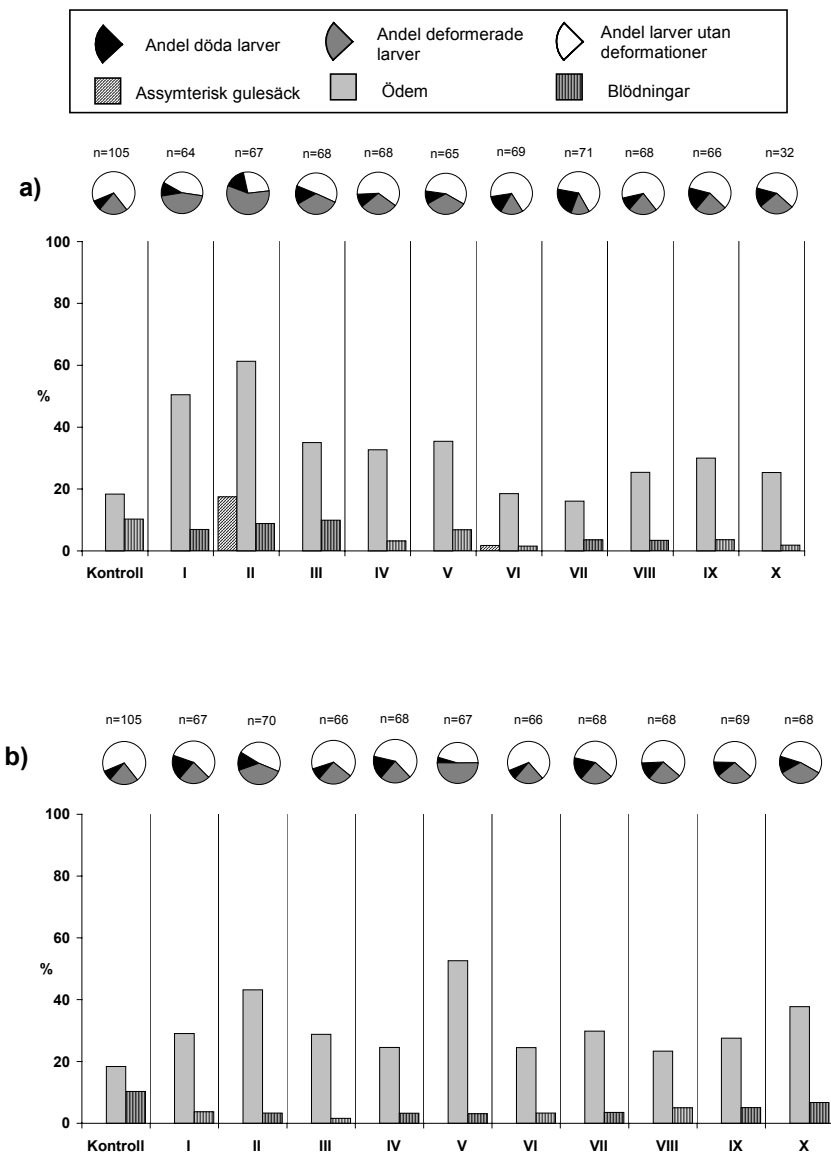


Figur 7. Dos-responskurvor för EROD-induktionen i leverhomogenat från regnbågs-larver exponerade för B[a]P, samt Totalextrakt och fraktioner därav isolerade från Örserumsvikens bottensediment.

Observera Log-log skalan.

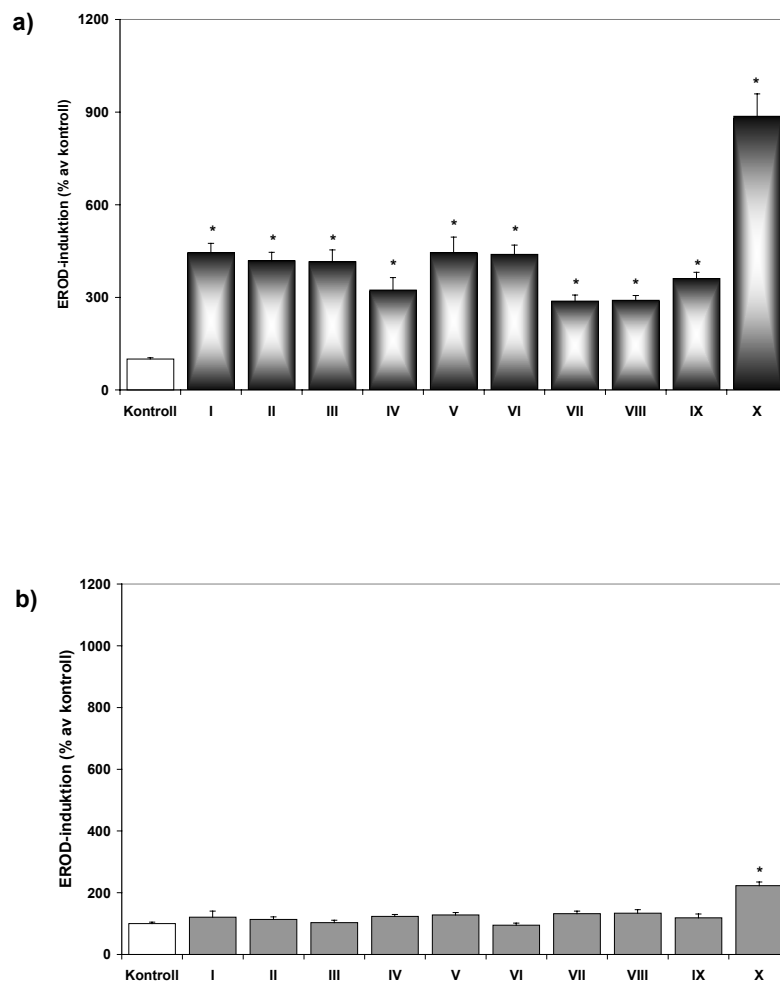
* = EROD-induktionen är statistiskt signifikant skild från kontroller ($p < 0,05$).

Deformationsfrekvensen orsakade av sub-fraktionerna redovisas i figur 8, där a) illustrerar de tio sub-fraktionerna från PAF-fraktionen och b) de tio sub-fraktionerna från den Syntetiska PAF-fraktionen. Sub-fraktion_II från PAF-fraktionen orskar mest antal utvecklingsskador. Den omisskänliga assymetriska gulesäcken orsakades endast av sub-fraktion_II och _VI, men endast en regnbåge som blivit exponerad för sub-fraktion VI hade denna specifika deformation. De tio sub-fraktionerna från den Syntetiska PAF-fraktionen orsakade alla en något förhöjd frekvens av mortalitet och utvecklingsskador i regnbåge dock ej lika mycket som PAF-fraktionens analoga sub-fraktioner.



Figur 8. Mortalitet och deformationsfrekvensen i larver exponerade för triolein (Kontroll), samt a) sub-fraktioner från Örserumsvikens PAF-fraktion och b) sub-fraktioner från den Syntetiska PAF-fraktionen. n anger antal exponerade ägg.

Figur 9 illustrerar sub-fraktionernas förmåga att inducera EROD-aktivitet i leverhomogenat från exponerade regnbågs-larver. Alla sub-fraktioner från PAF-fraktionen orsakade statistiskt signifikanta ($p < 0,05$) EROD-induktioner. Sub-fraktion_X var mest potent, annars uppvisade sub-fraktionerna liknande potential sinsemellan. Endast sub-fraktion_X från den Syntetiska PAF-fraktionen orskade en statistisk signifikant EROD-induktion.

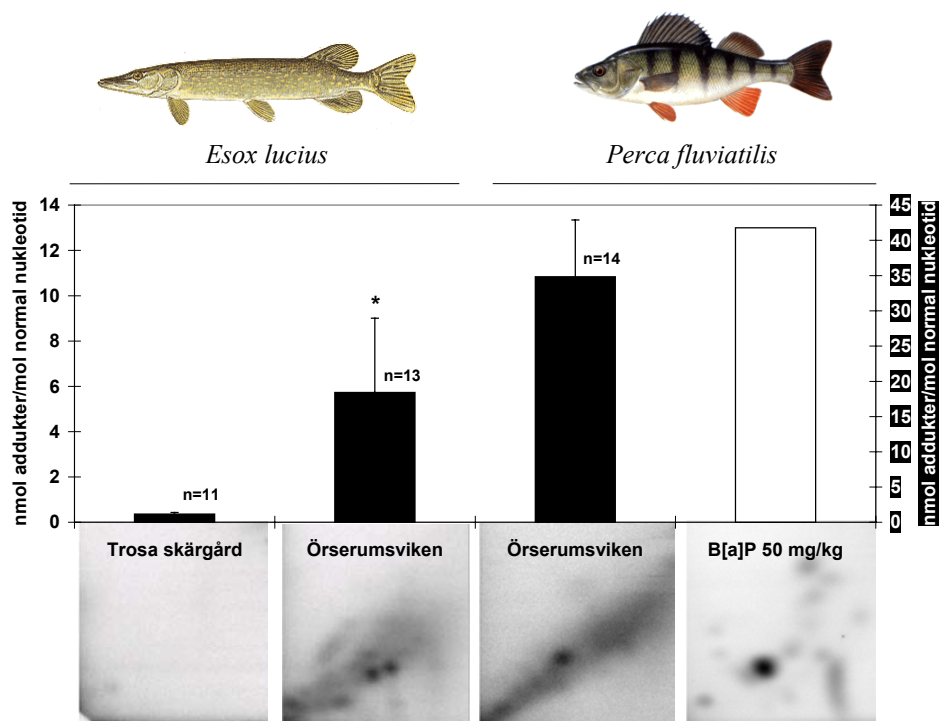


Figur 9. EROD-induktionen i leverhomogenat från regnbågs-larver exponerade för sub-fraktioner från a) Örserumsvikens PAF-fraktion och b) den Syntetiska PAF-fraktionen. Alla doser motsvarar 69 g sediment/kg ägg.

* = EROD-induktionen är statistiskt signifikant skild från kontroller ($p < 0,05$).

3.2 DNA-addukter i vildlevande fisk

Gäddorna i Örserumsviken har ca 20 gånger högre frekvens DNA-addukter ($p < 0,05$) i sina leverar än vad gäddorna i Trosa skärgård har. Abborre från Örserumsviken uppvisade ej samma DNA-adduktmonster som Örserumsvikens gäddor, dessutom är andelen DNA-addukter ca 2 gånger högre ($p < 0,05$) i abborre (Fig. 10). DNA-adduktstandarden som består av leverprov från en abborre som exponerats för 50 mg/kg B[a]P uppvisar ett väldigt specifikt DNA-adduktmonster där halten DNA-addukter ligger ca 4 gånger över de vildlevande abborrarna.



Figur 10. DNA-adduktfrekvensen och DNA-adduktmonsteret i vildlevande gädda och abborre, insamlad från Trosa skärgård (referens) och Örserumsviken, samt från en abborre exponerad för 50 mg B[a]P/kg. Observera att den högra skalan endast tillhör abborren exponerad för 50 mg B[a]P/kg. * = DNA-adduktfrekvensen är statistiskt signifikant skild från referenser ($p < 0,05$).

3.3 Kemisk analys

Tabell 1 sammanfattar resultaten från PAH analyserna utförda på PAF-fraktionen och dess sub-fraktion_II. Den kemiska analysen av sub-fraktion_II visar att det finns stora mängder av alkylerade och svavelsubstituerade PAHer. Dessutom är ungefär hälften av mängden Fluoranten och Pyren isolerad i denna sub-fraktion.

Tabell 1. Sedimentkoncentrationer och doser av individuella PAHer i PAF-fraktionen och i sub-fraktion_II.

PAF-fraktion	Sediment koncentration	Doser		
		69 g/kg ägg	14 g/kg ägg	2,8 g/kg ägg
		(µg/kg ägg)	(µg/kg ägg)	(µg/kg ägg)
	(µg/g sediment)			
Phenanthrene	0,69	49	9,8	2,0
1-Methylphenanthrene	0,41	28	5,7	1,1
2-Phenylnaphtalene	0,26	18	3,6	0,72
Fluoranthene	1,6	0,11x10 ³	23	4,6
Pyrene	1,4	90	19	3,9
Benzo(ghi)fluorantene	0,18	14	2,5	0,50
Benz(a)anthracene	0,48	36	6,7	1,3
Chrysene	0,61	42	8,6	1,7
2,3-Benzanthracene	0,08	5,6	1,1	0,23
Benzo(b)fluoranthene	0,37	26	5,2	1,0
Benzo(k)fluoranthene	0,42	29	5,9	1,2
Benzo(e)pyrene	0,41	28	5,7	1,1
Benzo(a)pyrene	0,41	28	5,7	1,1
Perylene	0,12	8,5	1,7	0,34
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	0,36	25	5,1	1,0
Benzo(ghi)perylene	0,32	22	4,5	0,90
Coronen	0,083	5,7	1,2	0,23
Dibenzo(a,i)pyrene	0,039	2,7	0,55	0,11
Summa	8,3	0,57x10 ³	0,12x10 ³	23

sub-fraktion_II	Sediment koncentration	Doser	Antal kongener	
				69 g/kg ägg
				(µg/kg ägg)
	(µg/g sediment)			
Dimethylphenantrene	0,022	1,5	1	
Fluoranthene	0,89	61	1	
Pyrene	0,32	22	1	
Trimethylphenantrene	0,0073	23	9	
Methylpyrene	0,29	20	6	
Tetramethylphenantrene	0,40	22	10	
Benzonaphtothiophene	0,11	7,7	1	
Methyl-Benzonaphtothiophene	0,25	22	5	
Dimethyl-Benzonaphtothiophene	0,26	18	4	
Summa	2,5	0,20x10 ³	38 38	

4 Diskussion

4.1 Hur giftigt är det i Örserumsviken?

Örserumsvikens bottensediment har potential att orsaka mer utvecklingskador hos fisk än vad Slingsvikens och Flögens bottensediment har. Rörande potentialen att orsaka subletala skador på fisk (EROD-induktion) är Örserumsvikens bottensediment ca 10 gånger mer potent än Flögens bottensediment och drygt 20 gånger mer potent än Slingsvikens bottensediment (Tab. 2). Dessutom är dos-responskurvan för EROD-induktionen av Örserumsvikens Totalextrakt mycket brantare och högre jämfört med Slingsvikens och Flögens dos-responskurvor. Dessa skillnader förklaras sannolikt av olika sammansättningar av EROD-inducerande kemikalier i de tre bottensedimenten.

Tabell 2. Exponeringslösningarnas EROD-inducerande potential uttryckt som B[a]P-ekivalent och den relativa potentialen, där Örserumsvikens Totalextrakt tillskrivits 100, samt figurtilhörighet.

Exponeringslösning	Dos (g/kg ägg)	B[a]P- ekivalent ¹ (mg/kg ägg)	Relativ potential ²	Figur
Slingsviken	74	1.0	3.8	5
Flögen	50	1.7	9.7	5
Örserumsviken	3.0	1.0	100	5
Totalextrakt	2.6	1.6	100	7a
DAF-fraktion	2.7	0.35	21	7a
PAF-fraktion	2.8	1.4	81	7a
Sub-fraktion_I	69	1.2	2.8	9a
Sub-fraktion_II	69	1.1	2.6	9a
Sub-fraktion_III	69	1.1	2.6	9a
Sub-fraktion_IV	69	0.73	1.7	9a
Sub-fraktion_V	69	1.2	2.8	9a
Sub-fraktion_VI	69	1.2	2.8	9a
Sub-fraktion_VII	69	0.54	1.3	9a
Sub-fraktion_VIII	69	0.56	1.3	9a
Sub-fraktion_IX	69	0.90	2.1	9a
Sub-fraktion_X	70	2.4	5.5	9a

¹ B[a]P-ekivalenterna är uträknade genom att extrapolera dos-responskurvan för exponeringslösningens EROD-induktion till B[a]P dos-responskurva. Därmed erhålls ett mått på hur stor dos B[a]P som behövs för att orsaka en liknande EROD-induktion. Extrapoleringen är utförd på den brantaste delen av B[a]P dos-responskurva.

² Eftersom doserna för de olika exponeringslösningarna är olika sinsemellan normaliserar potentialen, B[a]P-ekivalenten, mot dosen och mot Örserumsvikens Totalextrakt.

Kemikalierna i Örserumsviken orsakar ca 20 gånger mer DNA-skador, analyserat som DNA-addukter, i gädda än vad kemikalierna i Trosa skärgård gör. Kontamineringsmässigt kan Trosa skärgård sannolikt jämföras med Slingsvikens nivå. Orsaken till varför abborre jämfört med gädda i Örserumsviken uppvisar både högre frekvens och skilt mönster av DNA-addukter förklaras eventuellt genom skillnad i exponering av DNA-skadande kemikalier på grund av olika födoval mellan de två arterna. Eftersom abborre och gädda är olika arter är deras metabolism skild åt genom kvantitativ biotransformation samt eventuell DNA-reparation, vilket kan resultera i olika mönster av DNA-addukter. B[a]P injicerade abborrar har ett adduktmönster som ej observerats i vildlevande abborre, vilket betyder att DNA-addukterna som abborre i Örserumsviken uppvisar ej dominerade av B[a]P. Detta är skilt från vissa andra PAH kontaminerade lokaler, exempelvis creosotkontaminerade bottnar, där B[a]P orsakar en signifikant del av DNA-addukterna (Ericson *et al.*, 1998).

Med hjälp av DNA-adduktmönstret kan vissa slutsatser dras rörande exponeringssituationen. Den observerade diagonala radioaktiva zonen kopplas ofta samman med exponering av komplexa blandningar t ex ciggaretrök (Izzotti *et al.*, 1999). Då dessa abborrar insamlades (sommaren 2002) observerades en oljeliknande film på vattenytan som orsakades av det pågående muddringsarbetet i Örserumsviken. Denna film av eventuella oljeföreningar kan ge upphov till en något annorlunda exponeringssituation och följdaktligen andra DNA-addukter än vad som rådde innan muddringsarbetet.

För att se histopatologiska effekter ett år efter exponering av regnbågsägg krävs troligtvis med tanke på tidigare undersökningar (Black *et al.*, 1998) både högre doser än de vi använt oss av, samt även ett större antal exponerade ägg. Sannolikt har de individer vi exponerat som utvecklat dessa typer av skador dött under försökets gång.

4.2 Vilka kemikalier ger de toxiska effekterna vi ser?

Enligt teorin om hur detta HPLC-system fraktionerar olika kemikalier (Karlesky *et al.*, 1983) isoleras Met-Hg i MAF-fraktionen. Met-Hg orsakar främst neurologiska effekter och utvecklingstörningar, vilket betyder att en del av de deformationer orsakade av MAF-fraktionen (Fig. 6a) sannolikt beror på Met-Hg. Dock ger MAF-fraktionen endast något förhöjd deformationsfrekvens jämfört med kontrollerna, vilket tyder på att Met-Hg endast står för en liten del av den totala toxiciteten i Örserumsviken. Enligt Fjeld *et al.* (1998) beräknas en dos på motsvarande 1,35 mg Met-Hg i muskel vara tillräcklig för att orsaka neurologiska

skador på fisks avkomman. De gäddor som analyserats ligger strax under denna nivå (0,2 – 1,0 mg/kg, Axelman *et al.*, 1998), vilket betyder att Met-Hg skulle kunna orsaka neurologiska störningar på fisk i området. Dessa neurologiska effekter som Met-Hg kan orsaka ligger dock utanför denna undersöknings ramar. I råtta har man observerat att Met-Hg har förmåga att störa EROD-induktionen av kända inducerare (Takabatake *et al.*, 1980), dock tyder ej våra resultat på några kraftiga antagonistiska effekter orsakade av Met-Hg.

Fertila kvinnor bör undvika hög konsumtion av fisk fångad i Örserumsviken, på grund av ökad risk av fosterskador. Idag finns ej entydiga data rörande gränsvärden för Met-Hg förmåga att skada mänskligt foster. Klart är dock att det har potential att skada nervsystemet och att hjärnans utveckling är mest känsligt vid fosterstadiet (Castoldi *et al.*, 2001).

Genom vår fraktioneringsmetod, HPLC med NH₂-kolonn och hexan som mobil fas, isoleras alla PCBer från Totalextraktet i DAF-fraktionen (Zebühr *et al.*, 1993). Därmed erhålls PCBs toxiska potential genom biologisk analys av DAF-fraktionen. PCB-profilen i den inre delen av Örserumsviken liknar den kommersiella PCB blandningen Aroclor 1242 (Axelman & Broman, 1999). Enligt andra undersökningar utförda på ITM (Gun Åkermans ej publicerade resultat) krävs en dos över 8 mg Clophen A50/kg ägg för att erhålla en EROD-induktion som motsvarar den vi observerar då 17 g sediment/kg ägg av DAF-fraktionen exponeras för äggen. 17 g/kg ägg av DAF-fraktionen motsvarar en dos om ca 3 mg Aroclor 1242/kg ägg och eftersom Aroclor 1242 verkar vara mer potent än vad Clophen A50 är (Schmitz *et al.*, 1996) (Elcombe & Lech, 1978) betyder det att huvuddelen av EROD-induktionen i DAF-fraktionen sannolikt kan tillskrivas de PCBer som finns i Örserumsvikens bottensediment.

Genom att bereda den Syntetiska PAF-fraktionen undersöktes de 18 PAHernas bidragande toxicitet. En stor del av mortaliteten och utvecklingsskadorna verkade orsakas av dessa 18 PAHer (Fig. 6a). Eftersom misstanke förelåg att mortaliteten var av någon okänd anledning förhöjd, upprepades försöket (Fig. 6b). I upprepningsförsöket framgick det att endast en liten del av mortalitet och utvecklingsskador effekter orsakades av dessa 18 PAHer. Å andra sidan uppvisade även de båda kontrollerna (triolein-exponerade eller B[a]P-exponerade larver) en lägre toxisk potential. Detta betyder sannolikt att i första försöket var antingen äggen av någon okänd anledning redan kontaminerade, eller så blev larverna exponerade för någon kemikalie under försökets gång. Dessa okända faktorer bidrog sedemera till att djuren blev känsligare för utvecklingsskador orsakade av kemikalier. För att erhålla klarhet i detta dilemma bör därför försöket återupprepas.

Trots skillnad mellan de båda försöken rörande utvecklingsskador uppvisade den Syntetiska PAF-fraktionen samma potential att orsaka EROD-induktion i de två försöken. Detta betyder att de 18 PAHerna endast kan förklara ca 10% av EROD-induktionen som PAF-fraktionen uppvisar.

Alla sub-fraktioner från PAF-fraktionen gav utvecklingsskador, varav sub-fraktion_II var mest potent samt orsakade med hög frekvens den omisskänliga assymetriska gulesäcken. Att dessutom sub-fraktion_VI gav assymetrisk gulesäck är dock ej att anse alltför osannolikt med tanke på att endast B[a]P även orsakar denna specifika deformation, samt att B[a]P skall eluera ut någonstans mellan sub-fraktion_VI och _IX, vilket skulle kunna vara orsaken till denna observation. En kvalitativ kemisk analys av sub-fraktion_II avslöjade att den innehöll stora mängder svavel och alkylsubstituerade PAHer. Hur mycket dessa PAF bidrar till toxiciteten i Örserumsviken är i dag ej utrett på grund av de ej är tillgängliga på den kommersiella marknaden. Andra undersökningar har visat att just dessa typer av PAF är mer toxiska än de PAHer som oftast analyseras (Brack *et al.*, 2000). Sammantaget med den kvalitativa kemiska analysen av sub-fraktion_II samt DNA-adduktanalysen i abborre och gädda från Örserumsviken betyder dessa resultat att det sannolikt är hundratals kemikalier av polycyklisk aromatisk karaktär, sk. PAF, som orsakar de observerade toxiska effekterna. De största PAHerna isoleras i sub-fraktion X för både PAF-fraktionen och den Syntetiska PAF-fraktionen, vilket medför att de tyngsta PAHerna (t ex Benzo(ghi)perylene, Coronen, Dibenzo(a,i)pyrene) bland de som vi och andra rutinmässigt analyserar, har störst potential att orsaka EROD-induktion.

4.3 Var kommer dessa giftiga kemikalier ifrån?

Hg användes som fungicid under processen, PCB härstammar främst från självkopierande papper, medan PAH-källan är mindre utredd (se Meili, 2002 bilaga 1). PAHerna kommer främst från Westerviks Pappersbruk, samt även från Östersjön. Enligt Henry Åkerlund (telefonintervju 020516), produktionschef 1961-1979 drevs ett koleldat värmekraftverk under produktionen. Askor från detta värmeverk deponerades i viken. Även bitumenpapper (asfaltsbelagd papper) försöktes återvinnas under produktionen. Eftersom PAF-fraktionens okända giftiga kemikalier, med stor sannolikhet även har samma ursprung som de analyserade PAHerna och att de har liknande fysio-kemiska egenskaper som dessa PAHer, är det väldigt troligt att dessa följer samma spridning i miljön som de 18 PAHerna. Detta medför även att dessa kemikalier sannolikt ej är unika för Örserumsviken. Vi har även bedrivit

undersökningar i Stockholm och dess närhet och funnit liknande effekter både kemiskt och biologiskt av samma potens som i Örserumsviken (Åkerman *et al.*, 2003).

4.4 Hur påverkar detta saneringen av Örserumsviken?

De typer av kemikalier som står för huvuddelen av de toxiska effekterna vi undersökt och lyckats utröna (substituerade PAHer och tunga PAHer) har liknande fysio-kemiska egenskaper som PCB och PAH. Detta betyder att om saneringen av PCB och PAH lyckas i Örserumsviken, kommer även andra PAF-substansgrupper sannolikt att minska.

I vilken grad efterbehandlingen lyckas återstår dock fortfarande att undersöka. Vi har utfört en mindre studie där det visat sig att om stort läckage sker under muddringen kommer kemikalier av den typen vi identifierat att åtminstone lokalt orsaka skada (Sundberg *et al.*, 2000).

Dessutom har vi placerat ut sedimentfällor vilka vi regelbundet provtar för att undersöka om muddringen förändrar den toxiska potentialen i Örserumsviken.

5. Referenser

- Axelman, J. & Broman, D. (1999) Inventories and fluxes of polychlorinated biphenyls from a contaminated industrial site. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **18**, 1871-1881.
- Axelman, J., Åkerman, G., Balk, L., Tjärnlund U. & Broman D. PCB- och kvicksilverundersökning i Örserumsviken. Slutrapport Januari 1998. 1-73. 1998. Stockholms universitet.
www.vastervik.se/miljo/orserum/rapport/rapport.htm
- Black, J.J., Maccubbin, A.E. & Johnston, C.J. (1988) Carcinogenicity of benzo[a]pyrene in rainbow-trout resulting from embryo microinjection. *Aquatic Toxicology* **13** (4), 297-308.
- Brack, W., Segner, H., Moder, M. & Schuurmann, G. (2000) Fixed-effect-level toxicity equivalents - A suitable parameter for assessing ethoxyresorufin-O-deethylase induction potency in complex environmental samples. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **19**, 2493-2501.
- Burgess, R.M. (2000) Characterizing and identifying toxicants in marine waters: a review of marine toxicity identification evaluations (TIEs). *International Journal of Environment and Pollution*, **13**, 2-33.
- Castoldi, A.F., Coccini, T., Ceccatelli, S. & Manzo, L. (2001) Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. *Brain Research Bulletin*, **55**, 197-203.
- Dunier, M. & Siwicki, A.K. (1993) Effects of pesticides and other organic pollutants in the aquatic environment on immunity of fish: A review. *Fish & Shellfish Immunology*, **3**, 423-438.
- Elcombe, C.R. & Lech, J.J. (1978) Induction of monooxygenation in rainbow trout by polybrominated biphenyls: a comparative study. *Environmental Health Perspectives*, **23**, 309-314.
- Ericson, G., Liewenborg, B., Näf, C., & Balk, L. (1998) DNA adducts in perch, *Perca fluviatilis*, from a Creosote contaminated site and in perch exposed to an organic solvent extract of creosote contaminated sediment. *Marine Environmental Research* **46** (1-5), 341-344.
- Ericson, G., Lindesjö, E. & Balk, L. (1998) DNA adducts and histopathological lesions in perch (*Perca fluviatilis*) and northern pike (*Esox lucius*) along a polycyclic aromatic hydrocarbon gradient on the Swedish coastline of the Baltic Sea. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **55**, 815-824.
- Ericson, G., Noaksson, E. & Balk, L. (1999) DNA adduct formation and persistence in liver and extrahepatic tissues of northern pike (*Esox lucius*) following oral exposure to benzo[a]pyrene, benzo[k]fluoranthene and 7H-dibenzo[c,g]carbazole. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **427**, 135-145.

- Fjeld,E., Haugen,T.O. & Vollestad,L.A. (1998) Permanent impairment in the feeding behavior of grayling (*Thymallus thymallus*) exposed to methylmercury during embryogenesis. *Science of the Total Environment*, **213**, 247-254.
- Grifoll,M., Solanas,A.M. & Bayona,J.M. (1992) Bioassay-directed chemical characterization of genotoxic agents in the dissolved and particulate water phases of the Besos and Llobregat rivers (Barcelona, Spain). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **23**, 19-25.
- Ishaq,R., Åkerman,G., Näf,C., Balk,L., Bandh,C. & Broman,D. (1999) Organic pollutant characterization and toxicity testing of settling particulate matter by nano-injection in sea trout (*Salmo trutta*) eggs. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **18**, 533-543.
- Izzotti,A., Bagnasco,M., D'Agostini,F., Cartiglia,C., Lubet,R.A., Kelloff,G.J. & De Flora,S. (1999) Formation and persistence of nucleotide alterations in rats exposed whole-body to environmental cigarette smoke. *Carcinogenesis*, **20**, 1499-1505.
- Karlesky,D., Shelly,D.C. & Warner,I.M. (1983) A study of polynuclear aromatic-hydrocarbons on an amino bonded phase liquid-chromatographic column in the normal and reversed phase. *Journal of Liquid Chromatography*, **6**, 471-495.
- Marvin,C.H., Tessaro,M., McCarry,B.E. & Bryant,D.W. (1994) A bioassay-directed investigation of Sydney Harbour sediment. *Science of the Total Environment*, **156**, 119-131.
- Meili,M. (2002) Föroreningshistorik i och utanför Örserumsviken, Västerviks kommun. Hg, PCB och PAH, samt C/N, $\delta^{15}\text{N}$ och $\delta^{13}\text{C}$ i sediment daterade med ^{137}Cs , $^{239+240}\text{Pu}$ och ^{210}Pb . *ITM rapport*.
www.vastervik.se/miljo/orserum/rapport/rapport.htm
- Palm,A., Wängberg,I. & Brorström-Lundén,E. (2001) Kvicksilver och organiska miljögifter i Örserumsviken. Utvärdering av mätresultat. 1-98. *IVL Rapport B1433*.
www.vastervik.se/miljo/orserum/rapport/rapport.htm
- Prough,R.A., Burke,M.D. & Mayer,R.T. (1978) Direct Fluorometric Methods for Measuring Mixed-Function Oxidase Activity. *Methods in Enzymology* (ed. by S.P.L.Fleicher), pp. 372-377. Academic Press, New York.
- Schmitz,H.J., Behnisch,P., Hagenmaier,A., Hagenmaier,H., Bock,K.W. & Schrenk,D. (1996) CYP1A1-inducing potency in H4IIE cells and chemical composition of technical mixtures of polychlorinated biphenyls. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **1**, 73-79.
- Sundberg,H., Ishaq,R., Tjärnlund,U., Åkerman,G., Broman,D. & Balk,L. (2000) Biomarker-directed fractionation of total extracts from aquatic environmental abiotic matrixes. *Organohalogen Compounds*, **49**, 434-437.
- Takabatake,E., Fujita,M. & Sawa,Y. (1980) Combined effects of polychlorinated biphenyls and methylmercury on hepatic microsomal monooxygenases and the hepatotoxic action of bromobenzene. *Journal of Pharmacobio-Dynamics*, **3**, 463-469.
- Walker,M.K., Spitsbergen,J.M., Olson,J.R. & Peterson,R.E. (1991) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) toxicity during early life stage development of lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **48**, 875-883.
- Walker,M.K., Zabel,E.W., Åkerman,G., Balk,L., Wright,P. & Tillitt,D.E. (1996a) Chapter Four: Fish egg injection as an alternative exposure route for early life stage toxicity studies. Description of two unique methods. *Techniques in Aquatic Toxicology* (ed. by G.K.Ostrander), pp. 41-72. CRC Press, Boca Raton.
- Walker,M.K., Cook,P.M., Butterworth,B.C., Zabel,E.W. & Peterson,R.E. (1996b) Potency of a complex mixture of polychlorinated dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, and biphenyl congeners compared to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in causing fish early life stage mortality. *Fundamental and Applied Toxicology*, **30**, 178-186.
- Zebühr,Y., Näf,C., Bandh,C., Broman,D., Ishaq,R. & Pettersen,H. (1993) An Automated HPLC Separation Method with 2 Coupled Columns for the Analysis of PCDD/Fs, PCBs and PACs. *Chemosphere*, **27**, 1211-1219.
- Åkerman,G. & Balk,L. (1995) A Reliable and Improved Methodology to Expose Fish in the Early Embryonic Stage. *Marine Environmental Research*, **39**, 155-158.
- Åkerman,G., Tjärnlund,U., Grunder,K., Sundberg,H., Zebühr,Y., Broman,D. & Balk,L. (2003) Biodirected fractionation to evaluate responsible anthropogenic substances of adverse biological effects in Stockholm's waterways. *Manuscript*.

6 Erkännanden

Denna undersökning har finansierats av Västerviks kommun som ett delprojekt i Projekt Örserumsviken. Christer Hermansson och Christer Ramström, Västerviks kommun, samt Karin Jönson tackas för ovärderlig hjälp vid insamling av bottensediment i Örserumsviken och Slingsviken. Bo Troedsson, Vetlanda kommun tackas speciellt för insamlandet av Flögens bottensediment.