



Vitmärlans reproduktion i Hanöbukten



Detta är en rapport som har tagits fram på uppdrag av Havs- och vattenmyndigheten. Rapportförfattarna ansvarar för innehållet och slutsatserna i rapporten och innebär inte något ställningstagande från Havs- och vattenmyndighetens sida.

Havs- och vattenmyndigheten

Datum: 2018-02-26

Omslagsfoto: Fredrik Ljunghager

ISBN 978-91-88727-01-5

Havs- och vattenmyndigheten

Box 11 930, 404 39 Göteborg

www.havochvatten.se

Vitmärlans reproduktion i Hanöbukten

Matias Ledesma och Brita Sundelin
Stockholms universitet, Institutionen för Miljövetenskap
och Analytisk Kemi (ACES).

Havs- och vattenmyndighetens rapport 2018:12

Förord

Regeringsuppdraget 2014-2017 i Hanöbukten handlar i huvudsak om miljögifter och effekten av dessa. Vitmärlans reproduktion är en mycket bra indikator på påverkan av miljögifter och därför låg det nära till hands att inkludera denna i undersökningarna.

Att Vitmärlan inte trivs på bottenarna i det utpekade problemområdet är svårt att råda över, isens utbredning i Hanöbukten likaså. Att det endast gick att hitta Vitmärla i tillräcklig mängd på en enda station tar inte bort det faktum att det fanns en anmärkningsvärt hög andel av missbildade embryon. Intressant men också oroande.

Tack till de tappra själarna som trotsat Kung Bore och Neptunus.



Mikael Krysell

Göteborg 2018-02-26

Bakgrund

Under de senaste åren har rapporter om problem hos kustfisk, sjöfågel samt förekomsten av brunt illaluktande vatten uppmärksammats i Hanöbukten och en utredning kring denna problematik startades därför 2011. Havs- och vattenmyndigheten (HaV) hade under 2013 ett regeringsuppdrag att utreda bakgrunden och orsakerna till problematiken (Havs- vattenmyndigheten 2013). De utredningar som HaV och Länsstyrelsen i Skåne tidigare genomfört har inte kunnat fastställa deras orsaker. Januari 2013 fick Havs- och vattenmyndigheten som regeringsuppdrag att vidare utreda bakgrunden och orsakerna till problematiken i Hanöbukten. Uppdraget löd: " Havs- och vattenmyndigheten ska efter samråd med berörda myndigheter, institut och organisationer analysera vilka möjliga orsaker som kan ligga bakom de miljöproblem som redovisas i skrivelse från Länsstyrelsen i Skåne län och Region Skåne" (Underrättelse angående allvarliga problem i Hanöbuktens ekosystem, Regeringskansliet dnr M2012/1741/Nm).

Anledningen till att vitmärkan inkluderades i studierna var att vi 2012 studerat reproduktionen hos vitmärkan på en station i norra delen av Hanöbukten (PMK 12 vid Utklippan) inom det nationella miljöövervakningsprogrammet "Missbildade embryon hos vitmärka". Metoden är en rekommenderad metod inom ICES för att detektera effekter av miljögifter i sediment

([http://ices.dk/sites/pub/Publication%20Reports/Techniques%20in%20Marine%20Environmental%20Sciences%20\(TIMES\)/times41/TIMES41.pdf](http://ices.dk/sites/pub/Publication%20Reports/Techniques%20in%20Marine%20Environmental%20Sciences%20(TIMES)/times41/TIMES41.pdf)) och är en "precore indicator" inom HELCOM. Vi har i mikrokosmexperiment med vitmärka funnit ett starkt samband mellan halten av kemikalier i sedimentet och frekvensen missbildade embryon (Sundelin 1983, 1984, Eriksson et. al. 2005) . Även fältstudier i olika typer av industrirecipienter har visat ett starkt samband till miljögifter (Reutgard et al. 2014) . Av denna anledning startades det nationella miljöövervakningsprogrammet med vitmärkans reproduktion. Programmet som startade 1994 reviderades 2012 och antalet stationer fördubblades från 14 till 30 för att täcka en större del av Östersjöns kustlinje. Resultatet från 2012 visade förhållandevis kraftiga skador på stationen i Hanöbukten. En missbildningsfrekvens på drygt 6 %, vilket skall jämföras med bakgrundsmedelvärdet på 2.6 %. Stationen i Hanöbukten kunde inte provtagas följande år då fartygskostnaden ökat markant de senaste åren och även 2015 då vi erbjöds medel från HaV fanns inte tillräcklig finansiering för att provta stationer i Hanöbukten.

Provtagning 2016

I januari 2016 fick vi möjlighet att använda Sjöfartshögskolans fartyg Calmare Nyckel för sedimentprovtagning i Hanöbukten. Båten saknar isbrytarklass och is i Kalmarsund under den tilltänkta perioden medförde att provtagningen sköts upp i 14 dagar. Resultat från makrofaunaprovtagningen 2013 användes för att välja ut stationer med förekomst av vitmärla.

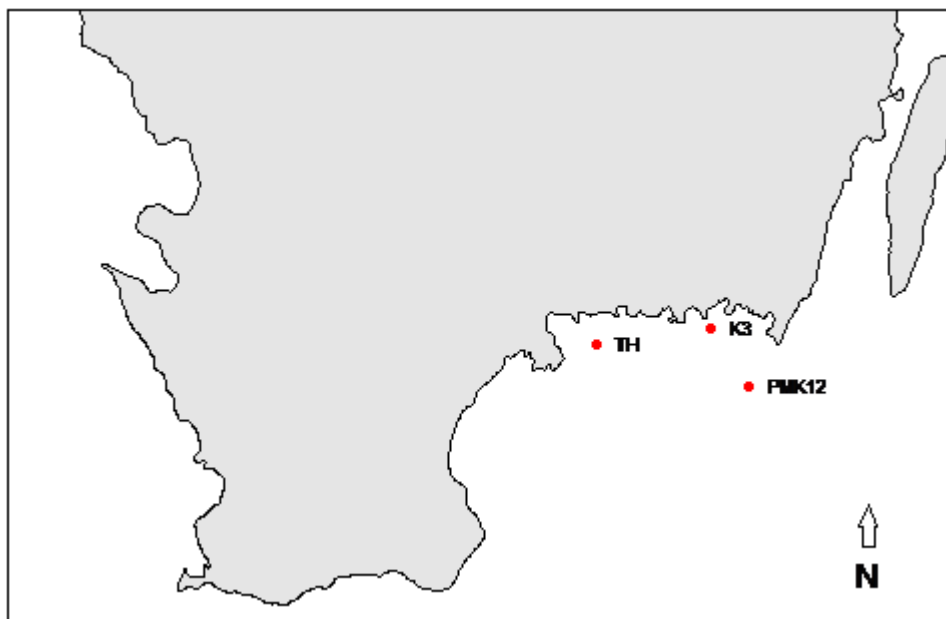


Fig. 1 Stationer som provtogs med avseende på vitmärla i februari 2016.

Målsättningen var att även inkludera stationer i västra Hanöbukten där man framför allt noterat skador på fisken men i området hittade vi inga stationer där man funnit vitmärla de senaste åren och då kostnaden skulle öka markant om vi på måfå skulle leta stationer med vitmärlaförekomst fanns ingen möjlighet att gå söder om Sölvesborg. Två av stationerna T/H och PMK 12 ligger relativt djupt, 39 resp 37 m medan K3 är en grundare station på 9 m. Abundansdata från 2013 visade att det med lite ansträngning skulle vara möjligt att hitta 50 gravida honor vilket är riktlinjen för miljöövervakningen av vitmärla. Vitmärlan har emellertid minskat kraftigt i hela Hanöbukten under de senaste åren och i år fanns inga vitmärlor på PMK 12 och K3. Endast T/H vid Tärnö hade förekomst av vitmärla. Insamlade djur transporterades i kylboxar till universitetet (ACES) där embryanalyserna ägde rum.

Provtagning



Embryoanalys

Varje gravid hona analyseras levande. Honan bär sin avkomma i en äggkammare (marsupium) ventralt. Parningen sker i månadsskiftet november/december och de mogna äggen vandrar ned i marsupiet där hanen lämnat sin spermator och befruktningen sker. Embryoutvecklingen tar ca 2.5 månad innan juvenilerna kläcks. Alla märkräftor (amfipoder) saknar larvstadium. Analysen sker i slutet av januari då embryoutvecklingen pågått ca 1.5-2 månader och det är lättare att identifiera skador och missbildningar. Man vill dock vara säker på att inga honor släppt sina nykläckta juveniler. Honan analyseras för fekunditet (ägg per hona) och avvikelser hos honan noteras som t.ex. parasitförekomst, manganfläckar i exoskelettet vilket tyder på att honan utsatts för låga syrenivåer i sedimentet. Embryon som preparerats ut ur honan analyseras under stereomikroskop (80 x förstoring) med avseende på utvecklingsstadium (vi har delat upp dem i 9 olika stadier), missbildade, membranskadade, utvecklade (embryoutvecklingen har avstannat före gastrulation då embryot börjar differentieras i olika organ) och döda ägg och äggsamlingar (stor del av kullen dör i tidigt skede och återfinns som en lipidrest i marsupiet) För information om embryoanalysen se Sundelin och Eriksson, 1998.

Statistisk analys

Som referensstation valdes HAE3 utanför Östergötlands norra skärgård. Denna station har data som överensstämmer med bakgrundsvärdet för missbildade embryon i Östersjön. Andel honor med skadade embryon, frekvens av embryoskador och utvecklade embryon testades i en kontingenstabell. Frekvensen av embryoskador och utvecklade embryon testades med Chitvå test med Yates korrektion. För andel honor med skadade embryon användes Barnard test som är lämplig för små stickprov. Äggproduktion analyserades med envägs Anova medan för utvecklingsstadium användes en icke parametrisk test (Mann Whitney). Som signifikansnivå användes p värde = 0.05.

Resultat

Äggproduktionen mätt som fekunditet (ägg/hona) skilde sig inte mellan referensstationen HAE3 och T/H även om stationen i Hanöbukten hade ett högre numerärt värde (Fig 2). Utvecklingsstadium skilde sig inte heller mellan stationerna men stationen i Hanöbukten provtogs 2 veckor senare än övervakningsstationerna i Östersjön och hade trots detta ett lägre värde så det är nog troligt att utvecklingen är lite försenad (Fig 3). Fekunditeten är framför allt beroende av näringstillgången och styrs framför allt av storleken på kiselalgsblomningen på våren medan embryoutvecklingen framför allt är temperaturberoende och djupet har stor betydelse för utvecklingen. Ofta har djupare stationer som ligger under termoklinen en snabbare utveckling vilket innebär att många av stationerna i norra Bottenhavet som ligger på över 100 m djup har en högre temperatur under senhösten/vintern än grundare stationer och därmed så är embryon mer utvecklade vid provtagningen. Det är dock en relativt stor variation mellan individer.

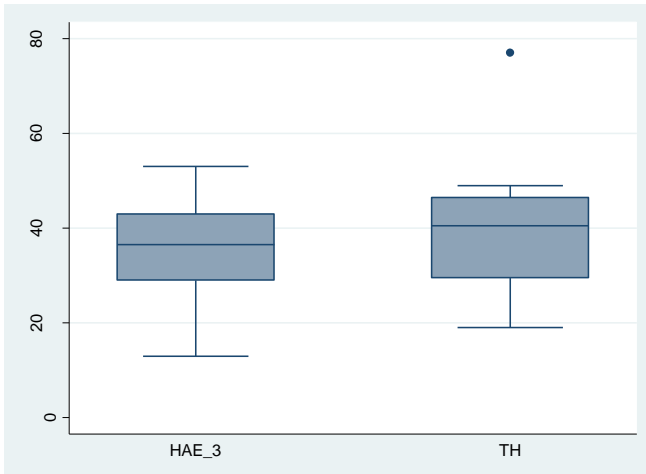


Fig. 2. Fekunditet (ägg/hona). Boxplot (medianvärde, 75 och 25 percentil, max-min samt extrem värde)

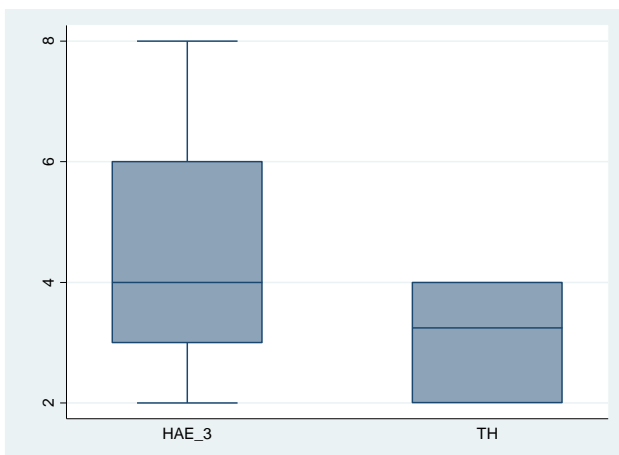


Fig. 3. Utvecklingsstadium hos embryon. Boxplot (medianvärde, 75 och 25 percentil, max-min samt extrem värde).

Frekvensen av missbildade och membranskadade embryon var förhållandevis hög på T/H och även andelen honor med skadade embryon var mycket hög (Fig. 4).

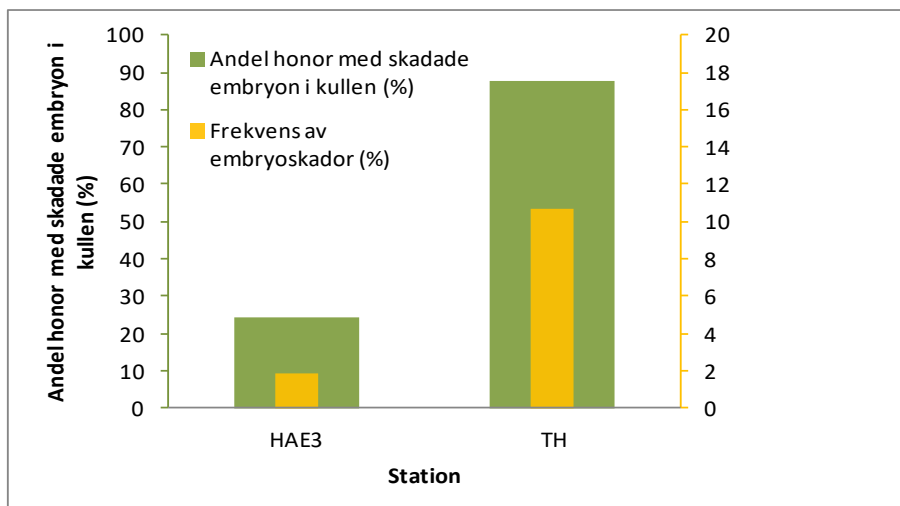


Fig. 4. Andel honor med missbildade och membranskadade embryon i kullen samt frekvensen av missbildade och membranskadade embryon hos honan.

Medelvärde för missbildade och membranskadade embryon på övervakningsstationer i Östersjön ligger på 2.6 % och bakgrundsvärde mellan 0-3.6 % per hona och station T/H har en frekvens som ligger högt även i jämförelse med industrirecipienter och skillnaden är signifikant ($p < 0.01$). Vi har helt nyligen funnit att även utvecklade embryon kan uppkomma vid exponering för miljögifter (Löf et. al. 2016 a, b) även om den huvudsakliga orsaken är näringsbrist (Sundelin et al. 2008). Även skillnaden för utvecklade ägg mellan stationerna är signifikant ($p = 0.0004372$). Andelen honor med missbildade och membranskadade embryon är signifikant högre på stationen i Hanöbukten $p = 0.00584427$ (Fig. 4). Om man inkluderar även utvecklade/odifferentierade ägg har 100 % av honorna på stationen i Hanöbukten någon form av skadade ägg (Fig. 5). Skillnaden är signifikant ($p < 0.01$).

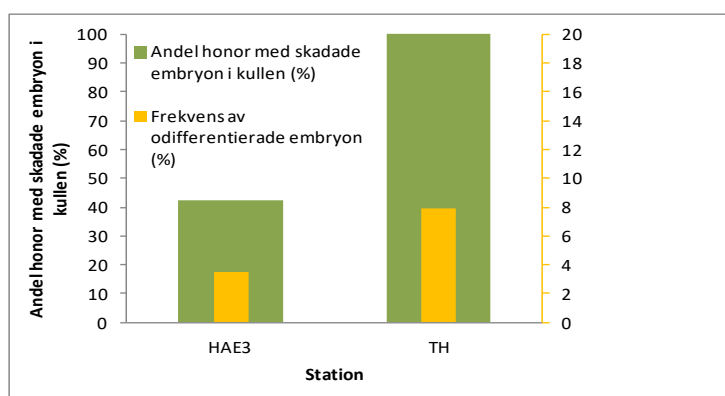


Fig. 5 Andel honor med missbildade, membranskadade och utvecklade embryon, samt frekvensen utvecklade embryon.

Vid provtagningen i januari 2016 fanns inga vitmärklar på station PMK 12 som provtogs 2012. Även 2012 var individtätheten låg och för att erhålla 50 gravida honor krävdes 2 bottenskrap och 6 hugg. Vid detta tillfälle registrerades relativt höga frekvenser på stationen, vilket var anledningen till att vitmärklans reproduktion studerades 2016. PMK 12 ligger ju längre från kusten än TH och skadorna var inte lika kraftiga som på TH.

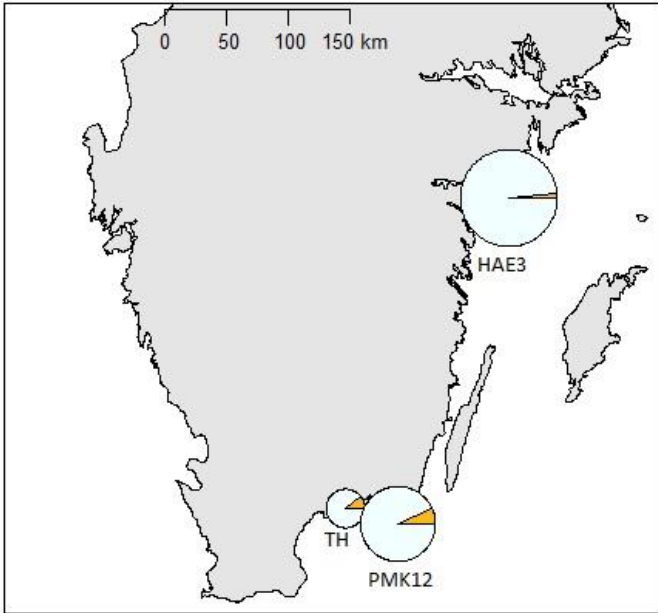


Fig. 6. Embryoskador (missb + memb) per station . Station PMK 12 provtogs 2012, medan TH och HAE3 provtogs 2016. Storleken på pajerna motsvarar antal honor per station.

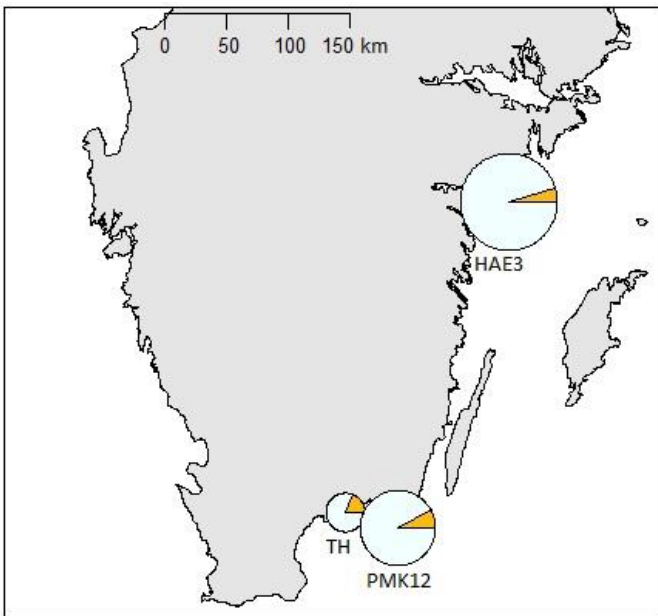


Fig 7: Total antal embryoskador (missb + memb+utvecklade) per station .

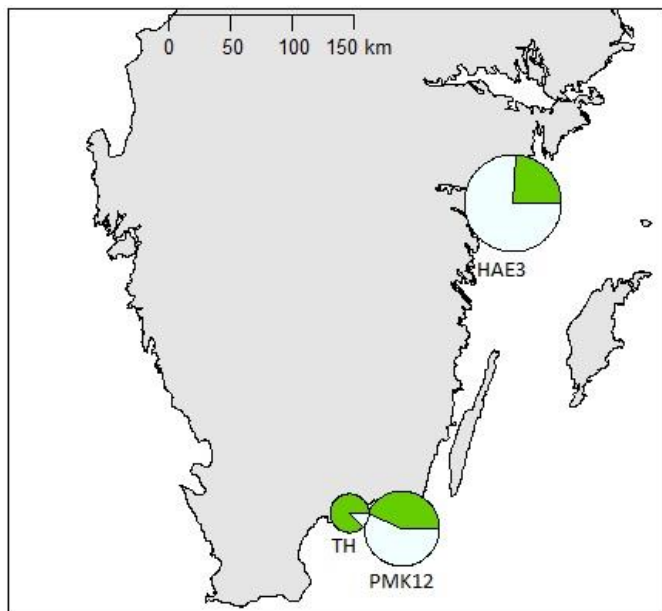


Fig 8: Andel honor med skadade embryon (missb +memb). Storleken på pajar motsvarar antal honor per station.

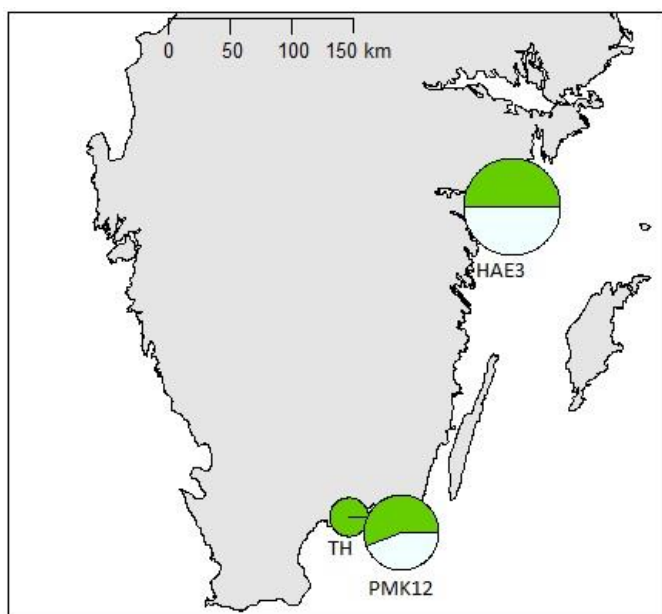


Fig 9: Andel honor med skadade embryon (missb +memb+ utvecklade). Storleken på pajar motsvarar antal honor per station.

Andelen honor med skadade embryon (missb+membran) var 80 % på station TH och när vi lägger till de utvecklade så hade samtliga honor skadade embryon. Vi har beräknat BAC och EAC värden för andel honor med missbildade och membranskadade embryon och bakgrundsvärdet ligger på 15 % och EAC värdet på 22 %. Det är således en kraftig höjning från bakgrundsvärdet. Även frekvensen missbildade embryon är förhöjd från bakgrundsvärdet 2.6 % i Östersjön och det är sannolikt att vitmärlorna varit exponerade för miljögifter av något slag. Vi saknar idag data över kemikalier i sedimentet och denna information skulle möjligtvis öka förståelsen för de kraftiga effekterna på vitmärlans reproduktion.

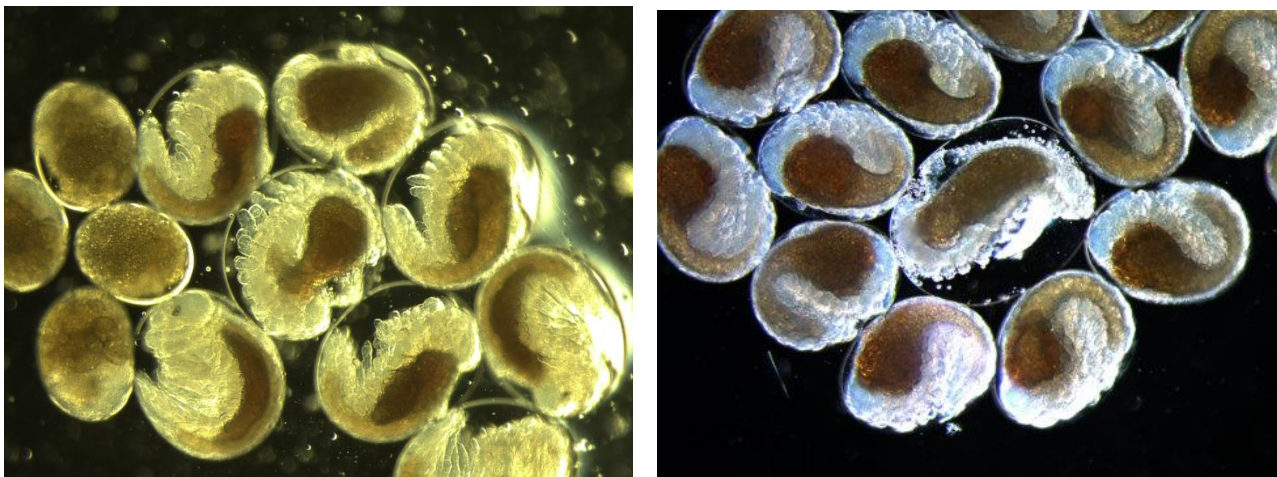


Fig. 10 Missbildade och outvecklade embryon tv samt ett membranskadat (äggmembranet har skadats och vatten har läckt in) embryo th på station TH i Hanöbukten.

Kontaminanter i sedimentet

För att försöka utreda vilka faktorer som orsakat de kraftiga effekterna på vitmärlan analyserades sedimentet med avseende på specifika kemikalier som metaller, PAHer samt PCBer. Dessutom genomfördes en förutsättningslös (nontarget) screening av sedimentet för att ytterligare få en uppfattning om den sedimentlevande vitmärlan exponerats för kemikalier. Sediment insamlades från tre lokaler i Hanöbukten samt tre referenslokaler i Egentliga Östersjön.

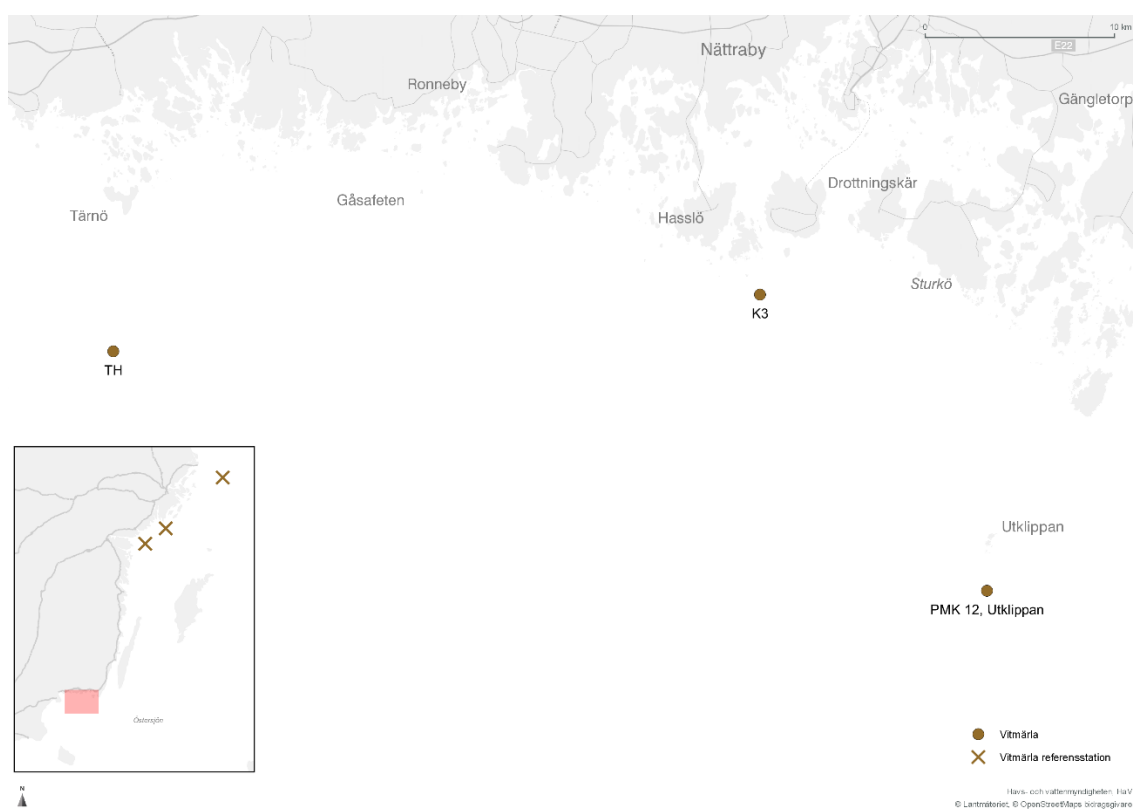


Fig. 11. Provtagningsstationer i Hanöbukten samt referensstationer i Västra Gotlandsbassängen och Norra Egentliga Östersjön

Tab. 1. Stationsdata för stationer i Hanöbukten och referensstationer

Område	Station	Djup (m)	Latitud	Longitud
Hanöbukten	PMK 12, Utklippan	37	55 96 618	15 70 005
Hanöbukten	TH vid Tärnö	39	56 04 5700	14 56 1199
Hanöbukten	K3	9	56 07 1599	15 30 72
N eg. Östersjön	HAE 3	43	58 31 18	17 18 96
N eg. Östersjön	Gr, Utsjö	50	58 45 14	17 57 77
N eg. Östersjön	SB8	62	59 30 56	19 49 32

Resultat

Varken metaller, PAHer eller PCBer uppvisade några halter som skulle kunna förklara de kraftiga effekterna på vitmärlan (tabell 2, 3 och 4). Metallhalterna på station K 3 är genomgående högre än på övriga stationer men det är bara halterna av kadmiun som skulle resultera i några toxiska effekter och halterna på station TH där vi registrerade kraftiga effekter på vitmärlans reproduktion avviker inte metallhalterna från referenslokaler. PCBer var förhöjda på stationen K3 men där hittades inga vitmärlor och station TH hade lägre halter än stationen vid Hävringe. Halterna av PAHer är visserligen högst i sedimentet från stationerna K3 och TH i Hanöbukten men är inte så höga att det förklarar de kraftiga effekterna.

Tabell 2. Metallhalter i sediment från Hanöbukten och referensstationer

	SAMPLE	PMK 12 Jan 2016	TH Jan 2016	SB 8 Jan 2016	HAE 3 Jan 2016	K 3 Jan 2016	Gr.utsjö Jan 2016
TS	%	76,3	55,4	75,6	78,7	20,4	67,1
As	mg/kg TS	0,65	4	2,48	1,35	17,7	6,69
Cd	mg/kg TS	0,0358	0,163	0,077	0,0708	2,21	0,136
Co	mg/kg TS	1,25	3,9	3,38	4,2	8,06	17,9
Cr	mg/kg TS	3,81	13,8	13,9	16,1	43,2	77,9
Cu	mg/kg TS	2,06	9,86	7,88	9,1	73,1	34,4
Hg	mg/kg TS	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04	0,291	<0.04
Ni	mg/kg TS	2,75	11,4	8,68	10,3	36,1	40,8
Pb	mg/kg TS	5,3	16,4	6,87	7,73	77,5	18,6
V	mg/kg TS	6,25	19	17,9	21,5	39,9	89,8
Zn	mg/kg TS	14,2	45,3	35,3	39,2	191	121

Tabell 3. PCBer i sediment från Hanöbukten och referensstationer

PCB ng/g	K3	TH	PMK 12	HAE	SB8	Gr utsjö
18	0	0	0	0	0	n.d.
28	0	0	7,6	0	6,1	n.d.
52	318	8,4	5,1	33,9	3,7	n.d.
70	64,1	0	0	49,6	0	n.d.
90/101	872,1	25,4	12,8	111,5	9,1	n.d.
110	214,1	15,6	5,1	49,7	5,3	n.d.
118	737,8	35,4	10,2	85,5	11,2	n.d.
105	150,9	9,1	3,7	19,9	3,3	n.d.
149	1008,9	10,9	11,2	123,6	10,2	n.d.
153	1744,3	24,1	19,1	194,3	18	n.d.
138	2070,5	26,9	23	236,4	21,7	n.d.
180+193	1071	14,7	6,8	126,9	6,8	n.d.
199	0	0	0	0	0	n.d.
194	0	0	0	0	0	n.d.
Sum	8251,7	170,5	104,6	1031,3	95,4	n.d.

Tabell 3. PAHer i sediment från Hanöbukten och referensstationer

Ng/g	Gr utsjö	HAE3	K3	pmk12	SB8	TH
Fluoren	#VALUE!	1,6	4,4	0,9	3,4	3,4
Phenantrene	3,2	8,3	26,1	9,5	20,4	25,0
Anthracene	3,6	1,8	10,1	2,4	4,9	5,3
2-Methyl Anthracene	1,4	0,4	2,5	2,7	1,7	1,5
1-meFen	1,8	2,5	4,7	3,3	1,2	3,6
2-Phenylnaphtalene	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Flu	1,8	9,6	48,9	15,3	22,7	33,7
Pyr	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
B(a)F	1,6	1,5	7,7	2,7	3,8	4,9
B(e)F	0,2	0,8	6,5	2,0	3,0	3,4
2-mePyr	0,5	0,7	3,6	1,2	1,6	2,2
1-mePyr	0,2	0,5	2,1	0,8	1,0	1,4
B(ghi)F	0,5	2,5	8,8	4,2	5,2	7,9
Cp(cd)P	0,1	0,1	1,5	0,3	0,4	4,6
B(a)A	0,5	4,9	31,5	9,9	15,6	19,9
Chr	1,8	7,8	26,4	11,9	16,5	22,1
2,2'-dinaphtyl	0,1	0,4	1,3	0,7	0,8	1,1
B(b)F	1,2	12,9	42,2	24,5	28,6	39,2
B(j+k)F	0,4	5,1	21,0	11,1	13,6	16,2
B(e)P	0,8	5,6	21,8	11,9	13,5	17,2
B(a)P	0,2	5,1	27,8	10,5	14,1	16,6
Per	10,6	9,2	11,5	3,4	19,1	10,7
Ind	0,7	17,1	59,1	29,0	31,7	46,5
B(ghi)P	0,8	11,9	42,7	19,4	21,1	30,7
Di benz(a,h) Anthracene	0,1	2,4	11,3	4,3	5,2	7,7
Picen	0,3	3,1	12,7	5,8	6,7	10,2
Cor	1,4	5,9	14,6	8,0	9,3	10,3
Di benzo(a,e)Pyrene	0,2	1,5	9,9	2,4	3,1	3,5
Summa	33,9	123,6	460,6	198,3	268,3	348,8

Eftersom reproduktionseffekterna på vitmärlan var mycket kraftiga och de vanligaste miljögifterna inte gav någon förklaring till effekterna gjordes en förutsättningslös (nontarget) screening av sedimentet. Metoden bygger på en bred extraktionsprocedur och därefter en högupplösande (Orbitrap) mass spektrometri, som genererar flera tusen unika kromatografiska element. Metoden ger både exogena och endogena substanser samt endast molekylvikter. Molekylvikterna motsvarar i de flesta fall unika substanser. Molekylvikternas relativa betydelse i Hanöbukten

illustreras i Fig 13. Det visade sig att stationerna i Hanöbukten signifikant avviker för de substanser som bidrar mest till separationen av de två områdena (Fig 12). Det är idag oklart vilka substanserna är, och uppföljande studier är nödvändiga för att validera eventuella ämnen som man identifierat men genom att gå in i speciella bibliotek och jämföra massvikter skulle det kunna vara möjligt att bestämma det.

Sediment Negative/Positive ionization (-QCs)

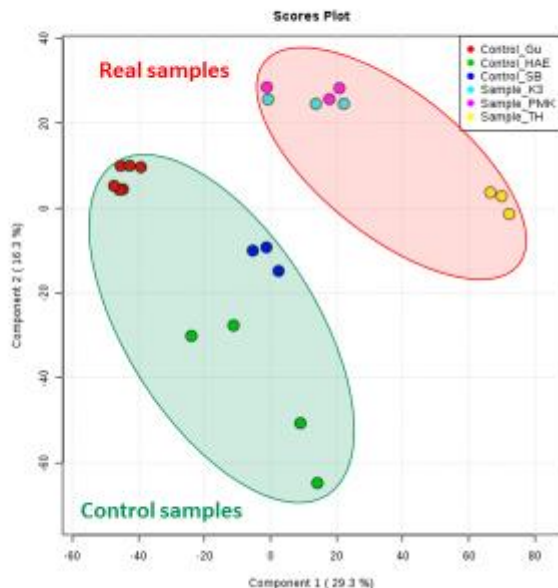


Fig. 12. Stationerna i Hanöbukten är signifikant separerade från referensstationerna vad gäller kemiska substanser.

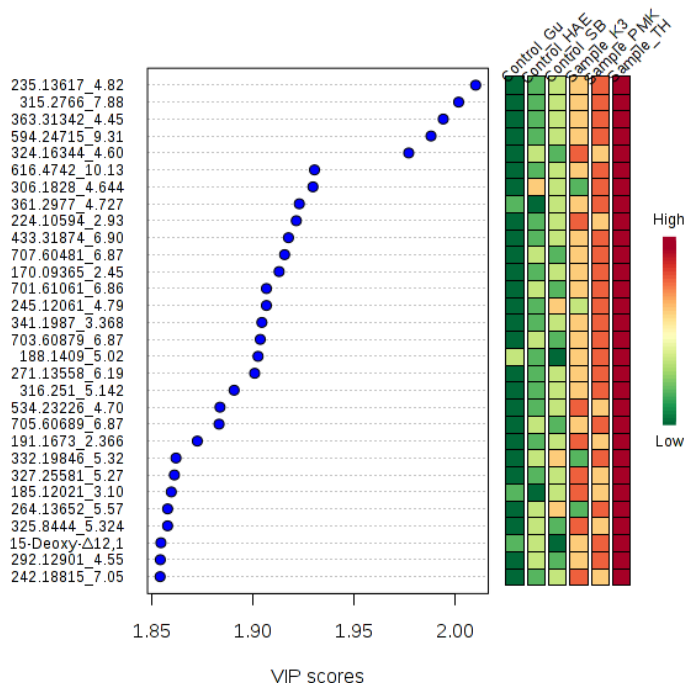


Fig. 13. Sammantaget negativ och positiv jonisering. Den massvikt som mest bidrar till resultatet. De funna molekylikternas betydelse på de olika stationerna

Slutsatser

1. Skadorna på vitmärlan på stationer i Hanöbukten är mycket kraftiga även jämfört med många industrirecipienter och de talar för att vitmärlorna påverkats av någon typ av miljögifter.
2. Det är troligtvis inte något av de traditionella miljögifterna som orsakat skadorna på vitmärlan då varken metaller, PCBer eller PAHer visar några alarmerande halter.
3. Screeningen av sedimentet på de olika stationerna visar att det är signifikanta skillnader mellan Hanöbuktsstationerna och referensstationer i Östersjön vad gäller substanser där vi idag endast känner molekylvikten.

Studien har utförts med medel från Havs- och vattenmyndigheten/Svensk miljöövervakning.

Referenser

1. 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
2. Löf M, Sundelin B, Liewenborg B, Bandh C, Broeg K, Schatz S, Gorokhova E. (2016 a). Biomarker-enhanced assessment of reproductive disorders in *Monoporeia affinis* exposed to contaminated sediment in the Baltic Sea. *Ecol Indicator* 63:187-185.
3. Löf M, Sundelin B, Bandh C, Gorokhova E (2016 b), Embryo aberrations in the amphipod *Monoporeia affinis* as indicator of toxic pollutants in sediment, a field evaluation. *Ecol Indicator* 60:18-30.
4. Reutgard M, Eriksson Wiklund A-K, Breitholtz M, Sundelin B. (2014). Embryo development of the benthic amphipod *Monoporeia affinis* as a tool for monitoring and assessment of biological effects of contaminants in the field: A meta-analysis. *Ecological indicator* 36:483-490
5. Sundelin, B. (1983). Effects of cadmium on *Pontoporeia affinis* (Crustacea: Amphipoda) in laboratory soft-bottom microcosms. *Mar. Biol.* 74, 203-212.
6. 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
7. Sundelin, Rosa, R., Eriksson Wiklund, A-K (2008). Reproduction disorders in a benthic amphipod, *Monoporeia affinis*, an effect of low food quality and availability. *Aquatic Biology*, 2:179-190.
8. 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),
9. 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.