

Bedömningsgrunder för missbildade embryon hos vitmärlan (*Monoporeia affinis*)

Martin Reutgard, Brita Sundelin, Stockholms universitet, Institutionen för Tillämpad miljövetenskap, ITM

Bakgrund.

Vitmärlan (*Monoporeia affinis*) är en glacialrelikt som förekommer i hela Östersjön från Bottenviken ned till södra delen av Östersjön. Den är en sedimentlevande stenoterm nyckelart som är viktig för syresättning av sedimentet samt viktig föda för rovlevande evertebrater som *Bylgides sarsi* och *Halicryptus spinulosus* samt vissa fiskarter som t.ex. strömming, sik, tånglake och skrubbskädda. Den har en förhållandevis hög lipidhalt (ca 30 % av torrvikten) och visat sig känslig för exponering för olika typer av miljögifter men även för syrebrist och kombinationen av miljögifter tillsammans med syrebrist ökar effekterna av miljögifter (Gorokhova et al 2010 och 2013). Individtätheten av vitmärla har minskat drastiskt under de senaste decennierna, både i Bottniska Viken där populationerna minskade till mindre än 1/10 i början av 2000-talet och ännu inte återhämtat sig samt i Egentliga Östersjön där populationerna även minskat kraftigt sen 70-talet. Med tanke på användningen av vitmärlans reproduktion i det Nationella övervakningsprogrammet i Östersjön och förslaget att använda variabeln missbildade embryon som en core indikator i ett kommande övervakningsprogram inom Helcom har vi arbetat vidare med att ta fram bedömningsgrunder för variabeln med avseende på deskriptor 8 (koncentrationer av miljögifter har nivåer som inte ger upphov till förorenings effekter) inom Havsmiljödirektivet (Directive 2008/56/EC).

Bedömningsgrunder för missbildade embryon av vitmärla

Vid framtagandet av bedömningsgrunder för missbildade embryon av vitmärla har vi utgått från data från den nationella provtagningen som har pågått sedan 1994 fram till 2011 då programmet reviderades och utökades med fler stationer längs kusten. Prover har samlats in årligen i skiftet januari/februari på 5 stationer i Bottenhavet och 9 stationer i Asköområdet. Stationsnätet för den nationella provtagningen före 2012 kan ses i Fig 1

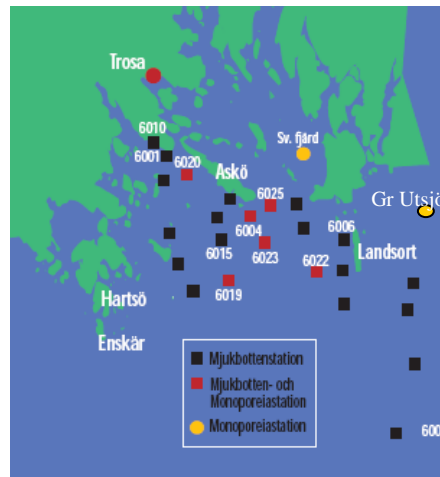
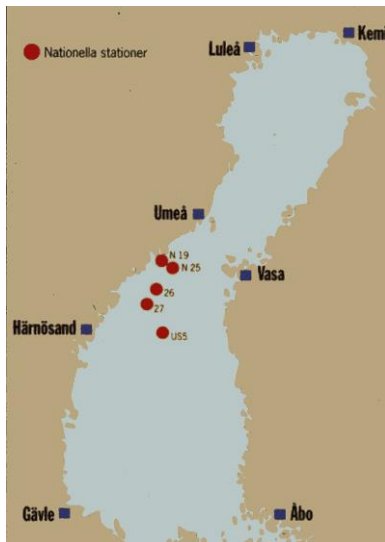


Fig. 1 Stationer i Bottenhavet (vä), Stationer i Asköområdet (hö)

Nedanstående data har uteslutits ur datamängden på grund av avvikelser från övriga referensstationer

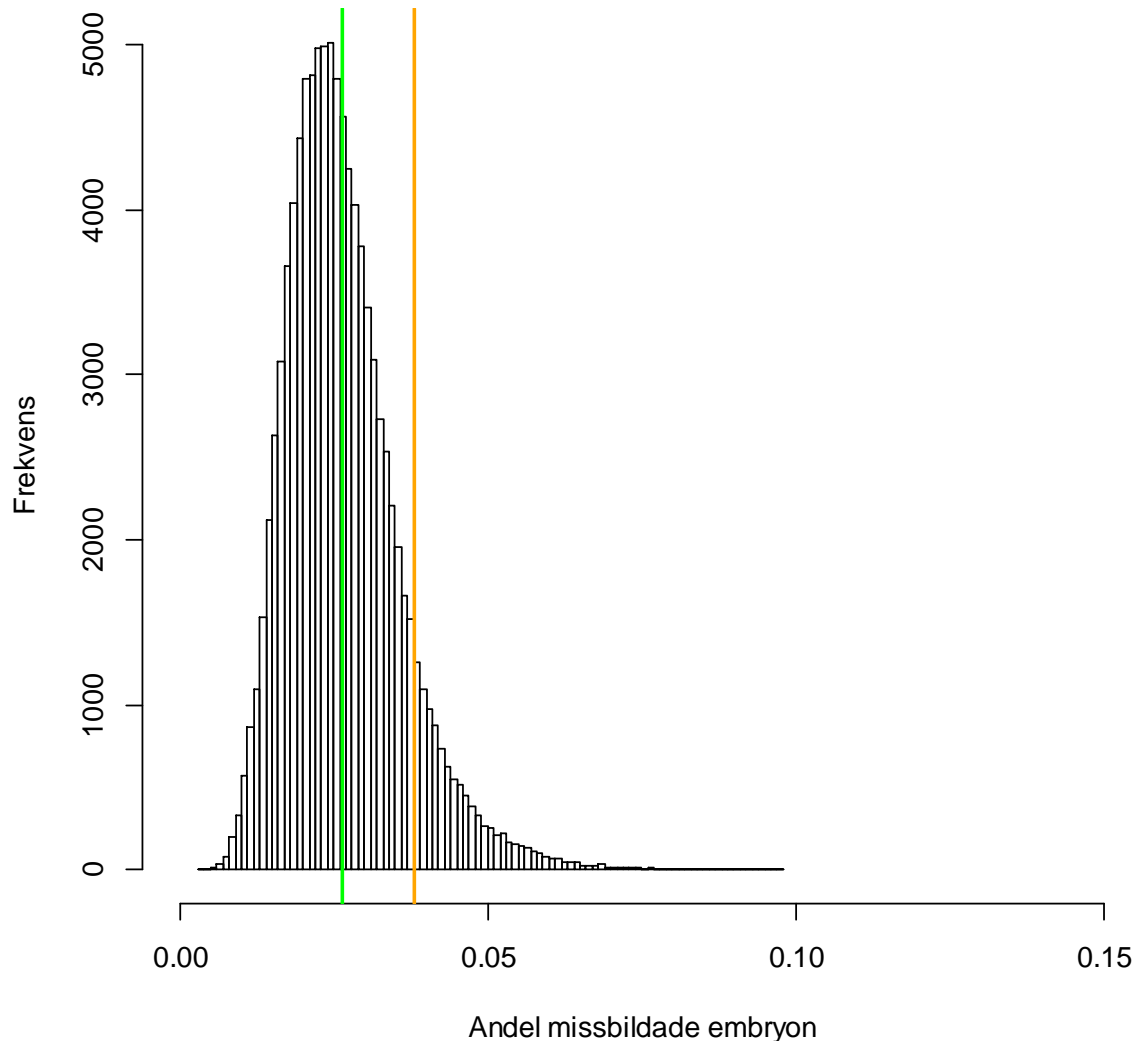
- Station 6020 i Egentliga östersjön har helt uteslutits eftersom den visar en förhöjd andel missbildade embryon under större delen av tidsserien, se Figur 4. Särskilda studier har gjorts vid station 6020 utan att lyckas förklara den förhöjda andelen missbildade embryon. En teori som har diskuterats är dumpad ammunition.
- År 2002 -2004 var förekomsten av en specifik typ av embryoskada där lipider läckt ut genom det inre membranet (s.k. Lipidskador) extremt hög i Asköområdet (Figur 3). Vi har inte möjlighet att i efterhand korrigera för detta och har därför valt att stryka dessa år vid framtagandet av bedömningsgrunder eftersom detta kraftigt överskuggar övriga embryoskador som normalt dominerar skadebilden.

Urvalet innehåller 8622 honor med drygt 230 000 embryon.

Eftersom gränsvärdet baseras på en percentil har provstorleken en avgörande betydelse för var gränsvärdet hamnar. En högre provstorlek ger mindre varians till följd av slumpvisa fel och därför också en mindre spridning (lägre percentil). Eftersom provstorleken varierar stort från år till år och från station till station, har vi valt att använda oss av upprepade slumpmässiga provtagning s.k. Bootstrapping, där vi själva kan kontrollera provstorleken. Vi har valt att använda en provstorlek på 50 honor (ca 1500 embryon) vilket är den rekommenderade provstorleken i det Nationella provtagningsprogrammet. Den slumpmässiga provtagningen av 50 honor i dataurvalet upprepades 100 000 gånger för att få en jämn spridning.

Resultatet visar att andelen missbildade embryon är i genomsnitt 2,6 %, (bakgrundsvärde) (Figur 2 och tabell 2). Vi har valt att använda den 90:e percentilen i likhet med de flesta

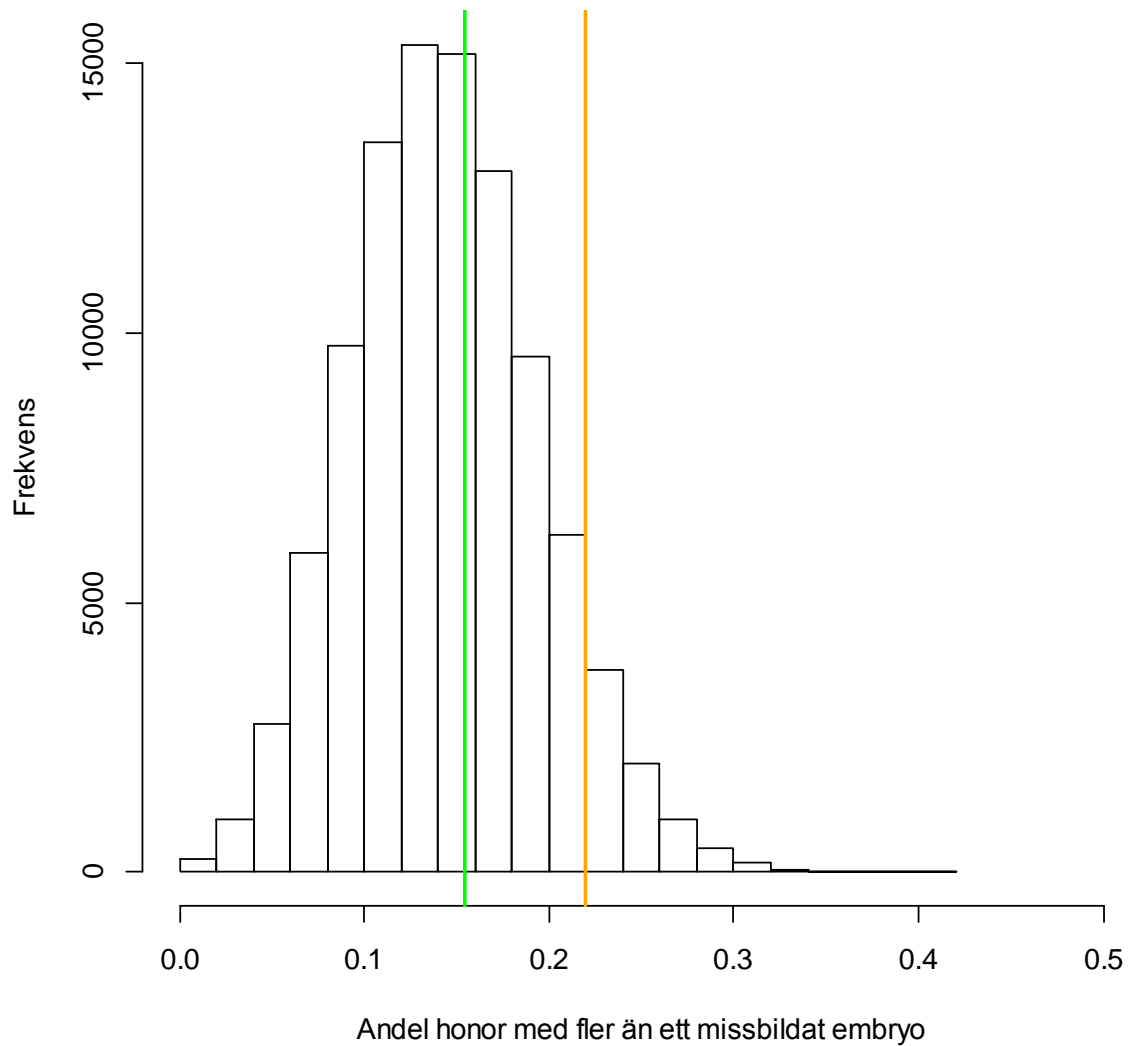
andra bedömningsgrunder för biologiska effekter (ICES Cooperative Research Report no 315). Den 90:e percentilen hamnar vid 3.8 % missbildade embryon.



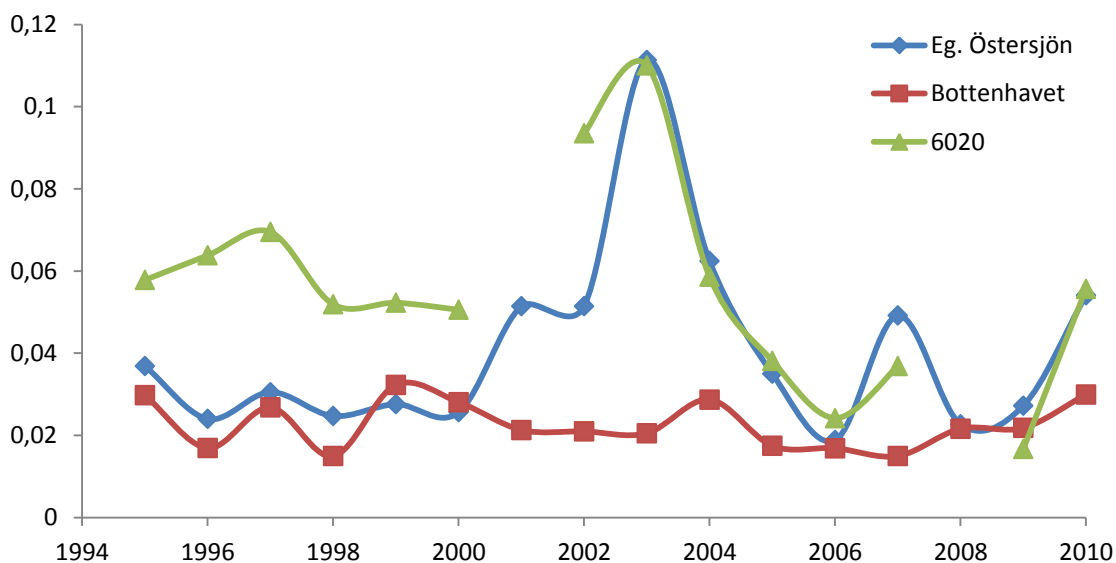
Figur 2 Andel missbildade embryon av vitmärlan (Monoporeia affinis). Grön linje illustrerar det genomsnittliga värdet i bakgrundsområden och orange linjen värdet som är signifikant förhöjt från bakgrunden.

Ett annat sätt att bedöma påverkan är att analysera andel honor med missbildade embryon (Figur 3). En sammanställning av data från påverkade områden och utvalda övervakningsdata från det Nationella programmet visar att man har störst chans att upptäcka statistiskt säkerställda skillnader mellan påverkat och opåverkat område genom att jämföra andel honor med fler än ett missbildat embryo. (se tabell 2)

Slumpvis upprepad provtagning (100 000 gånger) av 50 honor visar att andelen honor med fler än ett missbildat embryo är i genomsnitt 15.4 % och 90 percentilen är 22 %.



Figur 3. Andel honor med >1 missbildat embryo. Grön linje illustrerar genomsnittsvärdet i bakgrundsområden och orange linje en signifikant avvikelse från bakgrunden.



Figur 4. Andelen missbildade embryon (medel) från 1994 – 2010 i Bottnhavet (röd linje), Egentliga Östersjön (blå linje) och Station 6020 (grön linje). Vissa år saknades ett tillräckligt stort antal gravida honor på station 6020.

Tabell 1. Bedömningsgrunder för andel missbildade embryon samt andel honor med missbildade embryon

Bedömningsgrund	Genomsnitt	Bakgrundsnivå	Förhöjd nivå
Andel missbildade embryon	2.6 %	0 - 3.8 %	> 3.8 %
Andel honor med fler än 1 missbildat embryo	15 %	0 - 22 %	> 22 %

Bedömningsgrunder för biologiska effekter på låg biologisk organisationsnivå (olika typer av biomarkörer som t.ex. vitellogenin hos hanfiskar, acetylcholinesteras, EROD, DNA-addukter och lysosomal membranstabilitet (LMS)) inkluderar även ett högre gränsvärde (EAC), som ska spegla när en effekt befaras leda till effekter på högre nivå som påverkar en organisms fitness. Denna indikator, missbildade embryon, är dock en effekt på relativt hög organisationsnivå och vi anser därför att BAC och EAC sammanfaller för denna variabel.

Modeller för att avgöra risken för effekter på populationsnivå är under utveckling. Preliminära resultat visar att det inte finns en betydande risk för populationstillväxten om andelen missbildade embryon ligger under 3.6 % d.v.s. "övre" gränsvärdet för bakgrundsnivån. Dock föreligger en risk för betydande populationseffekter i förorenade områden med kraftigt förhöjd frekvens av embryoskador.

Missbildade embryon hos vitmärkla har studerats både i fält i förorenade recipienter och i laboratorieexperiment med olika typer av miljögiftsexponering, både metaller och organiska miljögifter (Eriksson et al. 1996, 2004, 2005, Sundelin 1983, 1984, 1988, 1989, 1996, 1998, 2008). Både exponering i mjukbottenmikrokosmsystem och fältstudier i förorenade

områden har visat att missbildade embryon uppstår vid miljögiftsexponering men är förhållandevis okänsliga för annan typ av stress som t.ex. syrebrist och är ett känsligare mått på föroreningsbelastning än andra reproduktionsvariabler som fekunditet, befruktningfrekvens, äggutveckling, döda och outvecklade ägg, döda äggsamlingar (Eriksson et al. 2004). Fältstudier i olika typer av recipienter längs Östersjökusten har analyserats med hjälp av s.k. metaanalys och det finns ett klart samband mellan missbildade embryon och avståndet till föroreningskällan (Reutgard et al in press). Andra avvikelser från normal embryoutveckling som odifferentierade ägg (stannat i utvecklingen innan gastrulationen) och döda ägg och äggsamlingar hos honan saknar tydlig koppling till miljögiftsexponering (Sundelin et al 1998, 2008).

Tabell 2. Andel honor med >n missbildade embryon i referensområden och förorenade områden. Jämförelse av andel honor med fler än ett missbildat embryo (>1) ger högst statistisk styrka.

Referensområden			Andel honor med >n missbildade embryon				
			> 0	>1	>2	>3	>4
Askö och Bottenhavet	PMK	Medel	0,32	0,15	0,08	0,05	0,03
Askö och Bottenhavet	PMK	90:e percentil	0,40	0,22	0,14	0,08	0,06
Förorenade områden			Andel honor med >n missbildade embryon				
	Station	≥0	> 0	>1	>2	>3	>4
Umeå	Syd1	5	0,6	0	0	0	0
Umeå	Syd2	3	0,33	0	0	0	0
Piteå	VD6	67	0,59*	0,48*	0,22*	0,15*	0,09
Piteå	VD4	11	0,91*	0,64*	0,36 _B	0,36*	0,36*
Piteå	12B	66	0,59*	0,46*	0,32*	0,26*	0,17*
Iggesund	IG1	35	0,57*	0,34 ^B	0,2	0,11	0,086
Iggesund	IG2	35	0,63*	0,57*	0,49*	0,46*	0,4*
Sundsvall	SU4	33	0,52	0,42*	0,33*	0,30*	0,15*
Sundsvall	SU5	35	0,63*	0,49*	0,37*	0,23*	0,23*
Bråviken	2.3 (2010)	11	0,55	0,46 _B	0,091	0,091	0
Bråviken	2.3.4 (2011)	5	0,6	0,6 ^B	0,4	0,2	0
Bråviken	6 (2011)	36	0,56*	0,39*	0,19	0,14	0,06

Referenser

Eriksson, A-K., Sundelin, B., Broman, D., Näf, C (1996). Effects on *Monoporeia affinis* of HPLC-fractionated extracts of bottom sediments from a pulp mill recipient. In: Environmental fate and effects of pulp and paper mill effluents. Servos et al (eds) p 69-78, St Lucie Press Florida.

Eriksson Wiklund AK, Sundelin B (2004). Biomarker sensitivity to temperature and hypoxia- a seven year field study. *Mar Ecol Prog Ser* 2, 74: 209-214.

Eriksson Wiklund A-K, Sundelin B, Broman D. (2005). Toxicity evaluation by using intact sediments and sediment extracts, *Mar Poll Bull.* 50 (6): 660-667

Gorokhova E, Löf, M, Halldórsson H, Tjärnlund U, Lindström M, Elfving T, Sundelin B (2010). Single and combined effects of hypoxia and contaminated sediments on the amphipod *Monoporeia affinis* in laboratory toxicity bioassays based on multiple biomarkers. *Aquatic Toxicology* 99 (2010) 263–274

Gorokhova E, Löf, Lindström M, Sundelin B (2013). Exposure to contaminants exacerbates oxidative stress in amphipod *Monoporeia affinis* subjected to fluctuating hypoxia. *Aquatic Toxicology* 127:46-53.

Reutgard, M, Eriksson Wiklund, AK, Breitholz M, Sundelin B. Embryo development of the benthic amphipod *Monoporeia affinis* as a tool for monitoring and assessment of biological effects of contaminants in field: A meta-analysis. *Ecological Indicator* (in press)

Sundelin, B. (1983). Effects of cadmium on *Pontoporeia affinis* (Crustacea: Amphipoda) in laboratory soft-bottom microcosms. *Mar. Biol.* 74, 203-212.

Sundelin, B. (1984). Single and combined effects of lead and cadmium on *Pontoporeia affinis* (Crustacea: Amphipoda) in laboratory soft-bottom microcosms. In: Ecotoxicological testing for the marine environment. G. Persoone, E. Jaspers, and C. Claus (Eds). State Univ. Ghent and Inst. Mar. Scient. Res., Bredene, Belgium. Vol. 2. 588 p.

Sundelin, B. (1988). Effects of sulphate pulp mill effluents on soft-bottom organisms - a microcosm study. *Wat. Sci. Tech.* Vol. 20, No. 2, pp. 175-177.

Sundelin, B. (1989). Ecological effect assessment of pollutants using Baltic benthic organisms. Thesis, Univ. of Stockholm, Dep. of Zoology 106 91 Stockholm

Sundelin, B., A-K. Eriksson (1998). Malformations in embryos of the deposit-feeding amphipod *Monoporeia affinis* in the Baltic Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 171: 165-180.

Sundelin B., Eriksson Wiklund A-K, Ford A (2008). The use of embryo aberrations in amphipod crustaceans for measuring effects of environmental stressors. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences* no 41 (TIMES)