

Bilaga 4. Effektbaserad metodik

Skälet till att övervaka miljögifter i miljön, och särskilt i samband med operativ övervakning, är i hög grad relaterat till att man vill förutsäga risker och effekter. De halter man har uppmätt behöver tolkas, och hittills har man i Sverige främst fokuserat på att bedöma trender av olika ämnen. En ökande trend innebär alltid en risk, eftersom halterna med tiden når sådana nivåer att negativa effekter kan inträffa. Även för substanser som inte uppvisar uppåtgående trender behöver man dock göra en bedömning av om de förekommer i sådana halter att effekter inte kan uteslutas. En sådan bedömning är ofta mycket komplicerad, inte minst på grund av att det inte bara är halten av en enskild substans som styr vilka effekter man kan förvänta sig. Olika miljöfaktorer kan till exempel styra ämnenas tillgänglighet och därmed upptag av levande organismer. Även närvaro av andra substanser kan bidra och man pratar ofta om så kallade cocktaileffekter i dessa sammanhang. Att förutsäga effekter av blandningar utifrån ingående halter av enskilda ämnen är komplicerat redan vid närvaro av ett fåtal substanser, eftersom de kan samverka på olika sätt. För de komplexa blandningar som förekommer i miljön saknas den möjligheten, eftersom det inte är möjligt att mäta precis alla ämnen, och sammansättningen kan dessutom variera med tiden (omvandlingsprodukter bildas). Det är inte heller okomplicerat eller billigt att ta fram bedömningsgrunder för samtliga relevanta miljögifter, om de ska baseras på den information som krävs.

Det finns även metoder som direkt mäter effekter av miljögifter i miljön och syftet med denna bilaga är att beskriva hur sådan metodik kan vara användbar i olika sammanhang. Man behöver dock vara medveten om att alla typer av effekter inte går att mäta. Risk för framtida effekter till följd av en upplagring i näringsväven kräver i dagsläget att man även analyserar många ämnen kemiskt. Dessutom kan det i vissa sammanhang vara svårt att identifiera orsaker till en observerad effekt. Denna kunskap är ofta nödvändig för att identifiera lämpliga åtgärder, i synnerhet om effekter observerats där källspårning är komplicerad att göra på annat vis än med kännedom om vilka substanser som är problematiska.

De metoder och angreppssätt som beskrivs i denna bilaga är inte obligatoriska enligt vattendirektivet. I de europeiska vägledningsdokument som tagits fram hittills omnämns dock effektbaserade metoder på några ställen, och beskrivs tillsammans med till exempel passiva provtagare som komplementär metodik. De användningsområden som man har identifierat är till exempel för att underlätta design av ett övervakningsprogram och som uppföljande analyser för att bekräfta behov av åtgärder (såsom sanering av sediment) i de fall kemisk statusklassning baserat på halter av miljögifter i sediment kan anses osäker. Under 2011-12 pågår också arbete med att ta fram en rapport som beskriver användbarheten hos effektbaserad övervakningsmetodik i detta sammanhang¹.

De användningsområden som har kunnat identifieras inom ramen för det här projektet är dock:

- Bekräfta att det verkligen förekommer effekter då förhöjda halter påträffats. Kan vara angeläget i de fall åtgärdsinsatser är kostsamma och ytterligare stöd behövs.
- Som prioriteringsunderlag för att välja ut områden att undersöka vidare.

¹ Arbetet bedrivs inom en arbetsgrupp som kallas CMEP (Chemical Monitoring and Emerging Pollutants), med representanter från de olika medlemsländerna, industrin och akademiska världen.

- För undersökningar i komplext förorenade områden där det inte är tydligt vilka variabler som är mest relevanta att analysera
- För att identifiera ämnen som är angelägna att övervaka framöver (effektstyrd analys)
- Som screeningverktyg av olika typer av källor/utsläpp
- I samband med avloppsvattenkaraktäriseringar för att få en uppfattning om det är motiverat att gå vidare med kroniska tester
- Som ett tidigt varningssystem för att observera effekter i annars relativt opåverkade miljöer.
- Vissa kan dessutom användas istället för kemiska analyser för vissa tillämpningar (men i normalfallet ska man främst se dem som kompletterande analyser som kan ge viktig information)

Olika typer av metoder – för olika angreppssätt och syften

Effektbaserad metodik kan grovt delas in i följande fyra typer, med korta definitioner av den betydelse som avses i denna rapport:

- In vitro tester, mäter effekter på odlade celler
- In vivo tester, mäter effekter på organismer som exponeras på laboratoriet
- Biomarkörer, mäter effekter på organismer som exponeras i fält – på individnivå eller därunder (på celler, enzymer mm)
- Analyser på högre organisationsnivåer, det vill säga effekter på biologiska populationer och samhällen

De två förstnämnda bygger på att man hämtar in prover från miljön och exponerar antingen odlade celler eller hela organismer för dessa prover. För både in vitro och in vivo analyser (liksom kemiska analyser) gäller att dessa analyser bara kan svara på de substanser som förekommer i provet man har tagit. Det är därför viktigt att man tar ett ”representativt prov” precis som vid provtagning för kemisk analys. Substanser som förekommit men omvandlats kan man på detta sätt inte detektera.

In vivo tester

In vivo tester har generellt haft begränsad användning inom övervakningen. Flera av dessa tester har utvecklats för att undersöka effekter av enskilda substanser vid test på laboratoriet, där man kan exponera dem för allt högre koncentrationer. De halter som oftast förekommer i miljön ger sällan utslag i den här typen av tester, om det inte rör sig om relativt förorenade prover (till exempel förorenade sediment) eller exponering pågår under en längre tid (vilket innebär högre kostnader). Däremot används de ofta för att undersöka effekter av avloppsvatten.

Lämpliga personer att kontakta vid ytterligare frågor om in vivo tester är Britta Eklund (Stockholms Universitet), Göran Dave (Göteborgs universitet), Anders Sjölin (Toxicon), Kerstin Magnusson (N Research) och Karl Lilja (IVL).

In vitro tester

Man kan på många sätt och vis jämföra in vitro analyser med kemiska analyser men med skillnaden att man istället för att analysera substanser mäter till exempel inbindning till en viss receptor i en cell, det vill säga respons hos en enskild verkningsmekanism. In vitro tester finns utvecklade för väldigt många typer av verkningsmekanismer men några av de vanligaste och tillgängliga på kommersiell basis är östrogenaktivitet, Ah receptoraktivitet (dioxineffekter) och androgen aktivitet. För vissa sådana tester får man svaret uttryckt i ekvivalenter för en viss substans (till exempel TCDD ekvivalenter).

En fördel med in vitro tester vid jämförelse med in vivo tester är att den här typen av analyser kan ge information om risk för effekter på längre sikt men redan efter kort tids exponering. Det finns även etiska aspekter på detta, förutom de rent ekonomiska. Dessutom krävs oftast bara små mängder prov. En nackdel är framför allt att man har ett så pass förenklat system att man kan missa effekter som bara kan studeras på levande organismer.

Lämpliga personer att kontakta vid ytterligare frågor om in vitro tester är Magnus Engwall (Örebro universitet), Peter Behnisch (Biodetection Systems, BDS), Karl Lilja (IVL), Timo Hamers (IVM Holland).

Biomarkörer

Biomarkörer kan delas in i två undergrupper beroende på om de främst svarar på en viss typ av substanser (specifika biomarkörer) eller ger utslag på många olika substanser (generella biomarkörer). Det finns användningsområden för båda typerna. Specifika biomarkörer är t ex värdefulla för att följa upp om en förhöjd halt verkligen ger effekter (för att bekräfta riskbedömningen). Omvänt gäller också att vid induktion av en specifik biomarkör är det relativt enkelt att dra slutsatser om vilka substanser som gett upphov till responsen. Generella biomarkörer ger ett mer samlat svar och är särskilt användbara för att få en övergripande bild av påverkan och gradienter i ett område. Detta kan vara väldigt angeläget till exempel om det är oklart vilken typ av substanser som det är mest relevant att analysera, till exempel i en situation med många olika typer av utsläppskällor.

Analyser på högre organisationsnivåer

Analyser på högre organisationsnivåer beskrivs inte utförligare i denna rapport, eftersom det än så länge inte går att identifiera några sådana som är redo att användas rutinmässigt i dagsläget, utan det behövs validerings- eller utvecklingsinsatser först. Några lovande metoder är dock SPEAR², PICT³ och metagenomics⁴. Lämpliga kontaktpersoner för dessa metoder är Willem Goedkoop (SLU), Hans Blanck (Göteborgs Universitet) respektive Joakim Larsson (Göteborgs Universitet).

² ett index som bygger på att man utifrån arters känslighet för olika typer av substanser delar in dem i "Species at risk" och "Species not at risk"; angreppssättet har en del likheter med andra index som används för fastställande av ekologisk status såsom BQI men reagerar således främst på t ex bekämpningsmedel snarare än t ex eutrofieringsrelaterade variabler. Metoden skulle behöva valideras för svenska förhållanden

³ PICT= Pollution Induced Community Tolerance, bygger på att man mäter toleransen hos ett samhälle (t ex perifyton) för en viss substans. Dvs man undersöker snarare en ändrad funktion än struktur. Metoden skulle behöva utvecklas för att lättare kunna användas på rutinbasis och även då man inte vet vilken typ av substanser samhället har utsatts för

⁴ Man undersöker effekter på genetisk nivå och utvecklingen går fort framåt när det gäller DNA sekvensering. Många tillämpningar finns, t ex för att göra en komplett analys av artsammansättning och funktion hos bakteriesamhällen vilket ger en indikation om påverkan som kan leda till effekter på hela ekosystemet.

Vilka effektbaserade metoder är redo att användas och i vilket sammanhang?

Effektbaserade metoder används redan rutinmässigt inom miljöövervakningen i Sverige, men det gäller framför allt biomarkörer och enbart för marin miljö inom de nationella programmen. För sådana biomarkörer finns undersökningstyper framtagna. Många av dem är dessutom rekommenderade metoder enligt ICES (International Council for the Exploration of the Sea). Dessutom har det förekommit enstaka undersökningar som använder andra typer av biomarkörer och ytterligare några är under utveckling.

Biomarkörer som är ”rekommenderade” enligt ICES (relaterat till marin miljö) listas nedan. Bedömningen av huruvida en metod är rekommenderad eller ej har inte beaktat om det finns bedömningsgrunder tillgängliga utan bygger snarare på om metodbeskrivning finns tillgänglig och om det påvisats att det går att detektera effekter av miljöfarliga ämnen i fält. Vissa men inte alla har dessutom interkalibrerats. De som markerats med fet stil ingår i det svenska övervakningsprogrammet.

- **DNA addukter**
- Acetylkolinesteras
- **Metallotionein**
- **EROD**
- AlaD
- PAH metaboliter i galla
- Lysosomal stabilitet
- Fisksjukdomar
- **Lever tumörer**
- **Histopatologi**
- **Vitellogenin**
- Intersex
- **Tånglakereproduktion**
- Scope for growth
- **Imposex**
- MDR/MXR
- **Embryonal utveckling hos amfipoder**

Biomarkörer: fisk

Det nationella programmet omfattar ett stort antal biomarkörer (fler än de som listas ovan). De flesta av fiskbiomarkörerna kan användas både för marina och limniska miljöer, men det finns färre data att jämföra med i limniska miljöer. För fiskbiomarkörer rekommenderas att undersökningarna görs i form av batterier, och att man gör en sammanvägd bedömning. Sådana bedömningsgrunder är under utveckling för närvarande och baseras på poängsystem och viktningar där risk för påverkan på populationsnivå får stor tyngd. Den här typen av undersökningar och bedömningar är tänkta att användas inom statusklassning relaterat till marina direktivet. För ytterligare frågor kring fiskbiomarkörer kan följande experter kontaktas: Lars Förllin (Göteborgs Universitet), och Anders Sjölin (Toxicon).

Biomarkörer: musslor och snäckor

Imposex övervakas regelbundet i Sverige på både Väst och Ostkust. I fallet imposex är det en relativt specifik biomarkör för exponering för tennorganiska föreningar, varför det är möjligt att dra slutsatser om orsak och verkan. De skador som eventuellt påvisas kan dock bero på en påverkan som skett tidigare eftersom tennorganiska föreningar ger irreversibla skador. Därför är det viktigt att även ha kännedom om åldern hos organismerna som analyseras, innan man kan använda resultaten för t ex trendanalys.

En i Sverige mindre känd men mycket lovande biomarkör är lysosomstabilitet på musslor (vanligast, men även fisk kan undersökas), vilken kan analyseras på beställning. För både imposex och lysosomstabilitet finns så kallade EAC-värden framtagna inom OSPAR att jämföra med. Imposex är också tänkt att användas som indikator vid statusklassningar relaterade till marina direktivet medan lysosomstabilitet föreslås som utvecklingsbar indikator, eftersom övervakningsprogram ännu inte etablerats. För ytterligare frågor kring biomarkörer på musslor och snäckor kan Åke Granmo eller Marina Magnusson (Marine Monitoring) kontaktas.

Biomarkörer: amfipoder

För vitmärkla har det visat sig att missbildade embryon kan kopplas till föroreningsgrad och påverkan på populationen. Här är bedömningsgrunder på väg att tas fram (EAC värden) och metoden föreslås som indikator inom marina direktivet. För ytterligare frågor kring denna metod kan Brita Sundelin (Stockholms Universitet) kontaktas.

Biomarkörer: limniska system

Vissa av de biomarkörer som redan nämnts är användbara även i limnisk miljö. Detta gäller i synnerhet fiskbiomarkörerna. I limniska miljöer finns också möjlighet att analysera mundeformationer hos fjädermygglarver (chironomider) och skaldeformationer hos kiselalger parallellt med andra undersökningar. I båda fallen kan man göra analysen även på sparad material och för ett mindre ekonomiskt tillägg om de utförs i samband med bedömning av övergödningsrelaterade variabler. För båda dessa gäller dock att man skulle behöva ta fram bedömningsgrunder som är lämpliga att använda inom statusklassningar, kopplade till risk för påverkan på populationsnivå. För kiselalgsdeformationer pågår ett projekt med att ta fram sådana bedömningsgrunder. För ytterligare frågor kring den här typen av analyser kontaktas Maria Kahlert (kiselalger) och Willem Goedkoop (chironomider) vid SLU.

In vitro analyser

In vitro analyser har använts mycket litet än så länge i Sverige men potentialen är stor, särskilt som komplement till traditionella undersökningar, för att fånga upp en större mängd substanser än vad som är möjligt vid enbart riktade kemiska analyser. Dessutom är vissa sådana in vitro analyser billigare än motsvarande kemisk analys men ger i stort sett samma svar (DR CALUX för direkt analys av dioxinrespons istället för kemisk analys av dioxiner, dibenzofuraner och dioxinlika ämnen). Vissa föreningar är inte heller möjliga att analysera kemiskt i tillräckligt låga halter (kvantifieringsgränserna är för höga) medan in vitro analysen har betydligt högre känslighet (gäller till exempel ER CALUX för analys av östrogena substanser såsom etinylöstradiol).

Möjligt studera samma verkningsmekanism på olika sätt

Samma verkningsmekanism som undersöks "in vitro" kan ofta även undersökas som en biomarkör. Därför kan man tänka sig att en lämplig uppföljning av förhöjd respons observerad i ett in vitro test är att undersöka motsvarande biomarkör för att bekräfta att substanserna är biotillgängliga och ger upphov till en respons även i fält och på levande organismer. Om DR eller PAH CALUX givit stort utslag i ett prov kan det t ex vara lämpligt att följa upp resultaten genom att mäta bland annat EROD (biomarkör) på vildfångad fisk. Om ER CALUX eller YES gett

utslag på vattenprov är det lämpligt att undersöka t ex vitellogenin på fisken i området. Omvänt kan man även tänka sig att det kan vara angeläget att ta reda på orsaker till induktion hos biomarkörer i fält med in vitro studier på prover tagna i området. Detta för att till exempel spåra tänkbara källor eller identifiera vilka ämnen som givit upphov till effekterna.

Hur tar man reda på vilka miljögifter det är som ger upphov till de effekter man har observerat?

Effects directed analysis (EDA)

I många fall är det inte helt nödvändigt att veta vilken eller vilka substanser som ger upphov till en viss effekt för att kunna spåra källor och därmed sätta in åtgärder. I en mycket komplext påverkad miljö eller i en miljö där det inte går att identifiera några specifika tänkbara källor utifrån vad man idag känner till, kan det dock vara nödvändigt att åtminstone kunna identifiera typ av substanser det handlar om. Sådan information kan man få genom att göra en så kallad effektstyrd analys (EDA, effects directed analysis). Detta innebär att man till exempel kan fraktionera upp de prover som ger upphov till respons. Sedan testar man varje fraktion för att identifiera vilken sådan fraktion som ger störst svar. En kemisk analys av denna kan påvisa vilka substanser som troligen ligger bakom effekten. Kostnaderna för dessa typer av analyser ökar dock snabbt i takt med antalet fraktioner som behöver testas. Det är därför viktigt att man använder sig av så billiga tester som möjligt, fokuserar på de prover som bedöms som mest angelägna att gå vidare med och kanske kan nöja sig med att kunna bedöma ungefär vilken karaktär de substanser har, som gett upphov till effekterna. Den här typen av tillvägagångssätt kräver samtidig tillgång till både kemisk och toxisk analyskompetens och utrustning och det kan därför vara lite problematiskt att identifiera utförare i Sverige. NIVA i Norge (Kevin Thomas), Leipzig universitet (Werner Brack⁵) och IVM i Holland (Timo Hamers) har dock mångårig erfarenhet av att utföra den här typen av studier.

Toxicity Identification Evaluation (TIE)

Ett närbesläktat angreppssätt är TIE, Toxicity Identification Evaluation och har sitt ursprung i metodik som utvecklades för att undersöka avloppsvatten i USA på 80-talet. Eftersom man då började eftersträva utsläppsvillkor inte bara baserade på halter/mängder av kemiska substanser utan även baserade på maximalt tillåten toxisk effekt, uppstod behovet av att även kunna utreda orsaken till effekterna och därmed stödja åtgärdsarbetet. TIE metodiken omnämns kortfattat i NV handbok 2010:3 (Kemisk och biologisk karakterisering av punktutsläpp till vatten. En handbok med vägledning om bestämning av egenskaperna hos utsläpp av avloppsvatten, Naturvårdsverket februari 2011). Här finns också hänvisningar till vägledningsdokument som stöd, både för att göra bedömningar i samband med avloppsvattenkaraktäriseringar och för bedömning av sediment (anpassat för tester på porvatten och hela sedimentprover). En fördel med TIE är att fokus ligger lite mindre på omfattande fraktioneringar och mer på lite grövre karaktäriseringar. För att undersöka om ett vattenprov är toxiskt på grund av metaller (i jonform) kan man t ex tillsätta EDTA och testa om provet. EDTA binder till flera tvåvärda metaller och om toxiciteten i det prov som behandlats med EDTA uppvisar lägre toxicitet kan man dra slutsatsen att en del av toxiciteten troligen förklaras av metalltoxicitet. Genom luftning (bubbling) kan man på motsvarande sätt få en uppfattning om det handlar om flyktiga ämnen, eller kanske tensider. Genom passage genom olika typer av kolonner som tar bort positivt laddade eller negativt laddade molekyler, liksom kolonner som binder hydrofoba ämnen kan man få en första uppfattning om orsakerna och kanske helt utesluta vissa källor. Även om TIE metodiken också tillämpats mycket sparsamt hittills i Sverige, innebär den inte några särskilda krav på utrustning

⁵ Helmholtz Centre for Environmental Research UFZ, Department for Effect-Directed Analysis

och kan därför troligen utföras av de flesta laboratorier som genomför toxicitetstester. Göteborgs Universitet (kontaktperson Göran Dave) har också använt sig av TIE för ett antal miljörelaterade undersökningar.

Praktiska aspekter och samordningsvinster

Eftersom biomarkörer oftast undersöks på fisk eller musslor och snäckor, kan de särskilt övervägas i samband med kemisk analys av dessa. Detta sparar både kostnader och bidrar till att underlätta utvärderingen. En stor del av kostnaderna förknippade med att analysera biomarkörer är nämligen förknippade med själva provtagningen. Vissa biomarkörer är mycket enkla och innebär i stort sett ingen extra kostnad (såsom LSI och GSI, Leversomatiskt Index respektive Gonadosomatiskt index; vilket i princip bara innebär att man behöver analysera vikt på lever respektive gonader utöver sådana parametrar som normalt noteras). Andra är mer kostsamma (gäller för till exempel DNA addukter). Man behöver dock noga planera den här typen av så kallade integrerade undersökningar, så att det blir tillräckliga mängder material för både kemisk analys och biomarkörer. Mest kritiskt är oftast tillgången till lever, eftersom många biomarkörer analyseras på denna. Vissa biomarkörer (vitellogenin) behöver dessutom analyseras omgående efter provtagningen. Till skillnad från kemisk analys är det sällan aktuellt att provbanka.

Lysosomstabilitet skulle kunna vara en lämplig undersökning att lägga till om man ändå överväger att analysera kemiska substanser i musslor. Det krävs inte så mycket material men det är, åtminstone för en av de metoder som används (NRR), viktigt att man gör analysen en kort tid efter provtagningen.

Många in vitro analyser kan ofta göras på i stort sett vilken typ av prov som helst, även materialet i en passiv provtagare och det krävs sällan stora mängder extra prov. Det tillkommer således sällan några särskilda svårigheter utöver de som är normala vid kemiska analyser. En möjlig aspekt som kan vara problematisk är att det är relativt få rutinmässiga utförare i Sverige idag så proverna behöver skickas utomlands.

In vivo analyser görs i övervakningssammanhang kanske främst på sediment och vatten/porvatten. Mängden prov som behövs varierar stort beroende på vilken testorganism som används, hur exponeringen sker och hur länge. Man bör vara medveten om att det oftast behövs stora mängder sediment för att framställa tillräckliga volymer porvatten.

Utvärdering – kan man använda sig av effektbaserade metoder för statusklassningar?

Hittills har en stor brist varit frånvaro av nationellt fastställda bedömningsgrunder för den här typen av metoder. För att kunna utvärdera data krävs därför expertkunskaper. Bedömningarna baseras idag ofta på att avgöra om effekter observerade på en lokal avviker signifikant från en annan (referens), eller om effekterna har ökat eller minskat med tiden.

Biomarkörer

Inom ramen för havsmiljöförordningen ska den här typen av metoder beaktas i form av effektbaserade indikatorer för deskriptor 8 och det finns nu därmed ett starkt behov av att

bedömningsgrunder utvecklas och fastställs på nationell nivå. För flera av de metoder som används i marina miljöer finns också EAC (Environmental Assessment Criteria) värden redan utvecklade eller föreslagna inom OSPAR för att bedöma risk för effekter. Flera av dem är troligen tillämpbara även för att utvärdera data som baseras på studier i svensk miljö.

Enligt den vägledning som nyligen publicerats (CIS 27) och som beskriver hur man ska ta fram kemiska bedömningsgrunder, ska man beakta data där en viss typ av toxiska effekter har studerats vid exponering på laboratoriet. Hit hör till exempel dödlighet men även tillväxt (vikt, längd, biomassa), antal (effekter på celler respektive populationer), immobilisering, reproduktion, könskvot, utveckling (till exempel ägg-embryo-olika levnadsstadier), missbildningar, celledning, kolupptag och fler typer av effekter som man bedömer är ekologiskt och medicinskt relevanta. Den förteckning över vilka egenskaper som utmärker sådana substanser som kan komma ifråga för att betraktas som föroreningar (inklusive "särskilt förorenande ämnen", SFÅ) innefattar också sådana som kan ge mutagenicitet och hormonella störningar (se bilaga VIII till vattendirektivet).

Med detta som utgångspunkt kan man anta att om man observerar den här typen av effekter i naturen och med stor sannolikhet kan dra slutsatsen att det rör sig om en respons till följd av exponering för miljögifter, också borde kunna beakta detta vid en ekologisk statusklassning, i samband med en expertbedömning. Detta är dock ett "vetenskapligt" ställningstagande och finns ännu inte uttalat i form av vägledning eller liknande.

Om effektbaserade metoder ska användas inom statusklassning är det lämpligast att utgå ifrån en sammanvägd bedömning av resultat från flera parallella analyser istället för att utvärdera varje enskild biomarkör för sig. Detta gäller i synnerhet för de markörer som kanske främst indikerar att vävnader har tagit upp substansen och att avgiftningssystemet inducerats (till exempel EROD). En sådan påverkan indikerar säkerligen en viss reduktion av "fitness" men behöver inte indikera en överhängande risk för påverkan på populationer. Andra biomarkörer kan mera direkt kopplas till en trolig risk för påverkan på populationsnivå (till exempel imposex hos nätsnäckor, missbildade tånglake- och vitmärleynigel) och bör således väga tungt vid sammanvägningen.

Imposex analyser ger direkt mått på risker relaterade till TBT, vilka annars kan vara svårt att uppskatta i praktiken genom kemiska analyser på vatten, sediment och/eller biota. Kvantifieringsgränsen i vatten är till exempel inte tillräckligt låg, sedimenthalter kan vara svåra att bedöma helt tillförlitligt och halten i nätsnäckorna påverkas av deras metabolism. De kan därför användas för att bekräfta kemisk status med avseende på TBT. Tyvärr finns dock ingen etablerad biomarkörmätod utvecklad för att undersöka effekter av TBT i limniska miljöer.

Biomarkörer utgör effekter som observeras på individer som lever i fält och speglar således den sammanlagda effekten och ger ett tidsintegrerat mått på påverkan. In vitro tester kan istället på sätt och vis jämföras med kemiska analyser fast med biologiska verktyg (odlade celler).

In vitro tester

För några enstaka in vitro metoder (DR CALUX) finns redan en utbredd acceptans för att man får lov att använda metoden på screeningnivå för att avgöra om livsmedelskriterier överskrids när det gäller dioxiner, dibenzofuraner och plana PCBer. En stor fördel med DR CALUX är att metoden är flera gånger billigare än att mäta dessa substansgrupper kemiskt. Dessutom erhålls resultaten uttryckta som TCDD ekvivalenter oavsett om man har gjort en kemisk eller biologisk analys. Metoden bygger på att man mäter induktion av den så kallade dioxinreceptorn. Även ER CALUX och YES med flera in vitro tester som svarar på påverkan från östrogena substanser har

föreslagits som lämpliga metoder för att spåra förekomst av vissa läkemedelsrester och andra substanser som har den här typen av effekter. Detta behöver dock utredas ytterligare något eftersom åtminstone YES analysen svarar i lika hög grad på EE-2 som E-2 i ett sådant test men EE-2 ger betydligt högre induktion än E-2 om man mäter t ex vitellogenin induktion på fisk som exponerats. Om det således är en typ av substanser som dominerar i det ena provet och en annan typ i det andra kan det vara svårt att jämföra resultaten med varandra liksom att jämföra resultat mot en kemiskt baserad bedömningsgrund. De kemiska analyserna av dessa ämnen är dock i dagsläget inte tillräckligt känsliga för att kunna användas för att bedöma riskerna. Det är därför tänkbart att ett bättre val i dagsläget ändå är att använda sig av in vitro metodiken för screeningändamål men då utgå ifrån ett ”värsta scenario”.

För övriga in vitro tester är de i dagsläget främst användbara för screeningändamål, t ex för att fånga in ett stort antal substanser och få en sammanlagd bedömning av alla de substanser som ger påverkan på en viss verkningsmekanism. De kan även vara användbara för grova jämförelser mellan belastning på olika platser. PAH CALUX resultat ska dock till exempel inte jämföras med motsvarande bedömningsgrund för PAHer, trots att resultaten uttrycks i form av benzo(a)pyren ekvivalenter. Men en stor respons indikerar att provet innehåller många dioxinliknande PAHer och hit hör benzo(a)pyren men även många andra strukturer som normalt inte mäts kemiskt.

Det finns också många olika typer av tester som mäter genotoxiska effekter, men i dagsläget har man inom projektet MODELKEY bedömt att de inte riktigt uppfyller kraven för att kunna anses vara känsliga och ”high through put” på grund av tidsåtgång och högre kostnader. Det är också problematiskt att ange en gräns för vad som är en acceptabel nivå för den här typen av effekter (såsom mutationer), men man kan få en uppfattning om relativa risker vid jämförelse mellan olika prover.