



Undersökning av det syntetiska
sötningsmedlet sukralos med avseende på
eventuella ekotoxikologiska effekter

*Margaretha Adolfsson-Erici
Ann-Kristin Eriksson Wiklund
Tomas Alsberg
Magnus Breitholtz
Caroline Ek
Johanna Minten*

Institutionen för tillämpad miljövetenskap

Department of Applied Environmental Science

Undersökning av det syntetiska sötningsmedlet sukralos med avseende på eventuella ekotoxikologiska effekter

Margaretha Adolfsson-Erici
Ann-Kristin Eriksson Wiklund
Tomas Alsberg
Magnus Breitholtz
Caroline Ek
Johanna Minten

Institutionen för tillämpad miljövetenskap, ITM
Stockholms universitet
e-post: omae@itm.su.se

ISSN 1103-341
Tryckeri: SU 090210
ISRN SU-ITM-181-143-SE

Innehåll

Sammanfattning.....	3
Summary.....	3
Bakgrund och syfte.....	3
Material och metoder	
Provtagning och analys av avlopps-, recipient- och exponeringsvatten.....	5
Gammarider – förstudie.....	6
Gammarider – pre-copulastudie.....	6
Gammarider - långtidsexponering.....	7
<i>Nitocra</i> – akuttoxicitet.....	7
<i>Nitocra</i> – utvecklingsförsök.....	7
Resultat	
Halter i avlopps- och recipientvatten.....	8
Exponeringskoncentrationer.....	8
Gammarider.....	9
<i>Nitocra</i>	9
Diskussion.....	11
Slutsatser.....	11
Tack.....	11
Referenser.....	12

Sammanfattning

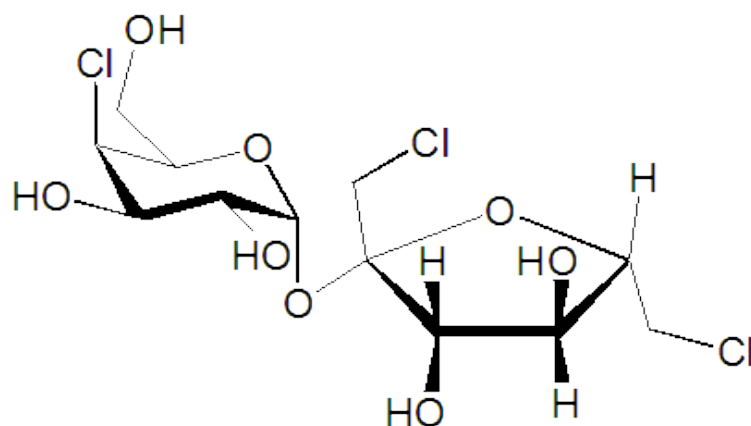
Två släkten av kräftdjur: *Nitocra spinipes* och *Gammarus oceanicus* resp *zaddachi* exponerades för sukralos i ekotoxikologiskt relevanta koncentrationer i kroniska tester. Vi arbetade utifrån följande hypoteser: skalömsning hos kräftdjur störs av höga halter sukralos i omgivande vatten samt att sukralos inte biokoncentreras i exponerade organismer. Långtidsexponering resulterade i högre dödlighet hos juvenila gammarider. Sukralos syntes inte påverka skalömsningstiden för de adulta honorna i ett pre-copula experiment. Inga tecken på biokoncentring kunde märkas. Exponeringen av *Nitocra* resulterade i att de djur som exponerats för de lägre koncentrationerna av sukralos var längre jämfört med kontrolldjuren medan för individer exponerade för de högre koncentrationerna minskade längden med ökande sukraloskoncentration. De kortaste individerna återfanns i den positiva kontrollen och hade exponerats för 50 µg/L lindan. RNA-innehållet varierade mellan exponeringarna och den var lägst i 500µg/L och högst i 5000 µg/L exponeringen. Vi fann däremot inget signifikant samband mellan RNA-innehåll och tillväxthastighet hos *Nitocra*. Detta kan möjligen vara en effekt av sukralosexponering, eftersom linjära responser från tidigare experiment har noterats. Inga skillnader avseende medelutvecklingstiden var signifikanta. Renat avloppsvatten från Henriksalsverket innehöll relativt höga koncentrationer sukralos liksom ytvatten från tre reningsverksrecipienter.

Summary

Two crustacean genus, *Nitocra spinipes* and *Gammarus oceanis* resp *zaddachi* were exposed to sucralose at ecotoxicologically relevant concentrations in chronic tests. Four weeks exposure resulted in increasing lethality with increasing concentrations in juvenile gammarideans. Sucralose did not influence the time for shell shedding of females in the pre-copula experiment. No sign of bioconcentration of sucralose in gammarideans could be detected. The exposure of *Nitocra* resulted in increased length for the individuals exposed to the lower concentrations, while the response was reduced at higher concentrations. The shortest individuals were found in the positive control where they were exposed to 50 µg lindane/L. The content of RNA varied between exposures, but no significant correlation between RNA-content and growth rate was detected. This finding could be an effect of sucralose exposure, since a linear response has been found in other studies. Treated sewage from Henriksdals sewage treatment plant contained relatively high concentration of sucralose as did surface water from three recipients.

Bakgrund och syfte

Sukralos ("Splenda") är ett syntetiskt sötningsmedel godkänt som livsmedelstillsats i Sverige. Sukralos är en triklorerad sockermolekyl som är 600 gånger sötare än socker (figur 1). Substansen är vattenlöslig samtidigt som den är mycket stabil. Sukralos tål upphettning samt sura och basiska miljöer, vilket gör att det kan användas i exempelvis bakning eller i produkter med lång hållbarhet. Den passerar kroppen oförändrad, vilket gör den i princip kalorifri. Dess stabilitet gör att den även passerar reningsverkens alla reningssteg relativt intakt. Sukralos har hittats i höga halter i avloppsvatten (ca 5 µg/L) och recipienter (ca 0.5 µg/L) (Brorström-Lindén et al. 2007). Uppskattningsvis släpps ca 7 ton sukralos ut i recipienter runt om i Sverige. Sukralos finns i 4000 produkter "worldwide".



Figur 1. Sukralos

I dagsläget finns endast ett fåtal publicerade rapporter som har påvisat toxiska effekter på organismer orsakade av sukralos (tex Gricce & Goldsmith 2000), varför den anses säker som livsmedelstillsats. Eventuella ekotoxikologiska långtidseffekter är inte utredda, men sukralos stabilitet i vattenmiljön gör den till en potentiell POP. Socker är en viktig signalsubstans i naturen, och om man får kraftigt ökade halter av ett sötningsmedel kan det få oväntade effekter. Det finns emellertid några studier som indikerar genotoxicitet (Sasaki et al. 2002), reducering av tarmfloran samt ökning av membratransportproteiner hos råttor (Abou-Donia et al. 2008) och en ökad förekomst av migränanfall hos personer med anlag för migrän (Bigal & Krymchantowski 2006). Sukralos orsakar kompetitiv inhibering av enzymer som sköter sukrostransport i växter (Reinders et al. 2006). I insekter har man funnit samband mellan andra sockerarter och vissa typer av feromoner (Pankiw & Page 2003). Det finns många typer av feromoner, men de mest kända är de som används i samband med parbildning och reproduktion. En mängd substanser, som t ex naftalen, har visat sig störa parbildningen hos akvatiska kräftdjur (Krång 2007). Ett sätt att mäta parbildning hos vissa typer av kräftdjur är användning ”pre-copula”-bildning/separation, för vilket testmetoder har utarbetats av bl a Pascoe et al. (1994). Detta visar att sukrosmetabolismen kan bli hämmad även i andra organismer. Skalömsning hos kräftdjur kan tänkas vara en mekanism som kan störas, då glukos är inblandad vid tillverkning av kitin som i sin tur bygger upp skalorna (Becker et al. 2000). Målen med detta projekt var att undersöka om sukralos biokoncentreras i exponerade organismer genom att exponera vattenlevande kräftdjur för sukralos samt att utreda ämnets toxicitet genom att studera effekter på skalömsning, parbildning samt en långtidsstudie av mortalitet. Vi analyserade även ett utgående avloppsvatten från ett modernt reningsverk samt ytvatten från tre reningsverksrecipienter

Hypoteser

- Skalömsning hos kräftdjur störs av höga halter sukralos i omgivande vatten.
- Signalsystem hos vattenlevande organismer påverkas av höga halter sukralos i omgivande vatten.
- Sukralos biokoncentreras inte i exponerade organismer.

Material och metoder

Provtagning och analys av avlopps-, recipient- och exponeringsvatten

Provtagning

Renat avloppsvatten från ett reningsverk och ytvatten från tre reningsverksrecipienter insamlades och analyserades med avseende på sukralos. Följande reningsverk eller reningsverksrecipienter ingick i studien:

Henriksdalsverket tar emot avloppsvatten från ca 690 000 personekvivalenter (p.e.). Rening sker med galler/sandfång, kemisk fällning med försedimentering, biologisk rening med fördenitrifikation och eftersedimentering samt sandfilter. Det renade avloppsvattnet leds ut i närheten av Waldemarsudde.

Käppalaverket tar emot avloppsvatten från ca 520 000 p.e. och har en liknande reningsprocess som Henriksdalsverket. Det renade avloppsvattnet leds ut i Halvkakssundet.

Tjustviks reningsverk renar avloppsvatten från ca 10 500 p.e. Reningsmetoden är SBR-teknik (satsvis biologisk rening): Galler/sandfång, kemisk fällning, biologisk rening, kväverening, slutfällning med polyaluminiumklorid samt efterföljande sedimentering. Det renade vattnet leds ut i Baggensfjärden.

Från Henriksdalsverket insamlades renat avloppsvatten med flödesproportionell provtagning under tre dygn, 080303-05 och frystes i väntan på analys.

Ytvatten från recipienterna insamlades 071207 och frystes i väntan på analys.

Henriksdalsrecipienten: (Waldemarsudde: N 59 19,06' E 18,06,12')

Käppalarecipienten: (Halvkakssundet N 59,21,31 E 18,14,42)

Tjustviksrecipienten: (Baggensfjärden N59 17,56 E 18,19,22)

Exponeringsvattnen insamlades och frystes i väntan på analys.

Extraktion och upprening:

Två replikat analyserades av varje vattenprov. Till utgående avloppsvatten (100 mL) och recipientvatten (1 L) adderades 62.8 ng surrogatstandard (sukralos-D6). Vattenproverna extraherades med fastfasextraktion (SPE): Oasis HLB 60 mg 3cc (Waters corp.) aktiverad med 2 mL metanol (Lichrosolv, Merck) och 2 mL H₂O före applicering. Efter extraktionen tvättades SPE kolonnerna med 0.5 M ammoniumhydroxid (Fluka) varefter sukralos eluerades med 2.5 mL metanol. Eluatet koncentrerades till 200 µL före analys.

Kromatografi och detektion:

Bestämningen av sukralos gjordes med LC/MS-MS. Separationsenheten var en Waters Alliance 2695 kopplad till Quattro II triple quadropol masspektrometer (Waters corp.). Separationskolonnen var en 150 mm x 2.1mm Hypersil BDS C18, 3µm. Volymen som injicerades var 5 µL. En linjär gradient användes: 80% vatten: 20% metanol till 60% vatten: 40% metanol på 7 minuter. Denna blandning behölls i 7 minuter innan kolonnen konditionerades inför nästkommande injektion. Flödet var 0.2 mL/min. Detektionen gjordes med multiple reaction monitoring (MRM) med samma jon detekterad i första och tredje quadropolen. Transitionerna var: 419 → 419, 421 → 421 and 427 → 427, cone voltage 40 V, collision energy 10 eV och dwell time 0.75 s i positive mode. Transitionerna motsvarar sukralos (35)+ Na, sukralos (35,37)+ Na och sukralos -D6 (35,37)+Na.

Kvantitering och QA/QC:

Var fjärde injektion var en standard med kända mängder sukralos och sukralos-D6. Dessa användes till enpunktskalibreringar. För varje prov användes den standard för kvantitering som låg närmast provet. En kalibreringskurva (5 punkter från 0.25 ng till 5 ng injicerad mängd gav $R^2 = 0.99$) visade att alla prover låg inom det linjära området. Instrumentets detektionsgräns var 60 pg injicerad mängd. Metoden prövades i en interkalibrering anordnad av IVL i samarbete med NORMAN, där två avloppsvatten och två recipientvatten analyserades av 7 st laboratorier. Resultatet visade att metoden hade tillfredsställande noggrannhet och precision.

Gammarider – förstudie

Denna pilotstudie gjordes för att testa kemisk analysmetodik, val av organism samt om tillsats av blåstång som föda påverkade upptaget av sukralos. Vi valde att arbeta med fältfångade kräftdjur från blåstångsbältet på grund av deras storlek, som möjliggör upptagsstudier, rikliga tillgång samt att de är vattenlevande. Vi valde mellan arter av släktena *Gammarus* och *Idothea*. Sex individer per akvarium av vardera *Idothea baltica* och *Gammarus* sp. exponerades separat i 400 mL vatten med en sukraloskoncentration av 500 µg/L under en vecka. Till hälften av akvarierna tillsattes blåstång som föda. Pilotstudien resulterade i att *Gammarus zaddachi* och *G. oceanicus* valdes framför *Idothea* som organsim. Två individer som fått föda och två som inte fått föda extraherades i metanol och analyserades med UPLC/QToF.

Gammarider - pre-copula experiment

Ursprungligen planerades en studie för att undersöka om sukralos påverkar den kemiska signaleringen som skulle göra att hannar och honor skulle få svårare att hitta varandra. Förstudien visade dock att med den begränsade försöksupställning som låg inom ramen för detta projekt, hade paren inga problem med att omedelbart finna varandra. Vi beslutade då att undersöka vår andra hypotes, att sukralos påverkar skalömsningen, även på de vuxna gammariderna. Hos gammariderna fångar hannen honan och håller henne till dess att hon skalömsar och är mottaglig för befruktning. Vi ville därför testa om tiden från pre-copula bildning till befruktning påverkades av sukralos. Nybildna (mindre än 24 timmar) pre-copula par av > 80% *G. zaddachi* placerades i testbägare med 400 mL testvatten. Paren kontrollerades sedan dagligen och vi noterade när honorna blev befruktade. Genom att vi behövde nybildade par pågick experimentet kontinuerligt till dess att vi hade sju replikat av varje koncentration, 0,5; 5; och 500 µg/L samt en kontroll.

Gammarider - långtidsexponering

För att testa den kroniska toxiciteten, exponerades nyfödda juveniler av *G. zaddachi* för testvatten under 28 dagar. Gravida honor fick gå enskilt i burkar med naturligt brackvatten till dess att avkomman var född. Honan artbestämde och i de fall att där honan var av rätt art och att antalet juveniler var minst 20 startades en serie. Varje serie bestod av ett replikat av varje testkoncentration, 4 st 0,5; 5; och 500 µg/L samt en kontroll. Varje replikat bestod av 5 juveniler i 20 mL testvatten samt en liten bit av algen *Ceramium tenuicorne*, som föda och skydd, i varje bägare. Vattenbyte utfördes två gånger per vecka och algerna förnyades två gånger under experimentets gång. Experimentet startades kontinuerligt och pågick till dess vi hade 8 replikat. Antalet överlevande juveniler efter 28 dagar räknades.

Nitocra - akuttoxicitet

96-h akuttest med *Nitocra spinipes*: Adulta djur, tagna från tre veckor gamla odlingar, exponerades i provrör i 10 mL testvatten under 96-h i mörker vid 22±1°C. Sukraloskoncentrationerna var 8, 40, 200, 1000, 5000 & 10000 µg/L samt en kontrollserie. Tre replikat med 10 djur i varje exponerades i kontrollserien samt i den högsta koncentrationen, i resterande koncentrationer användes två replikat med 10 djur vardera. Efter 96-h lästes försöket av och antal döda djur räknades i varje provrör.

Nitocra – utvecklingsförsök

Nitocra spinipes exponerades för sukralos i olika koncentrationer under 2 veckors tid (= 8 skalömsningar). Under denna tid följdes djuren individuellt, och observerades med vilken hastighet djuren utvecklades, om eventuell dödlighet och eller problem med skalömsning förelåg. Då testet var klart analyserades djurens längd och RNA-innehåll för att kontrollera den somatiska tillväxten. Som positiv kontroll användes 50 µg lindan/L. Nauplii, mindre än 24 h gamla, exponerades i 270 µL testvatten i 96-hålsplattor i mörker vid 22±1°C. Sukraloskoncentrationerna var 0.005, 0.5, 500 och 5000 µg/L samt en kontrollserie. Varje serie innehöll 40 replikat, ett djur per brunn med 10 brunnar på varje platta (totalt 4 st 96-hålsplattor användes). Från dag fem och framåt förekom en daglig tillsyn av djuren där utvecklingsstadiet noterades. När djuren kommit i copepoditstadie tre (CIII) konserveras de

för RNA-mätning alternativt längdmätning (förutbestämt) genom att konservera dem i RNA-later respektive glutaraldehyd. Genom längdmätning och utvecklingstiden (till CIII) beräknades även tillväxthastigheten. De djur som konserverats placerades i rumstemperatur en vecka för att sedan placeras i kyl i inväntan på RNA-analys. Analysen utfördes i ett sterilt rum för att undvika kontaminering av annat RNA. Fyra slumpvis valda djur från varje behandling placerades i eppendorfrör innehållande extraktionsbuffert och behandlades med ultraljud och skakning. RNA- och DNA-standarder för jämförelse förbereddes även inför analysen. Till analysen användes en svart 96-hålsplatta där 60 µl uppslutning pipetterades per brunn. Två mätningar utfördes på varje individ. Till alla dessa brunnar tillsattes 60 µl av färgämnet Ribogreen för infärgning av både RNA och DNA. Därefter inkuberades plattan i mörker i 5 min varefter fluorescensen mättes. Fluorescensen som uppmättes kom både från RNA och DNA. Därefter tillsattes 5 µl RNase till varje brunn för att eliminera allt RNA, varefter fluorescens uppmättes igen. Genom att subtrahera fluorescensen erhöles ett värde för enbart RNA, som sedan användes för att beräkna mängden RNA per djur. Längden kunde mätas genom att djuren placerades i mjölksyra på ett objektsglas och fotograferades i mikroskop. Genom bildprogrammet Leica IM50, image manager (Leica DMIL) längdmättes carapax och totallängden beräknades sedan med hjälp av en kvot mellan carapax och kroppslängd bestämd genom mätning av 24 kontrolldjur.

Resultat

Halter i avlopps- och recipientvatten

Det renade avloppsvattnet från Henriksalsverken innehöll 11 µg sukralos/L. Ytvattnet från Waldemarsudde innehöll 0,17 µg/L, från Halvkakssundet 0,18 µg/L och från Baggensfjärden 0,11 µg/L.

Exponeringskoncentrationer

Gammarider

Nominell (µg/L)		0.5	5	500	
Mätt (µg/L, mv)		0.3	4.2	470	

Nitocra

Nominell (µg/L)	0.005	0.5	5	500	5000
Mätt (µg/L, mv)	<0.2	0.9	4.4	470	4400

Gammarider

Gammariderna i förförsöket visade inga tecken på biokoncentrering. Tillsats av blåstång påverkade inte upptaget av sukralos i kräftdjuren. Huvudförsöket gav dessvärre inga tillförlitliga resultat på grund av analystekniska orsaker.

Långtidexponeringen av nyfödda gammarider resulterade i en signifikant trend (figur 2), dvs att en högre koncentration sukralos medförde högre dödlighet för juvenila gammarider (Jonckere-Terpstras test $p < 0,05$). Vi jämförde även antalet överlevande i den högsta koncentrationen och kontrollen med hjälp av Mann-Whitneys test varvid ”borderline” signifikans erhöles. Sukralos syntes inte påverka skalömsningstiden för de adulta honorna i pre-copula experimentet, som visade att sukralos under dessa betingelser inte påverkade antalet dagar från pre-copula bildning fram till dess att honan var befruktad. Inom experimentet varierade medelantalet dagar mellan 4 och 4.9.

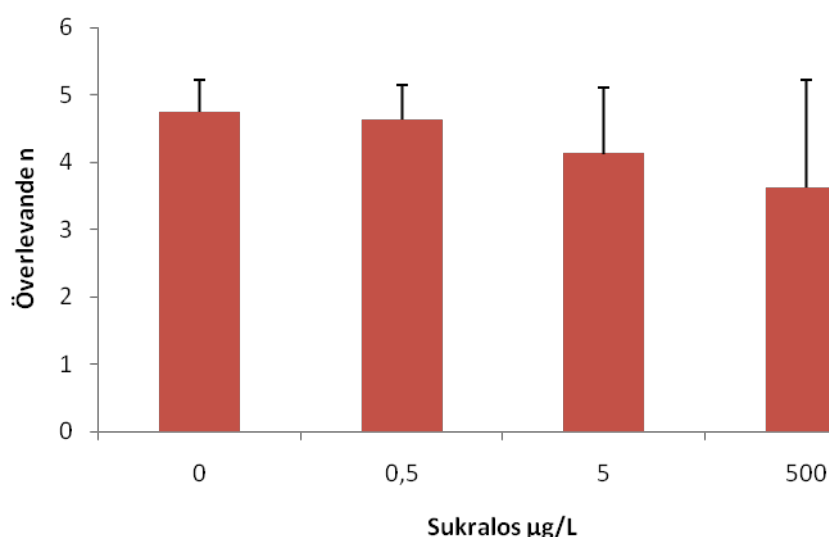


Fig. 2 Medelantal överlevande juveniler av *Gammarus zaddachi* exponerade för sukralos under 28 dagar. Data redovisas som medelvärde av 8 replikat +SD.

Nitocra

Akuttestet med adulta individer av *Nitocra* visade inte på någon toxicitet.

Exponeringen av juvenila *Nitocra* resulterade i att djuren exponerade för de lägre koncentrationerna av sukralos var längre jämfört med kontroldjuren medan för individer exponerade för de högre koncentrationerna minskade längden med ökande sukraloskoncentration (figur 3). De kortaste individerna återfanns i den positiva kontrollen och hade exponerats för 50 $\mu\text{g/L}$ lindan. RNA-innehållet varierade mellan exponeringarna och den var lägst i 500 $\mu\text{g/L}$ och högst i 5000 $\mu\text{g/L}$ exponeringen. Vi fann däremot inget signifikant samband mellan RNA-innehåll och tillväxthastighet, eller mellan RNA och kroppslängd. Vi fann ej heller något samband mellan medelutvecklingstid för olika copepoditstadier (figur 4).

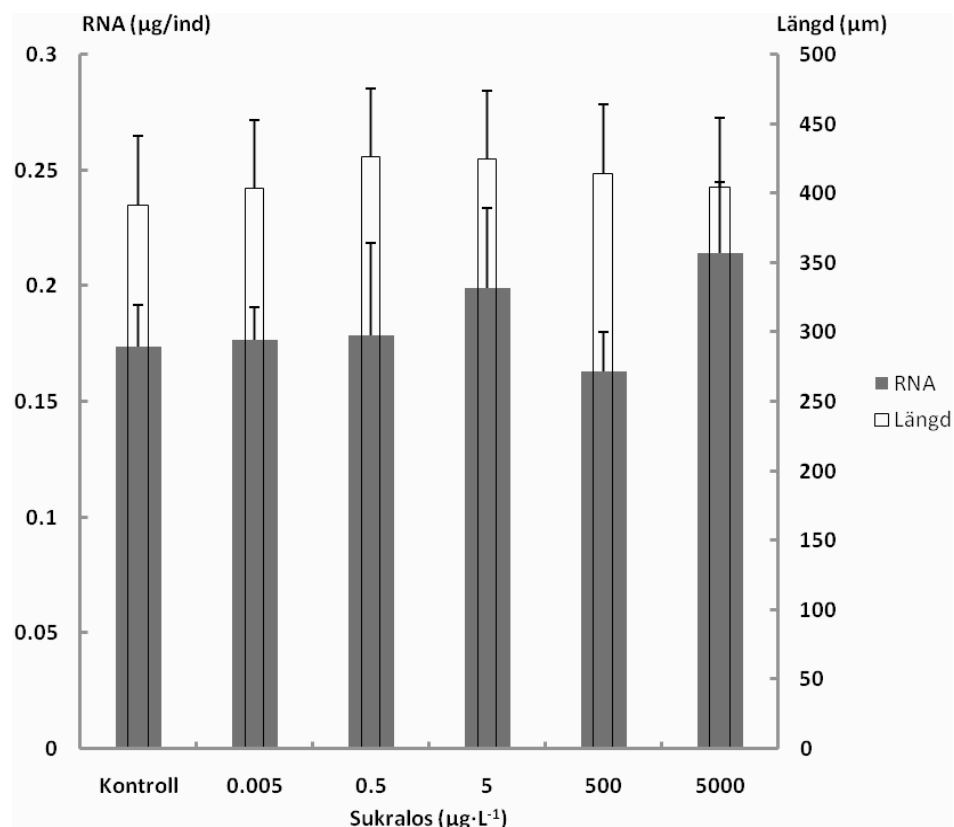


Fig 3. Medelkroppslängd samt RNA-innehåll hos *Nitocra* exponerade i tre veckor för fem koncentrationer av sukralos samt en kontroll. Data redovisas som medelvärde av 4 replikat +SD för RNA medan medelvärdet för längd baserades på antalet djur som hade uppnått stadium CIII och var i genomsnitt 16 + SD.

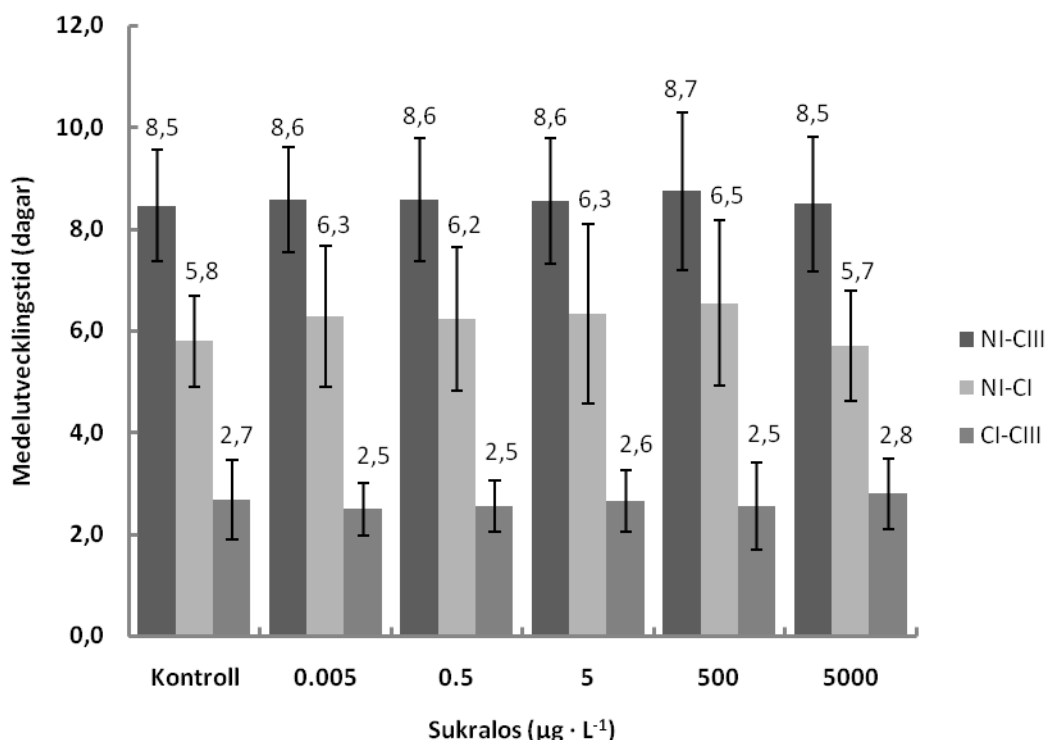


Fig 4. Medelutvecklingstid i dagar för olika stadier av *Nitocra* exponerade för sukralos. Data redovisas som medelvärde i +/- SD och baserar sig på 30-40 individer per behandling.

Diskussion

De relativt höga halter sukralos som uppmätts i renat avloppsvatten och ytvatten är en följd av ökad användning av sukralos i konsumentprodukter. Stabila ämnen som används i hushållen hamnar förr eller senare i ytvatten via reningsverken. Det är något förvånande att sukraloshalterna är så pass höga, utspädningen av det renade avloppsvattenet från Henriksdalsverken är blott 100 ggr. Utanför Waldemarsudde släpps även det renade avloppsvattent från Bromma reningsverk ut. Det är svårt att förklara att dessa halter är i samma storleksordning som i Baggensfjärden, vars reningsverk behandlar avloppsvatten från endast drygt 10 000 personer. Dessa resultat bekräftar dock de undersökningar som IVL gjorde 2007.

Långtidsstudien på nykläckta gammarider visade tecken på att högre sukraloskoncentrationer ökar mortaliteten. Inga tidigare studier har visat effekter på mortaliteten men det är för tidigt att dra några vidare slutsatser efter ett begränsat försök. Resultatet bör dock utredas vidare. Vi fann en stimulans av längdtillväxten hos *Nitocra* vid lägre koncentrationer men den avtog vid exponering för de högsta koncentrationerna. Denna typ av hormesiseffekt, dvs en stimulans vid låg dos är vanlig vid exponering för t ex läkemedel (Beckon et al. 2008). Tidigare studier (Saiz et al. 1998) har visat på ett linjärt samband mellan tillväxthastighet och RNA-innehåll i djuren, vilket vi inte fann i denna studie. En möjlig trend kan skönjas, ökande RNA-innehåll vid ökande sukraloskoncentration. Små organismer med högt innehåll av RNA kan tänkas investera sin energi i något annat än tillväxt, till exempel stressrelaterade proteiner (Korsloot et al. 2004). Några skalömsningseffekter kunde inte beläggas varken hos gammarider eller *Nitocra*. Analys av exponerade gammarider visade inga tecken på biokoncentring i organismerna, vilket var ett förväntat resultat, men det skulle behöva upprepas.

Slutsatser

Denna förstudie visade att sukralos inte biokoncentreras i gammarider, vidare att hos nyfödda gammarider ökar mortaliteten med en ökande koncentration av sukralos. Resultaten kunde inte påvisa några skalömsningseffekter hos gammarider eller *Nitocra*. Bristen på samband mellan RNA/längd resp RNA/tillväxthastighet kan vara indikationer på stress. Detta är en förstudie, och det vore intressant att göra en utvidgad beteendestudie hos kräftdjur, dels för att se om förmågan att hitta varandra inför parningen kan störas av höga sukraloskoncentrationer, och dels om födosökning kan försvåras av ökade sukraloshalter. Bristen på samband mellan RNA-innehåll och tillväxt bör utredas vidare, eftersom det kan vara ett tecken på stress.

Tack

Tack till Naturvårdsverket för finansiellt stöd, till Per Jonsson som hjälpte till med insamlandet av ytvatten och Berndt Björleinius och Cajsa Wahlberg på Stockholm vatten för provtagning av avloppsvatten.

Referenser

- Abou-Donia MB, El-Masry EM, Abdel-Rahman AA, McLendon RE, Schiffman SS (2008). *J of Toxicol. and Environ. Health.* 71 (21), p 1415-1429.
- Becker WM, Kleinsmith LJ, Hardin J (2000). *The world of the cell – 4th ed.* In: The Benjamin/Cummings Publishing Company, San Francisco, p 376-404.
- Beckon NW , Parkins C, Maxmovic A, Beckon AV (2008) *Environ. Sci. Technol.* 42, p 1308–1314.
- Bigal ME, Krymchantowski AV. (2006). *Headache* 46 (3), p 515-517.
- Brorström-Lundén E, Svensson A, Viktor T, Woldegiorgis A, Remberger M, Kaj L, Dye C, Bjerke, A, Schlabach M. (2007). *IVL report B1769*, p 1-24.
- Eriksson Wiklund AK, Börjesson T, Wiklund SJ. (2006). *Marine Pollut Bull.* 52:96-99.
- Gricce HC & Goldsmith LA (2000). *Food and Chemical Tox* 38(suppl 2), S1-S6.
- Korsloot A, van Gestel CM, van Straalen N (2004). *Environmental Stress and Cellular Response in Arthropods*, ISBN 0-415-32886-1 (Print) Boca Raton : CRC Press
- Krång, A-S. (2007). *Aquat. Toxicol.* 85, p 9-18.
- Pascoe D, Kidwards TJ, Maund SJ, Muthi E, Taylor EJ (1994). *Water Res.* 28, p 369-372.
- Reinders A, Sivitz AB, His AH, Grof CPL, Perroux JM, Ward JM. (2006). *Plant, Cell and Environ.* 29, p 1871-1880.
- Pankiw T, Page RE (2003). *J. Comp. Physiol.* 189, p 1432-1440.
- Saiz E, Clabet A., Fara A, Bedalet E (1998). *Limnol. Oceanogr.* 43, p 465-470.
- Sasaki YF, Kawaguchi S, Kamaya A, et al. (2002). *Mutation research-genetic toxicology and environmental mutagenesis.* 519 (1-2), p 103-119.