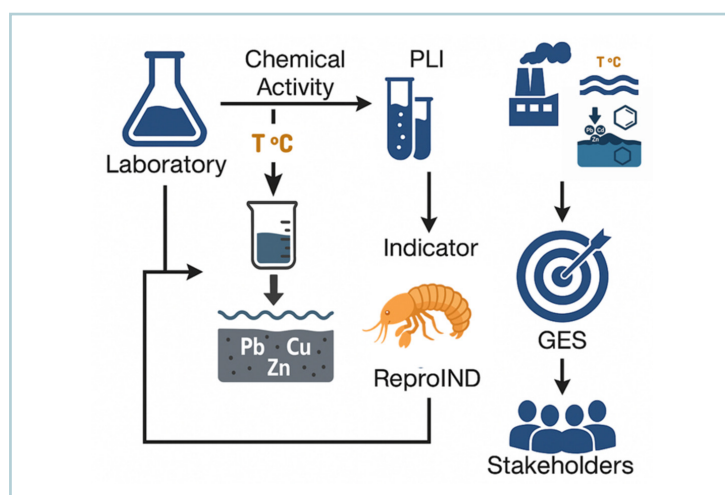


Kumulativa effekter: Inkludering av icke- kemiska stressorer i indikatorn ReproIND

Projekt INSERT: integrering av övervakningsdata, fältstudier, experimentell forskning och indikatorutveckling

Elena Gorokhova, Sebastian Abel,
Gastón Alurralde, Ann-Kristin Eriksson
Wiklund, Anna Sobek, Yves Saladin,
Sophie Steigerwald och Brita Sundelin



Kumulativa effekter: Inkludering av icke-kemiska stressorer i indikatorn ReproIND

Projekt INSERT: integrering av övervakningsdata,
fältstudier, experimentell forskning
och indikatorutveckling

av Elena Gorokhova, Sebastian Abel, Gastón Alurralde,
Ann-Kristin Eriksson Wiklund, Anna Sobek, Yves Saladin,
Sophie Steigerwald och Brita Sundelin

Naturvårdsverket
Tel: 010-698 10 00
E-post: registrator@naturvardsverket.se
Postadress: Naturvårdsverket, SE-106 48 Stockholm
Internet: www.naturvardsverket.se

ISBN 978-91-620-7218-6
ISSN 0282-7298

© Naturvårdsverket 2026

Tryck: Arkitektkopia AB, Bromma 2026
Omslag illustration: Elena Gorokhova

Förord

Rapporten *Kumulativa effekter: Inkludering av icke-kemiska stressorer i indikatorn ReproIND* redovisar resultaten från ett av sju projekt som finansierades inom forskningsutlysningen ”Kumulativa effekter på miljön”. Genom denna utlysning avsåg Naturvårdsverket och Havs- och vattenmyndigheten att främja utvecklingen av metoder och analytiska verktyg för kvalitativ och kvantitativ bedömning av kumulativa effekter på ekosystem inom ramen för miljöbedömningar. Projektet har finansierats av Naturvårdsverkets miljöforskningsanslag.

Rapporten har författats av Elena Gorokhova, Sebastian Abel, Gastón Alurralde, Ann-Kristin Eriksson Wiklund, Anna Sobek, Yves Saladin, Sophie Steigerwald och Brita Sundelin (Stockholms universitet). Den vetenskapliga kvaliteten har granskats av Ingela Dahllöf (Göteborgs universitet) och den praktiska relevansen har granskats av Johan Gustafsson (Havs- och vattenmyndigheten) samt Elisabeth Nyberg (Naturvårdsverket).

Författarna svarar för rapportens innehåll.

Stockholm, februari 2026

Marie Uhrwing
Avdelningschef,
Avdelningen för samordning, regeringsuppdrag och internationellt samarbete

Ordlista

Term	Definition
ReproIND	ReproIND är en integrerad biologisk effektindikator som sammanfattar flera reproduktionsrelaterade effekter hos en sentinelart för att bedöma påverkan på reproduktiv funktion på populationsnivå i miljöövervakning och miljöstatusbedömning.
Reproduktiv hälsa	Reproduktiv hälsa avser populationens förmåga till framgångsrik fortplantning och rekrytering över tid. Begreppet används här i ekologisk mening och skiljs från medicinska eller individbaserade tolkningar av reproduktiv funktion.
Kumulativa effekter	Kumulativa effekter avser den samlade påverkan av flera samtidiga stressorer, inklusive både kemiska och icke-kemiska faktorer, där effekterna inte bedöms isolerat utan i kombination.
Icke-kemiska stressorer	Icke-kemiska stressorer är miljöfaktorer som inte utgörs av kemiska ämnen, såsom temperatur, syrehalt, födotillgång eller fysisk störning, och som kan påverka organismers känslighet för kemisk exponering och biologiska effekter.
Kemisk aktivitet	Kemisk aktivitet är ett termodynamiskt mått på ett ämnes drivkraft att överföras mellan faser och tas upp av organismer. Måttet används för att jämföra biologiskt relevant exponering mellan olika kemikalier oberoende av deras koncentration och fysikalisk-kemiska egenskaper.
Potentiellt belastningsindex (PLI)	Potentiellt belastningsindex är ett sammansatt mått som beskriver den relativa kemiska belastningen i miljön baserat på uppskattad exponering och utgör inte ett direkt mått på biologisk effekt.
Miljöstatus	Miljöstatus beskriver tillståndet i ett ekosystem i relation till fastställda miljömål och bedömningskriterier. Inom MSFD används begreppet som grund för att avgöra om god miljöstatus uppnås.
God miljöstatus (GES)	God miljöstatus är ett policy- och förvaltningsmål inom EU:s marina strategi (MSFD) som anger att havsmiljön ska vara ekologiskt hållbar, produktiv och fri från oacceptabla antropogena påverkan.
Biologisk effektbaserad indikator	En biologisk effektbaserad indikator är ett mått som baseras på observerade biologiska responser hos organismer och används för att indikera miljöpåverkan, till skillnad från indikatorer som enbart beskriver exponering eller belastning.

Integrerad bedömning	Integrerad bedömning avser en sammanvägning av flera datatyper, stressorer eller biologiska effekter inom ett gemensamt ramverk för att stödja en helhetsbedömning av miljötillstånd.
Beslutsramverk	Ett beslutsramverk är en strukturerad metod för att kombinera indikatorer och bedömningskriterier för att stödja miljöstatusklassificering och förvaltningsbeslut.
Beslutsträd	Ett beslutsträd är ett operativt verktyg inom beslutsramverket där indikatorresultat följs stegvis för att vägleda tolkning och klassificering av miljöstatus.
Reproduktiva avvikelser	Reproduktiva avvikelser i reproduktionsrelaterade strukturer, embryonala missbildningar eller utvecklingsprocesser som kan indikera störd fortplantningsförmåga och potentiellt påverka populationens långsiktiga livskraft.
Sentinelart	En sentinelart är en art som används i miljöövervakning för att indikera miljöpåverkan i ett område, baserat på dess känslighet, ekologi och representativitet för relevanta biologiska processer.
Biologisk organisationsnivå	Biologisk organisationsnivå avser den nivå i biologiska system där observationer görs, exempelvis individ-, populations- eller samhällsnivå, vilket har betydelse för hur resultat tolkas i en förvaltningskontext.
Orsakssamband	Orsakssamband innebär ett verifierat kausalt förhållande där en faktor direkt bidrar till en observerad effekt. I denna rapport skiljs orsakssamband från statistiska samband, som inte nödvändigtvis innebär kausalitet.
Osäkerhet i bedömning	Osäkerhet i bedömning avser osäkerheter som uppstår från databegränsningar, metodval och naturlig variation och som påverkar tillförlitligheten i miljöstatusklassificeringar och slutsatser.

Innehåll

Förord	3
Ordlista	4
Tabeller	8
Figurer	9
Sammanfattning	10
English summary	11
1. Introduktion	12
1.1 Vidareutveckling av miljöbedömningar med kemisk aktivitet som exponeringsmått	12
1.2 Projektaktiviteter	13
1.3 Övergripande hypoteser och mål	15
2. Material och metoder	17
2.1 Experimentella metoder	18
2.1.1 Dosmått och kemikalier	18
2.1.2 Testorganismer	20
2.1.3 Exponeringssystem	20
2.1.4 Utvärderade kumulativa effekter och testfaktorer	21
2.2 Fältstudier	22
2.3 Statistisk modellering	23
2.3.1 Datatransformation, univariata tester och saknade data	24
2.3.2 Dos-respons analys	24
2.3.3 Multivariat modellering	24
2.3.4 PLS-SEM	24
2.3.5 Beslutsträdsmodellering	25
3. Resultat	26
3.1 Experimentella belägg för kemisk aktivitets lämplighet som dosmått	26
3.1.1 Experimentella system	26
3.1.2 Kumulativa effekter vid akuta och kroniska exponeringar	27
3.2 Effekter av föroreningar och abiotiska faktorer på ReproIND	29
3.3 Beslutsträdsanalys och revidering av ReproIND.	31
3.4 Samband mellan belastning och biologisk effekt	33
4. Diskussion	35
4.1 Kemisk aktivitet i ekotoxikologiska tester	35
4.2 Evidens för blandningseffekter från fältstudier	37
4.3 ReproIND-responser på regional variation i föroreningsbelastning och miljöförhållanden	38
5. Slutsatser och rekommendationer	40
5.1 Vidareutveckling av ReproIND-implementering och fastställande av GES	40
5.2 Koppling mellan kemiska och biologiska indikatorer	41

6.	Tack	43
7.	Källor	44
8.	Publikationer och tillgänglighet av data	48
8.1	Vetenskapliga publikationer	48
8.2	Rapporter	48
8.3	Preprints	48
8.4	Examensarbeten på masternivå	49
8.5	Vetenskapliga konferensbidrag	49
8.6	Presentationer för intressenter	50
8.7	Öppna data	50

Tabeller

Tabell 1. Översikt över test-/målorganismer, experimentella faktorer och variabler som användes i de experimentella och fältbaserade studierna. Motsvarande mål (O1–O4, se ovan) anges för varje aktivitet	19
Tabell 2. Översikt över datakällor och projekt som användes för att sammanställa data om miljöföroreningar, miljöfaktorer och ReproIND-komponenter (frekvens av embryonala missbildningar i populationen av vitmärta (<i>Monoporeia affinis</i>) samt frekvens av honor med embryonala missbildningar)	25
Tabell 3. Resultat från GLM-analys av GES-effekt på sambandet mellan kemisk aktivitet (LogPAHa) och organiskt kol i sedimentet (TOC).....	39

Figurer

Figur 1. Översikt över INSERT-projektets angreppssätt för integrerad bedömning av föroreningseffekter i Östersjön, där kemisk aktivitet, metallbelastning och icke-kemiska miljöfaktorer kombineras för vidareutveckling av ReproIND som biologisk effektindikator.....	14
Figur 2. Fördelning av kemisk aktivitet baserad på hydrofoba organiska föroreningar (HOCs) i sediment från olika delbassänger i Östersjön. Analysen visar PAHers relativa bidrag till den totala kemiska aktiviteten.....	19
Figur 3. Exponeringssystem som användes i de experimentella studierna: (A) vattenburen exponering med passiv dosering, (B) sedimentbaserad exponering enligt OECD, samt (C–D) kemisk aktivitetsbaserad laddning av sediment genom mättnings av torv med PAHer.	20
Figur 4. Tillväxtrespons hos dagmaskar och chironomider exponerade för sediment med varierande PAH-aktiviteter.....	27
Figur 5. Dos-respons-samband för immobilisering hos <i>Daphnia magna</i> (proxy för mortalitet) exponerade för en PAH-blandning inom intervallet för kemisk aktivitet 0,01–0,1.....	28
Figur 6. Respons i individuellt proteininnehåll hos <i>Daphnia magna</i> exponerade för en PAH-blandning inom intervallet för kemisk aktivitet 0,01–0,1, med eller utan samtidig exponering för zink.	28
Figur 7. Variation i förekomsten av embryonala missbildningar mellan stationer grupperade utifrån föroreningsbelastning.....	30
Figur 8. PLS-SEM-modell som kopplar embryonala missbildningar (ReproHealth) till biotiska (TrophDiv, trofisk diversitet, och GenDiv, genetisk diversitet) och abiotiska variabler (EXPOSURE, kemiska föroreningar i sediment, samt PHYS, fysikaliska miljöförhållanden).....	32
Figur 9. Beslutsträdsanalys (DT) av föroreningar och miljöfaktorer som påverkar GES baserat på ReproIND-värden från 55 stationer som användes för modellvalidering (rött: icke-GES, blått: GES).....	33
Figur 10. Variation i kemisk aktivitet (LogPAHa) och Metals-PLI grupperad för stationer klassificerade som GES respektive icke-GES.	34
Figur 11. Samband mellan sedimentets TOC och (A) kemisk aktivitet (LogPAHa) samt (B) Metals-PLI för stationer klassificerade som GES och icke-GES.....	35
Figur 12. Sammanfattning av centrala beslutspunkter identifierade av beslutsträdsmodellen (Figur 9) för bedömning av GES baserat på ReproIND.	43

Sammanfattning

Föroreningar i Östersjön och andra marina miljöer utgör risker för ekosystemens hälsa. Dessutom kan naturliga variationer i temperatur, salthalt eller näringsnivåer påverka biotillgängligheten och toxiciteten hos kemiska föroreningar, vilket i sin tur påverkar tillförlitligheten i bedömningen av miljörisker och biologisk respons. Riskbedömningar är dock inte utformade för att beakta de kumulativa (sammanslagda) effekterna av föroreningsblandningar och olika miljöfaktorer, vilket innebär att de misslyckas med att bedöma den fulla påverkan av exponeringar i naturliga miljöer. I INSERT adresserade vi detta genom att undersöka sammansatta toxicitetspotentialindicierna för hydrofoba organiska föroreningar (kemisk aktivitet) och spårmetaller (föroreningsbelastningsindex, PLI) som dosmått för att utvärdera blandningseffekterna av föroreningar, samtidigt som vi tog hänsyn till varierande icke-kemiska faktorer.

Vi inriktade oss på tre centrala aktiviteter. För det första undersökte vi den samlade påverkan av kemiska och icke-kemiska stressfaktorer på biologiska reaktioner i standardiserade ekotoxikologiska testsystem. Dessa experiment kombinerade kemisk aktivitet med relevanta stressfaktorer för att förbättra vår förståelse av deras biologiska effekter. För det andra tillämpade vi de sammansatta toxicitetspotentialindexen på ReproIND (reproduktiva avvikelser hos vitmärsla), en indikator som används för en helhetsbedömning av Östersjöns hälsotillstånd i samband med genomförandet av havsmiljödirektivet (MSFD). Detta innebär att förfinas GES-målen genom att integrera kemisk aktivitet och PLI med regionalt specifika miljövariabler för att säkerställa att målen baserade på ReproIND bättre speglar de unika förhållandena och stressfaktorerna i Östersjön. För det tredje samarbetade vi med expertgrupper och projekt inom ramen för HELCOM som arbetar med biologiska effektbedömningar, och vi samarbetade även med experter från OSPAR.

Förutom de vetenskapliga resultaten ledde vår studie till flera viktiga rekommendationer för att förbättra det praktiska värdet av föroreningsundersökningar, övervakning och statusbedömning i Östersjön, både på nationell och internationell nivå. Vi visade också värdet av att använda långsiktiga övervakningsdata om hälsostatus hos indikatorarter för att integrera kemiska och biologiska kriterier i arbetet med havsmiljödirektivet (MSFD). Utöver att främja implementeringen av ReproIND över Östersjöns miljögradienter stödjer detta integrerade tillvägagångssätt även de pågående översynerna av övervaknings- och bedömningsstrategier för biologiska effekter, både nationellt (SEPA/HaV) och internationellt (HELCOM MORE, ICES, och OSPAR).

English summary

Pollution in marine environments, such as the Baltic Sea, poses significant challenges to ecosystem health. Moreover, environmental variability related to temperature, salinity, or nutrient levels can alter the bioavailability and toxicity of chemical contaminants, leading to modified biological responses and influencing the effectiveness of environmental assessments. However, risk assessments are not equipped to consider the cumulative effects of contaminant mixtures and various environmental factors, failing to capture the full impact of real-world exposures. This gap was addressed in INSERT by investigating composite toxicity potential indices for non-polar hydrophobic organic contaminants (chemical activity) and trace metals (pollution load index; PLI) as dose metrics to evaluate the mixture effects of organic contaminants in environmental exposures and considering variable nonchemical conditions.

We focused on three main activities. First, we investigated the cumulative impact of chemical and nonchemical stressors on biological responses in standard ecotoxicological test systems. These experiments combined chemical activity with relevant stressors to enhance our understanding of their biological effects. Second, we applied the composite toxicity potential indices to ReproIND (*Reproductive aberrations in amphipods*), an indicator for the holistic assessment of the Baltic Sea health in the context of MSFD implementation. This involved refining the GES targets by integrating chemical activity and PLI with regionally specific environmental variables to ensure that these targets accurately reflect the unique conditions and stressors in the Baltic Sea. Third, we engaged with expert groups and projects involved in HELCOM-guided biological effect assessments and collaborated with OSPAR experts.

In addition to the scientific findings, our study resulted in several key recommendations to enhance the practical value of contaminant screening surveys, monitoring and status assessment in the Baltic Sea, both nationally and internationally. We also demonstrated the value of using long-term monitoring data on the health status of sentinel species to integrate chemical and biological criteria for MSFD. In addition to advancing ReproIND implementation across the environmental gradients of the Baltic Sea, this integrated approach supports ongoing revisions of monitoring and assessment strategies for biological effects both nationally (SEPA/HaV) and internationally (HELCOM MORE, ICES, OSPAR).

1. Introduktion

EU:s marina strategi för havsmiljön, Marine Strategy Framework Directive (MSFD), kräver en systematisk bedömning av miljöstatusen i Europas regionala havsområden för att säkerställa att god miljöstatus (GES) uppnås och bibehålls. Detta arbete omfattar utveckling och användning av olika verktyg för att definiera, mäta och följa upp GES-mål, med särskilt fokus på Deskriptor 8 (D8), som behandlar effekter av miljögifter i marina ekosystem. Enligt direktivet ska medlemsstaterna visa att halterna av föroreningar inte leder till oacceptabla föroreningseffekter. I praktiken baseras dock bedömningen av miljökvalitet i huvudsak på kemiska indikatorer (D8.1), medan biologiska effektindikatorer (D8.2), som speglar den faktiska belastningen av föroreningar i ekosystemen, används i betydligt mindre utsträckning.

Indikatorer är en förenkling av komplexa ekologiska processer och används för att bedöma ekosystemens tillstånd samt för att formulera och pröva hypoteser om föroreningars effekter. För att vara ändamålsenliga i miljöförvaltningen behöver indikatorer ge en praktiskt användbar bild av hur miljöstressorer påverkar biologiska system. Även om indikatorer endast fångar delar av underliggande ekologiska processer är det avgörande att de på ett tillförlitligt sätt återspeglar ekologiskt relevanta tillstånd, så att de kan användas som stöd för effektiva förvaltningsåtgärder.

1.1 Vidareutveckling av miljöbedömningar med kemisk aktivitet som exponeringsmått

Vitmärslor är väletablerade sentinelarter inom miljöövervakning, bland annat på grund av deras vida utbredning och deras representation av olika ekologiska grupper, såsom sedimentlevande, litoral- och nektoniska arter. Analys av embryonala missbildningar som metod för att bedöma reproduktions- och utvecklingstoxicitet etablerades 1994 (Sundelin och Eriksson, 1998), vilket understryker betydelsen av att övervaka reproduktiva och utvecklingsrelaterade effekter av exponering för miljögifter för att uppnå ekologiskt meningsfulla bedömningar i komplexa föroreningssituationer.

ReproIND, en indikator baserad på embryonala missbildningar hos vitmärslor (HELCOM, 2023a), är en av få tillgängliga indikatorer för bedömning av biologiska effekter i regionen. Indikatorn infördes först inom det svenska nationella marina miljöövervakningsprogrammet och antogs därefter av HELCOM. ReproIND har nyligen rekommenderats av expertgruppen SGEFF (*Study Group on developing new guidelines for the monitoring of biological Effects of contaminants*; HELCOM-OSPAR) som stöd för biologisk effektövervakning inom ramen för MSFD. Indikatorn utgör därmed en integrerad del av de samlade bedömningarna av Östersjöns miljötillstånd (HELCOM, 2023b, 2018) och har använts i bedömningscyklerna HOLAS II (2011–2016) och HOLAS III (2016–2021).

Exponering för miljöföroreningar sker i form av kemiska blandningar och i samspel med miljöfaktorer såsom temperatur, salthalt och syrehalt, vilket leder

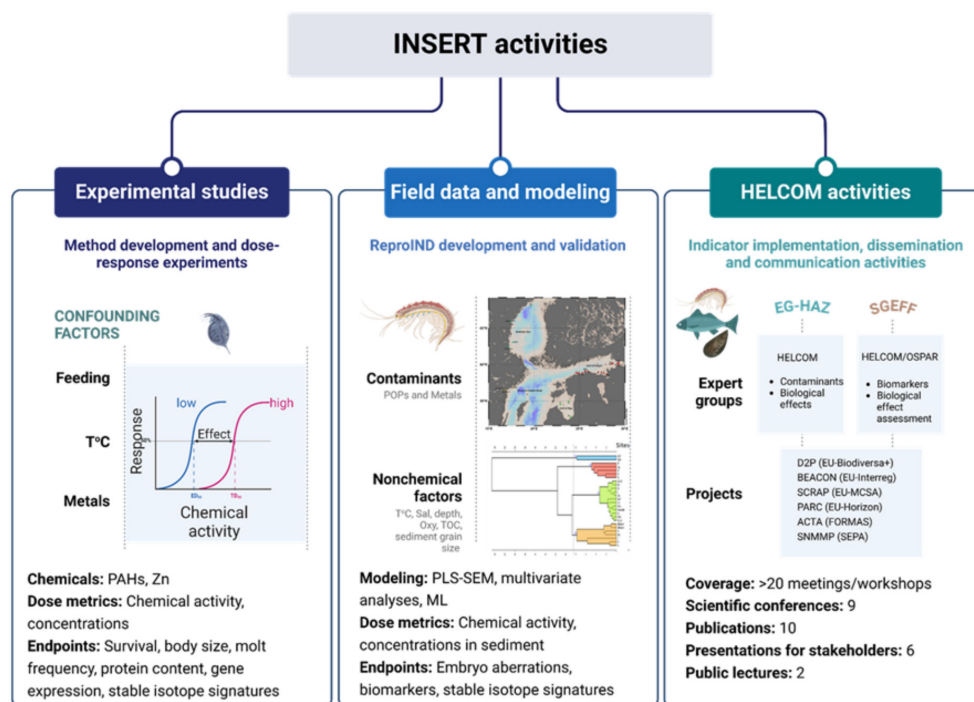
till komplexa effekter som ofta förbises i traditionella riskbedömningar. Trots att det finns etablerade ramverk för bedömning av blandningseffekter i akvatiska miljöer (Holmes *et al.*, 2018; Redman *et al.*, 2017) begränsas deras breda tillämpning av blandningarnas komplexitet, brist på mekanistiska data, regulatoriska begränsningar samt osäkerheter i prediktion av kumulativa effekter (Beyer *et al.*, 2014). Därtill baseras de flesta bedömningar främst på kemiska data, med begränsad integrering av biologiska effekter, vilket försvårar en ändamålsenlig tillämpning av Deskriptor 8 inom MSFD och tydliggör behovet av habitatklassificering med målvärden som baseras på kombinerade kemiska och biologiska kriterier.

För att särskilja effekter av miljögifter från påverkan av andra stressorer krävs både fältstudier och experimentell forskning. Genom att identifiera störfaktorer kan modeller utvecklas som särskiljer kemiska från icke-kemiska orsaker till biologiska effekter, såsom embryonala avvikelser. Detta angreppssätt bidrar till en tydligare tolkning av förorenings effekter och ger ett förbättrat beslutsunderlag för miljöförvaltning. Integrering av toxikologiska exponeringsindex, såsom Toxic Units (TU), Toxic Equivalency Quotient (TEQ) och Hazard Index (HI), stärker exponeringsbedömningen och förbättrar förståelsen av kumulativ toxicitet i komplexa miljöer (Swain, 2024; Van den Berg *et al.*, 1998; Warne, 2003).

Kemisk aktivitet är ett framväxande mått inom miljötoxikologin som erbjuder ett enhetligt angreppssätt för att bedöma påverkan av kemiska föroreningar på ekosystem (Gobas *et al.*, 2018). Till skillnad från koncentrationsbaserade bedömningar, som fokuserar på enskilda ämnen, integrerar kemisk aktivitet den samlade effekten av flera substanser genom att kvantifiera deras gemensamma toxikologiska potential. Måttet beaktar baslinjetoxicitet orsakad av neutrala organiska ämnen vid låga koncentrationer och återspeglar deras samlade påverkan på biologiska system. Kemisk aktivitet är särskilt värdefull för att bedöma blandningstoxicitet och för att identifiera överskjutande toxicitet, det vill säga specifik toxicitet som inte orsakas av narkos, och som inte alltid framgår av enskilda koncentrationsmätningar (Mackay *et al.*, 2011). Trots dessa fördelar och den starka teoretiska grunden har kemisk aktivitet ännu inte fått ett praktiskt genomslag i bedömningar av förorenings effekter, som fortfarande huvudsakligen baseras på koncentrationsmätningar av utvalda ämnen. Inom INSERT undersöktes därför hur kemisk aktivitet, som representerar den toxikologiska potentialen hos opolära hydrofoba organiska föroreningar, kan integreras i befintliga riskbedömningsramar för att bättre koppla exponeringsrisker till biologiska effekter.

1.2 Projektaktiviteter

INSERT visade på kunskapsluckor rörande kumulativa effekter i Östersjöns sediment genom att använda kemisk aktivitet som dosmått för hydrofoba organiska föroreningar (HOCs). Med tanke på metallers betydelse som miljögifter inkluderades även samverkande effekter av exponering för HOCs och metaller. Dessa effekter analyserades med hjälp av kemisk aktivitet och antingen exponering för enskilda metaller i experimentella studier eller Pollution Load Index (PLI; Tomlinson *et al.*, 1980) i sediment i fältstudier, som prediktorer för biologiska effekter. Genom att integrera kemiska och icke-kemiska stressorer vidareutvecklades ReproIND för en mer heltäckande bedömning av förorenings effekter i Östersjön (Figur 1).



Figur 1. Översikt över INSERT-projektets angreppssätt för integrerad bedömning av förorenings-effekter i Östersjön, där kemisk aktivitet, metallbelastning och icke-kemiska miljöfaktorer kombineras för vidareutveckling av ReproIND som biologisk effektkindikator.

Arbetet inom INSERT strukturerades enligt följande:

- **Explorativa laboratoriestudier** genomfördes med daphnier, chironomider och daggmaskar, vilka är etablerade testorganismer inom ekotoxikologi. Deras känslighet för föroreningar, korta livscyklar, väletablerade testprotokoll och experimentell flexibilitet möjliggjorde kontrollerade studier av interaktioner mellan kemikalier och andra stressfaktorer.
- **Validering och vidareutveckling av ReproIND** genomfördes för tillämpning inom MSFD genom integrering av sammansatta kemiska exponeringsindex (kemisk aktivitet för HOCs och PLI för metaller) samt icke-kemiska faktorer (såsom temperatur, salthalt och andra miljövariabler). Fältdata från vitmärkla i Östersjön kombinerades med avancerad statistisk modellering för att kvantifiera dessa samband. Baserat på resultaten togs rekommendationer fram för förbättring av ReproIND samt ett angreppssätt för integrerad bedömning av kemisk exponering och biologiska effekter.
- **Samarbete med HELCOM, OSPAR och nationella forskningsprojekt** etablerades för att bidra till utvecklingen av övervakning av biologiska effekter och till implementeringen av ReproIND i Östersjön. Dessa insatser har varit centrala för att konceptualisera hur icke-kemiska faktorer kan beaktas vid fastställande av GES-värden och därmed stärka HELCOM-ledd övervakning av biologiska effekter i Östersjön.

1.3 Övergripande hypoteser och mål

Det övergripande syftet med INSERT var att förbättra bedömningen av kumulativa effekter och miljöstatus i Östersjön genom integrering av kemiska och biologiska mått. Projektet utgick från ett antal hypoteser (H1–H3) som prövar användbarheten hos sammansatta toxicitetsindex, vidareutvecklar ReproIND som biologisk effektindikator samt utvärderar betydelsen av icke-kemiska miljöfaktorer. De tillhörande målen (O1–O5) adresserar dessa hypoteser genom riktade laboratorie- och fältstudier, utveckling av robusta diagnostiska verktyg, samverkan med relevanta aktörer samt framtagande av praktiskt tillämpbara rekommendationer för miljöövervakning.

Hypoteser

- **H1: Sammansatta toxicitetsindex och biologiska effekter**
Kemisk aktivitet och skattningar av Pollution Load Index (PLI) ger ett tillräckligt mått på den samlade toxikologiska potentialen hos kemiska blandningar. Kemisk aktivitet fångar effektivt baslinjetoxicitet (narkos) och möjliggör identifiering av fall av överskjutande toxicitet (specifik toxicitet).
- **H2: Revidering av ReproIND**
När ReproIND integreras med skattningar av kemisk aktivitet och justeras för betydelsefulla miljövariabler ger indikatorn en mer träffsäker bedömning av utvecklingstoxicitet hos vitmärkla och förbättrar klassificeringen av miljöstatus med avseende på kemisk exponering, inklusive bedömning av GES.
- **H3: Icke-kemiska faktorer**
Miljöfaktorer såsom temperatur, salthalt och näringsrelaterade variabler påverkar i betydande grad de biologiska responser som observeras hos testorganismer, vilket motiverar att dessa faktorer integreras i miljöbedömningar för att förfinas GES-värden.

Syften

- **O1: Utvärdera kemisk aktivitet som dosmått i ekotoxikologiska tester**
Undersöka tillämpbarheten och precisionen hos kemisk aktivitet för att bedöma den samlade toxiciteten hos blandningar av hydrofoba organiska föroreningar i vatten- och sedimentbaserade tester. Relevanta ämnen för dessa blandningar valdes ut baserat på praktiska överväganden och på föroreningsdata från fältstudierna.
- **O2: Identifiera betydelsefulla icke-kemiska faktorer**
Genomföra laboratorie- och fältstudier för att identifiera hur icke-kemiska faktorer påverkar biologiska responser relaterade till tillväxt och reproduktion samt kvantifiera deras betydelse. Fältobservationer av vitmärkla från olika bassänger användes för att maximera variationen i miljögradienter i de statistiska modellerna. Robust statistisk diagnostik utvecklades för att skilja mellan kemiska och icke-kemiska drivkrafter bakom embryonala missbildningar och därigenom möjliggöra en mer precis tillskrivning av biologiska effekter till föroreningar in situ.
- **O3: Förfinas ReproIND:s målvärden**
Validera och vidareutveckla befintliga GES-målvärden för ReproIND (det vill säga acceptabla bakgrunds nivåer för andelen missbildade embryon i popula-

tionen samt andelen honor med missbildade embryon) inom ramen för MSFD genom att integrera kemisk aktivitet, PLI och regionspecifika miljövariabler.

- **O4: Samverkan med intressenter**

Samverka med HELCOM, OSPAR och nationella forskningsprojekt inom bedömning av föroreningar och biologiska effekter för att integrera resultaten från INSERT i befintliga riskbedömningsramar. Bidra till revidering och implementering av GES-målvärden samt främja integrering av kemiska och biologiska effektkomponenter inom Deskriptor 8.

- **O5: Förbättra effektbaserad övervakning av miljögifter i Östersjön**

Ta fram praktiskt användbara rekommendationer för utformning och vidareutveckling av övervakningsprogram för biologiska effekter av miljögifter, med fokus på effektiv integrering av kemiska och icke-kemiska parametrar i övervakningen.

2. Material och metoder

I projektet undersöktes kemisk aktivitet systematiskt som exponeringsmått för att bedöma hur föroreningar påverkar biologiska responser vid exponering för kemiska blandningar. Metodutveckling kombinerades med experimentella studier och fältbaserade analyser med varierande försöks- och provtagningsdesign. Metoderna omfattade följande komponenter:

- **Laboratoriestudier** där biologiska responser hos etablerade testorganismer (daphnier, chironomider och daggmaskar; Tabell 1) identifierades vid kemikalieexponering. Studierna utvärderade även störfaktorer som påverkar dessa responser och utvecklade statistiska modeller för att kvantifiera den relativa betydelsen av viktiga prediktorer för observerade effekter. Experimentella system med passiv dosering (vattenburen exponering) utvecklades för dos-respons-studier av HOC-blandningar med användning av klimatkontrollerade kammare för att reglera exponeringsförhållanden och laboratoriekulturer. Dessa studier utvärderade effekter av kemisk aktivitet under både kemiska (samexponering för zink) och icke-kemiska (näring, temperatur) störfaktorer. Noggranna åtgärder vidtogs för att mäta exponeringsnivåer och säkerställa experimentens integritet och noggrannhet.
- **Fältstudier** där ReproIND-indikatorn (embryonala missbildningar hos vitmärkla och frekvensen av påverkade honor) utvärderades med data från *Mono-poreia affinis* insamlade i Östersjön (Bottniska viken, Bottniska havet, Norra egentliga Östersjön, Västra Gotlandsbassängen, Rigabukten och Finska viken). Ytterligare data hämtades från publicerade studier och öppna databaser (ICES DOME, SHARKweb, GitHub). Maskininlärning användes för att analysera samverkande effekter av kemikalier och miljöfaktorer (temperatur, salthalt, syre, sediment), med syfte att förfinas klassificering av miljöstatus (GES), förbättra diagnostik av föroreningspåverkan och öka förståelsen för betydelsen av icke-kemiska stressfaktorer.

Tabell 1. Översikt över test-/målorganismer, experimentella faktorer och variabler som användes i de experimentella och fältbaserade studierna. Motsvarande mål (O1–O4, se ovan) anges för varje aktivitet.

Aktivitet, mål	Exponering, kemikalier	Icke-kemiska faktorer	Test-organism	Effektmått
Experimentella studier (O1 och O2)	PAH-blandning, zink	Utfodring, temperatur	<i>Daphnia magna</i>	Överlevnad, kroppsstorlek, tillväxt, genuttryck, stabil isotopsignatur ($\delta^{13}\text{C}$)
Experimentella studier (O1)	PAH-blandning		<i>Lumbriculus variegatus</i> , <i>Chironomus riparius</i>	Upptag av PAHer, relativ tillväxt
Fältstudier, bassängspecifika effekter av enskilda föroreningar och icke-kemiska faktorer (O2)	Olika persistenta organiska föroreningar (POP), spårmetaller	Temperatur, salthalt, syrehalt, botten djup, TOC, klorofyll, sedimentets partikelstorlek	<i>Monoporeia affinis</i>	Fekunditet, embryomissbildningar, kroppsstorlek, genetisk diversitet, $\delta^{13}\text{C}$, populationsstorlek
Fältstudier, beslutsträdsmodellering (O3)	Kemisk aktivitet (baserad på PAHer), metallbelastningsindex (baserat på spårmetallhalter)	Temperatur, salthalt, syrehalt, botten djup, TOC	ReproIND baserad på <i>Monoporeia affinis</i>	GES-status baserad på frekvens av embryonala missbildningar

2.1 Experimentella metoder

2.1.1 Dosmått och kemikalier

Hydrofoba organiska föroreningar, som PAHer, löser sig företrädesvis i opolära miljöer som lipider, vilket betyder att de ackumuleras i fettvävnad och fosfolipidernas membranlager. Narkos uppstår då orsakad av icke-specifik störning av den riktiga (korrekta) funktionen hos cellmembranen (i allmänhet betraktad som platsen för toxisk aktivitet). Rapporterade data och teoretiska överväganden som relaterar toxiciteten hos opolära narkotiska föreningar till logaritmen av oktanolvatten-fördelningskoefficienten (K_{ow}) har använts för att definiera målintervallet för basal toxicitet.

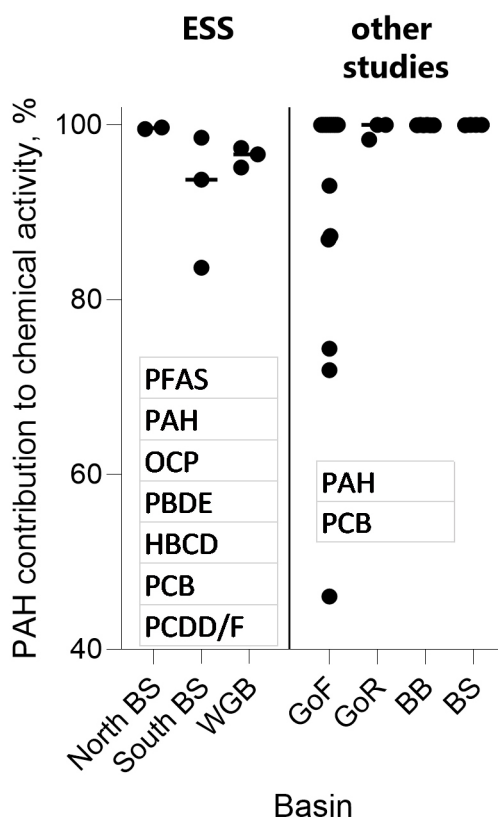
Kemisk (eller termodynamisk) aktivitet är ett dimensionslöst mått på hur ”aktiv” en kemikalie är inom en specifik fas, till exempel i lipider. Den representerar förhållandet mellan kemikalins koncentration (eller partiella tryck) i fasen och dess mättnadspunkt i samma fas. Kemisk aktivitet är additiv för neutrala kemikalier, vilket gör den till ett användbart mått för att bedöma effekten av blandningar av hydrofoba kemikalier (Gobas et al., 2018). Aktiviteter i intervallet 0,01–0,1 är mest relevanta för studier av blandningstoxicitet där narkos är den primära verkningsmekanismen. På dessa nivåer är kemikalierna inte fullständigt mättade i lipider, men är tillräckligt koncentrerade för att tillsammans framkalla narkotiska effekter (Gobas et al., 2018).

Baserat på fältdata över föroreningshalter valdes PAHer som representativa HOCs för de experimentella studierna. Eftersom experiment baserade på kemisk aktivitet fokuserar på den samlade aktiviteten snarare än identiteten hos enskilda ämnen användes en konsekvent blandning av fyra PAHer (acenaften, fluoren,

fluoranten och fenantren) i samtliga experiment. Alla kemikalier höll hög renhet ($\geq 98\%$) och preparerades enligt tidigare publicerade metoder (Abel et al., 2024; Steigerwald et al., 2024).

PAH- och metallhalter rapporterades för samtliga fältstationer med Repro-IND-data (Figur 2). Endast data från "Effect Screening Study" (Förlin et al., 2019; Gorokhova et al., 2023) innehöll ett brett urval av HOCs, medan de övriga studierna (Kolesova et al., 2024; Löf et al., 2016) enbart rapporterade PAHer och PCBer. För att säkerställa jämförbarhet beräknades kemisk aktivitet därför enbart baserat på PAHer, med beaktande av att detta kan innebära en underskattning till följd av uteslutna HOCs.

För att utvärdera denna potentiella underskattning och bedöma PAHers bidrag till den totala kemiska aktiviteten analyserades fördelningen av kemisk aktivitet med hjälp av det mest omfattande multi-HOC-datasetet (Figur 2). Analysen visade att PAHer i regel stod för mer än 90 % av den totala kemiska aktiviteten (median 93,2 %; 95 %-konfidensintervall: 82,3–98,1 %). Ett tydligt undantag var Finska viken, där PCBer bidrog i betydande grad ($> 50\%$). Sammantaget bedöms de PAH-baserade aktivitetsvärdena vara representativa för HOC-belastningen i sediment.



Figur 2. Fördelning av kemisk aktivitet baserad på hydrofoba organiska föroreningar (HOCs) i sediment från olika delbassänger i Östersjön. Analysen visar PAHers relativa bidrag till den totala kemiska aktiviteten.

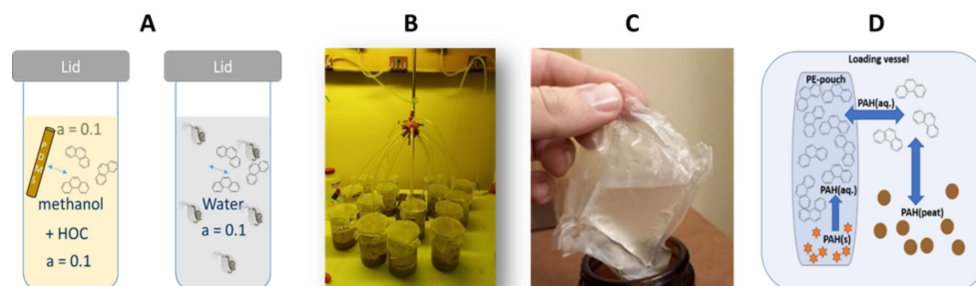
2.1.2 Testorganismer

Daphnia magna (klon 5, Berlin, Tyskland) användes i akuta tester. Kulturer (~ 10–15 individer/L) hölls i M7-medium och utfodrades med en blandning av grönalger odlade enligt OECD:s riktlinjer (OECD, 2004). Mediet byttes veckovis och kulturerna hölls vid $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ samt i en ljus-mörk-cykel på 16L:8D.

Vid kroniska sediment-vatten-exponeringar användes daggmasken *Lumbriculus variegatus* och fjädermygglarven *Chironomus riparius*, vilka båda är etablerade testarter för sedimentbaserade tester (OECD, 2023, 2007). Kulturerna erhöles genom samarbete med Joensuu universitet, Finland.

2.1.3 Exponeringssystem

Två exponeringssystem vidareutvecklades och användes för att representera olika miljökontexter där PAHer förekommer (Figur 3). Det vattenburna exponeringssystemet återskapar förhållanden i akvatiska miljöer för att studera PAHers toxicitet och biotillgänglighet i vatten. Sedimentexponeringssystemet simulerar ackumulering av PAHer i sediment och möjliggör stabila föroreningsnivåer i försökskäril där sedimentet utgör den primära källan till kemisk aktivitet. I båda systemen var målintervallet för kemisk aktivitet 0,01–0,1, och PAH-halter i exponeringsmediet verifierades med HPLC-PDA. Resultaten omvandlades till temperaturkorrigerade kemiska aktiviteter och användes i dos-respons-analysen.



Figur 3. Exponeringssystem som användes i de experimentella studierna: (A) vattenburen exponering med passiv dosering, (B) sedimentbaserad exponering enligt OECD, samt (C–D) kemisk aktivitetsbaserad laddning av sediment genom mättnad av torv med PAHer

- **Vattenburen exponering.** Passiv dosering är en metod inom akvatisk toxikologi som används för att upprätthålla stabila koncentrationer av hydrofoba organiska ämnen i vatten (Figur 3A). Metoden är särskilt lämpad för studier av HOCs och andra svårslösliga ämnen (Smith och Jeong, 2021). En stamlösning användes för att bereda laddningslösningar till passiva donatorer (silikonstavar) för att upprätthålla stabil exponering för PAH-blandningen vid fem nivåer av total kemisk aktivitet. Silikonstavarna rengjordes noggrant, mättnades i metanolösning och jämviktades därefter med exponeringsmediet.
- **Sedimentexponering.** Konstgjort sediment bereddes och laddades enligt OECD 218 och 225 med kvartssand (Figur 3B). Daggmaskar (*Lumbriculus variegatus*) och chironomider (*Chironomus riparius*) exponerades för en gradient av kemisk aktivitet (0,01–0,12) under 28 respektive 12 dagar, i enlighet med OECD:s rikt-

linjer. Föda till daggmaskarna (*Urtica* sp.-pulver) blandades i sedimentet före försöket, medan fiskfoder tillfördes tre gånger per vecka för chironomiderna. Exponeringen verifierades genom mätning av den biotillgängliga fraktionen av PAHer i sedimentet med den s.k. coated jar-metoden (Jahnke et al., 2014), varefter halterna omvandlades till kemisk aktivitet.

- *Kemisk aktivitetsbaserad laddning av sediment* (Abel et al., 2024). En metod för kemisk aktivitetsbaserad laddning av HOCs i konstgjort sediment utvecklades genom mätning av torv med PAHer (Figur 3C, D). Polyetenpåsar fyllda med PAH-kristaller och vatten placerades i kärl med en torv-vatten-blandning (Figur 3C) för att mätta torven (Figur 3D). Kärnen provtogs regelbundet och kemisk aktivitet beräknades. Jämvikt uppnåddes inom 5–17 veckor beroende på PAHernas kinetik. Det önskade aktivitetsintervallet i sedimentet justerades genom att blanda laddad och ren torv. På grund av tidsbegränsningar kunde sedimentexponeringen dock inte användas för tester av kumulativa effekter.

2.1.4 Utvärderade kumulativa effekter och testfaktorer

Kumulativa effekter i kontrollerade experimentella system utvärderades med vattenburen exponering och *Daphnia magna* som testorganism. Följande effekter undersöktes:

- *Näringsstatus*. Näringsstatus hos nyfödda daphnier manipulerades genom utfodring eller svält före exponering för att bedöma dess inverkan på toxicitetsdos. OECD-testet genomfördes med immobilisering, individuellt proteininnehåll och tillväxt som effektmått. Dessa mättes efter 72 timmars PAH-exponering samt efter en 48-timmars återhämtningsperiod med föda i rent medium (Saladin, 2023; Steigerwald et al., 2024).
- *Temperatur*. Nästan alla fysiologiska funktioner är temperaturberoende. Dessutom kan effekten av ett ämne vid en given kemisk aktivitet variera med temperaturen, eftersom ökad temperatur påverkar löslighet, volatilitet och diffusion genom cellmembran, vilket förändrar ämnets fördelning mellan vatten, membran och intracellulära lipider. För att särskilja termisk stress i sig från temperaturinducerad toxicitet användes en kombination av grad-dagar (degree-days, DD; proxy för fysiologisk ålder) och temperaturkorrigering av kemisk aktivitet. Daphnier exponerades för den narkotiska aktivitetsnivån under 3 DD vid 20 °C (72 h) och 25 °C (72 respektive 60 h). Immobilisering och individuellt proteininnehåll användes som effektmått.
- *Kombinerad exponering för PAHer och metaller*. Kombinationer av PAH/zink, endast PAH samt endast zink applicerades under 72 timmar med immobilisering och individuellt proteininnehåll som effektmått. Hela det narkotiska aktivitetsintervallet användes tillsammans med två nivåer av zinkexponering (nominella koncentrationer på 1 och 2 mg/L) i PAH- och PAH/zink-behandlingarna.

2.2 Fältstudier

Projektet inleddes med tre studier (Gorokhova *et al.*, 2024; Kolesova *et al.*, 2024; Raymond *et al.*, 2021) som undersökte dessa samband på olika skalor och i olika regioner. Ett gemensamt övergripande mål var att identifiera de huvudsakliga drivkrafterna bakom reproduktionsstörningar och/eller populationsförekomst hos vitmärsla, med fokus på föroreningar och miljöfaktorer.

Vidare sammanställdes data från dessa och andra relevanta studier genomförda tidigare (Löf *et al.*, 2016) eller inom andra projekt (Gorokhova *et al.*, 2023; Martella *et al.*, 2023). Saknade data för abiotiska faktorer hämtades från öppna databaser (ICES DOME; <https://dome.ices.dk/datsu/>; reproduktionsframgång hos vitmärsla) och SHARKweb (<https://sharkweb.smhi.se/hamta-data/>; abiotiska parametrar). Även ett antal internationella forskningsprojekt bidrog med data (Tabell 2). Det sammanslagna datamaterialet användes därefter i en modelleringsstudie (Gorokhova, 2024) för att identifiera associationsregler och tröskelvärden i syfte att förfinas GES-målvärden baserat på ReproIND, kemiska belastningar och abiotiska miljövariabler i flera bassänger (Bottniska viken, Bottniska havet, Västra Gotlandsbassängen samt Finska viken och Rigabukten). De primära data som användes i modellen sammanfattas i Bilaga I och är publikt tillgängliga via Zenodo (DOI: 10.5281/zenodo.17357254).

De biologiska effektdata omfattade reproduktiva missbildningar hos *M. affinis* (två ReproIND-komponenter: frekvensen av missbildade embryon i populationen samt frekvensen av honor med missbildade embryon; (HELCOM, 2023a)). Metoderna för dessa analyser beskrivs i tidigare publikationer (Löf *et al.*, 2016; Sundelin och Eriksson, 1998).

Kemisk aktivitet beräknades med Frank Gobas kalkylator [<https://www.sfu.ca/rem/toxicology/our-models/activity-calculator.html>] baserat på PAH-halter rapporterade i originalstudierna (NAP, ACNE, FLE, PA, ANT, FLU, PYR, BAA, CHR, BBF, BKF, BAP, DBAHA, BGHIP och ICDP). Sedimentets TOC sattes till 2 % och temperaturen till 10 °C i beräkningarna.

Pollution Load Index (PLI) för metaller (Tomlinson *et al.*, 1980) beräknades som ett geometriskt medelvärde av kontaminationsfaktorer och användes som proxy för metalltoxicitet i sediment för de nio metaller som konsekvent rapporterades i källdataseten (As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb och Zn). För PLI-beräkningarna användes regionala referensvärden för metaller i sediment (SEPA, 1999).

De miljövariabler (temperatur, salthalt, syrehalt, TOC och bottendjup) som användes i de statistiska modellerna härleddes från källdataseten. I de fall där någon variabel saknades hämtades den från SHARKweb eller extraherades från Data Assimilation System (DAS; (Sokolov *et al.*, 1997)) genom linjär interpolation eller extrapolation. DAS är ett program som konstruerar ett tredimensionellt rutnät av hydrografiska och kemiska övervakningsdata från samtliga Östersjöländer. Miljödata extraherades för relevant år (året före insamling av *M. affinis*) genom interpolation/extrapolation av uppmätta värden med upplösningar på 1 nautisk mil i nordsydlig riktning och 2 nautiska mil i öst-västlig riktning.

Tabell 2. Översikt över datakällor och projekt som användes för att sammanställa data om miljöföreningar, miljöfaktorer och ReproIND-komponenter (frekvens av embryonala missbildningar i populationen av vitmärta (*Monoporeia affinis*) samt frekvens av honor med embryonala missbildningar).

Publikation	Bassäng	Exponering	Miljövariabler	Projekt
(Löf et al., 2016)	Bottenviken, Bottenhavet	Metaller, PAH, PCB	Temperatur, bottendjup, salthalt, syrehalt, TOC	BEAST-projektet, gemensamt finansierat av BONUS+-programmet (FP7/2007–2013, bidragsavtal 217246) och NV;
(Förlin et al., 2019; Gorokhova et al., 2023)	Bottenviken, Bottenhavet, Västra Gotlandsbassängen	Metaller, PAH, PCB, PCDD/F, PFAS, OCP, HBCD, BT, PBDE	Temperatur, bottendjup, salthalt, syrehalt, TOC, sedimentets partikelstorlek	Effektscreening studie, NV; 2018–2020
(Raymond et al., 2021)	Bottenhavet, Västra Gotlandsbassängen	Metaller, PAH	Temperatur, bottendjup, salthalt, syrehalt, TOC	King Carl XVI 50-year Foundation for Science, Technology and Environment; projekten ReproIND (FORMAS; 2017-00864) och INSERT (NV)
(Martella et al., 2023)	Bottenhavet, Västra Gotlandsbassängen	Metaller, PAH	Temperatur, bottendjup, salthalt	ReproIND (FORMAS; 2017-00864) och AmphiDNA (FORMAS; 2019-01157)
(Kolesova et al., 2024; Strode et al., 2017),	Finska viken, Rigabukten, Bottenhavet	Metaller, PAH, PCB, BT	Temperatur, bottendjup, salthalt, syrehalt, TOC, sedimentets partikelstorlek	Flera projekt, inklusive BEACON (Interreg Baltic Sea Region, medfinansierat av EU; S007 10/2022–10/2024) och D2P (Biodiversa+; 2021-473).

2.3 Statistisk modellering

Univariata och multivariata metoder användes för att undersöka samband mellan variabler och identifiera källor till variation. I de experimentella studierna utgjorde dos-respons-analys det huvudsakliga verktyget för att analysera exponeringsrelaterade effekter. I både experimentella och fältbaserade studier användes dessutom regressionsbaserade metoder, i synnerhet generaliserade linjära modeller (GLM), samt multivariata tekniker (PERMANOVA, CAP och DistLM) för att identifiera signifikanta prediktorer.

Strukturell ekvationsmodellering (partial least squares SEM; PLS-SEM) användes för att analysera direkta och indirekta effekter mellan reproduktiv hälsa, sedimentföreningar, miljövariation, genetisk diversitet och näringsstatus hos *M. affinis* i Västra Gotlandsbassängen och Bottenhavet. Särskild vikt lades vid medieringen av föroreningseffekter via trofiska och genetiska populationsegenskaper på ReproIND, med GES-status som primär klassvariabel.

Slutligen användes beslutsträdsanalys (decision tree, DT), en maskininlärningsmetod, för att identifiera mönster i stora datamängder. Metoden är särskilt lämpad för att identifiera associationsregler och tröskelvärden, hantera multikollinearitet och små stickprov (vilket var fallet för detta datamaterial), samt ge tröskelvärdeskattningar för relevanta variabler (kemiska och miljömässiga) för att förfinas GES-målvärden.

2.3.1 Datatransformation, univariata tester och saknade data

Databearbetningen omfattade flera steg. Först rensades data från dubletter och inkonsekvenser korrigerades. Numeriska variabler standardiserades och extremvärden identifierades och transformerades eller exkluderades beroende på deras påverkan på analyserna. Datatransformationer, såsom logaritm- eller kvadratrotsomvandlingar, tillämpades vid behov för att uppfylla antaganden i de statistiska modellerna och förbättra tolkbarheten. För att hantera ett fåtal saknade föroreningsvärden i fältdataseten användes Expectation-Maximization-algoritmen (EM) i programvaran Primer 7.

2.3.2 Dos-respons analys

I dos-respons-analyserna användes kemisk aktivitet som dosmått. Till skillnad från koncentrationsbaserade angreppssätt ger kemisk aktivitet ett mått på andelen av ett ämnes potential att orsaka baslinjetoxicitet och beaktar de kombinerade effekterna av de fyra PAH-kongenerna i blandningen. Metoden möjliggjorde kvantifiering av PAH-blandningens toxicitet samt identifiering av eventuell specifik toxicitet, det vill säga responser som inte kan förklaras av narkos.

2.3.3 Multivariat modellering

Multivariata ordinationsmetoder användes i fältstudierna för att undersöka relationer mellan reproduktionsstörningar, föroreningar och miljöfaktorer. Hierarkisk klusteranalys (HCA) användes exempelvis för att gruppera lokaler med liknande föroreningsprofiler (Kolesova et al., 2024), med användning av euklidiskt avstånd och Wards metod för att förbättra klassificeringsnoggrannheten. Distansbaserad linjär modellering (DistLM) användes för att bedöma den relativa betydelsen av miljöfaktorer (sedimentets partikelstorleksfördelning, temperatur, syrehalt och TOC) och föroreningar för variation i biologiska responser hos vitmärkla (Raymond et al., 2021). Metoden baserades på en distansmatris för prediktorurval, med permutationer för att testa sambands signifikans.

2.3.4 PLS-SEM

PLS-SEM användes för att analysera samband mellan reproduktiv hälsa, sedimentföroreningar, miljövariation, genetisk diversitet och näringsstatus hos *Monoporeia affinis* i Västra Gotlandsbassängen och Bottenhavet. Metoden valdes eftersom den är väl lämpad för komplexa, prediktiva modeller med flera latenta variabler (LV) som inte kan mätas direkt och observerade variabler som används för att parametrisera dessa. PLS-SEM möjliggör samtidig analys av direkta och indirekta effekter i en och samma modell och hanterar effektivt små till medelstora stickprov samt data med icke-normal fördelning.

I modellen inkluderade de latenta variablerna frekvenser av embryonala missbildningar, isotopiska nischmått för resursutnyttjande (populationens trofiska status) samt nivåer av kemiska föroreningar (metaller, PAH-er och sammansatta index för potentiell toxicitet). Analysen beaktade även icke-kemiska faktorer såsom temperatur samt den potentiella rollen av genetisk diversitet (mtDNA-markörer) för variation i trofisk status och ReproIND (Gorokhova et al., 2024).

2.3.5 Beslutsträdsmodellering

Beslutsträdsanalys (DT) användes för att utvärdera sambanden mellan förorenings-exponering och ReproIND under varierande miljöförhållanden i Östersjön (Gorokhova, 2024). Metoden erbjuder flera fördelar för denna typ av analys, däribland förmågan att hantera icke-linjära interaktioner mellan variabler, vilket är centralt givet de komplexa sambanden mellan föroreningar och icke-kemiska miljöfaktorer såsom temperatur, salthalt och syrehalt. DT är även väl lämpad för analys av relativt små datamängder med både kategoriska och numeriska variabler, vilket var fallet för detta material (85 observationer). Metodens transparens möjliggör rangordning av centrala GES-drivkrafter och effekttrösklar kopplade till icke-GES-förhållanden, identifiering av tröskelvärden samt belysning av kritiska punkter där miljöbelastningar (kemisk aktivitet och PLI) leder till biologiska effekter och under vilka miljöförhållandenas (temperatur, djup och salthalt) effekter förstärks. Dessa egenskaper gjorde DT till ett ändamålsenligt verktyg för uppgiften och erbjöd ett pragmatiskt ramverk för bedömning och tolkning av miljödata.

3. Resultat

De experimentella och fältbaserade studierna gav samstämmiga belägg för att kemisk aktivitet driver biologiska responser vid både akuta och kroniska exponeringar. Vidare utvecklades och validerades en metod för kemisk aktivitetsbaserad laddning av sediment. Nedan presenteras resultaten i följande ordning:

- I avsnitt 5.1 redovisas de experimentella exponeringssystemen samt resultat som belyser hur störande faktorer (t.ex. födointag, temperatur och samexponering för metaller) påverkar dos-respons-samband vid PAH-exponering uttryckt som kemisk aktivitet hos etablerade testorganismer.
- I avsnitt 5.2 sammanfattas de föroreningar och abiotiska faktorer som påverkar ReproIND hos vilda populationer av vitmärsla (*Monoporeia affinis*) i olika bassänger.
- I avsnitt 5.3 presenteras resultaten från beslutsträdsmodellerna, inklusive associationsregler och tröskelvärden för betydelsefulla kemiska och icke-kemiska variabler kopplade till icke-GES-förhållanden, vilka utgör underlag för revidering av ReproIND.

3.1 Experimentella belägg för kemisk aktivitets lämplighet som dosmått

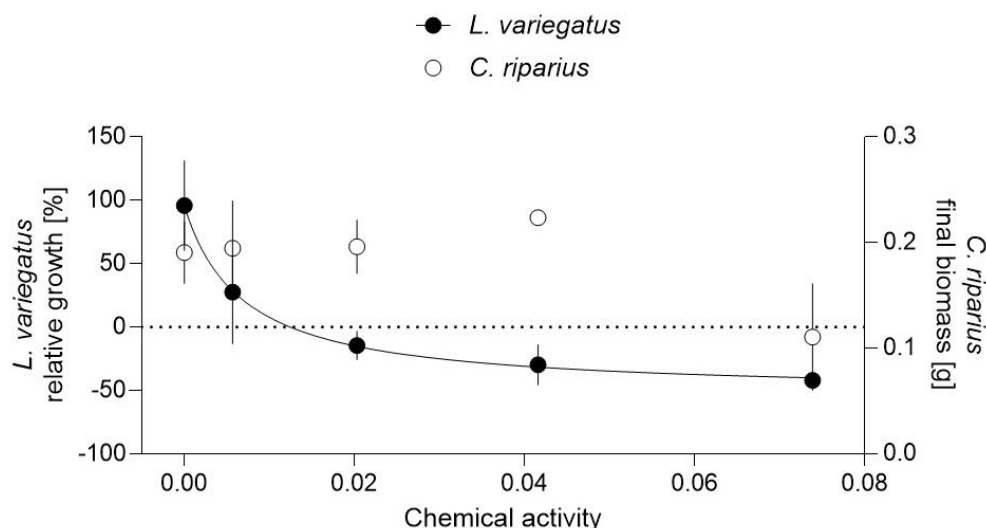
De experimentella studierna genererade dos-respons-data från tester genomförda enligt OECD:s riktlinjer där kemisk aktivitet användes som dosmått, vilket vidareutvecklar detta angreppssätt inom ekotoxikologi för hydrofoba organiska föroreningar (Saladin, 2023; Steigerwald *et al.*, 2024). De utvecklade och förfinade protokollen möjliggör även mer robusta experimentella designar och mer precis hypotesprövning när både kemiska och icke-kemiska variabler ingår. Sammantaget indikerar resultaten att befintliga standardriktlinjer kan behöva uppdateras för att bättre beakta variation i miljöfaktorer, så att toxicitetstester i högre grad kan förutsäga kombinerade effekter.

3.1.1 Experimentella system

Den föreslagna laddningsmetoden för sedimentexponering, baserad på kemisk aktivitet, möjliggör ökad stabilitet och bättre kontroll av exponeringsnivåer i experimentella studier och leder därmed till mer tillförlitliga dosuppskattningar (Abel *et al.*, 2024). Justeringar för temperatureffekter på kemikaliekoncentrationer och sorptionsdynamik har integrerats, och temperaturkorrigerade kemiska aktiviteter säkerställer realistiska exponeringsförhållanden (Oliveira dos Anjos *et al.*, 2023). Våra observationer visar dessutom på behovet av att beakta variation i torv- och sedimentegenskaper vid sedimenttoxicitetstester, eftersom nuvarande OECD-riktlinjer inte tar hänsyn till skillnader i kemisk aktivitet mellan olika typer av organiskt substrat (Arboleda, 2024). Detta är särskilt relevant i fall där exponeringsnivåer baseras på totalhalt i sediment snarare än på fritt lösta koncentrationer eller kemisk aktivitet. Sammantaget stärker dessa metodutvecklingar möjligheten att tillämpa ekologiskt relevanta exponeringsförhållanden i sedimenttoxicitetstester.

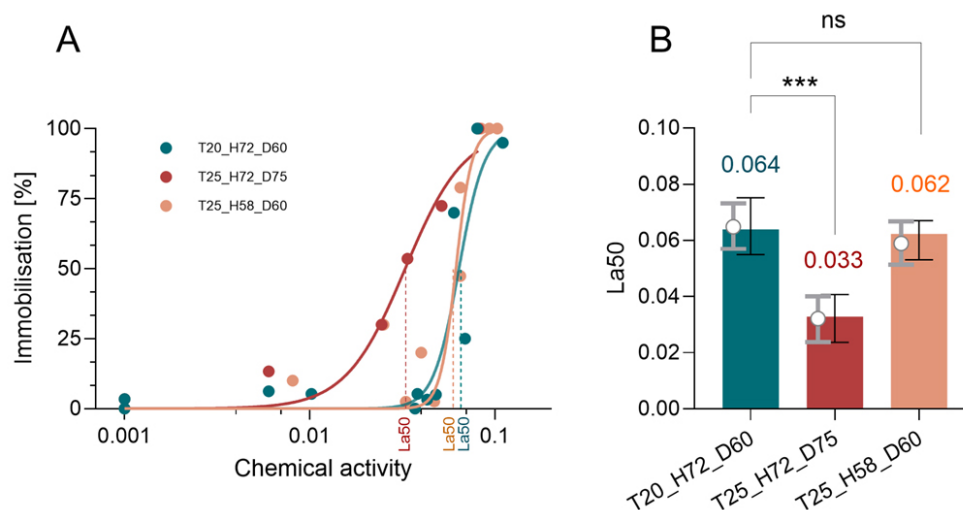
3.1.2 Kumulativa effekter vid akuta och kroniska exponeringar

- *Näringsstatus hos djur.* Näringsstatus hos nykläckta *Daphnia* påverkade i hög grad toxicitetsdosen för tillväxt, proteininnehåll och immobilisering. Svältade individer tolererade PAH-exponeringen avsevärt bättre, vilket återspeglades i signifikant högre La_{50} -värden (dvs. letal aktivitet för 50 % av de exponerade individerna). Dessutom uppvisade svältade individer en högre återhämtningsgrad (Saladin, 2023; Steigerwald *et al.*, 2024). Utfodringsregimen påverkade sannolikt även PAH-upptaget hos daggmaskar och chironomider vid sediment-exponering (Figur 4). Medan ackumuleringen var låg hos chironomider var den betydande hos daggmaskar. Detta upptagsmönster återspeglades även i tillväxten hos testorganismerna, där daggmaskarnas tillväxt minskade med ökande kemisk aktivitet (Ea_{50} , dvs. effektaktivitet för 50 % av de exponerade individerna, varierade mellan 0,01 och 0,07).



Figur 4. Tillväxtrespons hos daggmaskar och chironomider exponerade för sediment med varierande PAH-aktiviteter.

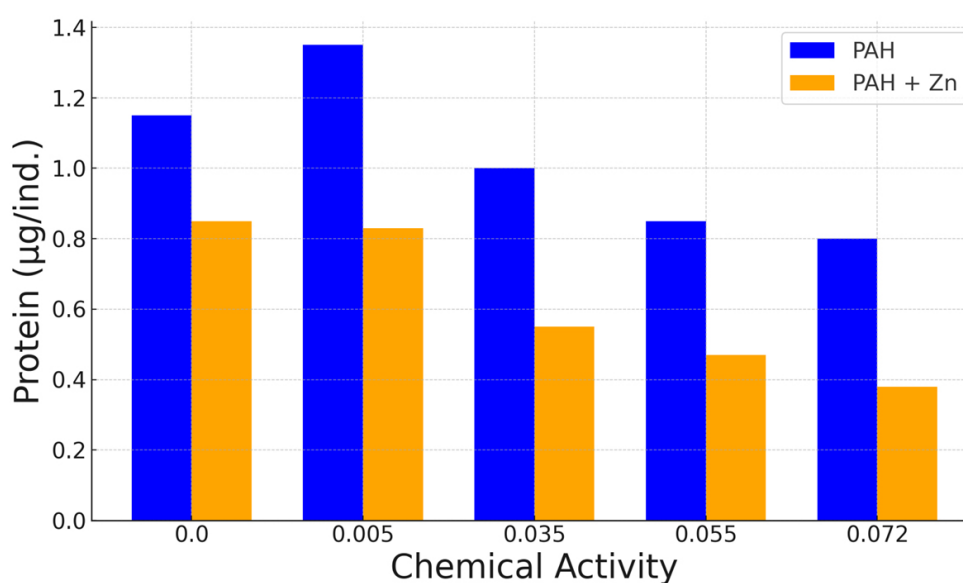
- *Temperatur.* Ingen signifikant interaktion mellan temperatur och dos påvisades. När exponeringstiden justerades till grad-dagar var skillnaden i La_{50} mellan temperaturerna inte signifikant (La_{50} : 0,061 jämfört med 0,068). När exponeringstiden i stället sattes till 72 timmar var La_{50} signifikant högre vid 25 °C än vid 20 °C (La_{50} : 0,035 jämfört med 0,068). Detta indikerar att den mer avancerade fysiologiska åldern hos daphnier vid den högre temperaturen, det vill säga en fysiologiskt längre exponeringstid, och inte en ökad toxicitet vid en given kemisk aktivitet, låg bakom den högre ”skenbara” toxiciteten vid högre temperatur.



Figur 5. Dos-respons-samband för immobilisering hos *Daphnia magna* (proxy för mortalitet) exponerade för en PAH-blandning inom intervallet för kemisk aktivitet 0,01–0,1.

(A). Daphnierna odlades vid antingen 20 °C eller 25 °C och exponerades för PAHer vid samma temperatur under tre grad-dagar. Vid 20 °C motsvarade detta 72 timmar (blå), och vid 25 °C 60 timmar. Därutöver exponerades daphnier från 25 °C-behandlingen för samma dosintervall under 72 timmar. (B) Median letal aktivitet (La_{50} ; medelvärde och 95 % konfidensintervall).

- Kombinerad exponering för PAHer och metaller.* Vid exponering för zink (Zn) vid 2 mg/L uppgick immobiliseringen till nära 80 % i behandlingar med enbart Zn, vilket omöjliggjorde en meningsfull utvärdering av blandningseffekter mellan PAHer och Zn. Vid en Zn-koncentration på 1 mg/L var immobiliseringen i PAH/Zn-behandlingen jämförbar med den som observerades vid exponering för enbart PAHer. Däremot var proteininnehållet hos daphnier lägre vid kombinerad exponering för PAHer och Zn, vilket indikerar en samverkande effekt på detta effektmått (Figur 6).



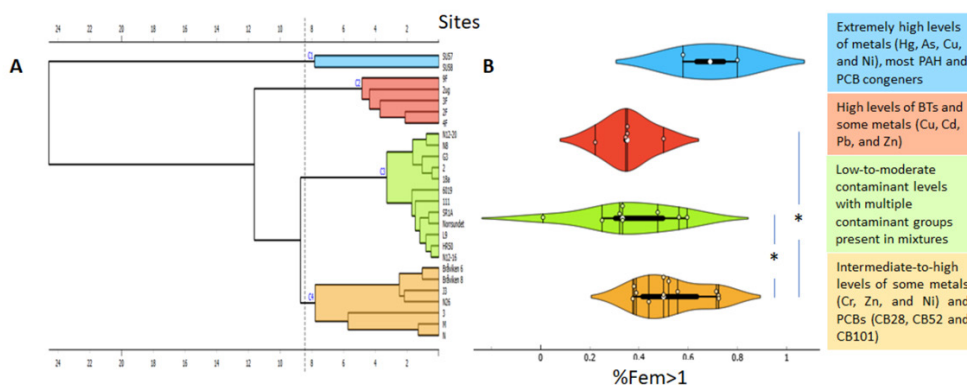
Figur 6. Respons i individuellt proteininnehåll hos *Daphnia magna* exponerade för en PAH-blandning inom intervallet för kemisk aktivitet 0,01–0,1, med eller utan samtidig exponering för zink.

3.2 Effekter av föroreningar och abiotiska faktorer på ReproIND

Tre fältstudier bidrog till utvärderingen av hur kemiska föroreningar och icke-kemiska faktorer påverkar reproduktiva egenskaper och populationskaraktistika hos vitmärta (*Monoporeia affinis*).

1. *Raymond med flera* (Raymond *et al.*, 2021) använde övervakningsdata för att identifiera vilka miljövariabler som bäst förklarade förändringar i bottenlevande makrofaunasamhällen. I detta datamaterial klassificerades PAH-halterna som medelhöga till höga enligt nationella riktlinjer (Josefsson, 2017) vid 4 av 29 stationer; därutöver överskred 8 stationer den nivå som definieras som opåverkad. De miljövariabler som inkluderades var sedimentets organiska kol (TOC), sedimenthalter av metaller och PAHer, syrgashalt i bottenvattnet, salthalt, temperatur samt klorofyll-a-koncentration i ytvattnet. Förekomsten av *M. affinis*, som är en av de vanligaste arterna i området, förklarades bäst av den totala PAH-halten som en enskild negativ prediktor. Inga metaller identifierades som betydelsefulla prediktorer. Resultatet indikerar att PAH-förorening kan reducera populationsstorleken hos sedimentlevande vitmärta, vilket bör beaktas när bottenfauna används för bedömning av eutrofieringsstatus. Studien visar även att vid referensstationer inom de svenska nationella marina miljöövervakningsprogrammen (SNMMP; programmen för makrozoobentos och akvatiska miljögifter) längs Östersjökusten överskrider halterna av 11 prioriterade PAH-kongener i sediment ofta den nivå som klassificeras som ”låg” enligt nationella riktlinjer (Josefsson, 2017). Detta indikerar att de biologiska effektdata som används kan överskatta bakgrundsnivån för embryonala missbildningar.
2. *Kolesova med flera* (Kolesova *et al.*, 2024) analyserade data från fyra delbassänger – Finska viken, Rigabukten, Bottenhavet och Västra Gotlandsbassängen – för att undersöka sambanden mellan embryomissbildningar hos *M. affinis*, hydrofoba organiska föroreningar (PAHer, PCBer och BTer; totala halter, TEQ-värden samt enskilda kongener testades som prediktorer) och metaller (både PLI och enskilda metallhalter testades som prediktorer). Den breda geografiska täckningen, som omfattade ekologiskt relevanta gradienter, möjliggjorde en integrering av icke-kemiska faktorer såsom temperatur, TOC och syrehalt i ett batteri av multivariata modeller. Metaller (PLI, Hg), PAHer (NAP och DBAHA) samt PCBer (PCB180) identifierades som signifikanta positiva prediktorer för förekomsten av embryonala missbildningar över bassängerna. Med tanke på de starka korskorrelationerna mellan olika metaller och PLI-värden samt mellan kongener av PAHer och PCBer är det sannolikt att de observerade effekterna inte är specifika för dessa enskilda ämnen utan återspeglar toxicitet från andra kongener i föroreningsblandningarna. Frekvensen av embryonala missbildningar ökade dessutom inte enbart med ökande föroreningshalter utan även med temperatur och salthalt. Sediment dominerade av sand, ofta med låg TOC, visade sig också ha en starkare toxisk effekt än sediment med högre andel silt och lerfraktioner. Det är dock viktigt att notera att beroenden av temperatur och salthalt endast kunde påvisas över hela spannet av de undersökta värdena (T: 2–6 °C och salthalt: 1,4–7,1; bottenvatten under vintertid, det vill säga under vitmärslans reproduktionsperiod). Inom enskilda bassänger var variationen

betydligt mindre och inga tydliga effekter kunde påvisas mellan stationer. Slutsatsen var därför att bassängspecifika GES-målvärden för embryonala missbildningar, anpassade till populationer som är lokalt anpassade till temperatur- och salthaltsvariationer, är tillräckliga för att hantera dessa beroenden.



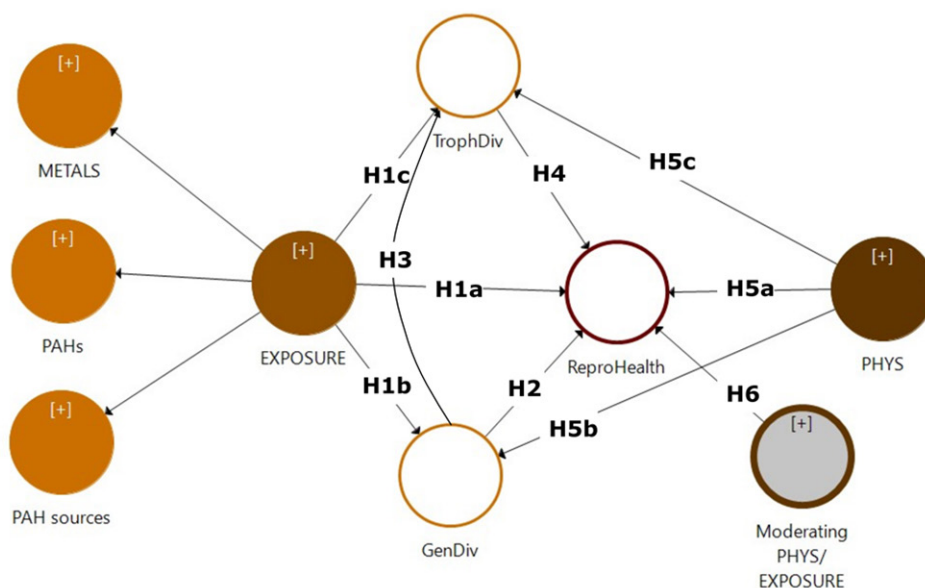
Figur 7. Variation i förekomsten av embryonala missbildningar mellan stationer grupperade utifrån föroreningsbelastning.

(A) Hierarkisk klusteranalys av provtagningsstationer baserad på föroreningsbelastning (Ward-länkning), vilket resulterade i fyra kluster (C1–C4). (B) Violindiagram för andelen honor med fler än ett embryonalt missbildat embryo. Kurvornas bredd motsvarar den ungefärliga tätheten av datapunkter. Medianvärde och interkvartilintervall visas som ett svart boxdiagram i respektive violin. Signifikanta skillnader mellan grupper, detekterade med oparat t-test, markeras med asterisk ($p < 0,05$). Notera att kluster C1 omfattade endast två stationer från Sundsvall med extremt höga halter av både HOCs och metaller.

Klassificering av provtagningsstationerna med klusteranalys identifierade fyra kluster som skilde sig åt i fråga om belastning och sammansättning av sam-förekommande föroreningar (Figur 7). Kluster 1 bestod av endast två kraftigt förorenade stationer (SU 57 och SU 58, Sundsvall, Bottenhavet) med mycket höga halter av metaller (As, Hg, Cu och Ni), PAHer och PCBer. Kluster 2 omfattade fem stationer i Finska viken med relativt höga halter av BTer, medan de två återstående klustren inkluderade stationer från flera delbassänger och kännetecknades av varierande blandningar av PAHer, PCBer och metaller. Inget av klustren representerade opåverkade förhållanden.

3. *Gorokhova och med flera* tillämpade PLS-SEM för att identifiera de viktigaste drivkrafterna för reproduktiv hälsa (ReproHealth) i Bottenhavet och Västra Gotlandsbassängen samt för att etablera direkta och indirekta samband mellan embryonala missbildningar, kemisk förorening (PAHer och metaller), trofiska egenskaper hos vitmärlepopulationerna och abiotiska faktorer (Figur 8). Föroreningsbelastning och icke-kemiska miljöförhållanden skilde sig markant mellan bassängerna. I motsats till förväntningarna observerades signifikant högre halter av både metaller och PAHer i Bottenhavet jämfört med Västra Gotlandsbassängen, med skillnader på 1,5–6,3 gånger för metaller och cirka två gånger för både låg- och högmolekylära PAHer. Temperatur hade en signifikant modererande effekt på ReproHealth i respektive delbassäng, det vill säga en signifikant interaktion mellan temperatur och föroreningar för sambandet EXPOSURE → ReproHealth. Effektriktningen var dock motsatt mellan modellerna, med en stark negativ effekt i Bottenhavet och en svag positiv effekt i Västra Gotlands-

bassängen. Detta innebär att föroreningsinducerad toxicitet delvis mildrades i Bottenhavet men förstärktes i Västra Gotlandsbassängen. Med hänsyn till den signifikant lägre temperaturen och de högre metallhalter i Bottenhavet kan man spekulera i att temperatures mildrande effekt inom det optimala termiska intervallet kan vara kopplad till mer effektiv avgiftning hos djuren, i linje med observationer hos fisk exponerade för metaller vid olika temperaturer (Castaldo et al., 2021). I Västra Gotlandsbassängen lever *M. affinis*, som är en glacial relik, nära sin temperaturlöslighetsgräns, vilket sannolikt bidrar till att negativa effekter av föroreningar förstärks vid högre temperaturer.



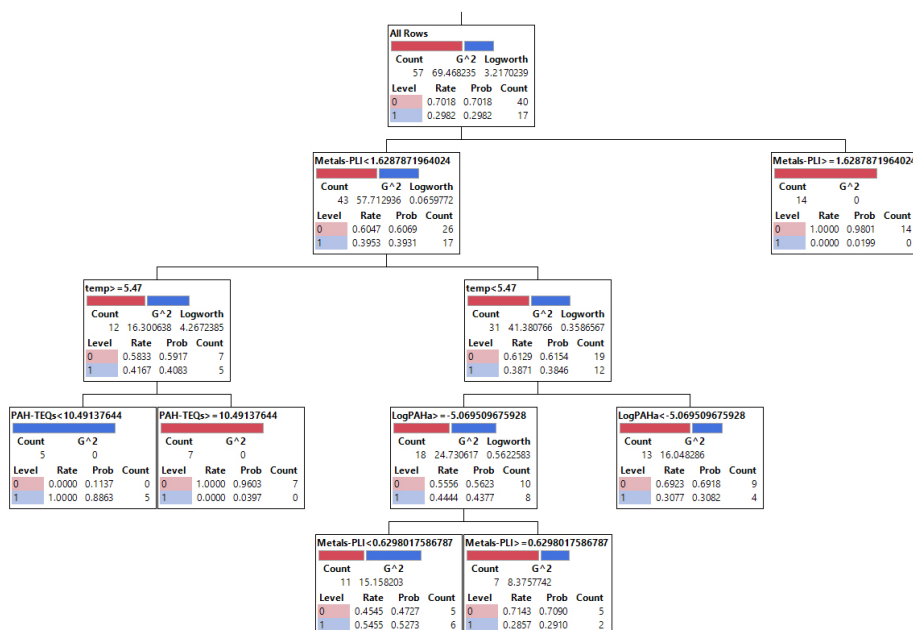
Figur 8. PLS-SEM-modell som kopplar embryonala missbildningar (ReproHealth) till biotiska (TrophDiv, trofisk diversitet, och GenDiv, genetisk diversitet) och abiotiska variabler (EXPOSURE, kemiska föroreningar i sediment, samt PHYS, fysikaliska miljöförhållanden).

Pilarna representerar samband mellan latenta variabler (LV; cirklar). Biologiska LV visas som vita cirklar, medan kemiska (EXPOSURE) och icke-kemiska (PHYS) LV visas i brunt. Indikatorerna (uppmätta parametrar som representerar olika aspekter av respektive LV) är dolda (markerade med [+]) för ökad tydlighet. EXPOSURE-modellen omfattade tre latenta variabler av första ordningen (ljusbruna) som representerar olika typer av föroreningar och föroreningsindex.

3.3 Beslutsträdsanalys och revidering av ReproIND.

Beslutsträdsmodellen (DT; Figur 9) tydliggjorde sambanden mellan föroreningspåverkan, representerad av sammansatta toxicitetspotentialindex för metaller (Metal-PLI) och PAHer (kemisk aktivitet), samt GES-status baserad på ReproIND. Modellen identifierade tröskelvärden för Metal-PLI och kemisk aktivitet som de mest betydelsefulla faktorerna för GES-utfall. Även icke-kemiska faktorer, i synnerhet botten djup och salthalt, identifierades som viktiga modererande variabler. Dessa tröskelvärden utgör ett underlag för att justera GES-målvärden i syfte att förbättra identifieringen av påverkade miljöer.

Det första delningskriteriet i beslutsträdet var ett bottendjup på 75 m, vilket markerade en ökad förekomst av icke-GES-förhållanden vid större djup. Det bör dock noteras att mindre än 12 % av stationerna i datamaterialet översteg detta djup. Nästa delning identifierade ett Metal-PLI-tröskelvärde på $< 0,2$, vilket indikerade att ytterligare cirka 11 % av stationerna med låga metallhalter, huvudsakligen belägna i Neva-deltat i Finska viken, klassificerades som icke-GES.



Figur 9. Beslutsträdsanalys (DT) av föroreningar och miljöfaktorer som påverkar GES baserat på ReproIND-värden från 55 stationer som användes för modellvalidering (rött: icke-GES, blått: GES). Modellen visar sambanden mellan föroreningspåverkan, uttryckt som sammansatta variabler för metaller och PAHer (Metal-PLI och LogPAHa, kemisk aktivitet för PAHer, log-transformerad), och GES-status. Identifierade tröskelvärden inkluderar LogPAHa (-5) och Metal-PLI ($0,5$), samt icke-kemiska faktorer såsom bottendjup (75 m) och salthalt ($6,5$). Resultaten indikerar behov av att justera GES-målvärden för embryonala missbildningar, särskilt vid djupare stationer, samt att revidera EQS för metaller vid salthalter under $6,5$.

Vid stationer där Metal-PLI översteg $0,2$ förekom både GES- och icke-GES-förhållanden. I detta intervall hade kemisk aktivitet (LogPAHa) en central betydelse, där högre aktivitetsnivåer var associerade med icke-GES-status i 65 % av fallen. Metaller utgjorde en ytterligare avgörande faktor genom att särskilja icke-GES-förhållanden vid Metals-PLI-nivåer över $0,5$. Kombinationen av LogPAHa > -5 och Metal-PLI $> 0,5$ ökade sannolikheten för icke-GES till 86 %, vilket tydligt visar betydelsen av samverkande effekter mellan PAHer och metaller för att inducera biologiskt skadliga blandningseffekter.

Som sista delningskriterium identifierades salthalt som en modulerande faktor vid stationer med både hög kemisk aktivitet och förhöjd metallbelastning, där salthalter $< 6,5$ oftare resulterade i icke-GES-status. Denna effekt drevs huvudsakligen av stationer i den nordligaste delen av studieområdet (Bottenviken) samt i östra Finska viken. Det är sannolikt att även andra kemiska föroreningar bidrog till de observerade icke-GES-förhållandena i dessa låg-salthaltsmiljöer, trots relativt låga halter av metaller och PAHer.

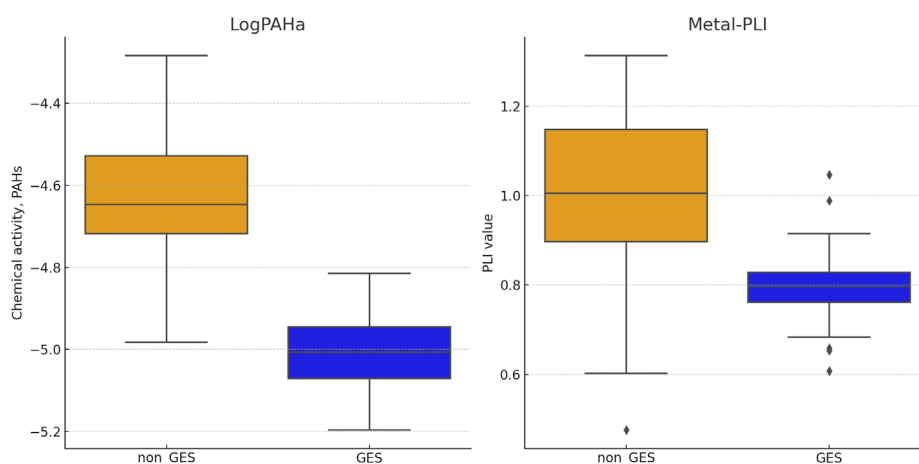
Modellens prestanda utvärderades med fokus på förmågan att identifiera icke-GES-förhållanden och visade hög träffsäkerhet. ROC-analysen resulterade i ett AUC-värde

på 0,85, vilket indikerar god diskriminerande förmåga mellan GES och icke-GES. Metals-PLI var den viktigaste prediktorn (0,38), följt av kemisk aktivitet (LogPAHa; 0,28), bottendjup (0,23) och salthalt (0,15).

3.4 Samband mellan belastning och biologisk effekt

Resultaten visar tydliga samband mellan belastning och biologisk effekt för ReproIND när belastning representeras av kemisk aktivitet baserad på PAH-halter i sediment (Figurerna 9 och 10). Med utgångspunkt i dessa samband föreslås ett angreppssätt för integrering av kemiska och biologiska indikatorer inom ramen för Deskriptor 8 i MSFD för övervakning och bedömning av förorenings effekter.

De två linjära regressionerna mellan kemisk aktivitet och organiskt kol i sediment (TOC), som skiljer sig åt i sina intercept (Figur 10), utgör ett ramverk för screening av stationer med avseende på potentiell föroreningspåverkan. Eftersom lutningarna är identiska mellan regressionerna är interceptet den avgörande faktorn, där ett högre intercept representerar påverkade stationer (GES) och ett lägre intercept representerar opåverkade stationer (icke-GES).

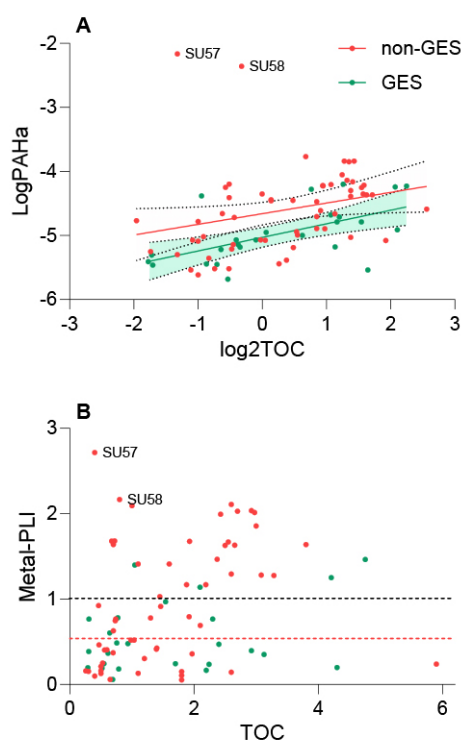


Figur 10. Variation i kemisk aktivitet (LogPAHa) och Metals-PLI grupperad för stationer klassificerade som GES respektive icke-GES.

Resultat från statistisk jämförelse mellan grupperna visas under x-axeln. Box- och whiskerdiagrammen visar medelvärde, median (gul linje), 25- och 75-percentiler samt min- och maxvärdet.

När data om HOCs och organiskt kol i sediment tas fram inom föroreningsövervakningen kan kemisk aktivitet beräknas, varefter den resulterande datapunkten statistiskt kan utvärderas för att avgöra vilken av regressionslinjerna den med störst sannolikhet tillhör. De skattade konfidensintervallen för respektive regression gör det möjligt att bedöma sannolikheten för att en given datapunkt är associerad med GES- respektive icke-GES-förhållanden. Denna utvärdering av föroreningsdata ger förvaltande myndigheter ett verktyg för att klassificera stationer utifrån sannolikheten för biologiska effekter och för att prioritera områden för vidare undersökning eller åtgärd baserat på evidens från klassificeringen.

För att säkerställa relevansen och tillförlitligheten i de klassificeringar som genereras med detta angreppssätt kan biologisk effektbedömning baserad på ReproIND, liksom andra biologiska effektindikatorer, integreras som en valideringskomponent. Detta kan exempelvis göras genom korsvalidering med ReproIND-data: stationer som klassificeras som potentiellt påverkade baserat på sambandet mellan kemisk aktivitet och TOC bör uppvisa motsvarande biologiska effekter, såsom reproduktionsstörningar hos vitmärsla, återspeglade i ReproIND-värden. Omvänt bör stationer som klassificeras som opåverkade visa begränsade eller inga reproduktiva störningar.



Figur 11. Samband mellan sedimentets TOC och (A) kemisk aktivitet (LogPAHa) samt (B) Metal-PLI för stationer klassificerade som GES och icke-GES.

Den linjära regressionen är signifikant för LogPAHa, med signifikant lägre intercept för icke-GES-gruppen (Tabell 3). Metal-PLI visade däremot inget tydligt samband med TOC, även om regressionen var svagt signifikant för icke-GES-stationer. Horisontella linjer i panel B markerar Metal-PLI-nivåer på 1 och 0,5, motsvarande allmänt accepterad toxicitetströskel (PLI = 1; Tomlinson et al., 1980) respektive den nivå (PLI = 0,5) som identifierades av DT-modellen som förknippad med ökad sannolikhet för negativa effekter vid kemisk aktivitet > 0,00001 (LogPAHa > -5).

Tabell 3. Resultat från GLM-analys av GES-effekt på sambandet mellan kemisk aktivitet (LogPAHa) och sedimentets organiska kol (TOC).

	SS	MS	F	P
Intercept	1540.348	1540.348	4 201.674	0.000 000
GES	2.391	2.391	6.521	0.012 582
LogTOC	3.231	3.231	8.814	0.003 957
GES*LogTOC	0.066	0.066	0.180	0.672 292
Error	28.962	0.367		

4. Diskussion

De övergripande målen med detta projekt var att fördjupa förståelsen av kumulativa effekter och multipla stressorer på biologiska effekter av miljöföroreningar, med särskilt fokus på att förbättra bedömningen av miljöstatus i Östersjön. Genom att integrera avancerade toxikologiska mått för kemisk exponering, biologiska effektindikatorer och samtidigt beakta icke-kemiska miljöfaktorer uppnåddes flera centrala resultat:

- tillämpningen av kemisk aktivitet vidareutvecklades och stärktes som ett tillförlitligt dosmått i ekotoxikologiska tester,
- ett arbetsflöde för validering av biologiska effektindikatorer utvecklades, och tydliga samband mellan belastning och indikatorrespons kunde påvisas för ReproIND,
- tröskelvärden identifierades för samverkande effekter av PAHer och metaller som är kopplade till icke-GES-förhållanden, det vill säga utfall av blandningseffekter,
- tröskelvärden fastställdes för miljövariabler som påverkar ReproIND-responsen på föroreningar,
- ett nytt angreppssätt föreslogs för integrering av kemiska och biologiska effektdata vid bedömning av föroreningsstatus i Östersjön, med potentiell tillämpbarhet även i andra ekosystem.

Dessa resultat bidrar till vidareutveckling av metoder för föroreningsbedömning och miljöövervakning i marina ekosystem och utgör samtidigt ett viktigt stöd för operativ tillämpning av ReproIND i Östersjön.

4.1 Kemisk aktivitet i ekotoxikologiska tester

De experimentella studierna i detta projekt har vidareutvecklat användningen av kemisk aktivitet som dosmått inom ekotoxikologi för hydrofoba organiska föroreningar (HOCs). Genom utveckling av nya protokoll och framtagande av dos-respons-data för både vattenburen och sedimentbaserad exponering, med planktoniska och bentiska testorganismer, har metoden visats vara förenlig med gällande OECD-riktlinjer. Metodutvecklingen möjliggör robusta experimentella upplägg där både kemiska och icke-kemiska störfaktorer kan beaktas, vilket samtidigt belyser behovet av att uppdatera befintliga standardriktlinjer. De föreslagna teknikerna för sedimentexponering ger förbättrad kontroll över kemisk aktivitet, men resultaten visar också att variation i substrategenskaper behöver studeras vidare för att säkerställa realistiska och tillförlitliga toxicitetstester.

Utvecklingen av den kemiska aktivitetsbaserade laddningsmetoden för sediment visade tydliga skillnader i olika torvpartiers förmåga att sorbera PAHer. Detta innebär att samma mängd kemikalie, laddad till olika torvtyper i biotester, kan ge upphov till olika exponeringsnivåer (Abel et al., 2024). Resultatet understryker behovet av att frångå bedömningar som enbart baseras på totalhalter.

Variationer i organiskt materials egenskaper påverkar även biotillgänglighet och potentiell frisättning av kemikalier från sediment till vatten i naturliga miljöer. Detta har nyligen visats i Finska viken, där två stationer med olika andel terrestriskt respektive marint organiskt kol i sedimenten undersöktes. Hydrofoba PAHer och PCBer visade sig sorbera starkare till sediment dominerade av marint organiskt kol, med konsekvenser för biotillgängligheten (Nybom et al., 2021).

De observerade medianvärdena för toxicitet i de akuta immobiliseringstesterna låg inom det förväntade intervallet för kemisk aktivitet vid baslinjetoxicitet (0,01–0,1), vilket stödjer narkos, en ospecifik toxisk verkningsmekanism, som den dominerande verkningsmekanismen i tester med daphnier och daggmaskar. Avsaknaden av immobilisering vid kemisk aktivitet under 0,01 stärker ytterligare bilden av narkos som en tröskeleffekt, där en viss aktivitetsnivå krävs för att inducera respons. Sammantaget visar detta att kemisk aktivitet är en tillförlitlig prediktor för baslinjetoxicitet i ekotoxikologiska studier med etablerade evertebratmodeller.

Ingen toxicitet som indikerar en specifik toxisk verkningsmekanism för PAHer observerades under denna tröskel, inklusive i pilotförsök där intervallet för kemisk aktivitet var 0,001–0,12. Detta bekräftar narkos som den dominerande verkningsmekanismen för PAHer vid höga koncentrationer när immobilisering används som effektmått. Däremot visar dos-respons-sambanden för proteininnehåll och, i synnerhet, genuttryck hos *Daphnia* att dessa responser uppträder vid avsevärt lägre kemisk aktivitet – minst en tiopotens under den förväntade narkoströskeln. Detta indikerar att andra verkningsmekanismer sannolikt ligger bakom dessa effekter. Specifika toxikologiska mekanismer kan därmed aktiveras vid lägre PAH-koncentrationer, möjligen kopplade till enskilda kongener, och utlösa molekyllära eller cellulära responser innan mer uppenbara effekter såsom immobilisering kan observeras.

De experimentella resultaten avseende betydelsen av näringsstatus, temperatur och kombinerad exponering för olika föroreningar stöds av PLS-SEM-modellen baserad på fältdata (Gorokhova et al., 2024). Utöver deras ekologiska relevans belyser dessa resultat även den komplexitet som följer av faktorer som kan variera i experimentella sammanhang, ibland oavsiktligt. Exempelvis påverkade näringsstatus hos daphnier deras känslighet för PAHer i hög grad, där svältade individer uppvisade högre tolerans jämfört med välutfodrade. Detta visar att testorganismernas energireserver och metabola tillstånd kan modulera toxikologiska responser på ett avgörande sätt och att dessa variabler därför bör beaktas i toxicitetsbedömningar.

På motsvarande sätt visade sig temperatur påverka toxiciteten på ett sätt som inte kan beskrivas enbart genom enkla dos-respons-samband. Exponering vid högre temperatur ledde till en mer avancerad fysiologisk åldrandeprocess hos organismerna, vilket i sin tur påverkade testutfallen genom en längre fysiologisk exponeringstid snarare än genom ökad toxicitet vid en given kemisk aktivitet. Detta understryker vikten av att justera exponeringstider utifrån grad-dagar och att tolka temperaturförhållanden korrekt i ekotoxikologiska studier för att undvika missvisande slutsatser om temperaturberoende toxicitet hos specifika ämnen.

Slutligen tillförde kombinerad exponering för olika klasser av föroreningar, såsom PAHer och metaller (zink i detta fall), ytterligare komplexitet. Interaktionerna mellan dessa ämnen följde inte alltid enkla additiva eller synergistiska mönster, och vissa toxiska effekter kunde endast observeras vid specifika kombinationer och när suborganismala effektmått användes. Denna variation understryker behovet av

att riskbedömningar i ekologiska sammanhang rör sig bortom analyser av enskilda ämnen och i stället tillämpar integrerade angreppssätt som beaktar blandningseffekter.

4.2 Evidens för blandningseffekter från fältstudier

Fältstudierna visar att kemiska blandningar, särskilt kombinationer av PAHer och metaller, har en betydande påverkan på reproduktiv hälsa och populationsstatus hos vitmärsla (*Monoporeia affinis*). Dessa effekter moduleras dessutom av icke-kemiska miljöfaktorer såsom temperatur, salthalt, bottendjup och sedimentets sammansättning. De relativa bidragen från PAHer respektive metaller som prediktorer varierade mellan studierna beroende på vilken biologisk respons som analyserades, till exempel populationsförekomst (Raymond *et al.*, 2021), olika aspekter av embryonala missbildningar (Kolesova *et al.*, 2024) samt GES-utfall (binär variabel) baserat på frekvenser av embryonala missbildningar (Gorokhova *et al.*, 2024).

Vidare har andra studier som är relevanta för INSERT, men som inte genomfördes inom ramen för detta projekt, pekat ut DNA-addukter som en möjlig mekanism bakom utvecklingstoxicitet (Gorokhova *et al.*, 2020). I dessa studier associerades specifika DNA-addukter med metaller (Hg, Cd och Zn) samt med den samlade PAH-belastningen, men inte med enskilda PAH-kongener (Martella *et al.*, 2023). Dessa observationer stödjer användningen av kemisk aktivitet som ett additivt toxicitetsmått för att integrera flera PAHer till ett samlat exponeringsmått vid analys av fältdata.

Samtidigt visar laboratoriestudier att toxiciteten vid akuta exponeringar i huvudsak kan tillskrivas narkos, där inga mätbara effekter observerades vid kemisk aktivitet under 0,01. De nivåer av kemisk aktivitet som uppmättes i sediment i fält låg generellt flera storleksordningar under de experimentella nivåerna (Figur 10), vilket talar för att narkotiska effekter har begränsad relevans under naturliga förhållanden. Trots detta observerades frekventa icke-GES-förhållanden vid kemisk aktivitet över 0,00001 (Figur 9A), vilket sannolikt är kopplat till specifika verkningsmekanismer snarare än baslinjetoxicitet.

Det bör också beaktas att beräkningarna av kemisk aktivitet i denna studie enbart baseras på PAHer och inte inkluderar andra hydrofoba organiska föroreningar som också kan bidra till de observerade effekterna. Mot denna bakgrund kan det inte fastställas om fältresponserna beror på överskjutande toxicitet från PAHer, även om PAHer är kända hormonstörande ämnen hos leddjur och därmed potentiella bärare av sådana effekter (Oberdörster *et al.*, 1999). Screening för överskjutande toxicitet bör därför genomföras i kontrollerade laboratoriestudier, eftersom fältförhållanden präglas av flertalet stressfaktorer och komplexa föroreningsblandningar som försvårar isolering av effekter från enskilda ämnen. Därtill är exponeringsnivåer och exponeringstider i fält ofta osäkra, till skillnad från i välkontrollerade experimentella studier. Sammantaget understryker detta behov av laboratoriebaserade studier för att på ett tillförlitligt sätt identifiera och kvantifiera överskjutande toxicitet utöver baslinjetoxicitet (Kienzler *et al.*, 2017).

4.3 ReproIND-responser på regional variation i föroreningsbelastning och miljöförhållanden

Beslutsträdsmodellen (Figur 8) identifierar centrala tröskelvärden och interaktioner mellan föroreningar och miljöfaktorer som påverkar GES-klassificeringen vid 71 stationer i de fem delbassängerna i Östersjön. Modellen pekar ut kritiska nivåer av PAHer (uttryckt som kemisk aktivitet) och metaller (uttryckt som deras samlade potentiella toxicitet). Ett huvudresultat är att stationer med både kemisk aktivitet över 0,00001 och metallbelastning över $PLI > 0,5$ hade en högre sannolikhet att klassificeras som icke-GES (Figur 8). Eftersom metalltoxicitet vanligen förväntas vid PLI -värden över 1 (Tomlinson et al., 1980) är detta resultat särskilt viktigt, då det indikerar att ett mer konservativt tröskelvärde kan vara motiverat.

Vidare är mer-än-additiva effekter vanliga för blandningar av metaller och PAHer (Gauthier et al., 2014). De viktigaste interaktionerna som kan leda till sådan förstärkt toxicitet inkluderar PAH-inducerad störning av cellmembranens integritet, vilket kan underlätta metallupptag, möjlig komplexbildning mellan metaller och PAHer, metallers hämning av PAH-detoxifiering via cytokrom P450, PAHers hämning av metall-detoxifiering via metallotionein samt ökad produktion av reaktiva syreföreningar vid vissa kombinationer av metaller och PAHer. Den ömsesidiga hämningen av avgiftningsprocesser indikerar dessutom möjliga positiva återkopplingar mellan dessa mekanismer (Gauthier et al., 2014). Samtliga dessa mekanismer är särskilt relevanta under embryogenesen och kan därmed bidra till den interaktion mellan kritiska tröskelvärden för kemisk aktivitet och PLI som modellen identifierade för ReproIND-utfallet.

Modellen identifierade även bottendjup och salthalt vid provtagningsstationerna som betydelsefulla determinanter för GES-utfall. Detta indikerar behov av att justera GES-målvärden för djupare stationer samt att anpassa miljö kvalitetsnormer (EQS) för metaller i områden med låg salthalt för att bättre fånga förorenings effekter. Den höga sannolikheten för icke-GES-förhållanden vid stationer djupare än 75 m kan relateras till rumslig variation i föroreningsfördelning, där ackumulering av föroreningar (andra än PAHer och metaller) ökar med djup. Eftersom dessa föroreningar inte inkluderades i beräkningarna av PLI och kemisk aktivitet omfattades deras effekter inte av modellen. Det är även möjligt att hydrografiska förhållanden eller andra naturliga habitatkaraktistika i djupare områden är suboptimala för vitmärlans reproduktion. Om så är fallet bör bottendjup beaktas vid utformning av effektstudier och övervakningsprogram.

Den praktiska implikationen av detta resultat är att bakgrundsvärden för embryonala missbildningar hos *Monoporeia affinis* bör justeras genom analys av den långsiktiga variationen i embryonala missbildningar i övervakningsdata från dessa djupare områden. Justerade bakgrundsvärden möjliggör i sin tur revidering av GES-målvärden för ReproIND och ökar förmågan att upptäcka förorenings-inducerade missbildningar. Parallellt behöver mer ekofysiologisk kunskap om djuprelaterade effekter på vitmärlans reproduktion samlas in för att klarlägga de underliggande ekologiska drivkrafterna.

Salthalt identifierades dessutom som en betydelsefull modulerande faktor vid stationer med förhöjd metallbelastning ($PLI > 0,5$). Stationer med salthalt under 6,5 hade en högre sannolikhet att klassificeras som icke-GES, ett mönster som var

särskilt tydligt i den nordligaste delen av studieområdet (Bottniska viken) och i östra Finska viken. Det är välkänt att låg salthalt kan förstärka effekterna av metallförorening genom ökad biotillgänglighet, förändrad metallkemi och ökad fysiologisk stress hos organismer (Acosta et al., 2011; Du Laing et al., 2008). Kust- och estuarina ekosystem med låg salthalt är därför särskilt sårbara, i synnerhet i områden med stort sötvatteninflöde eller där klimatförändringar påverkar salthaltsregimerna (Leal Filho et al., 2022). Mot denna bakgrund bör salthalt betraktas som en nyckelfaktor vid bedömning av föroreningsrisker i Östersjön, och giltigheten av tröskelvärdet 6,5 bör utvärderas vidare.

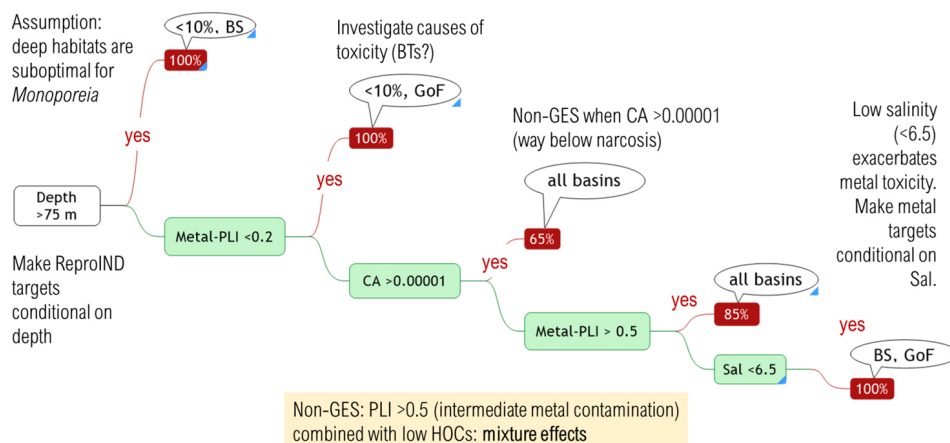
Slutligen klassificerades cirka 10 % av stationerna med låg metallbelastning (Metals-PLI < 0,2) som icke-GES. Det enda gemensamma draget för dessa stationer var låga halter av metaller, inklusive sådana med hög specifik toxicitet (t.ex. As, Hg och Cd). Detta indikerar att andra drivkrafter kan påverka GES-utfallen vid dessa stationer. En närmare granskning visar att stationerna uteslutande är belägna i Finska viken och att många av dem ligger i hamnområden. I de ursprungliga studierna rapporterades förhöjda halter av butyltennföreningar samtidigt som metallbelastningen var relativt låg och i vissa fall förekom även förhöjda PCB-halter (Kolesova et al., 2024). Detta är också de stationer där PAHernas bidrag till den totala kemiska aktiviteten är som lägst, till följd av höga PCB-halter (Figur 2). Varken butyltennföreningar eller PCBer inkluderades i beslutsträdsanalysen på grund av begränsad datatillgång eller hög andel värden under detektionsgränsen i andra bassänger. Dessa ämnen kan dock fortfarande bidra till icke-GES-förhållanden vid dessa stationer, där de låga PLI-värdena snarare kan vara tillfälliga än representativa för de faktiska drivkrafterna bakom de observerade effekterna. Ytterligare analyser med mer heltäckande kemiska data krävs för att klarlägga dessa till synes motstridiga resultat för områden som klassificerats som icke-GES trots låg belastning av metaller och PAHer.

5. Slutsatser och rekommendationer

5.1 Vidareutveckling av ReproIND-implementering och fastställande av GES

De studier som genomförts inom detta projekt, med fokus på både enskilda föroreningar och sammansatta index (kemisk aktivitet för hydrofoba organiska föroreningar och Pollution Load Index, PLI, för metaller), ger ett tydligt underlag för att revidera ReproIND:s målvärden så att de bättre återspeglar verkliga miljöförhållanden. En sådan revidering förväntas stärka indikatorns förmåga att bedöma effekter av föroreningsbelastning på biologiska system. Nedan presenteras våra rekommendationer för denna vidareutveckling (Figur 11):

- *Inför djupspecifika GES-målvärden för ReproIND.* Sammanställ ReproIND-data uppdelade efter bottendjup (> 75 m och < 75 m) och beräkna 95-procentiga konfidensintervall för både frekvensen av embryonala missbildningar i populationen och frekvensen av honor med embryonala missbildningar. De nya målvärdena bör inkluderas i HOLAS IV-bedömningen för att möjliggöra mer träffsäkra bedömningar av biologiska effekter med hänsyn till lokala djupförhållanden.
- *Identifiera orsaker till icke-GES-förhållanden som inte är kopplade till PAH- och metalltoxicitet i Finska viken.* Genomför icke-målriktade kemiska analyser vid stationer med låg kemisk aktivitet och lågt PLI men som ändå klassificeras som icke-GES, och komplettera dessa analyser med bioassays för att bekräfta biologiska effekter.
- *Prioritera bedömning av stationer där Metals-PLI överstiger 0,5 och kemisk aktivitet överstiger 0,00001.* Dessa två mått bör övervakas och hanteras gemensamt, eftersom kombinationen av förhöjd metallbelastning och hydrofoba organiska föroreningar avsevärt ökar sannolikheten för icke-GES-utfall.
- *Beakta salthalt i bedömningen av föroreningsrisker.* Integrera salthalt som en central faktor vid utvärdering av metallföroreningar, särskilt i kustnära och estuarina områden med låg salthalt där metalltoxicitet kan förstärkas. Detta inkluderar att se över och vid behov justera miljökvalitetsnormer (EQS) för metaller så att de är anpassade till låg-salthaltsmiljöer (< 6,5) i Östersjön.



Figur 12. Sammanfattning av centrala beslutpunkter identifierade av beslutsträdsmodellen (Figur 9) för bedömning av GES baserat på ReproIND.

Figuren visar kritiska miljötrösklar, inklusive bottendjup, Metals-PLI och kemisk aktivitet, som påverkar GES-klassificering. Rekommendationerna betonar vikten av att stratifiera ReproIND-data efter djup, prioritera övervakning vid stationer med Metals-PLI > 0,5, hantera samverkande effekter av metallförorening och HOCs vid hög kemisk aktivitet samt beakta salthaltens betydelse för metalltoxicitet.

5.2 Koppling mellan kemiska och biologiska indikatorer

Våra resultat visar tydliga samband mellan belastning och indikatorrespons för ReproIND när belastning representeras av kemisk aktivitet baserad på PAH-halter i sediment (Figurerna 9 och 10). Med utgångspunkt i dessa samband föreslås ett angreppssätt för att integrera kemiska och biologiska indikatorer inom ramen för Deskriptor 8 i MSFD för övervakning och bedömning av förorenings effekter.

De två regressionerna mellan kemisk aktivitet och sedimentets organiska kolhalt (TOC), som skiljer sig åt i sina intercept (Figur 10), utgör ett praktiskt ramverk för screening av stationer med avseende på potentiell föroreningspåverkan. Eftersom regressionernas lutningar är identiska är interceptet den avgörande skiljelinjen, där det högre interceptet representerar påverkade stationer (GES) och det lägre interceptet representerar opåverkade stationer (icke-GES).

När mätningar av hydrofoba organiska föroreningar och organiskt kol i sediment genomförs inom föroreningsövervakningen kan kemisk aktivitet beräknas, varefter den resulterande datapunkten statistiskt kan utvärderas för att avgöra vilken av regressionslinjerna den med störst sannolikhet tillhör. De skattade konfidensintervallen för respektive regression gör det möjligt att bedöma sannolikheten för att en given datapunkt är associerad med GES- respektive icke-GES-förhållanden. Denna utvärdering av föroreningsdata ger förvaltande myndigheter ett underlag för att klassificera stationer utifrån sannolikheten för biologiska effekter och för att prioritera områden för vidare undersökning eller åtgärd baserat på evidens från klassificeringen.

För att säkerställa relevansen och tillförlitligheten i de klassificeringar som tas fram med denna metod kan biologisk effektbedömning baserad på ReproIND,

liksom andra biologiska effektindikatorer, integreras som en valideringskomponent. Detta kan genomföras på följande sätt:

- **Korsvalidering med ReproIND-data**

Efter att stationer har klassificerats som potentiellt påverkade eller opåverkade baserat på sambandet mellan kemisk aktivitet och TOC kan ReproIND-data användas för att korsvalidera klassificeringen. Stationer som klassificeras som påverkade bör uppvisa motsvarande biologiska effekter, exempelvis reproduktionsstörningar hos vitmärta, vilket återspeglas i ReproIND-värden. Omvänt bör stationer som klassificeras som opåverkade uppvisa begränsade eller inga reproduktiva störningar.

- **Förfining av klassificeringen**

Om avvikelser identifieras, till exempel stationer som klassificeras som opåverkade men samtidigt uppvisar tydliga biologiska effekter, kan detta indikera att den regressionsbaserade klassificeringen behöver justeras. Sådana diskrepanser kan föranleda en fördjupad analys av föroreningssituationen vid den aktuella stationen eller en vidareutveckling av regressionsmodellen, exempelvis genom att inkludera ytterligare påverkansfaktorer som tidigare inte beaktats.

- **Återkopplingsmekanism för modellförbättring**

Integrering av ReproIND-data möjliggör en återkopplingsprocess där observationer av biologiska effekter kontinuerligt används för att förbättra regressionsmodellen. Över tid kan detta stärka modellens prediktiva förmåga och göra den mer känslig för ekologiskt relevanta variationer i kemisk aktivitet.

- **Fastställande av åtgärdsrösklar**

Genom att kombinera klassificeringen baserad på kemisk aktivitet och TOC med ReproIND-utfall kan mer precisa röskelvärden för förvaltningsåtgärder etableras. Om en viss nivå av kemisk aktivitet konsekvent samvarierar med negativa ReproIND-utfall kan denna nivå användas som en utlösande faktor för miljöåtgärder.

Kemisk aktivitet som ett additivt mått förenklar processen för att fastställa regulatoriska gränsvärden och för att bedöma miljökvalitet. Genom att inkludera ett bredare spektrum av hydrofoba organiska föroreningar erhålls dessutom en mer korrekt uppskattning av den samlade kemiska aktiviteten och den potentiella toxiciteten. Användningen av detta enhetliga mått, i kombination med andra sammansatta index för toxicitetspotential, ger tillsynsmyndigheter bättre förutsättningar att utvärdera kumulativa risker från föroreningsblandningar och att fastställa ändamålsenliga säkerhetsnivåer. Genom att integrera regressionsmodellen för kemisk aktivitet–TOC med biologiska bedömningar såsom ReproIND säkerställs att klassificeringen av föroreningspåverkan är både statistiskt robust och ekologiskt meningsfull. Detta stärker kopplingen mellan kemisk belastning och biologisk respons och stödjer habitatklassificeringssystem som kombinerar kemiska och biologiska kriterier för mer träffsäkra bedömningar av föroreningseffekter på biota.

6. Tack

Detta arbete finansierades av Naturvårdsverket inom ramen för projektet INSERT. Ytterligare stöd erhöles från FORMAS (projekt ACTA, 2019-00863), Interreg Baltic Sea Region med medfinansiering från Europeiska unionen (projekt nr S007, 10/2022-10/2024) samt European Biodiversity Partnership Biodiversa+ (projekt D2P, nr 2021-473).

Teknisk assistans vid kemiska analyser och proteinmätningar av Z. Li och B. Liewenborg (ACES, Stockholms universitet) tackas särskilt. Vi vill även rikta ett tack till Dr. Sandra Luecke-Johansson för hennes stöd i arbetet med *Daphnia*-relaterade studier.

HELCOM:s expertgrupp för farliga ämnen (EG-HAZ) bidrog med värdefulla diskussioner kring miljöföroreningar, och undergruppen för biologiska effekter av föroreningar gav viktig återkoppling avseende indikatorns relevans för miljöbedömning.

7. Källor

Abel, S., Eriksson Wiklund, A.-K., Gorokhova, E., Sobek, A., 2024. Chemical Activity-Based Loading of Artificial Sediments with Organic Pollutants for Bioassays: A Proof of Concept. *Environ. Toxicol. Chem.* 43, 279–287. <https://doi.org/10.1002/etc.5788>

Acosta, J.A., Jansen, B., Kalbitz, K., Faz, A., Martínez-Martínez, S., 2011. Salinity increases mobility of heavy metals in soils. *Chemosphere* 85, 1318–1324. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.07.046>

Arboleda, M.O., 2024. Sorption kinetics of 4 PAHs in different batches of peat and use of passive sampling to measure target chemical activities (MSc Thesis). Stockholm University, Stockholm, Sweden.

Beyer, J., Petersen, K., Song, Y., Ruus, A., Grung, M., Bakke, T., Tollefsen, K.E., 2014. Environmental risk assessment of combined effects in aquatic ecotoxicology: A discussion paper. *Mar. Environ. Res.* 96, 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.marenv-res.2013.10.008>

Castaldo, G., Pillet, M., Ameryckx, L., Bervoets, L., Town, R.M., Blust, R., De Boeck, G., 2021. Temperature Effects During a Sublethal Chronic Metal Mixture Exposure on Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Front. Physiol.* 12.

Du Laing, G., De Vos, R., Vandecasteele, B., Lesage, E., Tack, F.M.G., Verloo, M.G., 2008. Effect of salinity on heavy metal mobility and availability in intertidal sediments of the Scheldt estuary. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 77, 589–602. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2007.10.017>

Förlin, L., Sundelin, B., Gorokhova, E., Magnusson, M., Bergkvist, J., Parkkonen, J., Larsson, Å., Liewenborg, B., Franzén, F., 2019. Effektscreening–Biologisk effekt-övervakning i förorenade områden längs Sveriges kust 2017–2018 (Nationell miljö-övervakning på uppdrag av Naturvårdsverket).

Gauthier, P.T., Norwood, W.P., Prepas, E.E., Pyle, G.G., 2014. Metal–PAH mixtures in the aquatic environment: A review of co-toxic mechanisms leading to more-than-additive outcomes. *Aquat. Toxicol.* 154, 253–269. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.05.026>

Gobas, F.A.P.C., Mayer, P., Parkerton, T.F., Burgess, R.M., Meent, D. van de, Gouin, T., 2018. A chemical activity approach to exposure and risk assessment of chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 37, 1235–1251. <https://doi.org/10.1002/etc.4091>

Gorokhova, E., 2024. Integrating composite toxicity potential indices with biological indicators: Advancing contaminant status assessment under the MSFD. *bioRxiv*.

Gorokhova, E., Ledesma, M.G., Karlsson, A.M.L., Garbaras, A., Ketmaier, V., Sundelin, B., 2024. Understanding amphipod reproductive health drivers in the Baltic Sea: A Study Based on Structural Equation Modeling. *Authorea*. <https://www.authorea.com/users/243058/articles/575500-understanding-amphipod-reproductive-health-drivers-in-the-baltic-sea-a-study-based-on-structural-equation-modeling>

- Gorokhova, E., Martella, G., Motwani, N.H., Tretyakova, N.Y., Sundelin, B., Motwani, H.V., 2020. DNA epigenetic marks are linked to embryo aberrations in amphipods. *Sci. Rep.* 10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57465-1>
- Gorokhova et al., 2023. Linking biological effects to contaminant levels in sediment, fish and benthic invertebrates along the Swedish coast, Report, Swedish Environmental Protection Agency, 86 pp.; <https://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:naturvardsverket:diva-11066> (No. oai:DiVA.org:naturvardsverket-11066).
- HELCOM, 2023a. Reproductive disorders: malformed embryos of amphipods. HELCOM supplementary indicator report. Online. [WWW Document]. *Reprod. Disord.* URL <https://indicators.helcom.fi/indicator/reproductive-disorders/> (accessed 6.19.24).
- HELCOM, 2023b. HELCOM Thematic assessment of hazardous substances, marine litter, underwater noise and non-indigenous species 2016-2021. *Baltic Sea Environment Proceedings* n°190; https://helcom.fi/post_type_publ/holas3_haz
- HELCOM, 2018. HELCOM Thematic assessment of hazardous substances 2011-2016. Available at: <http://www.helcom.fi/baltic-sea-trends/holistic-assessments/state-of-the-baltic-sea-2018/reports-and-materials/>
- Holmes, C.M., Brown, C.D., Hamer, M., Jones, R., Maltby, L., Posthuma, L., Silberhorn, E., Teeter, J.S., Warne, M.S.J., Weltje, L., 2018. Prospective aquatic risk assessment for chemical mixtures in agricultural landscapes. *Environ. Toxicol. Chem.* 37, 674–689. <https://doi.org/10.1002/etc.4049>
- Jahnke, A., Mayer, P., McLachlan, M.S., Wickström, H., Gilbert, D., MacLeod, M., 2014. Silicone passive equilibrium samplers as ‘chemometers’ in eels and sediments of a Swedish lake. *Environ. Sci. Process. Impacts* 16, 464–472. <https://doi.org/10.1039/C3EM00589E>
- Josefsson, S., 2017. Klassning av halter av organiska föroreningar i sediment (No. 2017:12), Geological Survey of Sweden (SGU). Uppsala.
- Kienzler, A., Barron, M.G., Belanger, S.E., Beasley, A., Embry, M.R., 2017. Mode of Action (MOA) Assignment Classifications for Ecotoxicology: An Evaluation of Approaches. *Environ. Sci. Technol.* 51, 10203–10211. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b02337>
- Kolesova, N., Sildever, S., Strobe, E., Berezina, N., Sundelin, B., Lips, I., Kuprijanov, I., Buschmann, F., Gorokhova, E., 2024. Linking contaminant exposure to embryo aberrations in sediment-dwelling amphipods: a multi-basin field study in the Baltic Sea. *Ecol. Indic.* 160, 111837. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2024.111837>
- Leal Filho, W., Nagy, G.J., Martinho, F., Saroar, M., Erache, M.G., Primo, A.L., Pardal, M.A., Li, C., 2022. Influences of Climate Change and Variability on Estuarine Ecosystems: An Impact Study in Selected European, South American and Asian Countries. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 19, 585. <https://doi.org/10.3390/ijerph19010585>
- Ledesma, M., Gorokhova, E., Nybom, I., Sobek, A., Ahlström, D., Garbaras, A., Karlson, A.M.L., 2024. Does pre-exposure to polluted sediment affect sub-cellular to population-level responses to contaminant exposure in a sentinel species? *Environ. Pollut.* 341, 122882. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122882>

- Löf, M., Sundelin, B., Bandh, C., Gorokhova, E., 2016. Embryo aberrations in the amphipod *Monoporeia affinis* as indicators of toxic pollutants in sediments: A field evaluation. *Ecol. Indic.* 60, 18–30. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.05.058>
- Mackay, D., Arnot, J.A., Wania, F., Bailey, R.E., 2011. Chemical activity as an integrating concept in environmental assessment and management of contaminants. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 7, 248–255. <https://doi.org/10.1002/ieam.139>
- Martella, G., Gorokhova, E., Sousa, P.F.M., Tretyakova, N.Y., Sundelin, B., Motwani, H.V., 2023. DNA Adductomics for the Biological Effect Assessment of Contaminant Exposure in Marine Sediments. *Environ. Sci. Technol.* 57, 10591–10603. <https://doi.org/10.1021/acs.est.3c00499>
- Nybom, I., Horlitz, G., Gilbert, D., Berrojalbiz, N., Martens, J., Arp, H.P.H., Sobek, A., 2021. Effects of Organic Carbon Origin on Hydrophobic Organic Contaminant Fate in the Baltic Sea. *Environ. Sci. Technol.* 55, 13061–13071. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c04601>
- Oberdörster, E., Cottam, D.M., Wilmot, F.A., Milner, M.J., McLachlan, J.A., 1999. Interaction of PAHs and PCBs with Ecdysone-Dependent Gene Expression and Cell Proliferation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 160, 101–108. <https://doi.org/10.1006/taap.1999.8745>
- OECD, 2023. Test No. 218: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Sediment. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD, 2007. Test No. 225: Sediment-Water Lumbriculus Toxicity Test Using Spiked Sediment. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD, 2004. Test No. 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test. <https://doi.org/10.1787/9789264069947-en>
- Oliveira dos Anjos, T.B., Abel, S., Lindehoff, E., Bradshaw, C., Sobek, A., 2023. Assessing the effects of a mixture of hydrophobic contaminants on the algae *Rhodomonas salina* using the chemical activity concept. *Aquat. Toxicol.* 265, 106742. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2023.106742>
- Raymond, C., Gorokhova, E., Karlson, A.M., 2021. polycyclic aromatic hydrocarbons have adverse effects on benthic communities in the Baltic Sea: implications for environmental status assessment. *Front. Environ. Sci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2021.624658>
- Redman, A.D., Parkerton, T.F., Leon Paumen, M., Butler, J.D., Letinski, D.J., den Haan, K., 2017. A re-evaluation of PETROTOX for predicting acute and chronic toxicity of petroleum substances. *Environ. Toxicol. Chem.* 36, 2245–2252. <https://doi.org/10.1002/etc.3744>
- Saladin, Y., 2023. Is protein content a useful endpoint in acute ecotoxicological testing? (MSc Thesis). Stockholm University, Stockholm, Sweden.
- Smith, K.E.C., Jeong, Y., 2021. Passive Sampling and Dosing of Aquatic Organic Contaminant Mixtures for Ecotoxicological Analyses. *Environ. Sci. Technol.* 55, 9538–9547. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c08067>
- Steigerwald, S., Saladin, Y., Alurralde, G., Abel, S., Sobek, A., Eriksson Wiklund, A.K., Gorokhova, E., 2024. Enhanced tolerance to narcosis in starved *Daphnia magna* neonates. *Environ. Toxicol. Chem.* accepted.

- Strode, E., Jansons, M., Purina, I., Balode, M., Berezina, N.A., 2017. Sediment quality assessment using survival and embryo malformation tests in amphipod crustaceans: The Gulf of Riga, Baltic Sea AS case study. *J. Mar. Syst.* 172, 93–103. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2017.03.010>
- Sundelin, B., Eriksson, A.-K., 1998. Malformations in embryos of the deposit-feeding amphipod *Monoporeia affinis* in the Baltic Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 171, 165–180.
- Swain, C.K., 2024. Environmental pollution indices: a review on concentration of heavy metals in air, water, and soil near industrialization and urbanisation. *Discov. Environ.* 2, 5. <https://doi.org/10.1007/s44274-024-00030-8>
- Tomlinson, D.L., Wilson, J.G., Harris, C.R., Jeffrey, D.W., 1980. Problems in the assessment of heavy-metal levels in estuaries and the formation of a pollution index. *Helgoländer Meeresunters.* 33, 566–575. <https://doi.org/10.1007/BF02414780>
- Van den Berg, M., Birnbaum, L., Bosveld, A.T., Brunström, B., Cook, P., Feeley, M., Giesy, J.P., Hanberg, A., Hasegawa, R., Kennedy, S.W., Kubiak, T., Larsen, J.C., van Leeuwen, F.X., Liem, A.K., Nolt, C., Peterson, R.E., Poellinger, L., Safe, S., Schrenk, D., Tillitt, D., Tysklind, M., Younes, M., Waern, F., Zacharewski, T., 1998. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ. Health Perspect.* 106, 775–792.
- Warne, M.S.J., 2003. A Review of the Ecotoxicity of Mixtures, Approaches to, and Recommendations for, their Management. *Proc. Fifth Natl. Workshop Assess. Site Contam.*

8. Publikationer och tillgänglighet av data

8.1 Vetenskapliga publikationer

Abel, S., Eriksson Wiklund, A.-K., Gorokhova, E., Sobek, A., 2024. Chemical Activity-Based Loading of Artificial Sediments with Organic Pollutants for Bioassays: A Proof of Concept. *Environ. Toxicol. Chem.* 43, 279–287.

Kolesova, N., Sildever, S., Strode, E., Berezina, N., Sundelin, B., Lips, I., Kuprijanov, I., Buschmann, F., Gorokhova, E., 2024. Linking contaminant exposure to embryo aberrations in sediment-dwelling amphipods: a multi-basin field study in the Baltic Sea. *Ecol. Indicators*. 160, 111837. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2024.111837> (Kolesova et al., 2024)

Raymond, C., Gorokhova, E., Karlson, A.M., 2021. Polycyclic aromatic hydrocarbons have adverse effects on benthic communities in the Baltic Sea: implications for environmental status assessment. *Front. Environ. Sci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2021.624658> (Raymond et al., 2021)

Ledesma, M., Gorokhova, E., Nybom, I., Sobek, A., Ahlström, D., Garbaras, A., Karlson, A.M., 2024. Does pre-exposure to polluted sediment affect sub-cellular to population-level responses to contaminant exposure in a sentinel species? *Environ. Pollut.* 341, 122882. (Ledesma et al., 2024)

Steigerwald, S., Saladin, Y., Alurralde, G., Abel, S., Sobek, A., Eriksson Wiklund, A.K., Gorokhova, E., 2024. Enhanced tolerance to narcosis in starved *Daphnia magna* neonates. *Environ. Toxicol. Chem.* accepted. (Steigerwald et al., 2024)

8.2 Rapporter

Gorokhova et al., 2023. Linking biological effects to contaminant levels in sediment, fish and benthic invertebrates along the Swedish coast, Report, Swedish Environmental Protection Agency, 86 pp.; <https://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:naturvardsverket:diva-11066> (No. oai:DiVA.org:naturvardsverket-11066). (Gorokhova et al., 2023)

8.3 Preprints

Gorokhova, E., 2024. Integrating composite toxicity potential indices with biological indicators: Advancing contaminant status assessment under the MSFD. *bioRxiv*. (Gorokhova, 2024)

Gorokhova, E., Ledesma, M.G., Karlsson, A.M.L., Garbaras, A., Ketmaier, V., Sundelin, B., 2024. Understanding amphipod reproductive health drivers in the Baltic Sea: A Study Based on Structural Equation Modeling. Authorea. <https://www.authorea.com/users/243058/articles/575500-understanding-amphipod-reproductive-health-drivers-in-the-baltic-sea-a-study-based-on-structural-equation-modeling> (Gorokhova et al., 2024).

8.4 Examensarbeten på masternivå

Yves Saladin. 2023. The Use of Protein Content as a New Endpoint in Acute Ecotoxicological Testing, Stockholm University. (Saladin, 2023)

Manuela Ospina Arboleda. 2023. Sorption kinetics of 4 PAHs in different batches of peat and use of passive sampling to measure target chemical activities. Stockholm University. (Arboleda, 2024)

8.5 Vetenskapliga konferensbidrag

Abel S., Akkanen J., Eriksson Wiklund A.-K., Gorokhova E., Sobek A. 2023. Assessing environmental risks of hydrophobic organic contaminants in sediments using chemical activity. Conference on Sustainable Management of Contaminated Sediments: ongoing research in Sweden (Swedish EPA). Platform presentation. Stockholm, Sweden

Abel S., Akkanen J., Chaumet B., Eriksson Wiklund A.-K., Gorokhova E., Sobek A. 2023. Integrating Chemical Activity into Sediment-Water Bioassays with Benthic Invertebrates. SETAC North America 44th annual meeting. Poster presentation. Louisville, KY, USA

Abel S., Ospina Arboleda M., Eriksson Wiklund A.-K., Gorokhova E., Sobek A. 2023. How to set up sediment-water bioassays for hydrophobic organic contaminants using their chemical activity as a dose metric. SETAC North America 44th annual meeting. Poster presentation. Louisville, KY, USA

Abel S., Chaumet B., Steigerwald S., Eriksson Wiklund A.-K., Gorokhova E., Sobek A. 2023. The (sometimes overlooked) role of temperature in passive dosing experiments and chemical activity-based exposures. SETAC North America 44th annual meeting. Poster presentation. Louisville, KY, USA

Abel S., Steigerwald S., Alurralde G., Eriksson Wiklund A.-K., Gorokhova E., Sobek A. 2022 Moving Towards a Chemical Activity-Based Risk Assessment of Sediments. SETAC North America 43rd annual meeting. Platform presentation. Pittsburgh, PA, USA

Abel S., Akkanen J., Steigerwald S., Alurralde G., Eriksson Wiklund A.-K., Gorokhova E., Sobek A. 2022. Validation of a Novel Test System for Exposure Assessment with Benthic Invertebrates and Chemical Activity as a Dose Metric. SETAC North America 43rd annual meeting. Poster presentation. Pittsburgh, PA, USA

Abel S, Eriksson Wiklund A.-K., Gorokhova E., Sobek A. 2022 Moving Towards a Chemical Activity-Based Risk Assessment of Sediments. SETAC Europe 32nd annual meeting. Poster presentation. Copenhagen, Denmark

SETAC Europe 33rd Annual Meeting (30 April–4 May 2023) - Ireland. Isotopic variation in response to the combined chemical exposure and temperature. Alurralde G, Steigerwald S, Garbaras A, Abel S, Eriksson-Wiklund A-K, Sobek A, Gorokhova E.

Alurralde G, Steigerwald S, Gineitytė M, Eriksson-Wiklund A-K, Sobek A, Abel S, Garbaras A, Gorokhova E. International Symposium PRIMO 22 (26-29 May 2024) – France. Expanding the scope of stable isotope analysis to unravel chemical exposure effects.

S. Steigerwald, G. Alurralde, S. Abel, AK. E.-Wiklund, A. Sobek, E. Gorokhova. Incorporating nonchemical stressors into ReproIND indicator. SETAC North America; November 2022; POSTER.

S. Steigerwald, G. Alurralde, S. Abel, AK. E.-Wiklund, A. Sobek, E. Gorokhova. Combined effects of chemical mixtures and temperature on *Daphnia magna*. SETAC Young Environmental Scientists; August 2023; POSTER.

S. Steigerwald, G. Alurralde, S. Abel, AK. E.-Wiklund, A. Sobek, E. Gorokhova. Evaluating combined effects of temperature and chemical exposure in *Daphnia magna*. SETAC Europe; May 2024; POSTER.

S. Steigerwald, Y. Saladin, G. Alurralde, S. Abel, AK. E.-Wiklund, A. Sobek, E. Gorokhova. Enhanced tolerance to narcosis in starved *Daphnia magna* neonates. SETAC Europe; May 2024; PLATFORM.

8.6 Presentationer för intressenter

Alurralde Gastón, Gorokhova Elena. Second Informal Consultation Session of the Expert Group on Hazardous Substances (IC EG HAZ 2-2023). Online meeting – February 7-8, 2023. Presentation of INSERT and discussion on chemical activity applications.

Alurralde Gastón, Gineitytė Monika, Garbaras Andrius, Gorokhova Elena. Baltic Sea Day 2021. Baltic Sea Center, Stockholm University - Sweden. Reproductive disorders and contaminant exposure drive isotopic variability in *Monoporeia affinis*.

8.7 Öppna data

Ett integrerat dataset över föroreningsexponering, reproduktiv hälsa och miljövariabler i Östersjön har gjorts öppet tillgängligt inom ramen för INSERT-projektet. Datasetet omfattar kemiska data, biologiska effektmått (inklusive ReproIND) samt tillhörande miljöparametrar och utgör underlag för de analyser som presenteras i denna rapport.

Datasetet är publikt tillgängligt via Zenodo: DOI: 10.5281/zenodo.17357254.

Rapporten uttrycker nödvändigtvis inte Naturvårdsverkets ställningstagande. Författaren svarar själv för innehållet och anges vid referens till rapporten.

Kumulativa effekter: Inkludering av icke-kemiska stressorer i indikatorn ReproIND

Projekt INSERT: integrering av övervakningsdata, fältstudier, experimentell forskning och indikatorutveckling

I projektet INSERT samarbetade experter inom ekotoxikologi, miljö-kemi, ekologi och biokemi för att förbättra bedömningen av biologiska effekter enligt havsmiljödirektivet (MSFD). Projektet införlivade icke-kemiska stressfaktorer och utnyttjade de senaste framstegen inom bedömning av blandningstoxicitet och övervakning av föroreningar i Östersjön i syfte att åtgärda brister i traditionella riskbedömningar, som förbiser kumulativa miljöeffekter. Den integrerade metoden stöder pågående revideringar av övervaknings- och bedömningsstrategier för biologiska effekter. Projektresultaten kommuniceras till HELCOM och nationella miljömyndigheter för att främja miljöbedömning och förvaltning av Östersjön, både nationellt och internationellt.

Projektet har finansierats med medel från Naturvårdsverkets miljö-forskningsanslag som finansierar forskning till stöd för Naturvårds-verkets och Havs- och vattenmyndighetens kunskapsbehov.



Havs
och Vatten
myndigheten