



Biologisk karaktärisering av processavloppsvatten

Hösten 2002

Östrands massafabrik





1. Sammanfattning	2
2. Inledning.....	2
3. Metoder	3
3.1. Påverkan på bakterienivå.....	4
3.2. Akut påverkan på kräftdjur.....	5
3.3. Akut påverkan på i recipienten förekommande fisk.....	5
3.3.1. Fiskhantering	5
3.3.2. Blodprovstagning	6
3.4. Stresseffekter på i recipienten förekommande fisk	6
3.4.1. LeverSomatiskt Index (LSI)	7
3.5. Akut påverkan på embryon-yngel	7
3.6. Statistisk bearbetning.....	7
4. Resultat.....	8
4.1. Påverkan på bakterienivå.....	9
4.2. Akut påverkan på kräftdjur.....	9
4.3. Statistisk bearbetning av fiskmaterialet.....	9
4.4. Akut påverkan på i recipienten förekommande fisk.....	11
4.4.1. Viktförändring	11
4.4.2. Glukos.....	12
4.4.3. Blodvärde	12
4.5. Stresseffekter på i recipienten förekommande fisk	13
4.5.1. Viktförändring	13
4.5.2. Glukos.....	14
4.5.3. Blodvärde	15
4.5.4. LeverSomatiskt Index (LSI)	15
4.6. Akut påverkan på embryon-yngel	17
5. Diskussion	17
6. Referenser.....	19

1. Sammanfattning

Under hösten 2002 genomfördes en biologisk studie av processavloppsvattnet från Östrands massafabrik. För att kunna avgöra hur vattnet kunde tänkas påverka den lokala miljön användes havsöring från Indalsälven som kontrollorganism. För att komplettera detta med andra metoder och för att kunna studera fler trofinivåer så användes också bakterier, kräftdjuret *Daphnia magna* och rom/-yngel av zebrafisk.

Processavloppsvattnet visade inga akuta effekter på de organismerna med de metoder vi testade. Vare sig bakterier eller kräftdjur reagerade, trots att de kontrollerades i olika koncentrationer upp till rent processavloppsvatten. Havsöringarna påvisade skillnader i glukosförändring, men inte tillräckligt tydligt kopplat till koncentrationen.

Vid långtidsexponeringen fick havsöringen gå 10 dygn i koncentrationer upp till 50 % processavloppsvatten och yngel av zebrafisk överleva upp till 14 dygn i koncentration 96 % processavloppsvatten. För havsöring påvisades förhöjda Lever-Somatiskt-Index (LSI) vid koncentrationer >10 % och för zebrafiskyngel var överlevnaden kortare, tydligt men inte signifikant, vid koncentrationer från 6 %. Vid långtidsexponering, i klart högre koncentrationer av Östrands processavloppsvatten än vad som kan förekomma ens momentant i verkligheten, påverkas såväl havsöring 1+ som zebrafiskyngel.

2. Inledning

Pappers- och massaindustrier har länge ansetts påverka sina vattenrecipienter negativt. Omfattande satsningar på utveckling av vattenrening och större andel recirkulering av processvattnet har inneburit påtagligt minskade effekter på recipienten.

Åtskilliga undersökningar av industriernas påverkan på akvatiska system har genomförts (Barrestål & Nilsson 1981, Lagenfelt & Westerberg 1994, Lagenfelt I 1996, Lindeström et al. 2002, Westerberg 1988). I dessa rapporter har fisk varit effektparameter, men arter och metodikerna har skiftat. Barrestål & Nilsson (1981) har använt den nordamerikanska arten regnbåge under kontrollerade former i akvarium, Lagenfelt och Westerberg (1988, 1994, 1996) har koncentrerat sig på vilt levande tånglake medan Lindeström et al. (2002) har koncentrerat sig på vilt levande abborre.

Det finns för- och nackdelar med de olika metodikerna för att spåra effekter av en industris påverkan på akvatiska system. I många fall ligger industrierna så pass nära varandra att vattenområdet som en specifik industris avloppsvatten kan tänkas påverka inte säkert går att avgränsa. Det förekommer olika uppgifter om huruvida abborre är att beteckna som en tillräckligt stationär art, under vilka åldrar och årstider i så fall. Antagligen är tånglake tillräckligt orörlig för att kunna användas som effektparameter, men även här kan påverkansområdet från respektive industri bli svår att avgränsa. Ett annat dilemma med att använda vilt levande fiskar är att antalet individer i referens ofta blir så pass begränsat att mellanårsvariation försummas. Det har även visat sig att både tånglake och abborre har så pass låg fetthalt att de blir svåra att använda för mätningar av t.ex. klorerade organiska föreningar (Lindeström et al. 2002).

Att under kontrollerade förhållanden utföra studier, där såväl avloppsvattnets ursprung och representativitet används i säkra koncentrationer, har också sina svagheter. Det förekommer att för recipienten främmande arter som regnbåge och zebrafisk används, vilket antagligen skapar mer av ett akademisk än verkligt användbart resultat. När provkoncentrationerna blandas används sällan det i recipienten förekommande vattnet. Östersjön och Bottenhavet är svagt salt och därmed närmare fiskens egen salthalt, vilket torde inverka positivt på fiskarnas reaktion på de substanser som skall provas. Om inhemska arter används infinner sig problemet med vattentemperatur eftersom processavloppsvatten oftast är varmare än recipienten och oftast klart över optimal temperatur för svenska fiskarter.

Östrands massafabrik är beläget i Sundsvallsbukten och har större delen av Indalsälvens vatten (årlig medelavrinning 1930-90 på 445 m³/sek) som strömmar förbi fabriken för att nå Bottenhavet söder om Alnön. Östrand är en traditionell massafabrik med alla delars produktion fram till färdig pappersmassa. Östrand producerar även ånga och barmassa till Wifsta pappersbruk.

Av SCA:s massafabrik Östrand fick vi i uppdrag att genomföra biologisk karaktärisering av dess processavloppsvatten. Undersökningen genomfördes i en lokal på fabriksområdet (se fotografiet på framsidan av denna rapport) under november 2002. Syftet var flerdelat, att studera såväl akut toxicitet som mer långvariga effekter, samt effekter på olika trofi- och levnadsnivåer.

Syftet var även att studera effekter på i recipienten vanligtvis förekommande fiskarter och stammar. Härvid föll valet på 2-somrig havsöring av Bergeforsstam. Det är den havsöringstam som reproducerar sig närmast Östrand, samtidigt som den är odlad så pass länge att stammen numera kan betecknas som en "batch". Vid försök där svensk fisk som öring använts som jämförelse med bakterietester har bakterier visat sig mer känsliga för vissa ämnen (t.ex. Bertills et al. 1986). Försöken genomfördes därför med både fisk, kräftdjur och bakterier.

3. Metoder

För att utvärdera de undersökningsmässiga förhållandena och för att ta tillräckliga hänsyn till de organismer som användes under försöken bildades en djuretisk grupp. I denna grupp ingick fiskerikonsulent Erik Sjölander, docent Per Sjölander och veterinäre doktor Lars Roepstorff.

Flera undersökningar (Weber 2000, Žikić et al. 2001) visar att analys av blod ger snabba och säkra svar på subletal stress hos fisk. Žikić et al. (2001) visade att fiskar utsatta för subletal stress reagerade inom enstaka dagar genom att blodvärdet sjönk och blodsockret ökade.

För att öka kunskapen om huruvida subletal stress är framkallad av något som fisken uppfattar som gift används ofta levern eller dess enzymssystem på olika sätt. Levern är det viktigaste organet för avgiftning hos fiskar. Leverns storlek ökar på fisk med belastning på leverns avgiftningssystem, och denna koppling finns belagd för cellulosaindustri (Lagenfelt 1996).

Det processavloppsvatten som undersöktes var av den sammansättning som förekommer till recipienten. Detta innebär att vattnet som undersöktes togs ut direkt före utloppet till recipienten. Tillfällena för uttag av provvatten föregicks inte av någon information till Östrand.

Den enda provberedning som genomfördes innan de biologiska testorganismerna utsattes för processavloppsvattnet var temperering och luftning. Temperering genomfördes för att sänka vattentemperaturen till i närheten av den temperatur Indalsälven hade. Luftning genomfördes 12-24 timmar med vanliga akvarieluftare för att lufta bort kloröverskottet i råvattnet/älvvattnet före försökets början och för att hålla rimlig syrgasnivå i vattnet för att detta inte skulle förorsaka onödigt stress för försöksfiskarna. Syrgashalten och vattentemperaturen mättes 2-4 gånger per dygn med Christian Berners Oxi 330 och WTW TA 197-Oxi-elektrod. Kalibrering skedde varje dag och rengöring av elektrodmembran genomfördes före varje försöksomgång.

De olika huvudmomenten var:

1. Påverkan på bakterienivå
2. Akut påverkan på kräftdjur
3. Akut påverkan på i recipienten förekommande fisk
4. Stresseffekter på i recipienten förekommande fisk
5. Akut påverkan på embryon-yngel

3.1. Påverkan på bakterienivå

För att kunna få en enkel och vetenskapligt vedertagen modell för att mäta vattens toxicitet på bakterienivå användes här Microtox, vilket är ett allmänt bakterietest av toxicitet.

Vid tre tillfällen – 12/11, 22/11 (2 prov) och 28/11 - togs prover ut för bakterietester. Vid de två första tillfällena togs prover ut ur behållarna där fisk skulle sättas in, d.v.s. ur processavloppsvatten som luftats 12-24 timmar. I det tredje provet togs oluftat vatten direkt från utloppskanalen och det sista provet togs vatten där havsöring gått i 96 timmar och som under tiden luftats. Tillfällena valdes för att kunna kopplas till försöken med fiskar. Vid samtliga tillfällen frystes proverna ner omedelbart och skickades i fryst tillstånd till GS Ekotox i Upplands Väsby.

Microtoxtest genomfördes enligt ”Microtox M500 Manual, Version 1994-12-09, BasicTest”. Beräkningarna gjordes med ”Microtox data capture and reporting program version 6.30”. 2 % salthaltsskorrelation och bakteriebatch ACV 027-2 användes men ingen ljuskorrektion. För Microtox gjordes spädningsserier upp till 45 volym-% där såväl EC20, EC50 och Inhibition vid 45 volym-% analyserades.

För de bakteriologiska analyserna användes standardiserad bakteriebatch och ekotoxikolog Göran Svenstam på GS Ekotox utförde analyserna.

3.2. Akut påverkan på kräftdjur

För att studera den akuta effekten av Östrands processavloppsvatten togs ett prov på processavloppsvattnet ut 12/11-02. Provet frystes ner och skickades i fryst tillstånd till Toxicon AB i Landskrona, vilka genomförde testet enligt metod SS 02 81 80.

Metoden ”Akut toxicitet hos *Daphnia magna*” innebär att nykläckta djur inkuberas under 48 timmar i en gradient av testsubstansen. Testkoncentrationerna var 0,0; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 % v/v. För alla koncentrationerna gällde pH $7,8 \pm 0,2$ och $21,0 \pm 1,0$ °C samt dämpat ljus i ljusrymk på 16 timmar ljus och 8 timmar mörker.

3.3. Akut påverkan på i recipienten förekommande fisk

För att studera den akuta toxiciteten enligt metoden LC50-96h användes 3 behållare på 1 000 l vardera. I den första behållaren fylldes rent älvvatten (referens) och i den andra fylldes med 75 % processavloppsvatten och 25 % älvvatten samt den tredje fylldes med rent processavloppsvatten (100 %). Efter ett dygns luftning och temperering sattes 10 fiskar i respektive behållare och hölls där 96 timmar. I samband med försökets början och avslutning provtogs fiskarna. Detta försök startades 24/11-02.

3.3.1. Fiskhantering

Samtliga i försöken använda fiskar kom från Bergeforsens fiskodling. Fisken var havsöring av ålder tvåsomrig (1+). Fisken fick minst 24 timmar på sig att akklimatisera sig till behållarna och vattentemperaturen före registrering och försöksstart. Ingen matning av fiskarna skedde under försöken.

Vid samtliga provtagnings- och mätningmoment av fiskarna bedövades dessa med MS 222. Mätning genomfördes till närmaste mm, fiskvikt till närmaste gram och levervikt till närmaste tiondels gram. Samtliga fiskar mättes och vägdes såväl före försökets början som efter avslutat försök.

I samband med försökens start märktes varje fisk individuellt med små klippningar i olika fenor enligt ett specifikt mönster. Undersökning på individnivå möjliggjorde tydliga resultat på färre individer än där mätningarna sker gruppvis.



Figur 1 visar hur blodprovtagningen gick till med den sövda havsöringen liggande på en skumgummimatta

3.3.2. Blodprovstagning

Före start av försöket och vid avslutningen togs blodprov på varje fisk. Efter bedövning togs nödvändig liten mängd blod ut från kaudalvenen med spruta och kanyl 0,40 mm. För analys av glukos behövs 5 µl och för hemoglobin 10 µl blod.

För bestämning av blodsocker användes HemoCue Glucose 201 med dess speciella microcuvetter, och enheten har uppmätts i mmol/l. För bestämning av blodvärde användes HemoCue B-Hemoglobin med dess speciella microcuvetter, och enheten har uppmätts i g/l. Analyserna följde helt apparaternas instruktioner och mätarna kalibrerades före varje provtagningsomgång.



Figur 2 visar protokoll och mätare för Hb och glukos på en av provbehållarna.

3.4. Stresseffekter på i recipienten förekommande fisk

Samtliga förutsättningar avseende fiskar och dess behandling gäller lika som för kapitel 3.2. ”Akut påverkan på i recipienten förekommande fisk”. Under detta försök användes dessutom LSI.

För att studera om fisken stressades under längre tids exponering för processavloppsvattnet användes 10 dygns exponering. För att kunna avgöra eventuella skillnader användes 5 behållare på 1 000 l vardera. I varje behållare placerades 10 havsöringar. 4 olika koncentrationer processavloppsvatten användes: 2, 10, 25 och 50 % samt en tank med rent älvatten (referens). Detta försök startades 12/11-02.

3.4.1. LeverSomatiskt Index (LSI)

Levern är det dominerande organet för avgiftning även hos fiskar. Leverns storlek ökar med belastning på leverns avgiftningssystem. Levern används därför i olika sammanhang för att studera om fiskens avgiftningssystem har utnyttjats eller överutnyttjats. För att studera leveraktivitet har man ibland mätt ett avgiftningssenzym i levern – EROD. Lindeström et al. (2002) anger att de kommit fram till att EROD-aktiviteten också kan påverkas av om fisken får för lite föda. I föreliggande försöksserie matades inte fiskarna, varför EROD-analyser uteslöts i detta arbete. Westerberg (1988) använde LSI bland annat för att det måttet ”*visat sig samvariera väl med fysiologiskt mer specifika mått på miljöpåverkan såsom leverenzymaktivitet och elektrolytbalans*”.

Lever-Somatiskt-Index är kvoten, i procent, mellan leverns vikt och kroppsvikten hos fisken. Levervikten vägdes till närmaste 10-dels gram och helfiskvikten, inklusive inälvor, till närmaste gram. Analysen genomfördes när 10-dygnsförsöket avslutades.

3.5. Akut påverkan på embryon-yngel

Vid kroniska livscykeltest med fisk har man funnit att fisken just under reproduktionen (gametogenesen) och de tidiga utvecklingsstadierna (embryo- och yngelstadierna) är mest känslig för påverkan av bl.a. kemikalier. För att studera dessa stadier används en metod som enligt svensk standard benämns SS 02 81 93, och den fisk som används är zebrafisk, *Brachydanio rerio*, av känd och kontrollerad stam.

Metoden fungerar så att nybefruktade ägg av zebrafisk exponeras för en serie koncentrationer av provet och en kontroll. 20 befruktade ägg används per koncentration. Försöket fortsätter tills minst 90 % av äggen eller ynglen dött i samtliga provlösningar. Metoden utförs i ljusrytm av 12 timmar ljus och 12 timmar mörker per dygn. Temperaturen är $26 \pm 1^\circ\text{C}$ och inget foder tillförs ynglen. Av de skälen lever ynglen endast 2-3 veckor. De använda koncentrationerna var 0 (kontroll), 3, 6, 12, 24, 48 och 96 %.

Provet för detta test togs ut 2002-11-12 och är identiskt med det prov som kallas 12/11 i bakterieproverna. Provet frystes ner omedelbart och hölls fryst fram till analys. Testerna har utförts av Toxicon AB i Landskrona.

3.6. Statistisk bearbetning

Noll-hypotesen var att det inte förelåg några skillnader mellan fisk exponerade för rent vatten eller olika koncentrationer av processvatten. Detta testades statistiskt genom envägs variansanalys (Anova). Vid signifikanta skillnader mellan grupperna (där fler än två grupper ingår) har ibland post-hoc tester tillgripits för att studera vilka grupper som skiljer från varandra. Den statistiska programvaran SPSS (11.5.1) användes vid arbetet.

4. Resultat

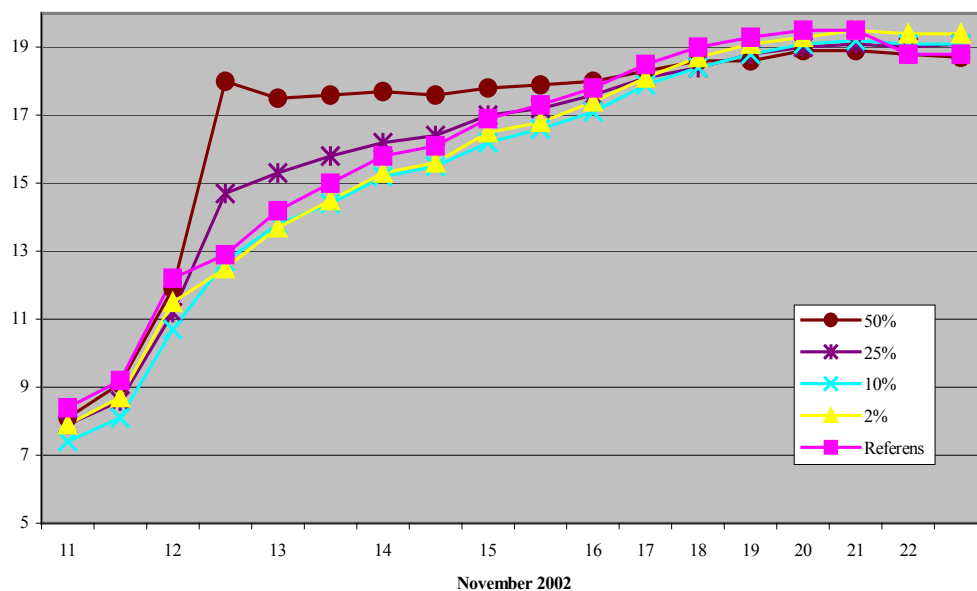
De vatten som användes i de olika testerna analyserades på Östrands laboratorium avseende de vanligaste parametrarna. Resultaten och de i de olika delproven använda benämningarna är:

Tabell 1 med provbeteckningar och vattenkemiska karaktäristika för de ingående proverna på Östrand hösten 2002.

		12/11	19/11	28/11
pH		7,1	7,6	8,0
Konduktivitet	mS/m	27,4	28,0	140,3
Susp 70µm	mg/l	1	<1	<1
Susp MGA	mg/l	1	<1	12
COD 70µm	mg/l	30	30	140
P (omskakat)	mg/l	0,13	0,29	0,42
N (omskakat)	mg/l	3	3	5

Syrgashalten under det akuta försöket låg på 5,1-5,9 mg/l med maximal skillnad vid samma tidpunkt på 0,6 mg/l. Under det långa försöket var syrgashalten 5,8-9,0 mg/l med maximal skillnad på 2,1 mg/l mellan någon av koncentrationerna. Under bägge försöksserierna låg syrgasmättnaden över 80 % och fiskarna visade inte några tecken på syrebrist.

Vattentemperaturerna påverkades till största delen av att rumstemperaturen var ganska hög så att det under det akuta försöket låg 13,0-19,0°C, med 5,9°C som störst temperaturskillnad vid försökets start. Högst var vattentemperaturen i högsta försökskoncentrationen. Under det långa försöket var vattentemperaturen 8,1-19,4°C med störst temperaturskillnad på 5,5°C mellan de olika koncentrationerna vid starten av försöket (Fig 3).



Figur 3 visar vattentemperaturen i behållarna med olika koncentrationer processavloppsvatten under det långa försöket på Östrand hösten 2002. Temperaturen i processavloppsvattnet var högre än älvvattnet, vilket visade sig vid försökets början i de högre koncentrationerna. Försöket startades med insättning av fiskar 12/11.

4.1. Påverkan på bakterienivå

När det gäller Microtox-test (Tab 2) visade samtliga prov ytterst svag effekt. Göran Svenstam angav att proven var mycket svagt toxiskt ”dricksvattnet i Stockholm har bara ungefär hälften så hög inhibition”. För att vara processavloppsvatten är inhibitionsnivåerna mycket låga. Trots att skillnaderna inte är signifikant skilda är det intressant att se att provet 28/11 har lägst inhibition. Detta är ett prov som blandat de bägge vattnen från 22/11, och därefter luftats och hållit havsöring under 4 dygn före provtagningen.

Tabell 2 Microtox-test på Östrand hösten 2002. Proven 12/11 och 22/11 L är luftade prover, 22/11 N är oluftat prov direkt från kanalen och 28/11 är prov där havsöring vistats 96 timmar och som luftats under tiden.

	Tid (min)	EC20 (vol%)	EC50 (vol%)	Hämning vid 45 vol% (%)
12/11	5	>45	>45	18
	15	37	>45	23
22/11 L	5	31	>45	28
	15	31	>45	28
22/11 N	5	28	>45	29
	15	25	>45	37
28/11	5	>45	>45	16
	15	>45	>45	14

4.2. Akut påverkan på kräftdjur

Resultaten av SS 02 81 80 på *Daphnia magna* på vatten 12/11-02 anses vara giltiga eftersom:

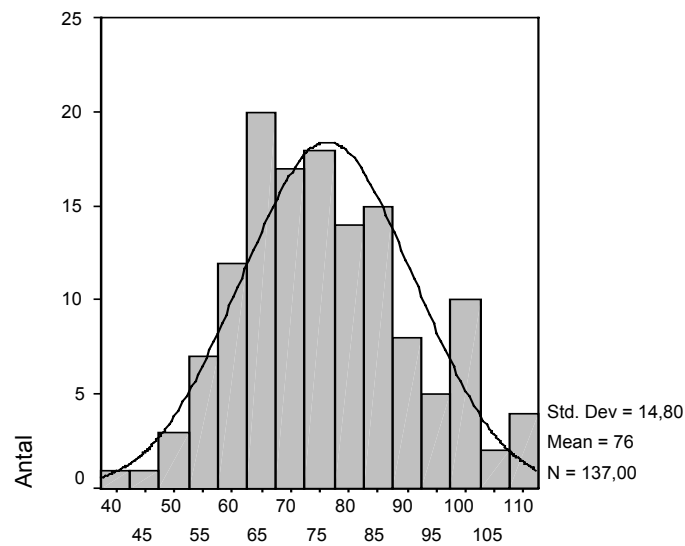
- Immobiliseringsgraden är <10 % i kontrollgruppen
- EC50-värdet (24h) ligger 0,9-2,0 mg K₂Cr₂O₇ per liter
- Halten löst syrgas >2 mg/l i testgruppen efter avslutat test

Inte i någon av de testade koncentrationerna upp till 100 % processavloppsvatten var immobiliseringsgraden >10%, vilket accepteras i kontrollerna enligt standarden. Eftersom vattnet inte orsakade någon egentlig immobilisering så gick det inte att beräkna någon EC50. Resultatet blir således att NOEC = 100 % v/v, och betecknades som ”ej akut toxiskt mot kräftdjuret *Daphnia magna*” (Olsson 2002b).

4.3. Statistisk bearbetning av fiskmaterialet

Eftersom undersökningarna av havsöring på det sätt de används i denna undersökning är nytt, så genomfördes en del statistiska bearbetningar av fiskmaterialet. Initialt testades huruvida data (längd, vikt, Hb, glukos, levervikt) avvek från normalfördelning (Fig 4). Endast vad avser vikt förelåg en avvikelser från normalfördelning. Viktvärden transformerades därför logaritmiskt (Log10) vid statistiska jämförelser.

SCA Östrand
Biologisk karaktärisering



Figur 4 visar fördelning av Hb-värden före försöksstart hos fisk som använts vid försöken.

Ett antal variabler beräknades som skillnaden (%) i tillståndet före försök mot tillståndet vid försökets avbrytande:

- $Hb\text{-förändring} = ((Hb\text{-före} - Hb\text{-efter})/Hb\text{-före}) * 100$.
Detta innebär att utvecklingens riktning (+ eller -) också beaktas.
- $Glukos\text{-förändring} = ((G\text{-före} - G\text{-efter})/G\text{-före}) * 100$.
Detta innebär att utvecklingens riktning (+ eller -) också beaktas.
- $Viktdifferens = ((Vikt\text{-före} - Vikt\text{-efter})/Vikt\text{-före}) * 100$.
Även dessa variabler kunde användas otransformerade vid parametriska tester.
- Vidare beräknades leversomatiskt index (LSI) som utgörs av leverns vikt i procent av den totala kroppsvikten.

En enkel bivariat korrelationsmatris visade att några av variablerna var korrelerade (Tabell 3). Därför har de statistiskt signifikanta utfall som framkom även testats med covariansanalys (Ancova) utförd som en GLM-anova för att kontrollera att inte detekterade skillnader var orsakade av skillnader i fiskarnas längd eller vikt mellan grupperna (längd eller vikt har använts som covariat).

Tabell 3 Bivariat korrelationsmatris med Pearson korrelationskoefficient (-1 till 1) och statistiskt signifikanta korrelationer markerade med *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$.

	L-b	V-b	LSI	Hb-b	G-b
Längd-början (L-b)		0,97**	-0,26*	0,22*	-0,04
Vikt-början (V-b)			0,68**	0,21*	-0,04
Leversom. Index (LSI)				0,04	-0,19
Hb-början (Hb-b)					0,002
Glukos-början (G-b)					

Av tabellen ovan visas att blodprovparametrarna Hb och glukos var oberoende av de övriga parametrarna vid försöksstart. Att längd och vikt är signifikant kopplade till varandra är naturligt, liksom LSI och vikt eftersom LSI är måttet på levervikt i förhållande till somatisk vikt.

4.4. Akut påverkan på i recipienten förekommande fisk

Under försöket överlevde alla individer i allt från rent älvvatten (referens) till 100 % processavloppsvatten. Någon LC50-96h i egentlig mening gick därför inte att beräkna.

Vid Anova-test av fiskmaterialet visade detta inga signifikanta skillnader ($p > 0.05$) avseende vikt och hemoglobin före, efter och/eller förändring mellan de olika testgrupperna. För glukos förelåg däremot en signifikant skillnad mellan grupperna. Att grupperna var lite olika storleksmässigt, men inte signifikant skilda, hade ingen koppling till någon av de mätta parametrarna.

4.4.1. Viktförändring

Trots att fiskindividerna till de tre grupperna togs ur samma grupp med var tredje individ till respektive grupp kom storlekarna att avvika (Tab 4). Fiskstorlek var dock betydelselös i relation till effektparametrarna (se kap 4.3.) Inga statistiskt signifikanta skillnader förelåg.

Tabell 4 Viktförändring av havsöringarna vid LC50-96h Östrand hösten 2002. Förändringarna är på individnivå. Referens är rent älvvatten, 75 % är 25 % älvvatten och 75 % processavloppsvatten och 100 % är bara processavloppsvatten.

		<u>Initial vikt (g)</u>	<u>Slutvikt (g)</u>	<u>Viktminskning (%)</u>
Referens	Medel	145,6	140,6	3,57
	Max	211	205	4,82
	Min	101	97	2,08
75%	Medel	160,3	154,1	3,97
	Max	291	283	6,25
	Min	78	74	2,40
100%	Medel	167,7	161,7	3,32
	Max	283	271	5,16
	Min	95	93	2,00

4.4.2. Glukos

Vid Anova-analys av glukoshalten före, efter och förändring, samt skillnad mellan grupperna fanns signifikanta skillnader.

Trots det slumpvisa urvalet av individer till de tre grupperna så skilde glukos redan före försöket mellan de tre grupperna. Före försöket hade ”100 %-gruppen” lägst glukos och vid avslutningen av försöket hade ”75 %-gruppen” lägst nivå. Även förändringen av glukos under försöket var signifikant skild mellan grupperna, med ”75 %-gruppen” som avvikare.

Tabell 5 Glukos i fiskblodet hos havsöringarna vid LC50-96h Östrand hösten 2002. Förändringarna är på individnivå. Referens är rent älvvatten, 75 % är 25 % älvvatten och 75 % processavloppsvatten och 100 % är rent processavloppsvatten

		Initial glukos (g/l)	Slut-glukos (g/l)	Förändring (%)
Referens	Medel	4,76	5,38	0,62
	Max	5,7	6,6	2,6
	Min	3,4	3,7	-1,1
75%	Medel	5,02	4,58	-0,44
	Max	6,6	5,5	1,5
	Min	3,5	3,2	-1,6
100%	Medel	4,17	4,82	0,65
	Max	5,0	5,6	1,8
	Min	3,2	4,1	-0,4

4.4.3. Blodvärde

Vid Anova-analys av hemoglobinhalten före, efter och förändring i absoluta tal och i relation till initiala värdena, samt skillnad mellan grupperna fanns ingen signifikant skillnad, oberoende av koncentrationen processavloppsvatten.

Tabell 6 Blodvärde i fiskblodet hos havsöringarna vid LC50-96h Östrand hösten 2002. Förändringarna är på individnivå. Referens är rent älvvatten, 75 % är 25 % älvvatten och 75 % processavloppsvatten och 100 % är rent processavloppsvatten.

		Initialt Hb (mmol/l)	Slut-Hb (mmol/l)	Förändring (mmol/l)
Referens	Medel	84,0	76,1	-7,9
	Max	101	101	46
	Min	55	60	-39
75%	Medel	80,6	81,7	1,1
	Max	100	94	94
	Min	56	57	57
100%	Medel	92,6	83,9	-8,7
	Max	108	109	8
	Min	71	59	-33

4.5. Stresseffekter på i recipienten förekommande fisk

Det har antagits att en koncentration på 2,5 % av vad som skall prövas är en extremt hög koncentration. Under år 2002 släppte Östrand ut 46 521 884 m³ avloppsvatten, varav knappt hälften (21 719 316 m³) var processavloppsvatten. Den övriga vattenmängden består av kylvatten. Detta betyder att Östrand släpper ut i genomsnitt 1,47 m³ avloppsvatten per sekund på årsbasis. Indalsälvens genomsnittsavrinning är på 445 m³/sek, vilket medför att avloppsvattnet från Östrand teoretiskt utgör 0,33 %, och för processavloppsvatten knappt hälften därav, till recipienten som i det här fallet är Alnösundet utanför Östrand.

4.5.1. Viktförändring

Trots att fiskindividerna till de fem grupperna togs ur samma grupp med var femte individ till respektive grupp kom storlekarna att avvika (Tab 7). Vare sig initialvikten som vikt-förändringen i absoluta tal eller procent var statistiskt skild mellan de fyra grupperna. Fisk-storlekar var dock betydelselösa i relation till effektparametrarna (se kap 4.3.).

Tabell 7 Viktförändring av havsöringarna vid långtidsexponering 10 dygn på Östrand hösten 2002. Förändringarna är på individnivå. Referens är rent älvvatten och 2, 10, 25 och 50 % är andelar processavloppsvatten

		Initial vikt (g)	Slutvikt (g)	Viktminskning (%)
Referens	Medel	183,5	170,9	6,92
	Max	350	331	9,52
	Min	120	113	5,43
2 %	Medel	164,3	152,3	7,29
	Max	262	242	8,67
	Min	95	88	5,43
10 %	Medel	134,0	123,5	7,67
	Max	215	196	9,09
	Min	102	95	4,80
25%	Medel	136,5	128,1	6,30
	Max	194	182	7,84
	Min	99	92	3,05
50 %	Medel	151,7	138,8	8,49
	Max	242	221	15,63
	Min	104	96	2,65

4.5.2. Glukos

Skillnaderna som uppkom var inte signifikant skilda. Initialt förelåg en signifikant skillnad, men denna upphörde under försöket. Någon bra förklaring till variationen kan vi inte ge eftersom fiskarna behandlades lika och slumpen avgjorde vilken grupp respektive fisk skulle tillhöra.

Vid Anova-analys av glukoshalten efter och förändring, samt skillnad mellan grupperna fanns ingen signifikant skillnad. Förändringen i glukoshalt skilde inte mellan grupperna oberoende om förändringen beräknades relativt den initiala halten eller i absoluta tal. Det förelåg således ingen skillnad i effektparametrar oberoende av koncentrationen processavloppsvatten.

Tabell 8 Glukos i fiskblodet hos havsöringarna vid långtidsexponering 10 dygn på Östrand hösten 2002. Förändringarna är på individnivå. Referens är rent älvvatten och 2, 10, 25 och 50 % är andelar processavloppsvatten

		Initial glukos (g/l)	Slut-glukos (g/l)	Förändring (%)
Referens	Medel	4,74	4,01	-0,73
	Max	5,7	5,6	1,0
	Min	3,9	2,8	-2,1
2 %	Medel	4,24	4,74	0,5
	Max	5,0	7,4	2,4
	Min	3,2	2,5	-1,7
10 %	Medel	4,29	4,47	0,18
	Max	5,1	7,4	3,6
	Min	3,1	3,7	-1,4
25%	Medel	5,48	5,35	-0,13
	Max	6,3	6,8	3,0
	Min	3,8	4,2	-2,1
50 %	Medel	5,19	5,09	-0,1
	Max	6,9	6,7	2,0
	Min	4,6	2,8	-3,3

4.5.3. Blodvärde

Vid Anova-analys av hemoglobinhalten före, efter och förändring i absoluta tal och i relation till initiala värdena, samt skillnad mellan grupperna fanns ingen signifikant skillnad. Grupperna var alltså lika oberoende av koncentrationen processavloppsvatten.

Tabell 9 Blodvärde i fiskblodet hos havsöringarna vid långtidsexponering 10 dygn på Östrand hösten 2002. Förändringarna är på individnivå. Referens är rent älvvatten och 2, 10, 25 och 50 % är andelar processavloppsvatten

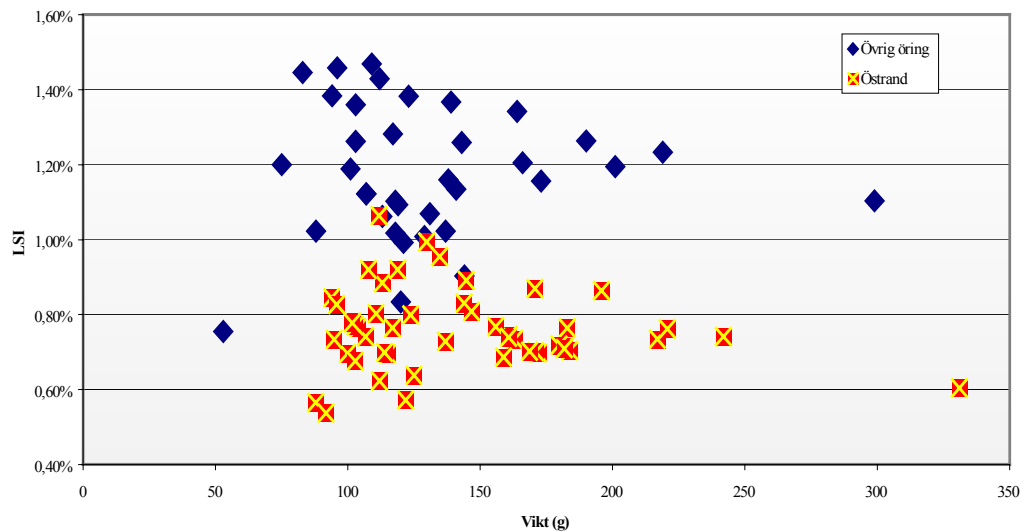
		Initialt Hb (mmol/l)	Slut-Hb (mmol/l)	Förändring (mmol/l)
Referens	Medel	79,9	80,2	0,3
	Max	98	121	68
	Min	53	52	-38
2 %	Medel	77,7	88,2	10,5
	Max	106	120	41
	Min	54	64	-19
10 %	Medel	65,0	88,2	23,2
	Max	102	114	53
	Min	41	58	-21
25%	Medel	71,5	81,6	10,1
	Max	81	100	27
	Min	64	70	-9
50 %	Medel	67,6	89,2	21,6
	Max	95	124	51
	Min	50	73	-9

4.5.4. LeverSomatiskt Index (LSI)

Levern är inte bara ett organ för avgiftning utan också en näringsdepå för glykogen, som periodvis kan stå för en ansevärd del av leverns vikt. I detta försök kommer samtliga fiskar från samma stam och tråg, och har därför matats lika och varit utsatta för lika temperaturvariationer före och under försöket. Vi utesluter därför eventuella variationer i glykogeninnehåll.

Det förekommer uppgifter om att större fiskar skulle ha högre LSI än mindre individer (Lindeström et al. 2002), men något sådant samband gick inte att spåra i detta material eller andra referensmaterial för havsöring (Fig 5).

SCA Östrand
Biologisk karaktärisering



Figur 5 visar relationerna LSI och somatisk vikt för respektive individ hos havsöringarna vid långtidsexponering 10 dygn på Östrand hösten 2002. "Övrig öring" gäller också havsöring av Bergforsstam, men där försöket genomfördes under svält men med lägre vattentemperatur, varför det är rimligt att anta att mindre energi förbrukades från leverarna och därmed resulterade i ett generellt högre LSI.

Som man kan se i Figur 5 så förelåg ingen samband mellan fiskvikt och LSI för havsöring 1+. När det gäller LSI efter 10 dygns exponering till processavloppsvattnet så påvisades signifikanta positiva korrelationer till provkoncentrationerna (Tab 10). Ingen annan parameter än provkoncentration kan korreleras till LSI.

Tabell 10 LSI hos havsöringarna vid långtidsexponering 10 dygn på Östrand hösten 2002. Förändringarna är på individnivå. Referens är rent älvvatten och 2, 10, 25 och 50 % är andelar processavloppsvatten

		<u>LSI (%)</u>
Referens	Medel	0,72
	Max	0,88
	Min	0,60
2 %	Medel	0,69
	Max	0,83
	Min	0,57
10 %	Medel	0,79
	Max	0,92
	Min	0,68
25 %	Medel	0,79
	Max	1,00
	Min	0,54
50 %	Medel	0,84
	Max	1,07
	Min	0,71

4.6. Akut påverkan på embryon-yngel

Samtliga kriterier uppfylldes för att resultaten skall godkännas. Detta gäller andel levande embryoner, syrgasmättnad, pH, temperatur m.m.

För samtliga koncentrationer var den mediana kläckningstiden 3,8-4,3 dagar, vilket anses som jämförbart eftersom det inte förelåg något samband mellan kläckningstid och koncentration processavloppsvatten.

Den mediana överlevnadstiden 11,4-13,0 dagar, med längst medial överlevnadstid för de lägsta koncentrationerna processavloppsvatten. Tolkningarna är att det föreligger ett samband mellan kortare överlevnad och stigande koncentration fr.o.m. 6 % processavloppsvatten. Sambandet är dock så pass svagt att några statistisk signifikanta skillnader inte uppstod (Olsson 2002a).

5. Diskussion

Vid blodprovstagning på öring i stressförsök i samband med surstötter har man funnit att glukos <6 g/l innebär ostressad fisk, 8-10 g/l innebär tydligt stressad fisk och >12 g/l medför att stressnivåerna är letala (Paul Andersson muntl uppg). Att mäta glukoshalter i blod på fiskar skulle därför kunna vara en användbar metod för att detektera subletala stressnivåer.

I föreliggande studien om Östrands processavloppsvatten har det gått att detektera signifikanta skillnader i blodets glukoshalt mellan havsöring i rent älvvatten jämfört med olika koncentrationer av processavloppsvatten. Den grupp som avvek mot de två andra var den med 75 % processavloppsvatten jämfört med referens och 100 % processavloppsvatten. Den enda skillnaden mellan grupperna var att ”75 %-gruppen” drabbades av lite dålig syresättning (luftsten lossnade) under försökets första morgon. Det var en kort incident, vilket sannolikt inte påverkade resultatet.

Žikić et al. (2001) fann att fiskar utsatta för subletal stress reagerade genom att blodsockret ökade. De fann även att blodvärdet sjönk vid subletal stress, men denna effekt har inte gått att spåra i fiskförsöken i Östrands processavloppsvatten.

Vid långtidsexponeringen (10 dygn) visade havsöringarna en signifikant koppling mellan koncentration processavloppsvatten från 10 % inblandning och LSI. Levern växte således ju högre koncentrationer processavloppsvatten de levde i. Eftersom detta samband gäller för koncentrationer >10 % och den beräknade andelen vatten från Östrand torde vara betydligt under 1 % så är den sannolika effekten på kringliggande miljö obetydlig.

Att använda havsöring av samma årsklass och stam, som odlats under många generationer, medför att ålder, ursprung, föda och andra bakomliggande förutsättningar är lika. Att dessutom individernas längd och vikt är oberoende av blodvärde och blodsocker ökar metodens värde. Att LSI inte är kopplat till initiala värden på Hb och glukos torde skapa ytterligare tillförlitlighet i metoden. Då LSI kan förändras p.g.a. att leverns näringsdepåer utnyttjas olika mycket (Fig 5) är mätning av vattentemperatur och glukos avgörande, liksom att referensindividerna får identisk behandling som försöksindividerna.

Testerna på bakterier visade att processavloppsvattnet hade endast obetydlig påverkan oberoende hur vattnet behandlades. Göran Svenstam gjorde till och med jämförelsen med Stockholms stads dricksvatten (!)

Vid testerna med kräftdjur påvisades ingen akuttoxisk effekt över huvud taget.

Vid försöket med rom och yngel av zebrafiskar fanns inga skillnader i kläckningstid eller dödlighet. Däremot förelåg en negativt korrelerad (ej signifikant) skillnad i överlevnadstid vid koncentrationer >6 %. Av detta kan man sluta sig till att Östrands processavloppsvatten inte påverkade embryonalutveckling men sannolikt åtminstone till viss del det första stadiet i en fisks liv.

Sammantaget kan Östrands processavloppsvatten beskrivas så att det inte är akut biologiskt farligt, men vid längre tidsexponeringar är det inte helt ofarligt för fisk i höga koncentrationer.

6. Referenser

- Barrestål C & L Nilsson. 1981. Akut toxicitet hos processavloppsvatten- En undersökning av processavloppsvatten från Ortvikens pappersbruk med hjälp av regnbågsforell. Examensarbete 1981:065 E, Högskolan i Luleå.
- Bertills U, I Björklund, H Borg, E Hörnström. 1986. Biologiska effekter av xantater. SNV Rapport 3112.
- Lagenfelt I & H Westerberg. 1994. Fiskeriutredning Södra Cell AB Mörrums bruk. Rapport Fiskeriverkets Utredningskontor i Jönköping, Filialen i Göteborg.
- Lagenfelt I. 1996. Fiskeriutredning Stora PapyrusNymölla. Fiskeriverket Kustlaboratoriet Rapport 96-03-31.
- Lindström L, C Grotell, J Härdig. 2002. Industripåverkan på Vätterns fiskar. Rapport nr 66 från Vätternvårdsförbundet.
- Olsson T. 2002a. Bestämning av toxicitet för embryoner och yngel av sötvattenfisk med semistatisk metodik på utgående avloppsvatten från SCA Östrand. Toxicon rapport nr 158/02.
- Olsson T. 2002b. Ekotoxikologisk test på utgående avloppsvatten från SCA Östrand. Toxicon rapport nr 174/02.
- SS 02 81 93. 1988. Vattenundersökningar – Bestämning av toxicitet för embryoner och yngel av sötvattenfisk – Semistatisk metod.
- Weber, R. E. 2000. Hemoglobin Function in Vertebrates, Molecular Adaptation in Extreme and Temperate Environments (Di Prisco, G.,Giardina, B., and Weber, R. E., editors) pp. 23 - 37, Springer-Verlag Italia, Milano
- Westerberg H. 1988. Fiskeriutredning Nymölla AB, Mörrums bruk. Arbetsrapport 1986 och 87. Rapport Fiskeristyrelsen Utredningskontoret i Göteborg.
- Žikić R V, A Š Štajn, S Z Pavlović, B I OgnjanovićZ S Saičić. 2001. Activities of Superoxide Dismutase and Catalase in Erythrocytes and Plasma Transaminases of Goldfish (*Carassius auratus gibelio* Bloch.) Exposed to Cadmium. *Physiol. Res.* 50: 105-111, 2001