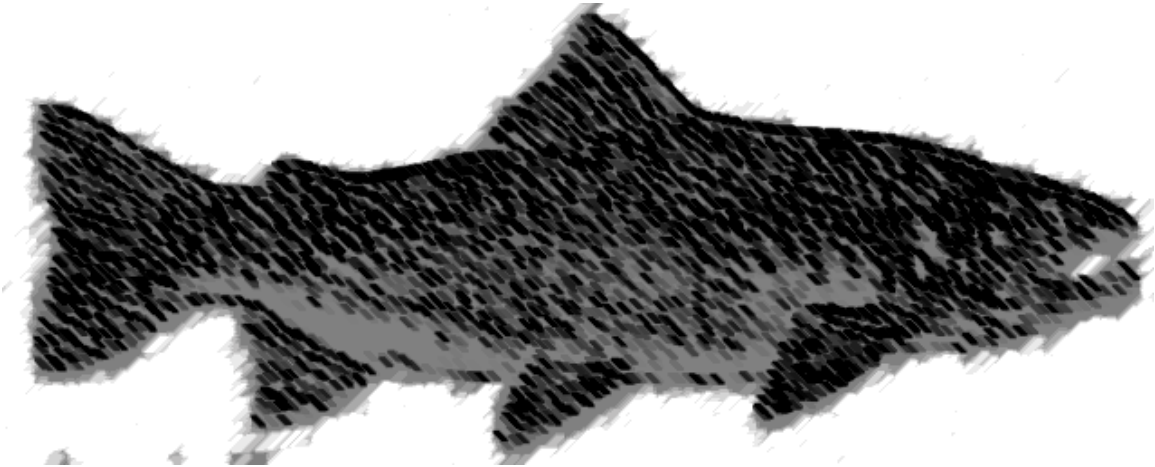


# **Undersökningar av kondensat bildat i kölvatten från båtar med utombordsmotorer**

**-kemiska analyser och biologiska effekter-**



**Tjärnlund, U., Åkerman, G., Grunder, K., Zebühr, Y., Sundberg, H.,  
Broman, D. och Balk\*, L.**

**Laboratoriet för Akvatisk Ekotoxikologi, Institutet för Tillämpad  
Miljöforskning (ITM), Stockholms universitet,  
S-106 91 Stockholm**

\*Till vilken korrespondens adresseras

## Innehållsförteckning

	Sida
1. Sammanfattning	3
2. Bakgrund	4
3. Material och Metoder	6
3.1. Kemikalier	6
3.2. Instrument	6
3.3. Undersökta motorer, drivmedel och oljor	6
3.4. Produktion av avgaskondensat	7
3.5. Extraktion av avgaskondensat	8
3.6. Kemisk analys av avgaskondensat	8
3.7. Exponering av fiskars tidiga utvecklingsstadier	9
3.8. Analys av mortalitet och deformationer	10
3.9. Provtagning och analys av fisklarver för subletala effekter	11
3.10. Statistik	11
4. Resultat	12
5. Diskussion	22
6. Erkännanden	27
7. Referenser	28

## 1. Sammanfattning

Motorbåtstrafiken orsakar utsläpp av oförbränt drivmedel och andra kolväten till svenska vattendrag uppgående till en mängd av cirka 15.000 ton/år. Vid förbränning och utsläpp av bensen och olja frigörs polycykliska aromatiska föreningar. Tidigare studier har visat på hög biotillgänglighet och allvarliga effekter på försöksfiskar efter exponering av avgaskondensat i kölvattnet från enstaka modeller av utombordsmotorer.

Föreliggande undersökning har studerat utsläpp från sju olika motorer, två 4-taktsmotorer och fem 2-taktsmotorer. Motorerna kördes i en bassäng med 800 liter vatten på olika varvtal till dess att de förbränt 2 l bensen. Ett 10 liters prov togs på bassängvattnet, som därefter extraherades med hexan för att erhålla ett avgaskondensat från varje motor. Hexanextraktet analyserades med avseende på polycykliska aromatiska föreningar (PAHer) och alkaner. Nybefruktade ägg från regnbåge (*Oncorhynchus mykiss*) exponerades i fyra olika doser enligt nanoinjektionsmetoden i samband med befruktningen. Detta sätt att exponera tidigt i utvecklingen har visat sig motsvara den exponering som äggen utsätts för via moderdjuret. Mortalitet och skador vid kläckning registrerades, och cirka 2,5 månader efter exponeringen uppmättes CYP 1A induktion (EROD-aktivitet) i levern hos fisklarverna.

Analysresultaten har visat att ett mycket stort antal olika PAHer går att återfinna i kölvattnet. I total halt av de 23 olika PAHerna kunde mellan 6 och 47 ng/liter analyseras i kölvattnet efter de sju undersökta utombordsmotorerna.

Vidare, mellan 13-22 olika alkaner förutom en stor andel ej separerade och strukturbestämda alkaner analyserades till en halt mellan 59 och 1800 ng/liter kölvatten.

De tre största 2-taktsmotorerna framkallade 90-100% mortalitet i de två högsta doserna och framkallade även olika utvecklingskador hos larverna i de två lägsta doserna. Samtliga motorer orsakade en signifikant höjning av EROD-aktiviteten i levern hos larverna, även för den lägsta dosen.

Slutsatsen av denna undersökning är att PAHer återfinns i höga koncentrationer i kölvattnet efter utombordsmotorer och att dessa ämnen kan, högst sannolikt, befaras orsaka skador på fisk i våra ekosystem.

## 2. Bakgrund

Vid sammanställning av nöjesbåtars trafik i USA har beräknats att de är ansvariga för utsläpp av oförbränt drivmedel och andra kolväten till vattenmiljön uppgående till en mängd av mer än 1.500.000 ton/år (Mele 1993). Motsvarande siffra för Svenska vatten är cirka 15.000 ton/år (Alexandersson 1991). Som jämförelse kan nämnas att under ett år orsakar motorbåtstrafiken i Sverige kolväteutsläpp till vår vattenmiljö som är 30 gånger större än utsläppen från Tsesisolyckan och i USA 40 gånger större än utsläppen från tankhaveriet med Exxon Valdez. Tsesis och Exxon Valdes olyckorna är de största enskilda tankhaverierna i Sverige respektive USA. Den avgörande skillnaden, förutom den större mängden, är att utsläppen från motorbåtstrafiken sker via diffus spridning och är därigenom ej direkt observerbar av gemene man. Analogt är ej heller de biologiska effekterna direkt observerbara, utan kan befaras leda till en långsam förändring av vår akvatiska livsmiljö, som först kan konstateras efter att en längre tid har förflutit. Det faktum att dessa utsläpp också ökar är ytterligare oroande, 1970 beräknades utsläppen till 490.000 ton/år i USA och 23 år senare var motsvarande siffra 1.590.000 ton/år (Mele 1993; Jackivicz *et al.* 1973). Enligt vår kännedom finns inga direkt motsvarande beräkningar publicerade för Svenska vatten, dock finns det anledning att anta att vi har en motsvarande utveckling, med cirka 25-50 procents ökning var sjunde år.

Vid förbränning och utsläpp av bensin och olja frigörs polycykliska aromatiska föreningar (PAHer). PAHer tillhör inte de mest stabila föreningar som mänsklig verksamhet ger upphov till. Man kan dock konstatera att halveringstiden för många PAHer kan vara förhållandevis mycket lång. Som exempel kan nämnas benzo(a)pyrene, den mest undersökta PAH-formen då det gäller uppenbar risk för biologiska effekter, som har en halveringstid på 57-529 dagar i naturliga vatten (Howard *et al.* 1991).

Vid tidigare studier när en enstaka modell av en utombordsmotor (2-takt) undersöktes på ett analogt sätt som i föreliggande undersökning kunde konstateras ett stort antal allvarliga biologiska effekter på försöksfiskarna efter exponering av avgaser kondenserade i kölvattnet (Balk *et al.* 1994; Tjärnlund *et al.* 1995; Tjärnlund *et al.* 1996). Störningar av ett antal centrala biologiska funktioner såsom kolhydratmetabolismen, immunsystemet och reproduktionen kunde påvisas. Även ett antal subcellulära störningar av flera olika enzymatiska aktiviteter var påfallande. En av de mest allvarliga effekterna var att genotoxiska skador observerades, sannolikt som ett resultat av polycykliska aromatiska kolväten i avgaskondensatet. Dessa ämnen kunde visas att ha bildat så kallade DNA addukter, dvs kovalent bundna strukturer till det genetiska materialet i levern och även i ett antal extrahepatiska vävnader såsom mjälte, tarm, blod och njure. I dessa undersökningar exponerades fiskarna för avgaskondensat både direkt via det omgivande vattnet, men också via födan. Således kunde konstateras att en hög biotillgänglighet förelåg för ämnen i avgaskondensatet och att det finns starka skäl att befara att motsvarande exponering sker i olika fältsituationer.

I en annan studie på killifish (*Oryzias latipes*) användes en utombordsmotor, Evinrude model 3836 (3hk, 2-takt) och bensin med 2 procent oljeinblandning. Den högsta koncentration, som användes i studien, var 3,87 ml förbränt bränsle per liter kölvatten.

Man studerade kläckning av ägg, larvtillväxt samt registrerade olika deformationer (Koehler and Hardy 1999). Resultaten visade, framför allt med avseende på deformationer i tidiga utvecklingsstadier, stora likheter med de störningar som vi har observerat tidigare (Balk *et al.* 1994; Tjärnlund *et al.* 1995; Tjärnlund *et al.* 1996).

Som generell bakgrund till denna undersökning skall det påpekas att vi har fokuserat dessa studier angående påverkan av olika kolväteutsläpp från utombordsmotorer på fisk. Det bör understyrkas att denna aspekt inte är heltäckande när det gäller potentiell negativ miljöpåverkan från utombordsmotorer på den akvatiska miljön. Under 1980 talet uppmärksammades fysiska effekter av propellerrörelser som möjliga störningar från båtmotortrafik (Liddle and Scorgie 1980). På senare tid har detta område uppmärksammats igen genom studier av påverkan på vissa biotoper (Stolpe 1995). Fytoplankton har uppvisat en möjlig påverkan av kondenserade avgaser i kölvattnet från motorbåtar. Analyserade effekter indikerade en större känslighet hos vissa arter. I tre av fem testade arter av fytoplankton hämmades fotosyntesen när de exponerades för utsläppen från en båtmotor (Hilmer and Bate 1983; Bate and Crafford 1985). I fältundersökningar har påträffats ett antal ämnen härörande från utomborsmotorers oljor i plankton (Bieger *et al.* 1996). Nyligen publicerade undersökningar har redovisat akustiska mätningar av de undervattensljud som produceras, speciellt av utombordsmotorer med högt varvtal, av kaviationen hos propellern (Au and Green 2000). Denna studie var fokuserad på eventuell påverkan på däggdjur, valar. När det gäller påverkan på andra djurgrupper såsom fisk, är vår kunskapsnivå i stort sett obefintlig.

De sju olika motorerna som finns representerade i denna undersökning är tänkta att motsvara, i grova drag, användandet av olika motorer i Sverige. Eftersom urvalet av motorer innehåller två moderna 4-taktare och relativt nya motorer kan de kanske anses att motsvara de kommande årens användande av utombordsmotorer, med nuvarande utveckling, i Sverige.

### **3. Material och Metoder**

#### **3.1. Kemikalier**

Hexan och cyklohexan dubbeldestillerade, köptes från Fluka Chemie AG, Schweiz. Deuteriummärkta PAHer D<sub>10</sub>-pyren och D<sub>12</sub>-perylene köptes från Cambridge Isotope Laboratories Inc., USA. Triolein, NADPH, resorufin, etoxyresorufin och glutationdisulfid inköptes från Sigma Aldrich, Tyskland. Övriga kemikalier som användes var av högsta renhet och inköptes från Merck, Tyskland eller Sigma-Aldrich, Tyskland.

#### **3.2 Instrument**

Mikroskopi av fiskägg, embryon och larver samt dissektion av leverar från larver utfördes med hjälp av WILD MZ8 (Leica) stereolupp med 6-50 ggr förstoring. Fotografisk dokumentation av embryo- och larvskador genomfördes med Leica DC 100 digitalkamera och Leica Lida standard program. Enzymatiska analyser genomfördes på en Hitachi U-3200 spektrofotometer och en Jasco ST 777 spektrofluorimeter. Aluminiumsilkatrör inköptes från Sutter Instrument CO, USA. Från Narishige Scientific Instrument Laboratory, Japan, användes mikroelektroddragare (PE-2), glaspipettslipare (EG-4), endimensionell mikromanipulator (WR-87), och grov manipulator (MN-100N). För kontroll av injektionsvolym användes en pico-injector (PLI-100), också tidigare inköpt, från Medical Systems Corporation NY, USA.

#### **3.3 Undersökta motorer, drivmedel och oljor**

För att försöka erhålla en bred, generell kunskap om olika utombordsmotorers utsläpp har vi undersökt sju olika motorer, representerande både gamla och fabriksnya med olika tekniska lösningar såsom 2- och 4-takt. För en översikt och historia av de använda motorerna i dessa undersökningar, samt bränsle och olika oljor vill vi hänvisa till tabell 1. De sju olika motorerna är tänkta att motsvara, i grova drag, användandet av olika motorer i Sverige. Eftersom andelen 2-taktare som används idag utgör cirka 90 procent så kan man i tabell 1 konstatera att denna motorgrupp (både nya och gamla) inte är tillräcklig representerad bland de sju. Uppsättningen av motorer som finns representerade i denna undersökning kan således snarast anses att eventuell motsvara de kommande årens användande av utombordsmotorer i Sverige.

**Tabell 1. Undersökta motorer och deras tekniska prestanda samt drivmedel**

Märke	Motortyp	RPM	Bränsle	Olja	Oljetillsats	Ålder
Johnson 4hk	2-takt, 2 cylindrar	5000/4000/ 1000	95 oktan	Quicksilver premium plus TC-W3	2% manuell inblandning	cirka 20 år
Yamaha 4hk	4-takt, 1 cylinder	4500/3500/ 1400	95 oktan	Statoil motorolja SAE 10- 30 (ej syntet)		ny
Mariner* 4hk	2-takt, 1 cylinder	5000/4000/ 1500	95 oktan	Quicksilver premium plus TC-W3	2% manuell inblandning	ny
Johnson 50hk	2-takt, 2 cylindrar	5500/4500/ 1300	95 oktan	Evinrude Biodegradable 100% synthetic	1% automatisk inblandning + 1% i bränsle	ny
Honda 50hk	4-takt, 3 cylindrar	4800/3700/ 1100	95 oktan	Statoil motorolja SAE 10- 30 (ej syntet)		ny
Yamaha** 60hk	2-takt, 1 cylinder	6000/4700/ 1500	95 oktan	Levererades med olja	Automatisk inblandning (1%)	cirka 10 år
Evinrude 90hk	2-takt, 4 cylindrar	5500/4500/ 700	95 oktan	Evinrude Ficht olja	Automatisk inblandning under inkörning (1-2%)	ny

\*Går att köra på 1% originalolja

\*\*Gick med 500 RPM övervarv vid full gas

### 3.4. Produktion av avgaskondensat

Produktion av vattenprover innehållande avgaskondensat genomfördes hos Svensk Maskinprovning, SMP, i Umeå.

För framtagande av avgaskondensat placerades motorn på kanten till en bassäng innehållande 800 liter nyligen upptappat kallt (cirka 5-6°C) kommunalt dricksvatten från Umeå. De små motorerna kördes med vanlig propeller, medan de större kördes med en mottryckspropeller. En sådan propeller tillåter att motorn kan varvas upp även i en liten bassäng, och ge en belastningskurva motsvarande normal användning. Varje motor kördes under en arbetscykel; fullgas, marschfart (cirka 80 % av max) samt trolling (cirka 20 % av max). Totalt förbrändes 2 liter bränsle per motor. Direkt efter förbränningen, togs ett 10 liters vattenprov i bassängen till höger om motorn. Att utföra provtagningen direkt försäkrar oss om att ett representativt prov har tagits i det väl omrörda bassängvattnet. Vattenprovet, i en polyeten dunk med åtskruvat lock (Al-folie under locket), täcktes med aluminium folie och frystes ner till -18°C. Kontrollanalyser (kemiska och biologiska) av Umeås kommunala dricksvatten, visade att dricksvattnet var

rent. Bassängen rengjordes mellan varje testkörning noggrant mha tensider och upprepade sköljningar med vatten. Även detta vatten analyserades och det visade att det var något kontaminerat, men att det var försumbart i jämförelse med vatten från bassängen efter testkörning av en motor.

### **3.5. Extraktion av avgaskondensat**

De frysta vattendunkarna med avgaskondensat transporterades till ITM i Stockholm. Där tinades proverna efter hand och extraherades med hexan. Tidigare studier har visat att en 48 timmars extraktion med hexan är tillräcklig för att på ett effektivt sätt extrahera de biologiskt aktiva substanserna i ett avgaskondensat från utombordsmotorer (Balk *et al.* 1994). Bildningen av en kolloid partikellösning av avgaskondensatet har föreslagits som bakgrund till det lämpliga extraktionsförfarandet (Balk *et al.* 1994; Tjärnlund *et al.* 1996). En volym på 400 ml hexan sattes till 8 liter avgaskondensatvatten och med hjälp av kraftig omrörning under 48 timmar extraherades vattnet. Vi försäkrade oss noggrant om att kondensat som var associerat till väggarna på provtagningsdunken extraherades över till hexanfasen, allt för att minimera extraktionsförluster. Hela denna procedur utfördes i mörker för att undvika, såväl möjlig ljusdegradering och/eller ljusaktivering av kondensatet orsakad av UV-ljus. Hexanextraktet överlagrades med N<sub>2</sub>-gas tills vidare analytiskt arbete med extraktet vidtog.

### **3.6. Kemisk analys av avgaskondensat**

En liten delmängd av extraktet togs ut till kemisk analys av PAHer och alkaner. Surrogatstandard, bestående av två deuteriummärkta PAHer D<sub>10</sub>-pyren och D<sub>12</sub>-perylene, sattes till delprovet. Surrogatstandard tillsätts för att isotoputspädningstekniken skall kunna användas vid kvantitering av PAHer vid den masspektrometriska analysen.

Delprovet innehållande standard applicerades på en öppen kiselgelkolonn (100 x 10 mm; ca 5 g kiselgel, som bränts 5 tim i 450° C och deaktiverats med 10% vatten). Kolonnen eluerades med sammanlagt 50 ml hexan varav de 10 första ml samlades upp i en separat spetskolv för vidare analys av alkaner. De resterande 40 ml samlades upp för analys av PAHer. Alkanfraktionen indunstades försiktigt och överfördes kvantitativt till analysvialen utan vidare upprening. Kolestan tillsattes som volumetrisk standard innan analysen. PAH-fraktionen upprengades vidare med en vätskekromatografisk metod där polycykliska aromatiska substanser t ex PAH separeras från monocykliska- och dicykliska aromatiska substanser (Colmsjö *et al.* 1987). Fraktionen innehållande PAH upprengades ytterligare genom extraktion med dimetylformamid (DMF) (Näf *et al.* 1992). Cyclohexanfasen indunstades och applicerades på en liten kiselgelpelare 30 x 0.5 mm för att avlägsna eventuella DMF rester. Kolonnen eluerades med 10 ml hexan. Provet indunstades försiktigt och överfördes sedan kvantitativt till analysvialen. En känd mängd volumetrisk standard, ”sprutspik” tillsattes i vialen innan analys.

PAHer och alkaner analyserades med en gaskromatograf kopplad till en lågupplösande massdetektor (GC-LRMS). Gaskromatografen var en GC 8000, Fisons instrument kopplad till en mass selektiv detektor, Fisons MD 800. GC parametrar kolonn: PTE-5 MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm fas, Supelco), förkolonn: deaktiverad silica (2 m x 0,25 mm, Supelco). Provet injicerades "On Column" och bärgasen utgjordes av helium. GC-ugnen temperaturprogrammerades från 100° C till 310° C med 7° C/min. MS parametrar: Joniseringsteknik: EI, 70eV. Fragmentet m/z 85 användes för identifikation av alkanerna.

### 3.7. Exponering av fiskars tidiga utvecklingsstadier

Ägg och spermier från lekmogen regnbåge (*Oncorhynchus mykiss*) erhöles från Kälarna fiskeriförsöksstation, Kälarna, och transporterades snabbt med flyg och bil till laboratoriet där äggen befruktades. Äggens diameter och vikt mättes efter vattensvällning. Vi har utvecklat en metod att exponera fiskägg för olika substanser och extrakt direkt efter befruktningen utan påverkan på djuren, den så kallade nanoinjektionsmetoden. Metoden finns beskriven i Åkerman and Balk, 1995 och i mera detalj i "Techniques in Aquatic Toxicology", (Ostrander, G.K. Ed.) CRC Press, Lewis Publishers, New York (Walker et al. 1996). För att få äggen att ligga fixerade vid injektionen placeras de i utstansade hål i en gel (1% agaros) gjuten i petriskålar. Injektionerna sker med glasrör av aluminiumsilikat som dragits till spetsar i en mikroelektroddragare och därefter slipats till en elliptiskt formad spets för att underlätta penetrering av äggskal och gulesäcksmembran. Glaspipetten hålls av en hydraulisk manipulator och injektionerna sker med en pico-injektor, som reglerar kvävgastruck under reglerbar tid så att injektionsvolymen blir lika i varje ägg. Efter injiceringarna placeras petriskålen med ägg, vanligen 36 st, i akvarier med genomflöde av aktivt kolfiltrerat och luftat dricksvatten. Detta sätt att exponera, genom att injicera i gulan tidigt i utvecklingen, har visat sig att motsvara den exponering som äggen utsätts för om moderdjuret är exponerat (via moderdjur; maternal exponering) (Walker et al. 1996). Upprepade och tidigare studier har visat att exponeringstekniken, själv, inte har någon som helst påverkan på djuren (Walker et al. 1996; Åkerman and Balk 1998; Åkerman et al. 1998; Ishaq et al. 1999). Detta kunde också observeras i våra kontrollgrupper i föreliggande studie genom att vi som ytterligare kontrollgrupp dessutom studerade icke injicerade grupper (visas ej).

Innan hexanet med avgaskondensatet användes till injektion i ägg, kördes det genom en kiselgelpelare, därefter dunstades hexanet bort med hjälp av kvävgas och återstoden löstes i 0,100 ml triolein. Triolein är en triglycerid som naturligt finns i stor andel av gulan oljeinnehåll hos fiskägg från regnbåge. En del av extraktet/trioleinlösningen späddes med triolein så att fyra koncentrationer erhöles motsvarande 1, 2, 4 och 8 liter testvatten från varje motor. Injektionsvolymen valdes att utgöra 0.1% av äggvikten, så de olika koncentrationerna av lösningarna blev 1/1000 i äggen. Äggvikten var 72-74 mg/ägg. När detta räknas om till ml förbränd bensin/kg ägg blev doserna 25, 50, 100 och 200 ml förbränd bensin/kg ägg. För kontrollgrupperna injicerades 0,1% ren triolein i äggen.

Tidigare studier har presenterat en modell där man approximativt kan räkna ut mängden förbränd bensin i kölvattnet efter en båt med utombordsmotor (Balk *et al.* 1994; Tjärnlund *et al.* 1996). Modellen grundar sig på att, oavsett motor och båt, kan en ungefärlig mängd förbränd bensin återfinnas i det initialt utspädda kölvattnet, definierat som en 1 meter bred och 1 meter djup sektion efter båten samt en längd av kölvattnet beroende på hur lång sträcka båten har färdats. Parametrarna som används för modellen är; bränsle förbrukning 0,5-1,0 liter per hästkraft och timme samt 0,3-1,0 knop erhållen per hästkraft. Modellen finns i detalj beskriven i en tidigare utgiven publikation på sidorna 11-13 med figur (Balk *et al.* 1994). Resultatet, efter beräkning, ger vid handen att cirka 2  $\sigma$ L förbränd bensin går att återfinna per liter kölvatten och har presenterats tidigare (Balk *et al.* 1994, Tjärnlund *et al.* 1995). Fisk har en stor förmåga att ta upp gifter direkt från det omgivande vattnet genom framförallt gälandning. Processen beskrivs som biokoncentration och kan variera kraftigt beroende på ämnets struktur. Biokoncentrationsfaktorer (BCF) mellan 50 ggr och 1.000.000 ggr finns beskrivna i litteraturen för olika miljögifter (Balk *et al.* 1984 och referenser däri). Eftersom molekylens storlek och hydrofoba egenskaper är två essentiella faktorer i denna biokoncentrationsprocess, kan man uppskatta att faktorn för den här studerade substansgruppen, PAHer, sannolikt bör ligga kring 10.000 ggr eller mer. Som exempel, en studie med benso(a)pyrens upptag i gädda (*Esox lucius*) visade att faktorn var över 1000 ggr för levervävnad och över 80.000 ggr för gallan efter endast cirka 2 dygns exponering (Balk *et al.* 1984).

Vid vidare beräkningar kan således antagas att den i denna studien lägsta dosen som har använts (25 ml förbränd bensin/kg ägg och antaget BCF 12500 ggr ) väl kan befaras att motsvara exponeringen i många fältsituationer. Följaktligen så blir den dubbla dosen (50 ml) och fyrdubbla dosen (100 ml) exponeringsnivåer som ej är realistiska när det gäller säkerhetsfaktorer för påverkan och påföljande riskbedömningar. Det bör i detta sammanhang påpekas och understrykas att valet av art för denna undersökning, regnbåge, på inget sätt är vald som ”modellart” för att motsvara den mest känsliga arten som måste skyddas i våra ekosystem. I stället bör antagas att det finns arter i vår miljö som uppvisar en åtminstone 10 ggr större känslighet. För dessa arter är 200 ml dosen viktig information för en riskbedömning.

### **3.8. Analys av mortalitet och deformationer**

Mortalitet registrerades regelbundet under exponeringen. Varannan dag undersöktes försöksmaterialet och döda djur registrerades och plockades bort. Analyser av mortalitet och deformationer följde procedurer som har beskrivits tidigare (Åkerman and Balk 1998). I samband med kläckning registrerades ett antal olika skador hos larverna och anges i procent av antalet kläckta larver. En mycket allvarligt skadad larv, som uppvisar mer än en definierbar deformation, kan således vara registrerad i fler än en av grupperna för de olika deformationerna.

### 3.9. Provtagning och analys av fisklarver för subletala effekter

Provtagning av levern för enzymatiska variabler utfördes enligt tidigare beskriven metodik (Amcoff et al. 2000). Tre veckor efter kläckningen, cirka 150 dygnsgrader, då larverna konsumerat cirka 2/3 av gulesäcken, dissekerades levrarna ut. Levrarna från 3 larver poolades och homogeniserades i 0,25 M sockros. Därefter alikvoterades homogenatet upp i cryo-rör och frystes ner direkt i flytande N<sub>2</sub> (-196∇C). Denna procedur upprepades tills totalt 15 fisklarver från varje grupp hade provtagits. Efter några timmar fördes proverna över till en lågtemperatur frysbox där de förvarades i -140∇C fram till att de enzymatiska analyserna genomfördes. CYP1A induktion analyserades i leverhomogenat som etoxyresorufin *O*-deetylase aktivitet (EROD) enligt metod som har beskrivits tidigare (Burke och Mayer 1974). Glutationreduktas analyserades också i leverhomogenat, enligt metod beskriven i Carlberg and Mannervik, 1975. Vid upptiningen för enzymatisk analys följdes procedurer som minimerar tiningseffekter, dvs snabb upptining utan att höja temperaturen i provet. Protein analyserades enligt en metod som har beskrivits tidigare (Lowry *et al.* 1951)

### 3.10 Statistik

För variablerna mortalitet och uppkomst av deformationer exponerades cirka 36 individer för varje extrakt och dos därav. Provtagning för enzymernas analys bestod av 15 individer per dosgrupp (4 olika doser) fördelade på 5 pooler bestående av 3 individer. Varje enzymatisk analys genomfördes dessutom minst i duplikat på homogenatet. Den statistiska spridningen baserar sig således på 5 medelvärden. Resultaten redovisas som stapeldiagram med medelvärde och ett 95%-igt konfidensintervall. Det 95%-iga konfidensintervallet har uträknats med användande av t-fördelning med respektive antal frihetsgrader. Signifikanta skillnader, mellan exponerade grupper och kontrollgrupper, analyserades med Anova och multipla jämförelser med Tukey Honestly Significant Difference test (SPSS 10.0, SPSS Inc. Chicago, USA). Som kontroll har djur injicerade med bäraren triolein används. Dessutom, ett antal försök med extraktion/lösnings-medel kontroller visade att ingen signifikant påverkan på de undersökta biologiska effektvariablerna förelåg (visas ej). Regressionsanalys användes för att jämföra EROD-aktivitet med summan av analyserade PAHer, samt mortalitet med summa analyserade alkaner.

#### 4. Resultat

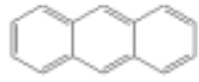
Analysresultaten har visat att ett mycket stort antal olika PAHer i höga koncentrationer går att återfinna i kölvattnet efter samtliga sju undersökta olika utombordsmotorer. Av de 23 olika analyserade PAHerna kunde samtliga återfinnas i kölvattnet efter samtliga undersökta motorer. I figur 1 presenteras strukturerna för de analyserade PAHerna. De analyserade halterna av respektive PAH finns redovisade i tabell 2. Som totalhalt av de analyserade PAHerna kan observeras att kölvattnet efter en motorbåt kan innehålla 6-47 ng PAHer per liter kölvatten, och ett medelvärde kan uträknas till 27 ng PAHer per liter kölvatten, baserat på de sju olika undersökta motorerna. Den procentuella fördelningen mellan olika PAHer redovisas i tabell 3. De flesta motorerna ger utsläpp av i första hand medelsmå PAHer (3 ringar), de utgör cirka 50% av de analyserade PAHerna. Den största motorn uppvisar en tendens för att avge en större andel PAHer med fler ringar. För övrigt kan anses att halterna av respektive PAH skiljer sig relativt lite mellan de olika motorerna, det finns ingen motor som uppvisar en skillnad, mer eller mindre än 10 ggr i kölvattenkoncentration, jämfört med de andra motorerna.

För alkaner i kölvattnet kunde 13-22 strukturellt olika alkaner analyseras, förutom en relativt stor andel icke separerade och strukturbestämda. I figur 2 redovisas strukturerna för de analyserade alkanerna. Halterna av dessa kolväten var som förväntat, cirka 50 ggr mer än PAHerna, även om relativt stora skillnader förekom mellan de olika motorerna (cirka 5-200 ggr). I tabell 4 presenteras halterna i kölvattnet för de 13-22 strukturellt analyserade alkanerna i kölvattnet. Med gaskromatografiteknik kan bara kolvätededjor med upp till 36 kolatomer analyseras. I extrakten från 2-taktsmotorerna fanns en oljeliknande rest kvar efter indunstning av hexanet, som utgör cirka 10 ggr mer än analyserade alkaner. Denna rest innehåller förmodligen kolväten med längre kolkedjor än 36 kolatomer.

Antalet döda ägg registrerade från befruktningen t.o.m. kläckningen redovisas i procent av antalet injicerade ägg i figur 3a. De tre största 2-taktsmotorerna orsakade 90-100% mortalitet i de två högsta doserna. Dessa motorer orsakade 25-50% mortalitet även i den näst lägsta dosen. I figur 3a redovisas också skador hos larverna registrerade efter kläckningen. Skadorna är indelade i tre grupper; blödningar (i huvudet, i huden, i gulesäcken), ödem (i gulesäcken, i hjärtsäcken) och/eller olika missbildningar (defekt blodkärlssystem runt gulan, sned gulesäck, felplacerad lever, deformerade käkar). Skadorna anges i procent av antalet kläckta larver och en allvarligt skadad larv kan vara registrerad i alla tre grupperna. Figuren visar att det framförallt är de stora 2-taktsmotorerna som ger skador hos larverna i de två lägsta doserna. I figur 3b visas fotografier med exempel på några uppkomna skador av avgaskkondensat från utombordsmotorer som kunde registreras.

Enzymet glutathionreduktas visade ingen signifikant höjning av aktiviteten i någon grupp (resultat visas ej). Däremot uppvisade CYP1A induktion kraftig påverkan för samtliga undersökta motorer (figur 4). Lägsta dosen från samtliga motorer orsakade en signifikant höjning av EROD aktiviteten i levern 2,5 månader efter att de blev exponerade som nybefruktade ägg. EROD-aktiviteterna korrelerar signifikant ( $p < 0.05$ ) positivt med summa analyserade PAHer för de undersökta motorernas avgaskkondensat. (Regressionsanalys:  $r^2 = 0,72$  och  $0,67$  för respektive dos 25ml och 50 ml förbränd bensin/kg ägg).

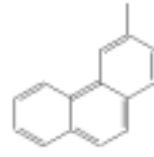
**Figur 1.** Strukturer för analyserade polycykliska kolväten i avgaskondensat från kölvatten efter båtar med utombordsmotorer.



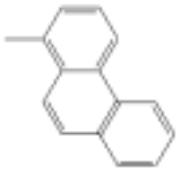
Anthracen



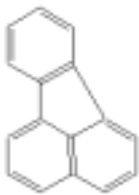
Fenantren



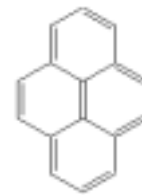
3-metylphenantren



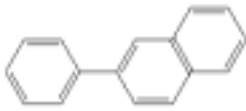
1-metylphenantren



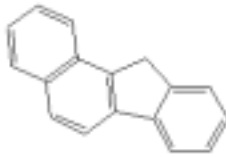
Fluoranten



Pyren



2-fenylnaftalen



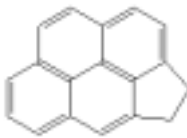
Benso(a)fluoren



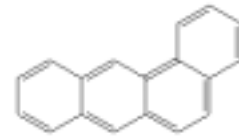
1-metylpyren



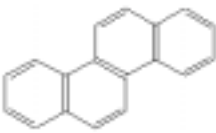
Benso(ghi)fluoranten



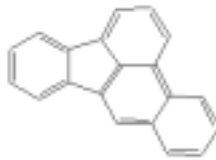
Cyklopenta(cd)pyren



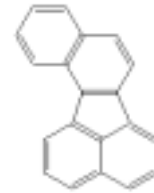
Benso(a)antracen



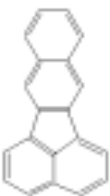
Krysen



Benso(b)fluoranten



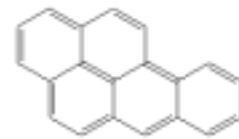
Benso(j)fluoranten



Benso(k)fluoranten

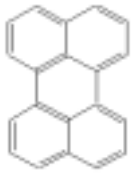


Benso(e)pyren

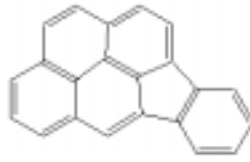


Benso(a)pyren

**Figur 1** (fortsättning)



Perylen



Indeno(1,2,3-cd)pyren



Benso(ghi)pyren



Coronen

**Tabell 2.** Polycykliska aromatiska föreningar, ng/l kölvatten. Angivna värden är omräknade till ng per liter kölvatten enligt beräkningsmodellen att 2 σL förbränd bensin går att återfinna per liter kölvatten (se avsnitt 3.7.).

	Johnson 4hk 2-t	Yamaha 4hk 4-t	Mariner 4hk 2-t	Johnson 50hk 2-t	Honda 50hk 4-t	Yamaha 60hk 2-t	Evinrude 90hk 2-t
Fenantren	9.68	2.07	10.6	9.08	1.54	2.40	7.92
Antracen	1.26	0.48	1.56	1.25	0.40	0.39	1.76
3-metylfenantren	5.56	0.59	6.17	5.33	0.40	1.88	1.62
1-metylfenantren	2.63	0.35	2.67	2.76	0.26	2.02	0.90
Fluoranten	1.57	0.72	2.58	3.05	0.08	0.75	4.73
Pyren	3.12	0.88	4.19	4.24	0.41	1.26	5.81
2-phenylnaftalen	1.12	0.19	1.17	1.47	0.75	0.46	1.01
Benso(a)fluoren	1.10	0.19	1.00	1.25	0.13	0.58	0.96
Benso(e)fluoren	0.61	0.23	1.17	1.50	0.15	0.65	1.21
2-metylpyren	0.65	0.10	0.69	0.80	0.07	0.39	0.41
1-metylpyren	0.43	0.08	0.51	0.57	0.05	0.30	0.47
Benso(ghi)fluoranten	0.20	0.16	0.48	0.52	0.09	0.21	1.71
Cyclopenta(cd)pyren	0.65	0.39	1.44	1.27	0.20	0.63	6.14
Bens(a)antracen	0.36	0.20	0.58	0.79	0.11	0.46	1.35
Chrysen/trifenylen	0.30	0.15	0.50	0.69	0.09	0.35	1.22
Benso(b)fluoranten	0.32	0.12	0.38	0.80	0.11	0.34	0.81
Benso(j+k)fluoranten	0.15	0.08	0.27	0.57	0.07	0.23	0.91
Benso(e)pyren	0.50	0.09	0.50	0.77	0.09	0.38	0.76
Benso(a)pyren	0.33	0.12	0.43	0.70	0.11	0.36	1.17
Perylen	0.06	0.02	0.09	0.15	0.02	0.06	0.22
Indeno(1,2,3-cd)pyren	0.21	0.09	0.36	0.70	0.11	0.03	1.29
Benso(ghi)perylen	1.10	0.20	1.19	1.43	0.20	0.77	2.70
Coronen	0.43	0.09	0.53	0.51	0.08	0.32	1.58
Summa	32.3	7.59	39.0	40.2	5.56	15.2	46.7

**Tabell 3.** Polycykliska aromatiska föreningar i %. Värdena är uträknade för varje enskild substans som procent av summan analyserade PAHer för varje motor.

	Johnson 4hk 2-t	Yamaha 4hk 4-t	Mariner 4hk 2-t	Johnson 50hk 2-t	Honda 50hk 4-t	Yamaha 60hk 2-t	Evinrude 90hk 2-t
Fenantren	29.98	27.24	27.1	22.60	27.77	15.79	16.96
Antracen	3.91	6.34	4.0	3.12	7.25	2.55	3.76
3-metylfenantren	17.22	7.79	15.8	13.27	7.22	12.38	3.48
1-metylfenantren	8.13	4.67	6.8	6.87	4.60	13.26	1.93
Fluoranten	4.86	9.45	6.6	7.58	1.52	4.95	10.13
Pyren	9.65	11.59	10.8	10.56	7.46	8.27	12.43
2-phenylnaftalene	3.47	2.44	3.0	3.65	13.41	3.00	2.17
Benso(a)fluorene	3.42	2.57	2.6	3.10	2.32	3.83	2.05
Benso(e)fluorene	1.88	3.07	3.0	3.74	2.76	4.27	2.59
2-metylpyren	2.02	1.32	1.8	1.99	1.32	2.59	0.89
1-metylpyren	1.33	1.05	1.3	1.43	0.98	1.97	1.00
Benso(ghi)fluoranten	0.61	2.06	1.2	1.29	1.62	1.39	3.65
Cyclopenta(cd)pyren	2.01	5.19	3.7	3.15	3.69	4.18	13.15
Bens(a)antracen	1.11	2.58	1.5	1.97	2.03	3.01	2.89
Chrysen/trifenylen	0.94	2.00	1.3	1.73	1.63	2.33	2.61
Benso(b)fluoranten	1.00	1.59	1.0	1.99	2.06	2.21	1.74
Benso(j+k)fluoranten	0.47	1.01	0.7	1.41	1.33	1.48	1.94
Benso(e)pyren	1.55	1.17	1.3	1.92	1.65	2.48	1.62
Benso(a)pyren	1.03	1.60	1.1	1.74	2.01	2.40	2.51
Perylen	0.18	0.29	0.2	0.39	0.30	0.38	0.48
Indeno(1,2,3-cd)pyren	0.64	1.18	0.9	1.74	1.96	0.20	2.76
Benso(ghi)perylene	3.40	2.63	3.1	3.55	3.61	5.06	5.77
Coronen	1.34	1.14	1.3	1.26	1.45	2.09	3.38

**Figur 2.** Strukturer för analyserade alifatiska kolväten i avgaskondensat från kölvatten efter båtar med utombordsmotorer.



Pentadecan, Hexadecan, Heptadecan, Octadecan, Nonadecan;  $C_{n=15-19}$



Pristan



Phytan



Eicosan, Heneicosan, Docosan, Tricosan, Tetracosan, Pentacosan, Hexacosan, Heptacosan, Octacosan, Nonacosan;  $C_{n=20-29}$

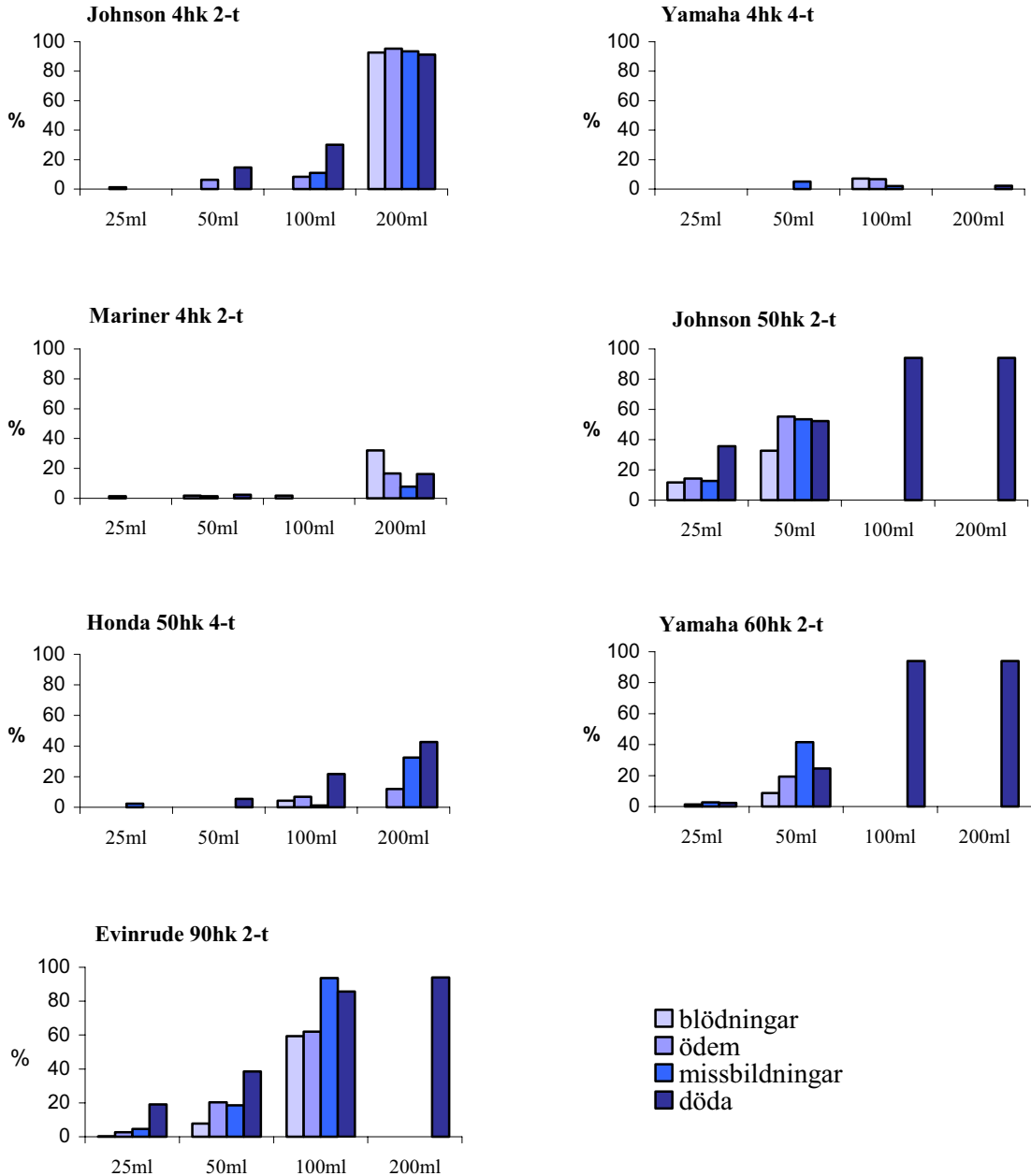


Triacontan, Dotriacontan, Tritriacontan, Tetratriacontan, Hexatriacontan;  $C_{n=30-33, 34,36}$

**Tabell 4.** Alkaner, ng/l kölvatten. Angivna värden är omräknade till ng per liter kölvatten enligt beräkningsmodellen att 2  $\sigma$ L förbränd bensin går att återfinna per liter kölvatten (se avsnitt 3.7.)

	Johnson 4hk 2-t	Yamaha 4hk 4-t	Mariner 4hk 2-t	Johnson 50hk 2-t	Honda 50hk 4-t	Yamaha 60hk 2-t	Evinrude 90hk 2-t
Pentadecan	60.7	5.14	4.47	43.1	1.85	21.2	23.8
Hexadecan	23.7	1.72	2.53	23.8	1.61	11.7	13.7
Heptadecan	4.01	0.69	0.60	9.80	0.89	5.68	1.73
Pristan	6.11	0.33	0.67	7.16	0.53	4.04	1.83
Octadecan	1.70	0.42	0.34	5.04	0.69	2.73	0.73
Phytan	3.14	0.25	0.44	4.02	0.37	1.57	0.78
Nonadecan	1.69	0.26	0.25	3.71	0.33	1.26	0.76
Eicosan	1.95	0.31	0.27	3.98	0.39	1.29	0.81
Heneicosan	1.25	0.34	0.16	2.55	0.31	1.00	0.48
Docosan	1.20	0.45	0.15	2.14	0.26	0.87	0.48
Tricosan	0.87	0.60	0.08	1.59	0.15	0.79	0.38
Tetracosan	0.89	0.68	0.12	1.74	0.32	0.92	0.74
Pentacosan	3.43	e.d.	0.39	4.65	0.36	1.37	1.78
Hexacosan	e.d.*	e.d.	e.d.	e.d.	0.30	1.26	e.d.
Heptacosan	e.d.	e.d.	e.d.	e.d.	0.40	1.26	e.d.
Octacosan	e.d.	e.d.	e.d.	e.d.	0.30	1.95	e.d.
Nonacosan	e.d.	e.d.	e.d.	e.d.	0.36	2.01	e.d.
Triacontan	e.d.	e.d.	e.d.	e.d.	0.33	1.84	e.d.
Dotriacontan	e.d.	e.d.	e.d.	e.d.	0.30	1.39	e.d.
Tritriacontan	e.d.	e.d.	e.d.	e.d.	0.32	1.60	e.d.
Tetratriacontan	e.d.	e.d.	e.d.	e.d.	0.37	3.56	e.d.
Hexatriacontan	e.d.	e.d.	e.d.	e.d.	0.12	e.d.	e.d.
Ej separerade kolväten	1697	1495	191	1153	47.6	417	760
Summa	1808	1506	202	1267	58.5	486	808

\*e.d. anger ej detekterbar



**Figur 3.** Mortalitet och skador hos regnbåge (*Oncorhynchus mykiss*) exponerade direkt efter befruktningen med extrakt från avgaskondensat från olika båtmotorer. Antalet döda embryon är registrerade från befruktningen t.o.m. kläckningen och anges i procent av antalet injicerade ägg. Skadorna är indelade i tre grupper; blödningar ( i huden, i huvudet, i gulesäcken), ödem (i gulesäcken, i hjärtsäcken) och /eller olika missbildningar (defekt blodkärlssystem runt gulan, sned gulesäck, felplacerad lever, deformerade käkar). Exempel på skador redovisas i figur 3b. Skadorna är registrerade hos larverna efter kläckningen och anges i procent av antalet kläckta larver. En allvarligt skadad larv kan vara registrerad i alla tre grupperna. Volymen under stapelgrupperna anger antalet ml förbränd bensin/kg ägg. [ex. En passerad båt med producerat kölvatten: 2 µL och 12500 ggr BCF ger 25 ml.]

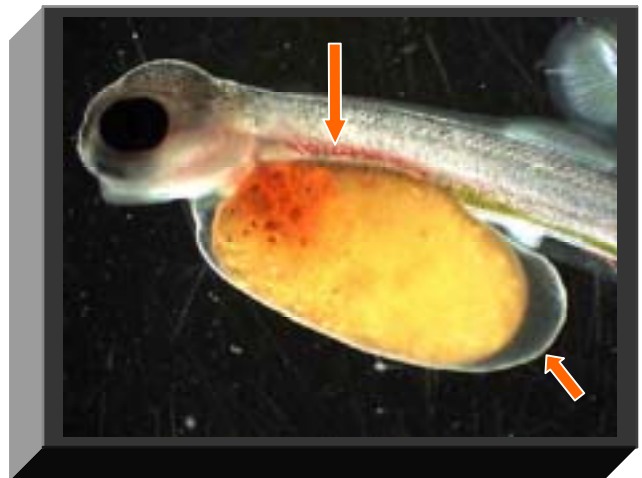
**Figur 3b.** Fotografier på triolein (carrier) exponerad kontrollarv av regnbåge (*Oncorhynchus mykiss*) och larver som blivit exponerade för extrakt från avgaskondensat i samband med befruktningen.



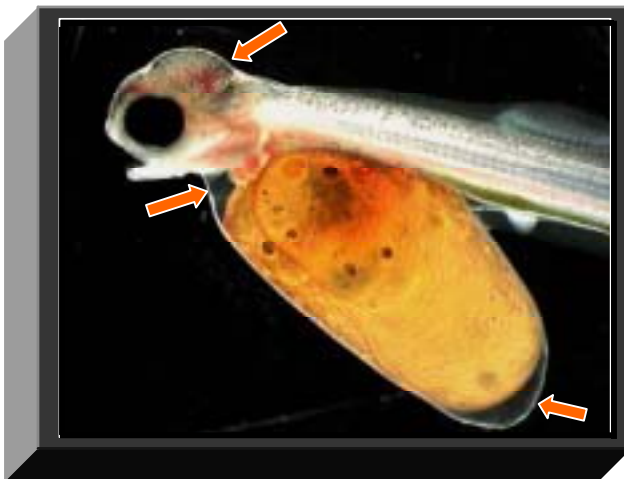
Larv som utvecklas normalt, triolein-injicerad kontroll.



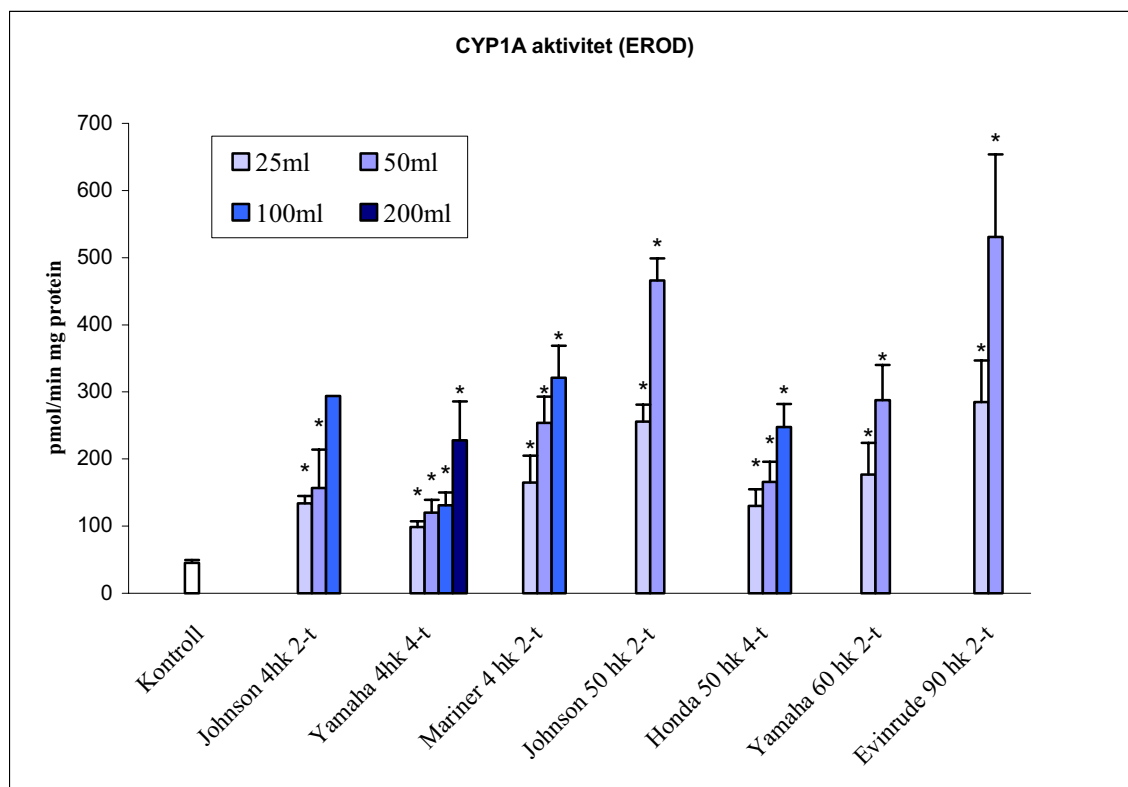
Larv som saknar blodkärlssystem runt gulesäcken efter exponering för avgaskondensat.



Larv med blödningar i huden och ödem runt gulesäcken efter exponering för avgaskondensat.



Larv med blödningar i huvudet samt ödem runt hjärtsäck och gulesäck efter exponering för avgaskondensat.



**Figur 4.** Cytokrom P4501A aktivitet (EROD) i levern från regnbågs-larver (*Oncorhynchus mykiss*) vid ca 2/3 gulesäcks-konsumtion. Äggen har blivit exponerade i samband med befruktningen, dvs cirka 2,5 månader tidigare. Staplarna visar medelvärden med ett 95%-igt konfidensintervall. Signifikanta skillnader mellan exponerade grupper och kontroll (injektion med endast bärare; triolein) analyserades med Anova och multipla jämförelser med Tukey Honestly Significant Difference test (SPSS 10.0, SPSS Inc., Chicago, USA).  
\*visar signifikant skillnad,  $p < 0,05$ .

## 5. Diskussion

Det skall direkt påpekas att denna undersökning inte är upplagd för att kunna jämföra de olika modellerna av utombordsmotorer, ej eller deras olika tillverkare. För att erhålla ett sådant underlag, dvs med avsikt att eventuellt kunna särskilja de olika motorernas utsläpp och potential för negativa biologiska effekter för den akvatiska miljön, skulle krävas en annan försöksuppläggning. Varje enskild motor skall då köras optimalt likvärdigt ur ett antal olika aspekter, såsom bränsle, olja, varvtal, ålder, vindförhållanden, service med mera. Vidare skulle krävas, för att få ett statistiskt underlag, att fler motorer av varje modell undersöks. De sju olika motorerna, som finns representerade i denna undersökning, är tänkta att i grova drag motsvara användandet av olika motorer i Svenska vatten. Eftersom urvalet av motorer innehåller flera moderna 4-taktare och relativt nya 2-taktare kan de kanske anses att motsvara de kommande årens användande av utombordsmotorer, med nuvarande utveckling.

Rent vatten (dricksvatten), som användes för dessa försök, innehåller lite partiklar och kan därför kanske förväntas att inte kondensera avgaserna lika effektivt som ett naturligt partikelinnehållande vatten. Det kalla vattnet, i början på varje motorkörning, motsvarar sannolikt det vanliga vattentemperaturen i många svenska vatten. Vattnet blir dock varmare under körningens gång, orsakat av avgasernas värme. Det kalla vattnet har en bättre förmåga att kondensera avgaserna och eftersom vattnet blir kontinuerligt varmare under förbränningen av det använda bränslet så finns det fog att antaga att det varmare vattnet under testkörningen minskar dess förmåga att kondensera avgaserna. Men den högre förekomsten av kolloida partiklar som bildas efterhand som mer bränsle förbränts kan eventuellt, å andra sidan, leda till en ökad kondensering av avgaserna som bildas efterhand senare. Slutligen kan konstateras att tidigare undersökningar har indikerat att cirka 50 procent av avgaserna kondenseras direkt i kölvattnet efter båten. Dock det finns givetvis en uppenbar risk att den halva som kanske driver iväg med vinden över vattnet riskerar, i hög omfattning, att falla ner på andra sidan viken eller sjön. Vindens påverkan på avgaser från utombordsmotorer har undersökts i delvis fältlika förhållanden (Wachs *et al.* 1992), och som väntat har vinden en påverkan av avgasernas riktning såväl som spridning. Den UV-ljus bestrålning som både kondensatet i vattnet och givetvis den partiella atmosfäriska delen exponeras för är att betrakta som en stor okänd riskfaktor i denna, här använda, försöksuppsättning. Bakgrunden är att nya studier har visat att toxiciteten kan öka anmärkningsvärt, flera tio-potenser, för organismer som utsätts för PAH'er och samtidigt bestrålas med UV-ljus (Pelletier *et al.* 1997; Spehar *et al.* 1999).

I sammanfattning kan således konstateras att det föreligger ett antal olika parametrar som sannolikt påverkar, i båda riktningarna, kölvattnets koncentration av kondenserade avgaser, och deras giftighet, efter en båt som drivs med en utombordsmotor. Dock kan konstateras att den här använda arbetsstrategin uppvisar ett godtagbart representativt närmevärde för olika situationer i fält.

Dessa studier av olika båtmotorer har visat att medelvärdet för benso(a)pyren i kölvattnet är 0,46 ng/l. Vid den lägsta dosen (25 ml) motsvarar denna koncentration att ägg/embryo har blivit exponerade för 5,7  $\sigma$ g/kg av denna PAH. I vild fångad insjööring (*Salvelinus*

*namaycush*) från Lake Ontario har halten av benzo(a)pyren i ägg analyserats. Analyserna visade att koncentrationen var 11,2  $\sigma$ g benzo(a)pyren/kg ägg (Fitzsimons, *et al.* 1995). Med avseende på benzo(a)pyren så kan konstateras att vår exponeringsdos använd i denna studie väl kan motsvara situationen för vild fisk. Med avseende på summan av de fyra PAHer, fluoranten, benzo(b)fluoranten, benzo(a)pyren och indeno(1,2,3-cd)-pyren som också analyserades, dels i denna studie och dels också i Fitzsimon *et al.* 1995 studie, framträder stor likhet till de vilda fiskarnas exponeringssituation. Fiskarna från Lake Ontario uppvisade 45,7  $\sigma$ g/kg ägg av summan av dessa PAHer. Analyser av vatten i föreliggande studie visade att koncentrationen var 3,20 ng/liter kölvatten som medelvärde från de sju motorerna av dessa fyra PAHer. Vid användandet av den lägsta dosen blev exponeringen 40  $\sigma$ g/kg ägg. Återigen kan således konstateras att vår exponeringsdos använd i denna studie väl kan motsvara situationen för vild fisk. Utan att känna till detaljerna och exponeringssituationen i detalj för fiskarna från Lake Ontario kan det konstateras att de halter/doser som vi har räknat ut och använt i våra försök inte utgör en överskattning av befaraede koncentrationsnivåer, utan att doserna är att betrakta som högst sannolika. Av detta kan slutsatsen dras att doserna använda i denna studie är att betrakta som halter som den vilda fisken är eller riskerar att bli exponerade för i samband med exponering för PAHer orsakade av avgaskcondensat från utombordsmotorer.

Fiskars unga utvecklingsstadier, ägg/embryo, gulesäckslarv och larv, blir exponerade för miljögifter, och då inkluderande de gifter som finns i det bildade avgaskcondensatet i kölvattnet efter båtar med utombordsmotorer, på minst tre olika sätt. Den första exponeringen sker via modern, maternal exponering. Under honornas uppbyggnad av könsorganen (äggäckarna med äggen), en process som ofta tar många månader i anspråk, anrikas gifterna i gulan hos äggen. Efter fiskens lek, när det befruktade ägget börjar utveckla ett embryo, utnyttjas gulan som näring- och energikälla för embryot. I samband med detta nyttjande av gulan blir således de embryonala cellerna och vävnaderna exponerade för gifterna som finns upplagrade och de toxiska effekterna kommer till uttryck. Miljögifter som honan har anrikat via födan och direkt via vattnet, oavsett var hon har uppehållit sig tidigare, drabbar således senare avkomman på lekplatsen.

Fiskars äggskal är relativt täta och skyddar därmed oftast det utvecklande embryot relativt bra mot miljögifter som finns i det omgivande vattnet. Dock, i samband med kläckningen då gulesäckslarven simmar ut ur äggskalsresterna blir gulesäckslarverna dessutom exponerade via gälarna samt över huden via det kontaminerade omgivande vattnet. Detta utgör det andra sättet varigenom fiskars unga utvecklingsstadier blir exponerade. Tidigare studier har visat att utsläppen från utombordsmotorer har hydrofoba egenskaper, detta gör att de dels bildar miceller (små i vattenfasen "svävande" aggregat) och dels att de adsorberas till olika organiska partiklar i vattenfasen. Sammantaget gör detta att utsläppen under vissa förhållanden sannolikt kan transporteras långt (-km-) i vattenmiljön, beroende på vattenrörelser och på så sätt avsättas i lekområden för olika fiskarter. Detta, transporten och bindningen till organiska partiklar utgör grunden för den tredje exponeringsvägen, den via födopartiklar.

Att använda sig av regnbåge (*Oncorhynchus mykiss*) som försöksdjur, och modellfisk vid den här typen av studier är ingen nackdel. Från odlare kan ett relevant biologiskt försöksmaterial erhållas, som väl kan anses vara representativt för många av de cirka 40.000 arter av benfiskar som finns globalt. I detta sammanhang kan det var motiverat att påminna om det faktum att kunskap om människans utsatthet (upptag, fördelning, metabolism, toxiska effekter m.m.) för giftiga ämnen i huvudsak faktiskt är baserat på studier av vita råttor.

Nanoinjektionsmetoden använd på artificiellt nybefruktade fiskägg kan anses härma de tre olika exponeringsvägarna som fiskars unga utvecklingsstadier blir exponerade via, nämligen via moderns gonad/egg uppbyggnad, via gälmembraner och hud efter kläckning samt via födan (Walker *et al.* 1996). Eftersom nanoinjektionstekniken applicerar dosen direkt i gulesäcken på ett nybefruktat ägg och gulesäcken konsumeras kontinuerligt under utvecklingen så har vi således utfört en kronisk (ca 2,5 mån) exponering fram till provtagningen på fisklarverna. Vidare kan påpekas att nanoinjektionen i det nybefruktade fiskägget också kan observeras och studeras som en exponering av en integrerad "cellkultur", bestående av embryonala celler och sedermera differentierade celler för de flesta essentiella livsfunktioner. Den mycket höga känsligheten som kan antagas, och som vi även har observerat i våra tidigare studier med denna teknik (Balk *et al.* 1995), är högst sannolikt en funktion av flera synergistiska faktorer, såsom, snabbt delande och differentierade celler (dvs. lite tid finns för reparation av cellfunktioner och genetiskt material), höga krav på fungerande stamceller, celler med essentiella kommunikationskrav, många olika celltyper, höga krav på att flertalet celler och stora delar av det genetiska materialet är intakt och ostört.

Exponeringsnivåerna för fisk i våra vatten varierar givetvis beroende på omfattningen av utombordstrafiken och geografien (insjö, älv, havsområde etc.) i det specifika området. Dock, totalt sett, över Sveriges vattenområden och på årsbasis, så är det uppenbart att dessa motorer står för en mycket stor del av utsläppen. Jämfört med oljeutsläpp och oljeolyckor så utgör utombordsmotorernas utsläpp cirka 90-97 procent av kolvätena.

Mortaliteten var 90-100% i de två högsta doserna för ägg exponerade för avgaskondensat från de tre stora 2-taktsmotorerna. Dödligheten kan inte förklaras enbart av halten av de analyserade PAHerna, utan måste bero på andra toxiska strukturer. Halten alkaner analyserade i extrakten är inte heller korrelerade till dödligheten. Sammantaget innebär detta att vidare studier bör genomföras för att fastställa de(n) ansvariga substans(ernas) struktur i avgaskondensatet från utombordsmotorer. Detta är speciellt önskvärt när alternativ (motor tekniska alternativ och bränsle alternativ) till förbättringar inom detta angelägna miljöområde diskuteras av samhället och dess myndigheter.

EROD-aktiviteten katalyseras av enzymet CYP 1A vilken ingår i cytokrom P-450 gruppen av enzymer, som har flera viktiga funktioner i cellen. De katalyserar hydroxyleringar, dealkyleringar, deamineringar, N-oxideringar, dehalogeneringar, peroxideringar och epoxideringar av miljögifter (Buhler and Buhler, 1998). I de flesta fall leder detta till att miljögiften får en ökad vattenlöslighet eller att det kan metaboliseras vidare av andra enzymer för att kunna utsöndras via urin eller feces. Då exponering sker

för miljögifter av typ PAHer kan dessa enzyms aktivitet öka, enzymet induceras. Detta kan ge upphov till en störning av endogena ämnens, ex. steroidhormoners, naturliga metabolism. Det första steget i en avgiftningsprocess kan ibland också innebära att miljögiften blir mer reaktivt med risk för genetiska skador såsom DNA addukter åtföljt av mutagena störningar. (Balk *et al.* 1994; Ericson *et al.* 1996, 1999). I det andra steget adderas vatten eller tripeptiden glutation till epoxider bildade av cytokrom P-450 systemet. Enzymet glutationreduktas genererar reducerad glutation i cellens cytosol och är därför viktigt dels för att skydda mot oxidation och dels för att underlätta utsöndring av miljögiften. Ingen signifikant effekt på denna variabel kunde dock konstateras i denna undersökning. Detta indikerar att levervävnadens normala kapacitet räckte till för att generera reducerad glutation för avgiftningen i våra exponeringsgrupper. Dessa resultat stämmer väl med våra tidigare undersökningar där induktion av glutationreduktas ej kunde påvisas lika regelbundet som CYP 1A induktionen, vid olika exponeringsförsök för avgaskondensat från utombordsmotorer (Balk *et al.* 1994).

Nyligen presenterade studier har visat att när fiskarten "mummichog" (*Fundulus heteroclitus*) blev exponerade för dioxin (2,3,7,8-tetraklorodibenso-p-dioxin) eller benso(a)pyren, i separata experiment, anrikades benso(a)pyren i princip i samma omfattning som dioxin i fiskarnas ägg (Monteverdi and DiGiulio 2000a). Tidigare studier har visat att svärmetaboliserade substanser såsom vissa PCBer och dioxin har en egenskap som gör att de ansamlas i fiskens ägg i gonaden. Det har ansetts att bakgrunden till detta är att dessa substanser karakteriseras av sin mycket långsamma metabolism i fiskarna, och därmed efterföljande låga utsöndring. Fiskägg med sin lipidrika miljö utgör en möjlighet för honornas "avgiftning". Resultaten av avgiftning/utsöndring via gonaden har resulterat i att avkomman istället drabbas av toxiska effekter. När embryon och larver utvecklas blir de exponerade, via gulesäcken för relativt höga halter, och som en konsekvens av detta drabbas avkomman av olika skador, som exempelvis "blue-sac disease" (Wolf 1969). Eftersom Monteverdi och Giulio's ovan citerade studie indikerar att det relativa upptaget till fiskäggen kan vara likvärdigt för dessa substansgrupper (PAHer och dioxiner) bör en framtida riskvärdering av båtmotorers utsläpp innehålla studier där halter av PAHer på ett mer regelbundet sätt analyseras i färdigutvecklade ägg insamlade från fiskhonor i fält. Även om dioxiner ofta uppvisar en betydligt högre potentiell toxicitet än PAHer så motiveras analyserna av det faktum att koncentrationen av PAHer i prover insamlade i fält är mycket högre än dioxinkoncentrationen. Eftersom vidare studier har visat att upptaget till äggen sannolikt till en signifikant del sker via en icke mättnadsbar association till vitelogenin (gulesäcksprotein) finns anledning att befara att upptaget till äggen är främst beroende av exponeringen av PAHer (Monteverdi and DiGiulio 2000b).

Kemiska analyser i fiskägg från vattenområden i Nordamerika med utombordstrafik har visat höga halter av vissa kolväten tillhörande den giftiga gruppen polycykliska aromatiska kolväten (PAH). Halterna är så höga att det inte finns utrymme för någon säkerhetsfaktor när det gäller PAH-exponering och de toxiska effekter som de orsakar. Detta innebär att det redan idag finns mycket starka skäl att anta att vi har en påverkan från utombordsmotorer i vår vattenmiljö som icke är acceptabel och därmed måste åtgärdas.

Utsläpp av PAHer från många tvåtaktsmotorer bestäms kanske i huvudsak av halten av PAHer i bensinen under det att effekten av den inblandade oljan har mindre betydelse för utsläppen (Magnusson *et al.* 2000). Om vi beaktar den mängd PAH som finns i 95-oktan bensin (Westerholm *et al.* 1988; Marr *et al.* 1999; Westerholm pers. kom.), skulle enbart PAH-innehållet i bensinen stå för mellan 1-4 ton utsläpp av PAHer (3-6 aromatringar) om vi förutsätter att 15.000 – 20.000 ton bränsle passerar oförbränt genom en 2-taktsmotor. Om vi istället räknar på de analyserade PAHerna i kölvattnet från denna undersökning blir resultatet att 1,6 –3,2 ton PAHer frigörs till den akvatiska miljön via kölvatten från utombordsmotorerna. Båda beräkningarna ger således en likartad föroreningsspridning.

För en avslutande riskutvärdering kan det konstateras att utsläppen av PAHer i avgaskondensat från utombordsmotorer, både 2-takts och 4-taktsmotorer, är oacceptabelt hög. Det finns stor anledning att befara kraftiga negativa biologiska skador orsakade av denna exponering på vild fisk och deras reproduktion i våra ekosystem. Mot bakgrund av den för närvarande antropogent förekommande mängden av xenobiotika i vår vattenmiljö, och då inkluderande PAHer även från andra källor, är det önskvärt, vid acceptering av en säkerhetsfaktor, att dessa utsläpp snarast reduceras till cirka 1/100-del av nuvarande utsläpp.

Vidare undersökningar som kan rekommenderas mot bakgrund av nuvarande kunskap, beskriven ovan, är dels undersökningar i fält och dels undersökningar på laboratoriet. För svenska förhållanden saknas det för närvarande kunskap om halter av PAHer i fiskägg från lekmogen fisk från områden med olika belastning av motorbåtstrafik. Med tanke på tidigare analyser redovisade från Nordamerika, jämförda med effekter funna vid motsvarande exponeringsnivåer i denna undersökning är det starkt motiverat att sådana kemiska analyser genomförs snarast.

Det skall understrykas att även om omfattande analyser har genomförts inom detta projekt, så innebär det inte att vi har kunnat peka ut de/den ansvariga substans(erna) för den höga giftigheten. Eftersom det pågår en diskussion i samhället för närvarande om att man bör övergå till alkylatbensin, som drivmedel för utombordsmotorer, är det hög tid att på laboratoriet undersöka biologiska effekter av dessa avgaskondensat. Att specifikt undersöka alkylatbensin och kanske ytterligare alternativa bränslen har föreslagits tidigare (Balk *et al.* 1994), och är ännu mer angeläget nu.

## **6. Erkännanden**

Detta projekt ”Kemiska analyser och biologiska effektundersökningar av utsläpp från utombordsmotorer” har finansierats av Naturvårdsverket och Sjöfartsverket. Tack till Christer Olofsson som initierade projektet. Testkörningarna, för att producera avgaskondensaten, utfördes av Jan-Erik Forssen, Kjell Holmgren och Christer Olofsson på ett förtjänstfullt sätt vid Svensk Maskinprovning, SMP, i Umeå. Bodil Gustavsson och Johan Persson tackas för värdefulla kommentarer på manuskriptet till denna rapport.

## 7. Referenser

Åkerman, G. and Balk, L. (1995) "A reliable and improved methodology to expose fish in the early embryonic stage." *Marine Environmental Research*, 39, 155-158.

Åkerman, G. and Balk, L. (1998) "Descriptive studies of mortality and morphological disorders in early life stages of cod and salmon originating from the Baltic Sea." *American Fisheries Society Symposium* 21:41-61.

Åkerman, G., Tjärnlund, U., Noaksson, E. and Balk, L. (1998) "Studies with oxythiamine to mimic reproduction disorder among fish early life stages." *Marine Environmental Research*, 46:(1-5) 493-497 .

Alexanderson, A. (1991) "Miljöpåverkan från fritidsbåtar, fiske- och arbetsfartyg. Sjöfartverket och Naturvårdsverket, Naturvårdsverket, Sweden, Rapport 3993.

Amcoff, P., Åkerman, G., Tjärnlund, U., Börjeson, H., Norrgren, L. and Balk, L. (2000) "Hepatic activities of thiamine-dependent enzymes, glucose-6 phosphate dehydrogenase and cytochrome P4501A in Baltic salmon (*Salmo salar*) yolk-sac fry after thiamine treatment." *Aquatic Toxicology*, 48 (4), 391-402.

Au, W.W.L. and Green, M. (2000) "Acoustic interaction of humpback whales and whale-watching boats." *Marine environmental research*, 49, 469-481.

Balk, L., Ericson, G., Lindesjö, E., Petterson, I., Tjärnlund, U and Åkerman, G. (1994) "Effects of exhaust from two-stroke outboard engines on fish. -Studies of genotoxic, enzymatic, physiological and histological disorders at the individual level.", 66 pages, TemaNord 1994:528, ISBN 92 9120 439 0.

Balk, L., Meijer, J., DePierre, J.W. and Appelgren L.E. (1984) "The uptake and distribution of <sup>3</sup>H-benzo(a)pyrene in the Northern pike, *Esox lucius*. Examination by whole-body autoradiography and scintillation counting." *Toxicology and Applied Pharmacology* 74, 430-449.

Balk, L., Tjärnlund, U., Ericson, G., Liewenborg, B. and Åkerman, G. (1995) "Investigations of sediment toxicity in the Dalsland channel lake system." *Länstyrelsen i Älvsborgs län. Rapport 1995;13.*, ISSN 1104-8271, 72 pages

Bate, G.C. and Crafford, S.D. (1985) "Inhibition of phytoplankton photosynthesis by the WSF of used lubricating oil." *Marine Pollution Bullentin*, 16 (10), 401-404.

Bieger, T., Hellou, J. and Abrajano Jr. T.A. (1996) "Petroleum biomarkers as tracers of lubricating oil contamination" *Marine Pollution Bullentin*, 32 (3), 270-274.

Buhler, D.R. and Wang-Buhler, J-L. (1998) "Rainbow trout cytochrome P450s: purification, molecular aspects, metabolic activity, induction and role in environmental monitoring." *Comp. Biochem. Physiol. C* 121, 107-137.

Burke, M.D. and R.T. Mayer. (1974) "Ethoxyresorufin: Direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene." *Drug Metab. Dispos.* 2, 583-588.

Carlberg, I. and B. Mannervik (1975) "Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver" *Journal of Biological Chemistry*, 250, 5475-5480.

Celander, M. and Balk, L. (1998) "Toxic effects of outboard motor emissions on fish." WHOI-98-03, *The Environmental Impacts of Boating; Proceedings of a workshop held at Woods Hole Oceanographic Institution, Woods Hole MA USA, December 7 to 9, 1994.* 84-86.

Colmsjö A., Zebühr Y., Östman C. (1987) "Group separation of PCDDs, PCDFs, PACs and aliphatic compounds on an amino bonded stationary phase for HPLC." *Chromatographia*, 24, 541-544.

Ericson, G., Åkerman, G., Liewenborg, B. and Balk, L. (1996) "Comparison of DNA damage in the early life stages of Cod, *Gadus morhua*, originating from Barents Sea and Baltic Sea." *Marine Environmental Research*, 42 (1-4), 119-123.

Ericson, G., Noaksson, E. and Balk, L. (1999) "DNA adduct formation and persistence in liver and extrahepatic tissues of northern pike (*Esox lucius*) following oral exposure to benzo(a)pyrene, benzo(k)fluoranthene and 7H-dibenzo(c,g)carbazole." *Mutation Research*, 47, 135-145.

Fitzsimons, J.D., Huestis, S. and Williston, B. (1995) "Occurrence of a swim-up syndrome in Lake Ontario lake trout in relation to contaminants and cultural practices. *J. Great Lakes Res.* 21 (Suppl. 1), 277-285.

Hilmer, T. and Bate, G.C. (1983) "Observations on the effect of outboard motor fuel oil on phytoplankton cultures." *Environmental Pollution (Series A.)*, 32, 307-316.

Howard, P.H, Boethling, R.S., Jarvis, W.F., Meylan, W.M. and Michalenko, E.M. (1991) *Handbook of environmental degradation rates.* Lewis Publishers, Inc., Boca Raton, Florida. 725p.

Ishaq, R., Åkerman, G., Näf, C., Balk, L, Bandh, C., and Broman, D. (1999) "Organic pollutant characterization and toxicity testing of settling particulate matter by nanoinjection in sea trout (*Salmo trutta*) eggs." *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18: 533-543.

- Jackivicz, T.P. and Kuzminski, L.N. (1973) "A review of outboard motor effects on the aquatic environment." *J. Water Pollut. Control Fed.*, 45 (8), 1759-1770.
- Koehler, M.E. and Hardy, J.T. (1999) "Effects of outboard motor emissions on early development of the killifish (*Oryzias latipes*)." *Northwest Science*, 73 (4), 277-282.
- Liddle, M.J. and Scorgie, H.R.A. (1980) "The effects of recreation on freshwater plants and animals: a review." *Biological Conservation*, 17, 183-206.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Magnusson R., Nilsson C., Andersson, K., Andersson B., Rannug U. And Östman C. (2000) "Effect of gasoline and lubricant on emission and mutagenicity of particles and semivolatiles in chain saw exhaust." *Environ. Sci. Technol*, 34, 2918-2924.
- Marr L., Kirchstetter T., Harley R., Miguel A., Hering S. and Hammond S. (1999) "Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons in motor vehicle fuels and exhaust emissions." *Environ. Sci. Technol*, 33, 3091-3099.
- Mele, A. (1993) "Polluting for pleasure." W.W. Norton & Company, New York, New York. 224 p.
- Monteverdi, G.H. and DiGiulio, R.T (2000a) "Oocytic accumulation and tissue distribution of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and benzo(a)pyrene in gravid *Fundulus heteroclitus*." *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 2512-2518.
- Monteverdi, G.H. and DiGiulio, R.T (2000b) "In vitro and in vivo association of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and benzo(a)pyrene with the yolk-precursor protein vitellogenin" *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 2502-2511.
- Näf C., Broman D., Brunström B. (1992) "Distribution and metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) injected into eggs of chicken (*Gallus domesticus*) and common eider duck (*Somateria mollissima*)." *Environ. Sci. technol.*, 1992, 11:1653-1660.
- Pelletier, M.C., Burgess, R.M., Ho, K.T., Kuhn, A., McKinney, R.A., Ryba, S.A. (1997) "Phototoxicity of individual polycyclic aromatic hydrocarbons and petroleum to marine invertebrate larvae and juveniles." *Environ. Toxicol. Chem.*, 16, 2190-2199.
- Spehar, R.L., Poucher, S., Brooke, L.T., Harison, D.J., Champlin, D., Cox., D.A. (1999). "Comparative toxicity of fluoranthene to freshwater and saltwater species under fluorescent and ultraviolet light." *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37, 496-502.

Stolpe, N.E. (1995) "A review of the boating impact workshop held at the Woods Hole Oceanographic Institution on December 7-9, 1994." Second annual marine and estuarine shallow water science and management conference, US EPA, Philadelphia, PA (USA), 30. (The Environmental Impacts of Boating; Proceedings of a workshop held at Woods Hole Oceanographic Institution, Woods Hole MA USA, December 7 to 9, 1994.)

Tjärnlund, U., Ericson, G., Lindesjö, E., Petterson, I. and Balk, L. (1995) "Investigations of biological effects of 2 cycle outboard engines exhaust on fish." *Marine Environmental Research*, 39, 313-316.

Tjärnlund, U., Ericson, G., Lindesjö, E., Petterson, I., Åkerman, G. and Balk, L. (1996) "Further studies of exhaust from two-stroke outboard engines on fish." *Marine Environmental Research*, 42 (1-4), 267-271.

Wachs, B., Wagner, H. and van Donkelaar, P. (1992) "Two-stroke engine lubricant emissions in a body of water subjected to intensive outboard motor operation." *Science of the Total Environment*, 116 (1-2), 59-81.

Walker, M., Zabel, E., Åkerman, G., Balk, L., Wilson, P. and Tillitt, D. (1996) "Fish egg injection as an alternative exposure route for early life stage toxicity studies. -Description of two unique methods." *Techniques in Aquatic Toxicology*, (Ostrander, G.K. Ed.) CRC Press, Lewis Publishers, New York. Book chapter four, 41-72, ISBN 1-56670-149-X.

Westerholm R., Alsberg T., Fromelin Å., Strandell M., Rannug U., Winquist L., Grigorladis V. and Egebäck K.-E. (1988) "Effect of fuel polycyclic aromatic hydrocarbon content on the emission of polycyclic aromatic hydrocarbons and other mutagenic substances from a gasoline-fueled automobile." *Environ. Sci. Technol.*, 22, 925-930.

Wolf, K., (1969). "Blue-sac disease of fish." *Fish Disease Leaflet 15*, U.S. Fish and Wildlife Service, Kearneysville, W. Virginia.