

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/270103445>

Tiaminbrist och överdödlighet i neurotoxiska symptom hos ejder i Stockholms skärgård

Technical Report · September 2009

DOI: 10.13140/2.1.3328.4160

CITATIONS

0

READS

408

9 authors, including:



Lennart Balk

Stockholm University

134 PUBLICATIONS 2,830 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Gun Åkerman

Stockholm University

43 PUBLICATIONS 538 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Tomas Hansson

Stockholm University

36 PUBLICATIONS 316 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Gunnar Thor Hallgrímsson

University of Iceland

65 PUBLICATIONS 241 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

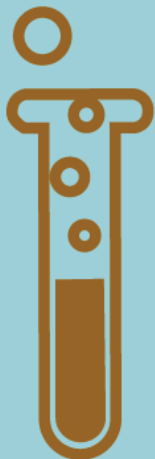
Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Bird Migration Strategies [View project](#)



Anthropogenically caused thiamine deficiency in the ecosystem [View project](#)



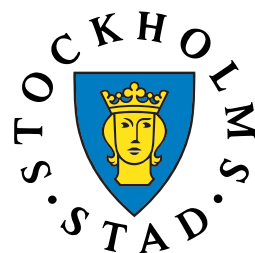
Nya gifter -
nya verktyg



ISSN 1653-9168

Tiaminbrist och överdödlighet i neurotoxiska symptom hos ejder i Stockholms skärgård

Balk, L., Hägerroth, P.-Å., Åkerman, G., Hanson, M., Tjärnlund, U.,
Hansson, T., Hallgrímsson, G., Zebühr, Y. och Sundberg, H.
Institutionen för tillämpad miljövetenskap, Stockholms universitet



Under åren 2004-2008 drev Miljöförvaltningen tillsammans med Stockholm Vatten AB projektet Nya gifter – Nya verktyg med finansiering ur stadens Miljömiljard.

Projektets mål var att ta fram information om vilka ämnen som bör prioriteras i stadens miljögiftsarbete, både i form av åtgärder och miljöövervakning.

Det beskrev också var i staden de prioriterade ämnena används, hur de når stockholm-miljön och vad staden och andra aktörer kan göra för att minska de problem som är förknippade med miljögifter i Stockholm.

En sammanfattande slutrapport publicerades under hösten 2008.

Varje författare ansvarar för innehållet i respektive delrapport.

Stockholm 2009

Omslagsillustration:
Tobias Flygar

Ett samarbete mellan:



Landstingets Miljövårdsfond

Skärgårdsstiftelsen

Signhild Engkvists Stiftelse

Stiftelsen Olle Engkvist

Byggmästare



Innehåll

Sammanfattning	2
Abstract	4
1 Inledning	6
2 Metoder	13
3 Resultat och Diskussion	18
4 Osäkerhet	40
5 Slutsatser	41
6 Åtgärder och ansvar	42
7 Erkännanden	43
8 Referenser	44

Sammanfattning

För närvarande pågår en mycket allvarlig miljöstörning över stora delar av Stockholms skärgård som ej är fullt uppmärksammas och därmed ej heller undersökt och klarlagd. Miljöstöringen består av tre tydliga observationer; neurotoxisk överdödlighet, reproduktionsstörningar och neråtgående trend i populationernas storlek. Symptombilden verkar kunna drabba olika biota (fågel och fisk) på ett delvis analogt sätt. Således kan det vara motsvarande störningar som vi nu observerar i vår miljö hos båda dessa grupper av djurarter. Förekomst av sjukdomen med tillhörande symptombild, tillsammans med kännedom om drabbade arter i Sverige och internationellt, gav vid handen att brist på vitamin B1 (tiamin) borde vara en prioriterad arbetshypotes, som härmed har undersökts i Stockholms vattenrecipient och skärgård.

Ett syfte med föreliggande undersökning i Stockholms skärgård har således varit att undersöka om en brist på tiamin kan utgöra grundorsaken till den neurotoxiska överdödlighet som har observerats hos flera arter av sjöfågel i Stockholms skärgård. Som "modellart" för fågel i Stockholms skärgård valdes ejder (*Somateria mollissima*). Mot den eventuella bakgrunden att de observerade miljöstöringarna i Stockholms skärgård kan utgöra en del av ett större påverkansområde i Östersjön, insamlades kontrollmaterial från sydvästra Island (Reykjanes), som antogs vara lämpat som kontrollområde till Stockholms skärgård.

För att fastställa om ejdern är drabbad av en cellulär/biokemisk brist av vitaminet har tiaminberoende enzymer analyserats i levern. Att rekonstituera tiaminberoende enzymatiska aktiviteter för levern *in vitro* för att påvisa brist på tiamin *in situ*, har också varit en viktig del i arbetet. Tiaminbristen har också blivit karakteriserad genom ett analytiskt kemiska mätningar av tiamin och dess olika fosforylerade former i ägg, i helhjärna samt i ett målområde i hjärnan för tiaminbrist, nämligen diencephalon.

Resultaten har tydligt visat att ejder i Stockholms skärgård högst sannolikt är drabbad av en brist på det essentiella vitaminet tiamin. Bristen av fritt tiamin hos ejdern har blivit påvisad i ägg genom att halterna som kunde analyseras i ägg från Stockholms skärgård var signifikant mycket lägre än halterna i äggen från Island. Analyser av tiamin och dess olika fosforylerade former i hjärna från ejderpull uppvisade också signifikant lägre halter i

Stockholms skärgård jämfört med individerna från Island. Delområden i hjärnan såsom diencephalon uppvisade också tydliga och signifikant lägre halter i Stockholms skärgård jämfört med individerna från Island. Analyserna av de tiaminberoende enzymerna transketolas och α -ketoglutaratdehydrogenas i levern uppvisade lägre specifik aktivitet i ejderpull från Stockholms skärgård jämfört med området på Island. Den lägre specifika aktiviteten i levern är högst sannolikt ett resultat av en nedreglering av den enzymatiska aktiviteten, orsakad av tiaminbristen. Latens för dessa enzymer, dvs. andelen enzym utan tiamindifosfat i aktivt site (andel apoenzym), uppvisade dessutom en tydligt och signifikant ökad andel latens i fåglarna från Stockholms skärgård. Detta utgör tillsammans en säkerställd "bild" av att ejdern i Stockholms skärgård är kraftigt påverkad av en tiaminbrist.

Undersökningarna är planerade och utförda med antagandet att de(n) ansvariga substansen(erna) har ett antropogent ursprung, samt innehar en tidigare ej känd egenskap, alternativt utgör ett nytt och okänt gift, orsakande tiaminbristen. Även om arbetet har varit inriktat på att biokemiskt och analytiskt kemiskt karakterisera sjukdomens neurotoxiska grund, och geografiska utbredning i Stockholms skärgård, har också arten för dessa studier valts mot bakgrund att senare underlätta arbetet med att undersöka hur exponeringen fortgår orsakande tiaminbrist syndromet.

Abstract

A large area of the Stockholm Archipelago is currently experiencing a serious ecological disturbance. There is a lack of awareness regarding this situation, which has therefore been neither investigated nor explained. This disturbance is characterized by three observations: 1) unnatural number of die-offs manifested by neurological dysfunction, 2) reproductive impairment, and 3) population decreases. Both birds and fish are affected in a similar fashion that indicates that they may be suffering from the same affliction. Considering our observations of this condition and its symptoms together with our knowledge of the affected species both in Sweden and abroad, we reached the conclusion that thiamine deficiency should take priority as a working hypothesis. This has been the starting point for our investigations in the receiving waters of Stockholm and its archipelago.

*One purpose of our investigation is therefore to study whether thiamine deficiency could be the cause of neurological dysfunction culminating in the unnatural number of die-offs among several species of seabirds in the Stockholm Archipelago. The common eider (*Somateria mollissima*) was chosen as a model species for birds. Since this disturbance might be affecting a larger area of the Baltic Sea, material for control samples was instead collected from the Reykjanes region of southwest Iceland, which could reasonably be assumed to constitute a control site.*

To determine whether the eider is suffering from a cellular, biochemical deficiency we measured the specific activities of thiamine-dependent enzymes in the liver. By adding the cofactor, thiamine diphosphate, we could determine the proportion of "latent" enzyme, i.e. enzyme lacking the cofactor in the active site, confirming in vitro an in situ thiamine deficiency. Thiamine deficiency has also been indicated through the chemical analysis of thiamine and its phosphate esters in egg yolk, whole brain and diencephalon, the brain region primarily affected by thiamine deficiency.

The results clearly show that the eider in the Stockholm Archipelago most likely is affected by a deficiency of the essential vitamin thiamin. Eider eggs from the Stockholm Archipelago had significantly lower levels of free thiamine than eggs from Iceland. Levels of thiamine and its phosphate esters were also significantly lower in brain samples, both whole brain and diencephalon, from eider ducklings from the Stockholm Archipelago than in corresponding

samples from Iceland. The specific activities of the thiamine-dependent enzymes transketolase and α -ketoglutaratedehydrogenase in liver were lower in eider ducklings from the Stockholm Archipelago than in those from Iceland. This decrease in specific activity is likely a result of a down-regulation of the enzymatic activity, caused by thiamine deficiency. We also found that the proportion of "latent" enzyme was substantially higher in birds from the Stockholm Archipelago. These results provide firm evidence of a substantial thiamine deficiency affecting the common eider in the Stockholm Archipelago.

The investigations were planned and performed under the assumption that the causative agent(s) are of anthropogenous origin, and has a previously unknown property or constitutes a new and unknown pollutant, causing the thiamine deficiency. Although the work was intended to characterize, biochemically and analytic chemically, the neurotoxic basis of the disease, and its geographical distribution in the Stockholm Archipelago, the species for these investigation was also selected with the background to facilitate the work to investigate how the exposure proceeds, causing the thiamine deficiency syndrome.

I Inledning

För närvarande pågår en mycket allvarlig miljöstörning över stora delar av Stockholms skärgård som ej är fullt uppmärksammas och därmed ej heller undersökt och klarlagd. Nyligen utförda observationer i Stockholms skärgård och längs kusten söder om Stockholm visar att ett stort antal individer hos olika fågelarter förlamas och därefter dör i ett neurotoxiskt symptom (Balk *et al.* 2009.). Situationen blir inte mindre allvarlig av att många av de i Stockholms skärgård häckande sjöfågelarterna uppvisar säkerställda minskningar i populationsstorlek sedan flera år tillbaka (Ahlbom och Fagergren 2004).

Under den senaste 10-årsperioden har det rapporterats för ICES fiskeområde 27, där Stockholms skärgård ingår som ett dominerande delområde, en mycket allvarlig neråtgående trend för flera arter av fisk såsom abborre, gädda och gös (Söderberg och Gårdmark, 2003). En minskad reproduktion hos flera kustnära fiskarter är också konstaterad, framför allt i södra delarna av Stockholms skärgård (Ljunggren *et al.*, 2005).

Sammantaget är dessa iakttagelser mycket oroväckande vad gäller framtiden för Stockholms skärgård såväl som för Östersjön i stort. De ovan nämnda populationsstörningarna i Stockholms skärgård utgör eventuellt enbart en del av en större miljöstörning utmed den Svenska Östersjökusten, där liknande dödlighet och minskningar i populationsstorlek har observerats under senare år (Anonym 2003, Lindström och Svensson 2004; 2006, Mörner *et al.* 2005, Karlsson *et al.* 2005). Förvaltandet av en uthållig miljö är i allt väsentligt omöjligt, om inte nuvarande trender kan brytas.

I punkter kan situationen sammanfattas på följande sätt:

- Flera arter av fågel uppvisar en överdödlighet tillsammans med tydliga och likartade toxiska/neurotoxiska symptom. Dessa symptom observerades i riktningen för den akvatiska föroreningsgradienten från Stockholm, som nyligen har beskrivits i Linderoth *et al.* 2006 och Hansson *et al.* 2006b. Således kan man inte utesluta risken av en kemiskt framkallad sjukdom från antropogena aktiviteter i Stockholm och dess omgivning. Att sjukdomen bör antas vara av antropogent kemiskt orsakat ursprung framgår, dels av att flera arter drabbas på ett likvärdigt sätt (biologiska agens såsom parasiter, bakterier eller virus drabbar sannolikt ej så många skilda arter på detta

analoga sätt), dels av att dödligheten i neurotoxiska störningar i samband med reproduktionen måste anses som onaturlig i ett friskt och opåverkat ekosystem.

- Nyligen utförda observationer (Ahlbom och Fagergren 2004) och pilotstudier (Appelberg *et al.*, muntligt Miljödepartementet 20 aug. 2004) tyder på att fortplantningen också är störd hos flera fågel- och fiskarter i Stockholms skärgård.
- Många fågelarter som häckar i Stockholms skärgård uppvisar en nedgång i populationen, framför allt under de senaste 5–15 åren (Ahlbom och Fagergren 2004). Ett motsvarande mönster, med vikande populationstrender, för flera arter av fisk har observerats i Stockholms skärgård (Söderberg och Gårdmark 2003).

Till bakgrunden hör också att laxen (*Salmo salar*) i stora delar av Östersjön drabbas av en sjukdom som orsakas av brist på det essentiella vitaminet vitamin B₁ (tiamin). Sjukdomen kallas M74 och drabbar laxen mycket allvarligt, under 90-talet dog all (100 %) avkomma från cirka 40 % av laxhonorna i medeltal. Under senare år (2000–2003, 2006) har sjukdomen varierat (~20–35 %), för att bara utgöra några få procent under 2004 och 2005. Sjukdomen har även tidigare visat på kraftiga tillfälliga nedgångar, under åren 1980–1984, och även 1998 var sjukdomsfrekvensen relativt låg (<10 %), för att därefter under efterföljande år visa på kraftiga ökningar. Sammantaget kan man konstatera att någon säker signifikant förbättring ej har kunnat påvisas för denna bristsjukdom över åren, i Östersjön. Denna tiaminbrist drabbar flera arter i Östersjön, även havsöringen (*Salmo trutta*) uppvisar M74 liknande symptom på vissa platser. Även i andra förorenade inlandhav och större sjösystem har tiaminbrist kunnat konstateras hos flera fiskarter (Brown and Honeyfield 2002). Slutligen kan understrykas att även andra arter såsom alligatorer uppvisar lägre halter av tiamin i ägg (cirka 6 ggr lägre), i stora sjösystem som är konstaterade att vara förorenade (Ross *et al.* 2002). Vidare, och mycket intressant, att förhöjd mortalitet hos alligatorerna kan vara mer korrelerat med tiaminbrist än med flera ”klassiska” miljögifter har presenterats i ett arbete (Sepulveda *et al.* 2004).

Trots forskning i Sverige och övriga Skandinavien under framför allt mitten på 1990-talet och fortfarande pågående undersökningar i Nordamerika, har ingen definitiv orsak till denna tiaminbrist kunnat påvisas (Brown and Honeyfield 2002). Vi har i tidigare arbeten inom detta forskningsområde karakteriserat tiaminbristsymptomen hos fisk (Åkerman and Balk 1998; Åkerman *et al.* 1998; Amcoff *et al.* 2000; Amcoff *et al.* 2002) och även parallellt utvecklat metoder som utgör viktiga verktyg för att bringa klarhet i denna

“bristsjukdom” hos både fisk och fågel (Åkerman and Balk 1995; Walker *et al.* 1996; DeRoode *et al.* 2000; Ekman *et al.* 2003; Ekman *et al.* 2004). Vi har arbetat efter hypotesen att ett eller flera gifter kan interagera med tiamins normala cellulära metabolism och på så sätt orsaka att en brist på tiamin uppkommer i djuren (Åkerman *et al.* 2003). Generellt och i princip finns det ingen anledning att anta att ett (eller flera) gift(er) i miljön, skulle uppvisa annorlunda biokemisk verkningsmekanism i fisk jämfört med fågel. Således kan det vara motsvarande störningar som vi nu observerar i vår miljö hos båda dessa grupper av djurarter.

Tiamin

Tiamin förekommer i fyra olika former i kroppens vävnader. Tiamin tas oftast upp som fritt tiamin via dieten, dvs. icke fosforylerat tiamin (T). Väl inne i cellen hos ryggradsdjur fosforyleras tiamin genom ett kinas som adderar två fosfatgrupper i en enzymatisk reaktion, tiamindifosfat (TDP) bildas. Tiamindifosfat är den essentiella kofaktorn för minst tre essentiella livsuppehållande enzymatiska funktioner i cellen, nämligen transketolas, pyruvatdehydrogenas och α -ketoglutaratdehydrogenas. Transketolas är essentiell i hexosmonofosfatshunten vars funktioner är att producera NADPH, att producera byggstenar för nukleinsyrasyntes (DNA, RNA) och att producera 4-, 5- och 7-kolssocker för vidare metabolism i glykolysen. Pyruvatdehydrogenas är metaboliskt lokaliserad till slutet av glykolysen, där den är ansvarig för kopplingen till citronsyracykeln och förhindrar att laktat kan byggas upp som leder till att en sur miljö bildas, som på sikt leder till cellernas och vävnadens förstörelse. Speciellt så har laktatbildning vid tiaminbrist ansetts kunna skada neurologiska funktioner i hjärnan. α -ketoglutaratdehydrogenas, lokaliserad till mitokondrierna, producerar reducerande ekvivalenter till andningskedjan och är genom detta helt essentiell för de molekylära mekanismerna för andningskedjan, andningen. Sammantaget är det inte svårt att mot denna bakgrund inse hur störningar på dessa essentiella och därmed livsuppehållande enzymatiska aktiviteter kan orsaka allvarlig och omedelbar skada, även när de bara är störda till viss del i celler och vävnader. Även om tiaminets roll som kofaktor för ett antal enzymatiska skeenden i cellerna är relativt välkända så finns det ytterligare essentiella mekanismer där tiamin är centralt i cellen. Tiamindifosfat kan bli ytterligare fosforylerat till tiamintrifosfat (TTP) och har då essentiella funktioner i samband med neurologiska funktioner i stora delar av hjärnan (Nakagawasai 2005). Tiamintrifosfat föreligger i de

flesta normala fall i mycket låga koncentrationer (delar av procent) jämfört med övriga former av tiamin. Eftersom nuvarande kunskapsläge väl indikerar att de olika formerna av tiamin kovarierar, så har vi inte fokuserat resurser på att analysera trifosfatformen specifikt i alla vävnader. Det finns dock en form av tiamin som inte kovarierar med de övriga formerna i samband med brist på tiamin, och det är tiaminmonofosfat (TMP). Tiaminmonofosfat anses för närvarande endast utgöra en nedbrytningsprodukt av de högre fosforylerade formerna, men, i samband med tiaminbrist kan tiaminmonofosfat vara speciellt intressant att följa. Anledningen är att vid en brist kan ofta just denna form uppvisa kraftigare nedgång än andra former. Bakgrunden anses vara att vid en bristsituation försöker cellerna återanvända denna form av tiamin för att minska tiaminbehovet i dieten. Följaktligen minskar halterna av monofosfatformen cellulärt eftersom den ej längre bara skall utsöndras från cellerna.

Symptom av tiaminbrist

Som underlag till överdödligheten hos adulta fåglar i ett neurotoxiskt syndrom har vi beskrivit ett sjukdomsförlopp/symptombild för gråtrut (*Larus argentatus*), ett sjukdomsförlopp som också till stora delar är identiskt med sjukdomsförloppet för andra arter av sjöfågel som drabbas. Denna symptombild är också i allt väsentligt identiskt med hur experimentellt framkallad tiaminbrist har befunnits påverka gråtrut i tidigare presenterade undersökningar (Gilman 1978). Först förlorar fågeln förmågan att hålla vingarna på ett korrekt sätt utmed kroppen, när den står. Därefter förlorar den förmågan att flyga, men den kan fortfarande utnyttja benen till att stå och gå/springa tämligen obehindrat. Därpå förlorar den gradvis styrkan i benen, som efter en tid blir helt förlamade. (Under denna tid så försöker fågeln ofta använda både näbben och vingknogarna för att försöka ta sig framåt.) Vid den här tiden kan också oftast en mycket ansträngd andning tydligt observeras. Andningen blir mer och mer ansträngd under hela fågelns sjukdomsförlopp. I samband med detta har ytterligare kraft förlorats i vingarna, som liksidigt förlamade hänger ner från den liggande fågelkroppen. Under denna gradvisa förlamningsprocess kan ofta iakttas en ökning av något som ser ut som "askflagor" i fågelns iris. Diarré innehållande galla rinner nu också ur fågelkroppen. Under hela denna sjukdomsprocess har fågeln, tillsynes, full funktion av huvudets rörelser och därmed nackmuskelnerna. Näbbens kraft blir dock försvagad på ett tidigt stadium, när kraften i benen minskar så försvinner samtidigt den mesta kraften i näbben. Under

sjukdomsprocessen så dricker fågeln gärna vatten om den är törstig, även om man måste hjälpa vissa individer genom att doppa näbben i vattenskålen. Mat vägras dock konsekvent, i försök med sondmatning kastar fågeln ofta omgående upp maten. I slutskedet kan speciellt nerv- och muskelryckningar, konvulsioner och olika typer av spasmer iakttas, ofta i mindre skala men ibland i en omfattning som berör hela fågelns kropp. Nu inträder oftast döden inom 12 timmar för fågeln.

Hela sjukdomsprocessen ser ofta ut att ta ungefär 7–14 dygn, men vi har observerat att sjukdomsförloppet varierar beroende på vid vilken tidpunkt på året som fåglarna drabbas. På våren går det långsammare jämfört med sensommaren. I övrigt har konstaterats att fåglar drabbas året runt av sjukdomsförloppet, under häckningssäsongen är det dock lättare att finna de drabbade individerna. Det kan antas bero på åtminstone två faktorer. Det faktum att många fåglar är kolonihäckande gör att det är lättare att observera drabbade individer i en större samling av arten. I samband med häckningen producerar honan ägg och har ett förhöjt behov av vissa näringsämnen (inkl. tiamin) som därigenom kan leda till att en bristsituation lättare uppkommer. Att honor drabbas i större utsträckning än hannar är också ett mönster som kan ses i fält. Exempelvis ser honorna för ejder ut att drabbas oftare än hanarna, både vad gäller fåglar med tydliga symptom och vad gäller minskande population.

En sak som säkert kan konstateras utifrån ovan beskrivna symptombild/sjukdomsförlopp är att fåglarna dör på ett högst onaturligt sätt. Undersökningar utförda vid Statens Veterinärmedicinska Anstalt (SVA) har under de senaste 7–8 åren provtagit drabbade fåglar, med avseende på eventuell påverkan av parasiter, bakterier eller virus, i denna symptombild. Även om enstaka fåglar i det analyserade materialet har visat sig drabbade (ex. hakmask, botulism och H5N1), så har analyserna tydligt visat att det inte finns någon systematisk påverkan från något biologiskt agens i de drabbade fåglarna (Mörner *et al.* personlig kommunikation 2004–2007). I övrigt skall också understrykas att fåglar under sjukdomsförloppet, och även nyligen döda, oftast påträffas i gott till mycket gott hull. Generell svält kan således inte utgöra en orsak till denna onaturliga död hos fåglarna.

Karakteristik för ejder (*Somateria mollissima*)

Ejderns huvudsakliga diet i Östersjön består av blåmussla (*Mytilus edulis*). Ejdern har en utbredning runt norra halvklotet mot norra polen samtidigt som den migrerar relativt kort. Ejdern provtagen på Island under häckningssäsongen är stationär året runt på Island. Ejdern som reproducerar sig i Östersjön migrerar till Mellaneuropa för vintern. Den europeiska populationen av ejder har minskat kraftigt under senare år (Desholm *et al.* 2002; Karlsson *et al.* 2005; Lindström and Svensson, 2006). Även i Stockholms skärgård uppvisar ejdern dramatiska nergångar under senare år (Ahlbom och Fagergren 2004). I samband med fältobservationer har observerats att denna art drabbas av det neurotoxiska syndromet, både adulta fåglar och pull i boet (ducklings) har observerats dö i symptombilden (se Fig. 23 nedan). Vi har observerat att en dödlighet på 90–99 % kan observeras under de första 72 timmarna efter kläckningen.

Arbetshypotes

Förekomst av sjukdomen med tillhörande symptombild (Gilman 1978), tillsammans med kännedom om drabbade arter i Sverige och internationellt (Åkerman and Balk 1998, Brown and Honeyfield 2000), gav vid handen att brist på vitamin B₁ (tiamin) utgör en prioriterad arbetshypotes som borde undersökas i Stockholms vattenrecipient och skärgård. Det faktum att gråtrutar funna i fält, fåglar som är förlamade och därmed har förlorat sin förmåga att flyga kan botas med hjälp av intramuskulär injektion med tiamin (negativa kontroll fåglar fick salin) med stor signifikant säkerhet (Fishers exakta test, $P = 0,00087$) (Balk *et al.* 2009), har ytterligare motiverat vår arbetshypotes. Tiaminbristen som drabbar flera laxartade fiskar i Östersjön och i de Stora sjöarna i USA och Canada är oftast undersökta via analyser av rommen från dessa fiskar. Att det i dessa fall rör sig om en brist som överförs från honan till avkomman råder det idag ingen tvekan om. Följaktligen, att en analog störning hos andra äggläggande djur skulle kunna analyseras via gulan/gulesäcken för att eventuellt påvisa en tiaminbrist är ett rimligt antagande. För eventuella vidare studier är undersökningarna också planerade och utförda med antagandet att de(n) ansvariga substansen(erna) kan vara kända, men innehar en tidigare ej känd egenskap, dvs. att orsaka tiaminbrist. Alternativet är att de(n) ansvariga substansen(erna) utgör ett nytt och okänt gift, som orsakar tiaminbristen.

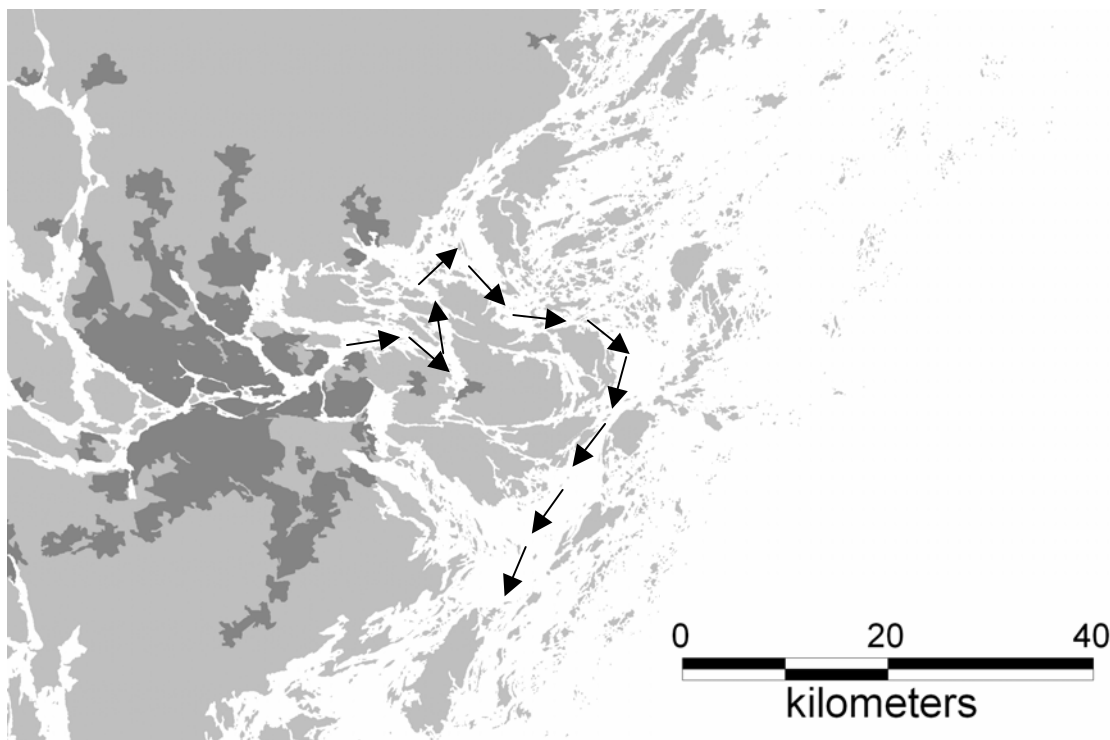
Med den ovan angivna bakgrunden har syftet med föreliggande undersökning inkluderat följande:

- Undersöka om en brist på vitamin B1 (tiamin) kan utgöra grundorsaken till den neurotoxiska överdödlighet som har observerats hos ejder i Stockholms skärgård.
- Att utveckla och optimera nya biokemiska verktyg för att vidare studera denna miljöstörning (miljöövervakning) har också varit en central uppgift för projektet.

2 Metoder

2.1 Undersökningsområden

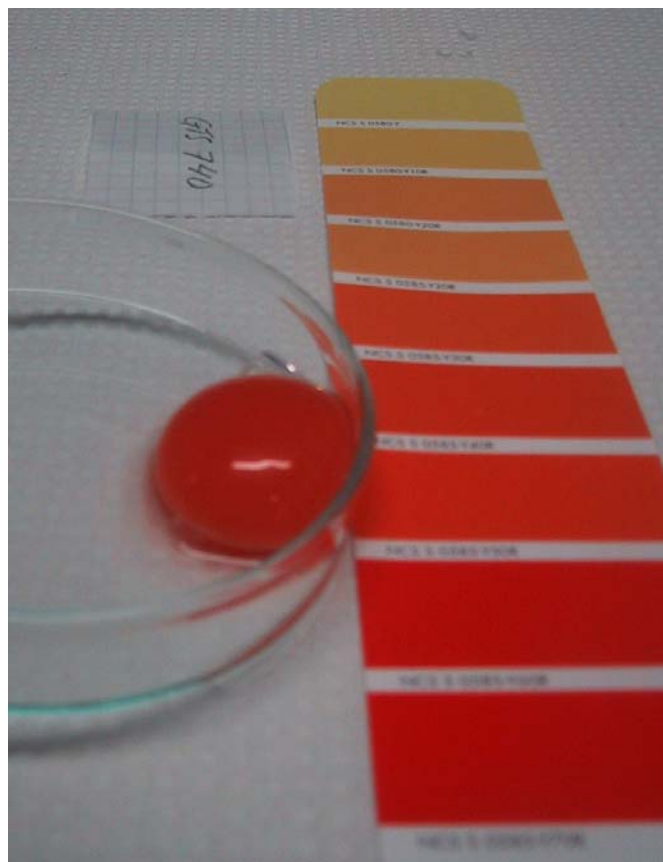
Tidigare studier har visat att Stockholm utgör en punktkälla för ett stort antal antropogena ämnen med en kraftig påverkan, både vad gäller biologiska effekter och vad gäller ett mycket stort geografiskt påverkansområde (Linderoth *et al.* 2006, Hansson *et al.* 2006a, Hansson *et al.* 2006b, Hansson *et al.* In prep.). I föreliggande undersökning har vattenrecipienten från de centrala delarna av Stockholms skärgård undersökts. De undersökta lokalernas förekomst och utbredning har medfört, att en gradient på cirka 30–40 km har undersökts. I Fig. 1 visas översiktligt det undersökta området med Stockholms urbaniserade områden utmärkt i mörkt grått. Kontrollmaterial insamlades från sydvästra Island under våren, både ägg (2005) och sedermera även ejderpull (2005 och 2006), som antogs att kunna utgöra ett kontrollområde till Stockholms skärgård.



Figur 1. Karta översiktligt beskrivande Stockholm och Stockholms skärgård. De mörkgrå ytorna visar urbaniserade områden, och de ljusgrå områdena utgör i huvudsak naturmark. De vita områdena utgör vattenområdena runt Stockholm. För detaljer rörande vattenrecipienten från Stockholm och dess vidare spridning och spädning i Stockholms skärgård hänvisas till nyligen presenterade data i Linderoth *et al.* 2006. En förenklad strömningsriktning av det renade avloppsvattnet från Stockholms centrala delar visas med hjälp av de svarta pilarna.

2.2 Provtagning av ägg

Ägg insamlades när de var nylagda och innan ruvningen påbörjats. Detta förfaringssätt är helt nödvändigt för att undvika att någon konsumtion av tiamin föranlett av cellbildning och embryouppbyggnad i äggen har förekommit. Äggen vägdes och längd och bredd mättes med skjutmått. Tidigare studier har visat att gulan i ägget är den matris där tiamin återfinns i höga koncentrationer. Äggen knäcktes och innehållet hälldes ut i en Petri-skål som visas i Fig. 2. Därefter provtogs gulan med hjälp av att en spruta (storlek 2 ml, utan kanyl) fördes ner i gulan så att den kunde insamlas utan risk för kontaminering med vitan.



Figur 2. Provtagning av fågelägg. I samband med provtagning av äggula genomförs en semikvantitativ uppskattning av koncentrationen av röda pigment (astaxantin etc.) med hjälp av en internationell färgskala.

Med ägget vilande i Petri-skålen uppskattades också semikvantitativt mängden rött pigment (framför allt astaxantin) i gulan genom jämförelse med en internationell färgskala (NCS, Natural color system©®). Av gulan togs ~1,0 ml till kryorör för direkt infrysning i flytande kväve. För längre förvaring på laboratoriet överfördes proverna till en -140 °C

frys fram till dess att analyser av tiamin genomfördes. Provtagning och analys av ägg genomfördes med information från fältarbetet om de tillhörde samma kull eller inte. Senare undersöktes skalvikten samt skaltjockleken med en mikrometer enligt publicerad metodologi (Tyler, 1961).

2.3 Provtagning av fågel

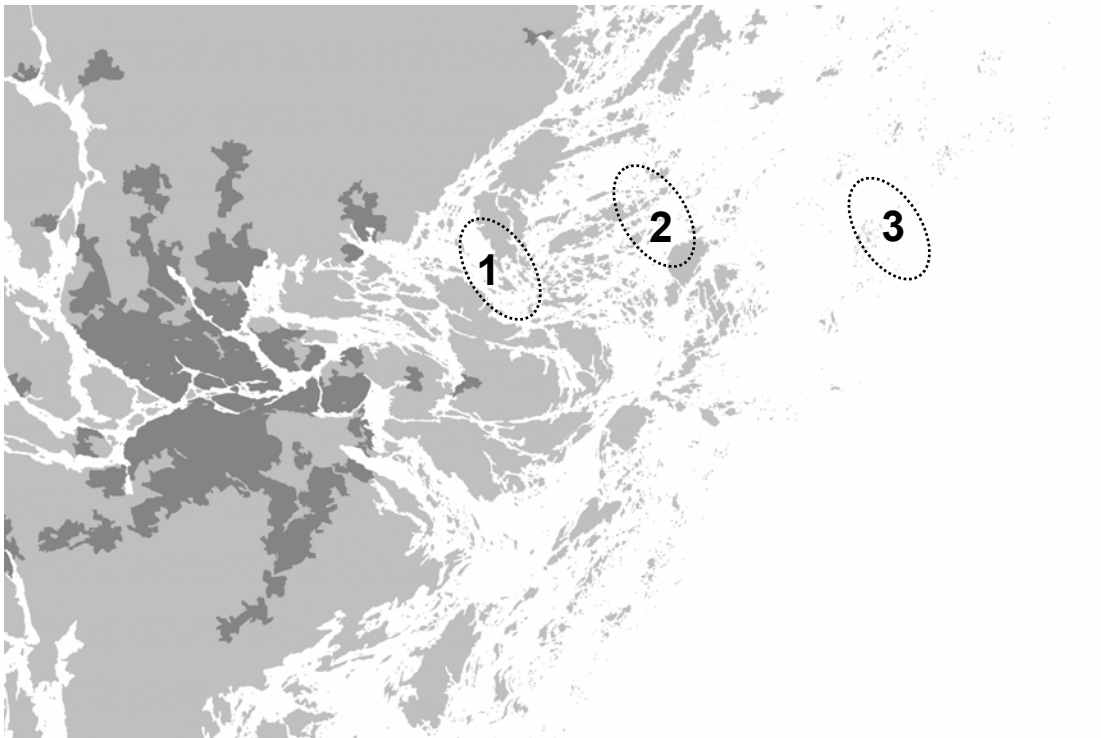
Provtagning av ejderpull (<48 timmar efter kläckning) följde en identisk rutin oavsett vilken lokal som provtogs, då inkluderande även lokalen på Island. Fågeln dekapiterades och blod samlades upp för analyser av hematokrit, blodglukos och blodhemoglobin (Linderoth *et al.* 2006, Hansson *et al.* 2006a, Hansson *et al.* 2006b). Blodutstryk utfördes för senare differentialräkning av vita blodceller, och möjligheten att undersöka frekvensen av mikrokärnor. Fågeln vägdes och dissekerades med avseende på hjärna, bröstmuskel, galla, lever, hjärta, mjälte, lunga, njure, tarm (inklusive eventuell förekomst av tarmparasiter) och eventuell gulesäcksrest. Prover som var ämnade för kemisk analys av fritt tiamin och dess fosfatestrar frystes omedelbart i flytande kväve.

Kemiska analyser av fritt tiamin och tiamins tre olika fosfatestrar; tiaminmonofosfat, tiamindifosfat och tiamintrifosfat utfördes med hjälp av ”reversed phase” HPLC (högtrycksvätskekromatografi) och detektion med fluorescens (Mancinelli *et al.* 2003). Proverna har innan dess blivit upparbetade och renade enligt Kankaanpää *et al.* 2002.

Organ eller vävnader för biokemiska enzymatiska analyser homogeniserades (Potter-Elvehjem homogenisator, 400 rpm, 5 ggr upp och ned) i 0,25 M sukros åtföljt av centrifugering 9000g_{av} under 10 minuter för framtagande av en 9000g_{av} pellet och en motsvarande 9000g_{av} supernatant. Supernatanten användes för analys av det tiaminberoende enzymet transketolas som analyserades enligt Smeets *et al.* 1971 och Tate and Nixon 1987, med små modifieringar som beskrivits i Amcoff *et al.* 2002. Pelleten med mitokondrierna användes för analys av det andra tiaminberoende enzymet, α -ketoglutaratdehydrogenas som analyserades enligt Heddi *et al.* 1993, med modifieringar beskrivna av Amcoff *et al.* 2000. Protein analyserades enligt Lowry *et al.* 1951, med bovint serum albumin som standard.

2.4 Lokaler i Stockholms skärgård

Under 2005 insamlades ejderägg och ejderpull från utspridda lokaler främst i södra skärgården, 20 syskongrupper av ägg och 14 syskongrupper av ejderpull provtogs (visas ej). Antalet insamlade individer från respektive syskongrupp varierade. Våren 2006 insamlades nylagda ejderägg, och ejderpull från boet vid tre lokaler; 1, 2 och 3, enligt Fig. 3. Äggen insamlades vid Rödkobb och Gumman (2006-04-27/05-03) på lokal 1, Söderholmarna, Segelskäret, Tjuvkobben (2006-05-03) på lokal 2, samt på Storskäret, Utterkobben, Skärkarlskobb (2006-05-03) utgörande lokal 3. Ejderpull insamlades och provtogs inom 2 dygn efter kläckning från Gumman, Björkholmen (2006-05-23) utgörande lokal 1, Finnhamn, Östra Lagnö (2006-05-23) från lokal 2, samt Skränsmågrundet, Skärkarlskäret (2006-05-22) lokal 3.



Figur 3. Karta beskrivande 3 insamlingslokaler för ejderägg och ejderpull i Stockholmsgradienten.

2.5 Statistik

I den statistiska analysen användes det aritmetiska medelvärdet för varje kull. På så sätt blev analysen mer balanserad, eftersom varierande antal ägg och pull insamlats från respektive syskongrupp. För normalfördelade variabler visar diagrammen medelvärde och 95 % konfidensintervall baserade på t-fördelningen. För icke-normalfördelade variabler visar diagrammen median och icke-parametriska 95 % konfidensintervall, dvs. utan något

antagande om underliggande fördelning. För att fastställa skillnader mellan grupper användes Students t-test eller ANOVA för normalfördelade variabler och Wilcoxon-Mann-Whitney-testet eller Kruskal-Wallis test för icke-normalfördelade variabler. I samtliga fall redovisas de ursprungliga P-värdena, dvs. utan anpassning till upprepade test. För att undersöka om stickproven var normalfördelade användes Shapiro-Wilks normalfördelningstest. För att undersöka om varianserna för normalfördelade variabler var homogena användes F-testet vid jämförelse av två grupper och Breusch-Pagan/Cook-Weisberg-testet för heteroskedasticitet vid jämförelse av fler än två grupper. I samtliga fall användes $\alpha = 0.05$ som signifikansgräns. När varianserna var inhomogena användes Satterthwaites metod för beräkning av frihetsgraderna vid Students t-test, samt Kruskal-Wallis test istället för ANOVA. För ejderägg, där det analyserade materialet var stort, används en vidareutveckling av ANOVA i form av en blandmodell med station som slumpfaktor och region som systematisk faktor. I de fall där en undersökt variabel var beroende av en annan variabel, till exempel kroppsvikten, vidareutvecklades ANOVA till ANCOVA genom att lägga till den senare variabeln som kovariat. För att kompensera för systematiska skillnader i kovariatet mellan grupperna, predikterades medelvärde och 95 % konfidensintervall med hjälp av modellen för ett givet värde på kovariatet. I dessa fall redovisas de predikterade värdena. Eftersom ejdrarna är mindre på Island än i östersjöområdet, så normaliserades alla isländska värden för storleksberoende variabler med 3,5 % (längdskala) eller 10,9 % (volym skala). Förhållandet baserades på mätningar av ejderns skelett (Ericsson 1987). För beräkningarna användes StatView 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) och Stata 9.2 (StataCorp LP, College Station, TX, USA).



Figur 4. Ejder (*Somateria mollissima*) hanne [guding], från Island (Foto: L. Balk och P.-Å. Hägerroth).

3 Resultat och Diskussion

3.1 Jämförelse mellan Stockholms skärgård och Island

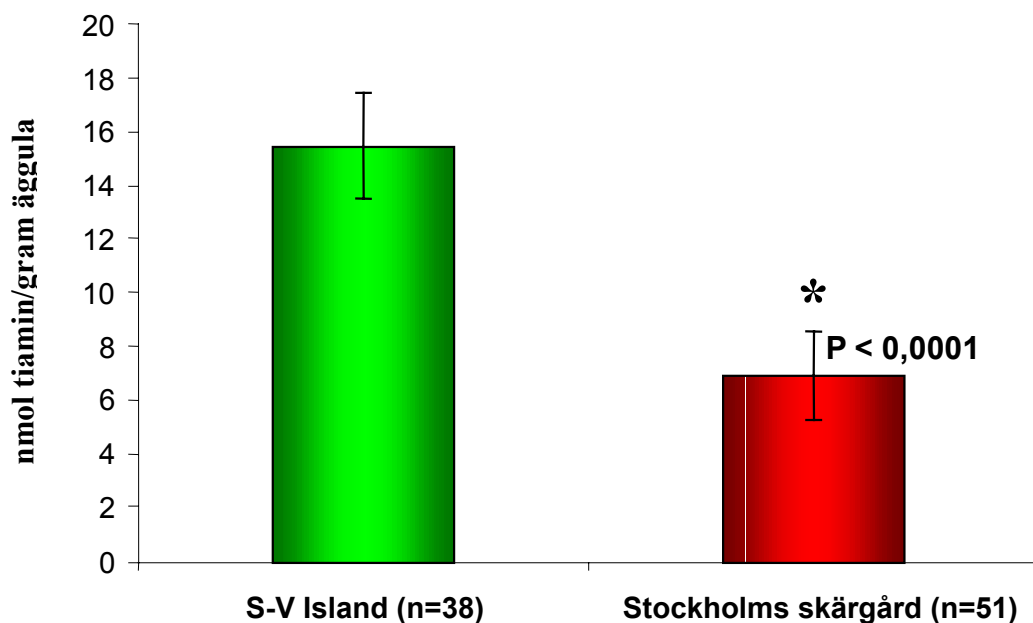
Resultaten från analyserna av tiaminhalten i äggulorna från Stockholms skärgård visade tydligt att de är signifikant lägre jämfört med äggen från Island. I Fig. 6 visas koncentrationen av tiamin i gulan hos ejderägg i Stockholms skärgård jämfört med ejderägg från de sydvästra delarna av Island. Halten tiamin i äggen från Stockholms skärgård är 6.9 nmol fritt tiamin/gram äggula. Fritt tiamin innebär här att den är icke fosforylerad. Det är samma form av tiamin som analyseras i fiskägg, där också det fria tiaminet är i absolut majoritet i äggen, oftast mer än 99 %. I samband med fältstudier under 2004–2007 (Balk *et al.* 2009) i skärgårdsområden utmed Svenska Östersjökusten där ejder häckar regelbundet, har vi observerat att i områden där äggen har uppvisat medelkoncentrationer under cirka 8–10 nmol/gram äggula, har ejderns nykläckta pull en mycket låg överlevnad. Faktum är att i områden med under 7 nmol/ gram äggula uppvisar ejderpull en ~90–99 % dödlighet under de första 3 dyggen.



Figur 5. Ejder (*Somateria mollissima*) hona [åda] med 4 pull, från Island (Foto: L. Balk och P.-Å. Hägerroth), tidigare en normal och vanlig observation också i Stockholms skärgårdar. Under senare år har denna typ av observationer minskat drastiskt i Stockholms skärgårdar. Cirka 3–7 dagar efter kläckning har en onormal överdödlighet bland pull ofta reducerat antalet till 1–10 pull per 100 honor.

Det skall understrykas att ejdern är en långlivad fågel, troligtvis kan honorna reproducera sig upp till ~15 års ålder (Cramp *et al.* 2006). Följaktligen har en utebliven reproduktion

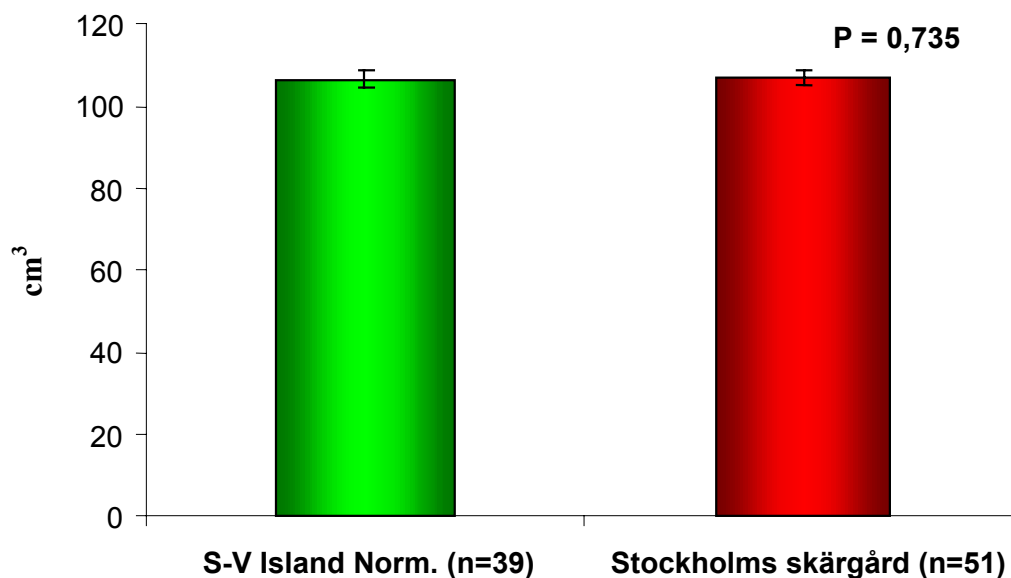
enstaka år ingen direkt påverkan på beståndet, men i det längre perspektivet leder utebliven reproduktion till en långsamt minskande population. Ejdern har uppvisat vikande bestånd i stora delar av Stockholms skärgård under senare år (Ahlbom och Fagergren 2004), och på det nationella planet uppvisar denna art ~3,1 % årlig minskning sedan 1980 (Lindström och Svensson 2006).



Figur 6. Koncentrationen av tiamin i gulan hos ägg från ejder (*Somateria mollissima*) på Island (kontroll) och i Stockholms skärgård. Resultat från poolat material från undersökningar under 2005 och 2006. ANOVA. n = antalet syskongrupper.

Ejderen i Norra Europa, inkluderande Östersjöregionen utgör samma art som på Island dvs. *Somateria mollissima*. Dock, ejdern på Island utgör något som kan beskrivas som en geografisk variant. Fåglarna, pull och äggen är några procent mindre på Island. Följaktligen så har vi normaliserat (linjärt) erhållna analysresultat för variabler som är beroende av denna storleksskillnad för kontrollmaterialet från Island, beteckningen på dessa värden är SV Island Norm., förutom att vi har angivit det analyserade värdet i respektive Figurtext. Normaliseringarna har visat att det är högst sannolikt att de är korrekta, se Figs. 7, 8 och 10.

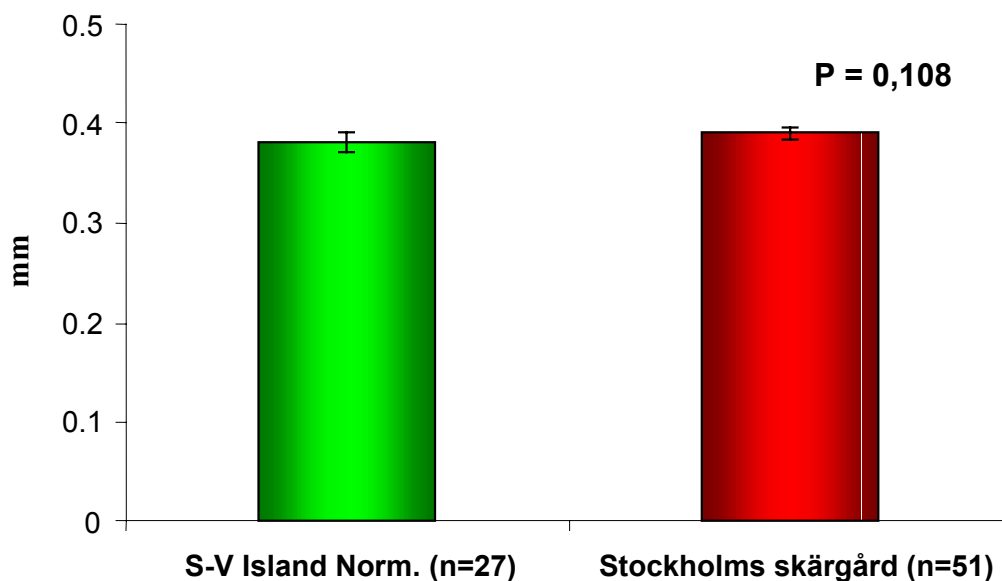
Total äggvolym redovisas i Fig. 7, och efter normaliseringen framträder att det inte är någon onaturlig skillnad mellan Island och Stockholms skärgård.



Figur 7. Total äggvolym hos ägg från ejder (*Somateria mollissima*) från sydvästra Island (kontroll) och från Stockholms skärgård. Resultat från poolat material från undersökningar under 2005 och 2006. De uppmätta värdena från SV Island (före normalisering) var $96,12 \pm 2,04 \text{ cm}^3$ (medel \pm 95 % konfidens intervall). ANOVA. n = antalet syskongrupper.

Ej heller för skaltjockleken (Fig. 8) framträder några skillnader mellan Island och Stockholms skärgård. För denna variabel är det värt att notera att både före normaliseringen ($0,368 \pm 0,009 \text{ mm}$ (medel \pm 95 % konfidens intervall)) och efter normaliseringen ($0,381 \pm 0,009 \text{ mm}$) är skaltjockleken för äggen från Island tunnare än de från Stockholms skärgård, som var $0,390 \pm 0,007 \text{ mm}$. En slutsats av dessa observationer blir att en del av de ”klassiska” miljögifterna såsom DDT, PCB och eventuellt också vissa andra hormonstörande substanser, som sedan tidigare är kända för att orsaka äggskalsförtunning, inte bör misstänkas i första hand att orsaka bristen på tiamin i dessa ägg (Cooke 1973).

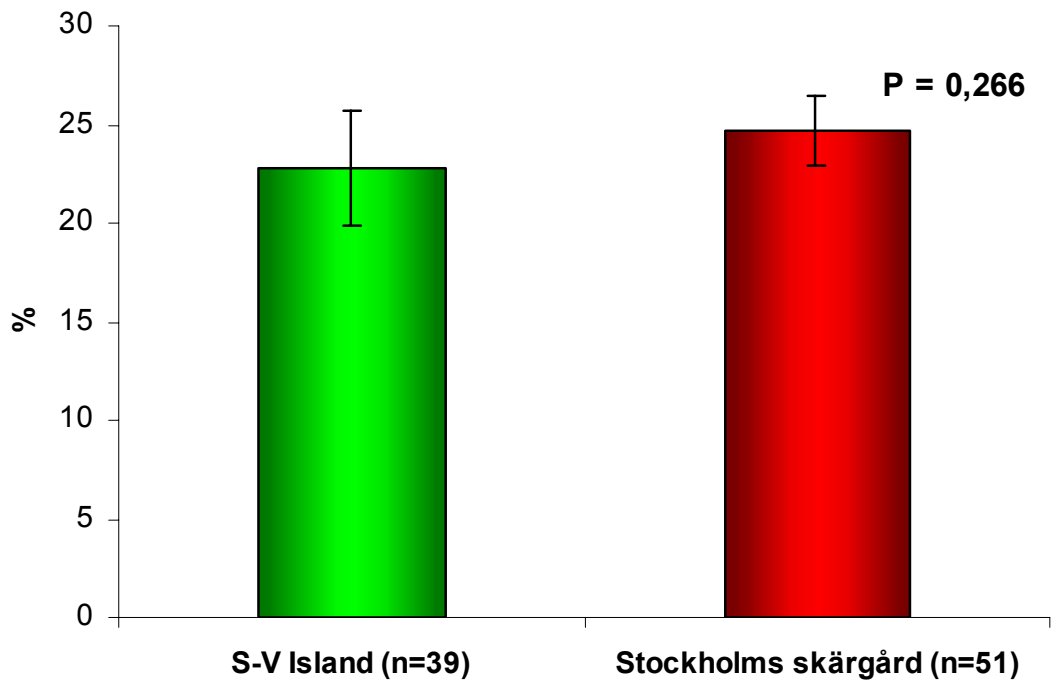
Rödheten uppskattades semikvantitativt (Fig. 9) med målsättningen att få en uppfattning om det röda pigmentet astaxantin. Detta röda pigment har visat sig att korrelera väl med höga tiaminkoncentrationer i rom för lax. Det verkar dock framför allt vara fråga om en kovariation utan mekanistisk biokemisk koppling eftersom det finns goda exempel hos laxen på individer med hög astaxantin halt och låg tiamin halt. Vid jämförelse av ejderägg från sydvästra Island och Stockholms skärgård är det uppenbart att tiaminkoncentrationen och rödheten inte samvarierar.



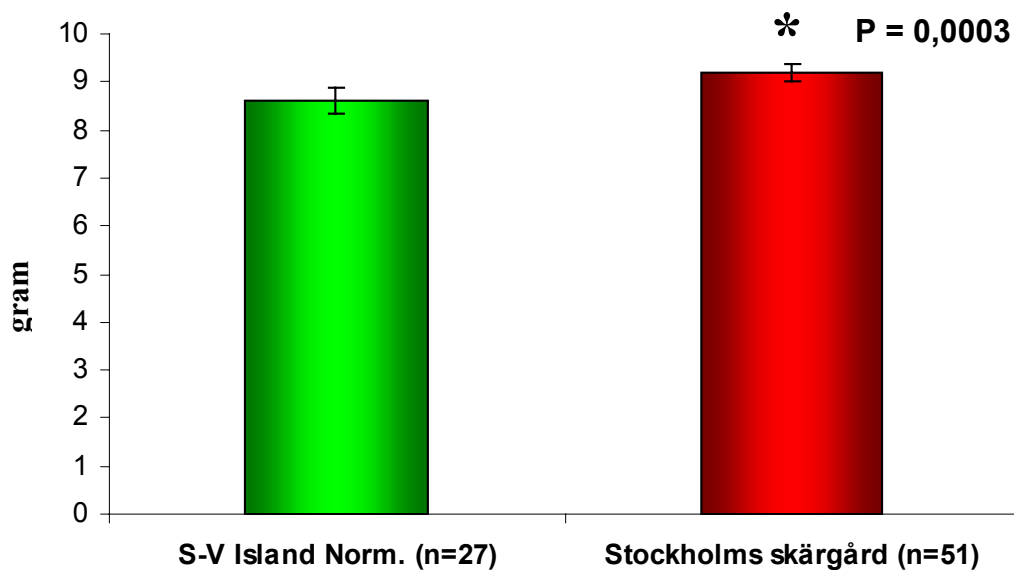
Figur 8. Skaltjockleken hos ägg från ejder (*Somateria mollissima*) från sydvästra Island (kontroll) och från Stockholms skärgård. Resultat från poolat material från undersökningar under 2005 och 2006. De uppmätta värdena från SV Island (före normalisering) var $0,368 \pm 0,009$ mm (medel \pm 95 % konfidens intervall). ANOVA. n = antalet syskongrupper.

Inga signifikanta skillnader förelåg för total äggvolym (Fig. 7) och skaltjocklek (Fig. 8), medan det förelåg en signifikant skillnad i skalvikt mellan sydvästra Island och Stockholms skärgård (Fig. 10). Dessa resultat bör dock tolkas med viss försiktighet, då normaliseringen är avgörande för resultatet. En preliminär tolkning av dessa resultat är i alla fall att en förtätning, en ökad densitet, har uppkommit i äggen från Stockholms skärgård. Vidare studier av eventuell förändring av strukturen i äggskalet är mycket önskvärt utifrån dessa erhållna data.

I detta sammanhang kan understrykas att under vårt fältarbete utmed svenska Östersjökusten har vi regelbundet gjort observationer som indikerar att en störning av äggets uppbyggnad är möjlig i samband med tiaminbristsyndromet. Vi har observerat ägg med dubbla skal, ovanlig form och ovanlig färg, i en frekvens som inte kan antas vara normalt, vare sig för svenska kuststräckor nu eller jämfört med förr i tiden, ej heller på Island kunde dessa felaktigheter observeras.

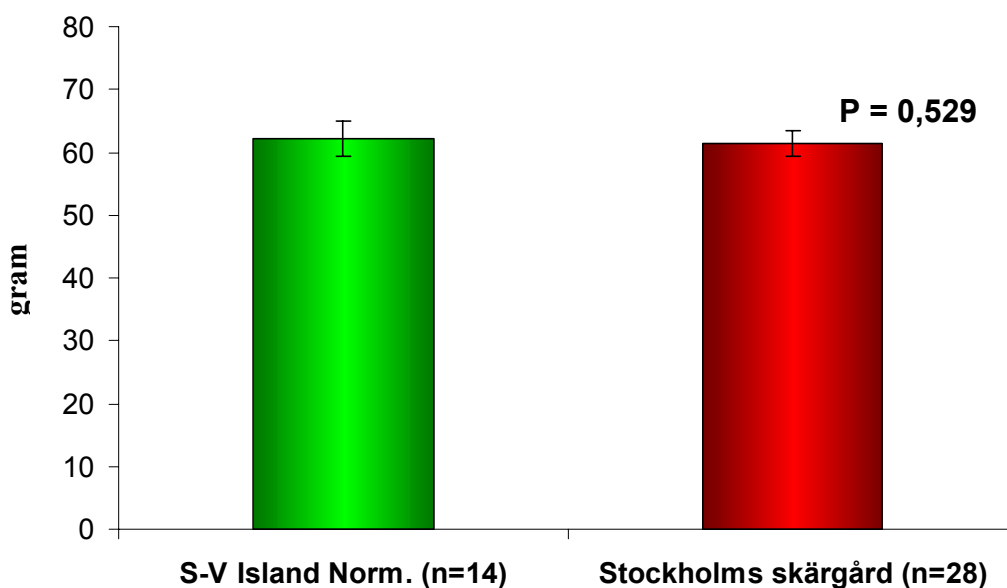


Figur 9. Rödheten hos gulan från ägg av ejder (*Somateria mollissima*) från sydvästra Island (kontroll) och från Stockholms skärgård. Resultat från poolat material från undersökningar under 2005 och 2006. ANOVA. n = antalet syskongrupper.



Figur 10. Skalvikten hos ägg från ejder (*Somateria mollissima*) från sydvästra Island (kontroll) och från Stockholms skärgård. Resultat från poolat material från undersökningar under 2005 och 2006. De uppmätta värdena från SV Island (före normalisering) var $7,770 \pm 0,238$ g (medel \pm 95 % konfidens intervall). ANOVA. n = antalet syskongrupper.

I analogi med att äggets storlek har normaliserats för Island, för att kunna jämföras med Stockholms skärgård, har motsvarande normalisering genomförts för den nykläckta ejderpull, innan jämförelse med ejderpull från Stockholms skärgård utförts. Resultaten presenteras i Fig. 11 och visar att ingen storleksskillnad föreligger mellan sydvästra Island och Stockholms skärgård. Resultaten visar också god överensstämmelse med den normaliserade äggvolymen (se ovan).



Figur 11. Kroppsvikten hos ejder (*Somateria mollissima*) pull från sydvästra Island (kontroll) och från Stockholms skärgård. Resultat från poolat material från undersökningar under 2005 och 2006. De uppmätta värdena från SV Island (före normalisering) var $56,15 \pm 1,79$ g (medel \pm 95 % konfidens intervall). Students t-test. n = antalet syskongrupper.

Ett antal organindex, lever, njurar, hjärna och gulesäck presenteras i Tabell 1. I inget fall var dessa organindex (organstorlekar) signifikant skilda mellan Island och Stockholms skärgård. Mot bakgrund av de stora skillnaderna i tiaminhalt i äggen, med mycket låga halter i Stockholms skärgård, så är det eventuellt två skillnader som man skulle kunna förvänta sig. En är en sämre konsumtion av gulesäcken, den andra är en förstorad lever i ejderpull från Stockholms skärgård. Dock, eftersom vi enbart kan provta de ejderpull som har, *de facto*, överlevt hela embryoutvecklingen och kläckningen, så kan individer som har överlevt fram till 1–2 dygn efter kläckning antas utgöra de individer med, relativt, högre tiaminhalter. Det bör också understrykas att ejderns pull är mycket unga (1–2 dygn), samt att de inte har hunnit äta någon föda vid provtagningen. Faktum är att ejderns pull minskar

i vikt under de två första dygnen, ett normalt fenomen som vi har sett både på Island såväl som i Stockholms skärgård. Innan de börjar äta, vanligtvis under det tredje dygnet efter kläckning, kan eventuellt påverkan på organens storlek, ex. lever, kanske ej hinna uttryckas signifikant.

Tabell 1. Organindex (organets vikt som procent av kroppsvikten) för lever, njure, hjärna och gulesäck i ejderpull på sydvästra Island (kontroll) och i Stockholms skärgård. n = antalet syskongrupper.

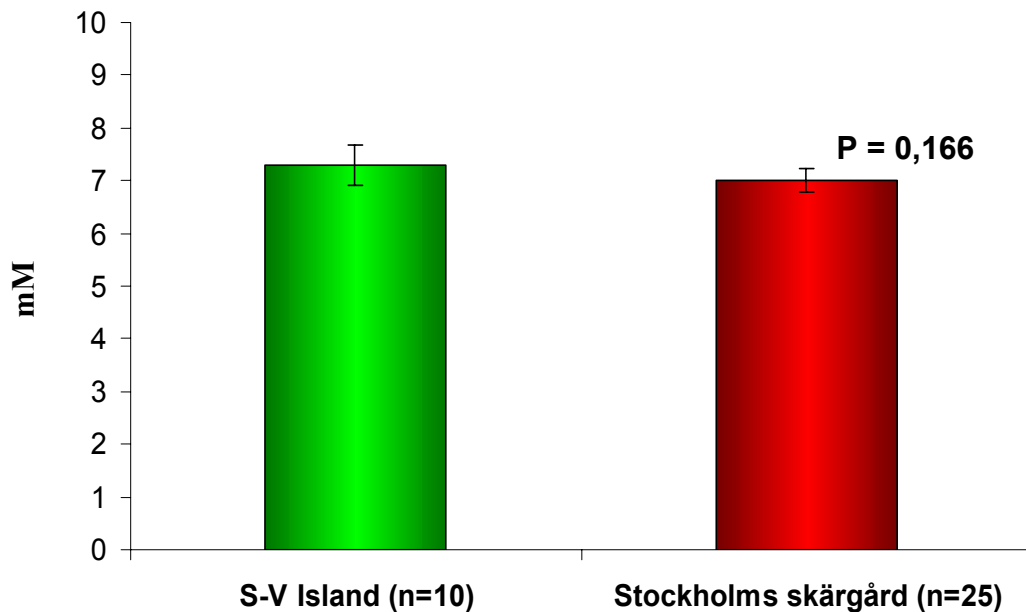
<i>Variabel</i>	Sydvästra Island	Stockholms skärgård	P-värde
Leverindex [%]	4,12 ± 0,24 (n=14)	4,19 ± 0,23 (n=28)	0,729 ^a
Njurindex [%]	1,45 ± 0,091 (n=10)	1,45 ± 0,092 (n=17)	0,919 ^a
Hjärnindex [%]	2,86 ± 0,12 (n=10)	2,72 ± 0,14 (n=14)	0,146 ^a
Gulesäcksindex [%]	9,85 ± 2,63 (n=12)	10,49 ± 1,79 (n=27)	0,676 ^a

^a Students t-test.

Glukos i blodet har i tidigare studier (Spannhof *et al.* 1978) visat sig öka i samband med tiaminbrist. En minskad möjlighet att metabolisera glukos och dess metaboliter genom de tiaminberoende enzymerna transketolas och pyruvatdehydrogenas, är en högst sannolik orsak till denna situation. I föreliggande studier kunde ej någon förhöjd halt av glukos i blodet observeras i ejderpull från Stockholms skärgård (Fig. 12). Även för denna variabel är en inverkan från faktumet att dessa pull ej har börjat äta möjlig. Andelen socker i ”dieten” från gulesäcken kan vara för låg för att kunna ge upphov till skillnader i förhöjda halter av glukos i blodet.

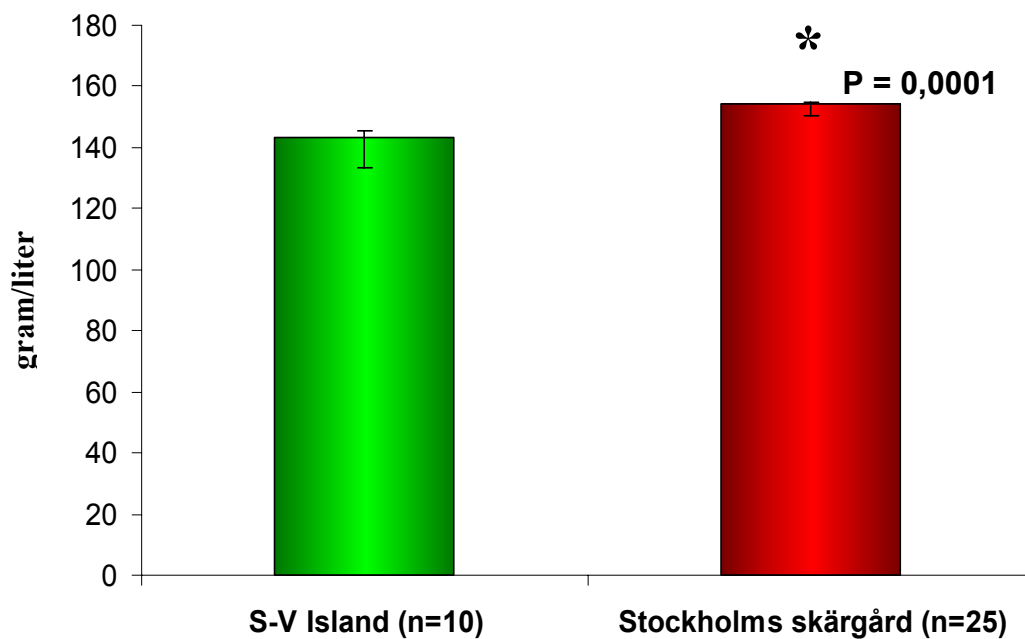
Variablerna hemoglobin i helblod (Fig. 13), och hematokrit (utgör volymen av de genom centrifugering packade röda blodcellerna i procent av blodets volym) (Fig. 14) visade båda en förhöjning i fåglarna från Stockholms skärgård jämfört med sydvästra Island. Det faktum att hemoglobin i erytrocyterna var lika (Fig. 15), icke signifikant separerat mellan de undersökta områdena, indikerar att en ökad mängd röda blodkroppar har producerats i ejderpull från Stockholms skärgård. Det finns ingen anledning att misstänka någon signifikant uttorkning av ejderpull från Stockholms skärgård jämfört med sydvästra Island, ett tillstånd som också skulle kunna ge dessa resultat. Istället är det en möjlig effekt av

tiaminbrist i dessa ejderpull genom det faktum att α -ketoglutaratdehydrogenas är ett tiaminberoende enzym som är direkt kopplat till andningskedjan (se Inledning, Tiamin), molekylär syreupptagning.

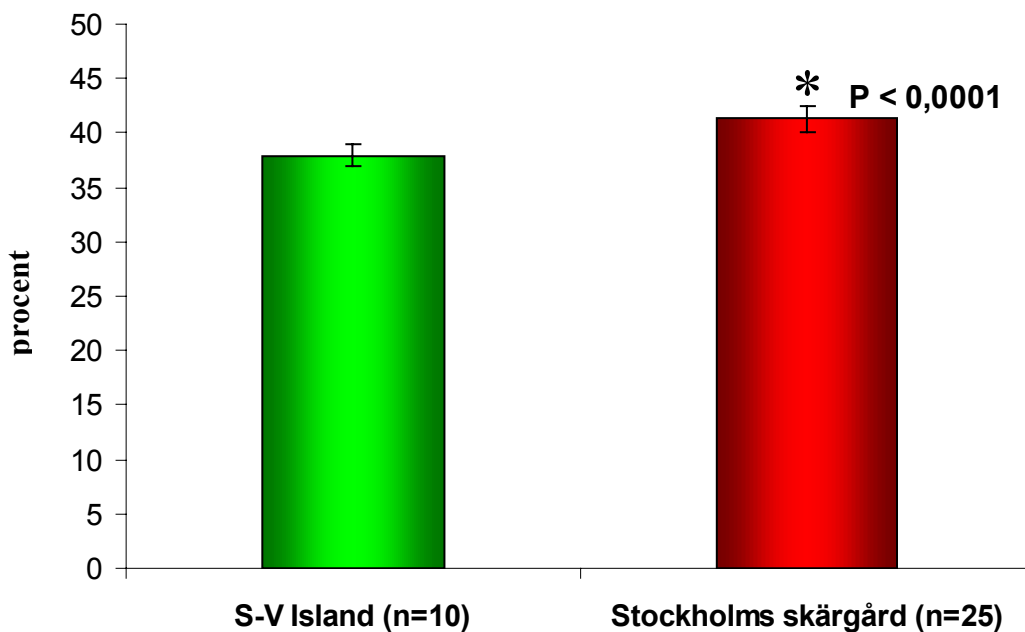


Figur 12. Glukos i blod från ejder (*Somateria mollissima*) pull från sydvästra Island (kontroll) och från Stockholms skärgård. Resultat från poolat material från undersökningar under 2005 och 2006. Students t-test. n = antalet syskongrupper.

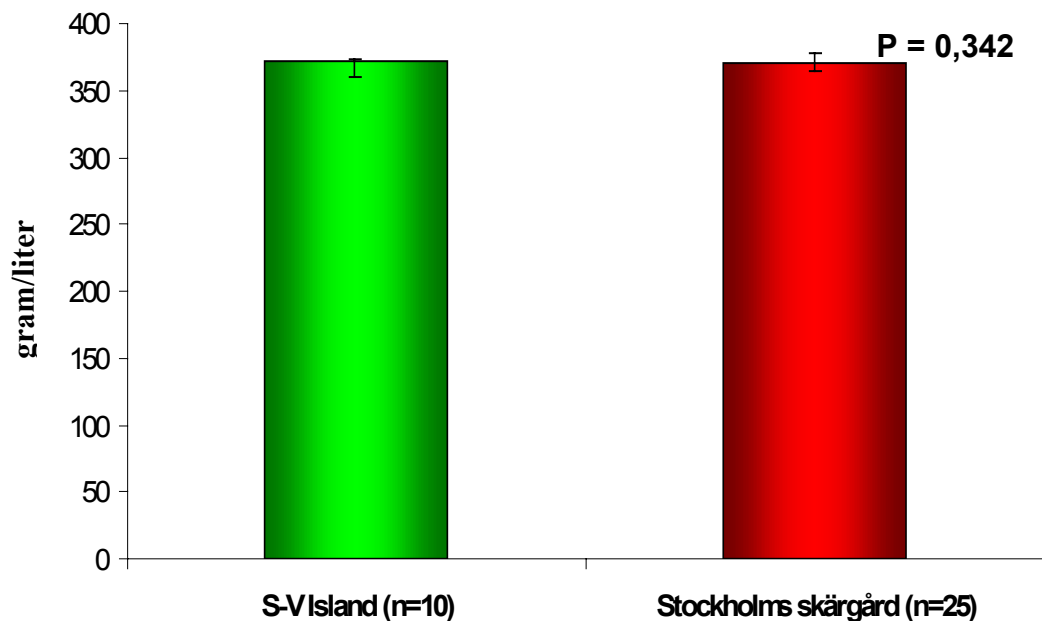
Hos djur med tiaminbrist kan ofta observeras en ansträngd andning, ett möjligt analogt fenomen till vad vi observerar här. Således, fågelkroppen upplever en syrebrist, även om den är molekylär mekanistisk och inte förekommande, och reagerar genom att producera mer blodkroppar för att försöka kompensera det ”upplevda låga syretrycket”. Teoretiskt, ett tätare äggskal, som har diskuterats ovan för denna art, skulle också/ytterligare kunna leda till ett lägre upplevt partialtryck av syre, resulterande i dessa förändringar.



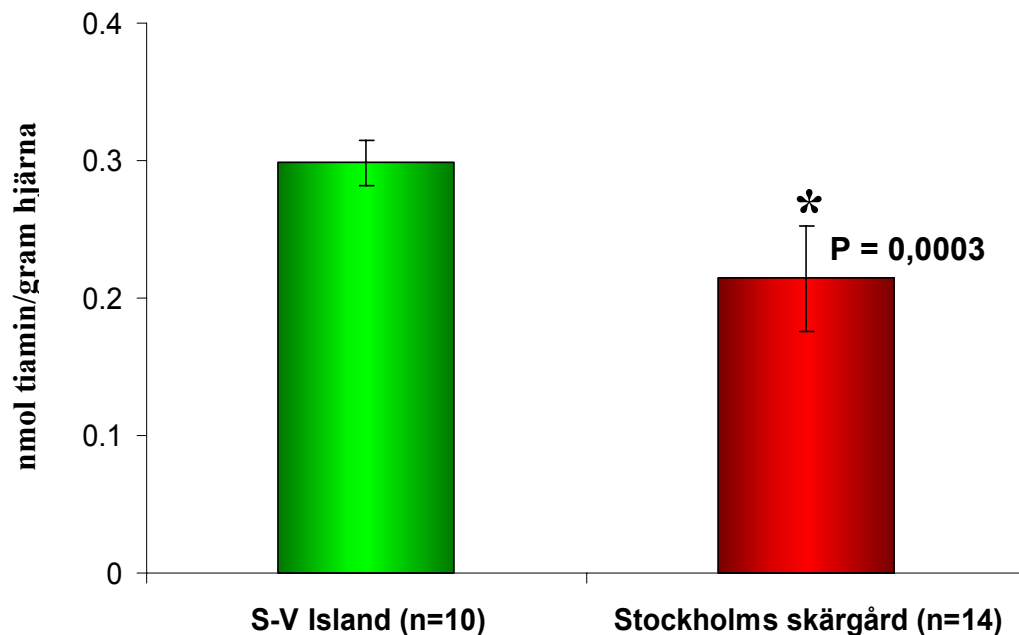
Figur 13. Hemoglobin i helblod från ejder (*Somateria mollissima*) pull från sydvästra Island (kontroll) och från Stockholms skärgård. Resultat från poolat material från undersökningar under 2005 och 2006. Wilcoxon-Mann-Whitney-testet. n = antalet syskongrupper.



Figur 14. Hematokrit från ejder (*Somateria mollissima*) pull från sydvästra Island (kontroll) och från Stockholms skärgård. Resultat från poolat material från undersökningar under 2005 och 2006. Students t-test. n = antalet syskongrupper.

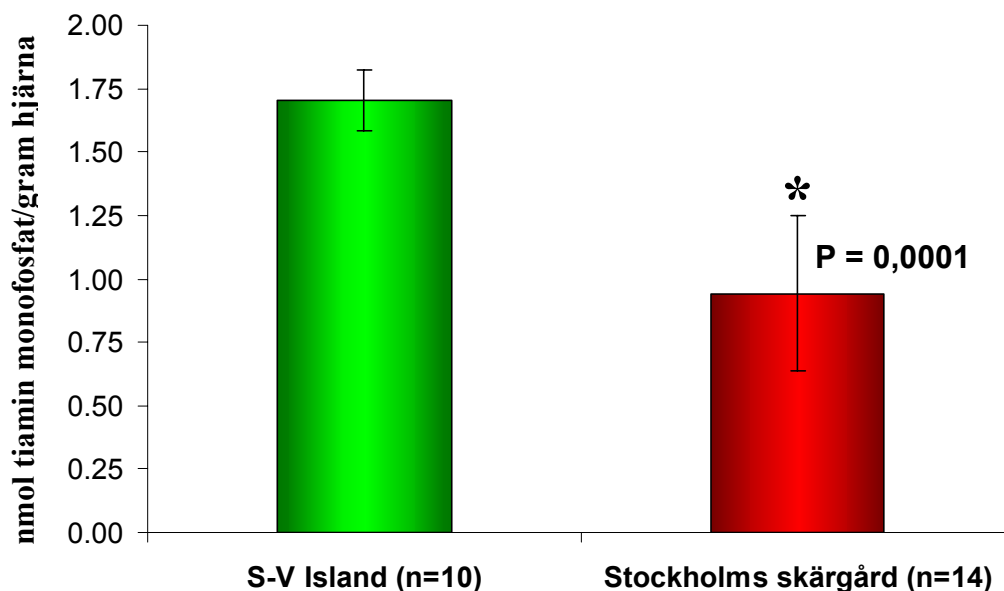


Figur 15. Hemoglobin i erythrocyter från ejder (*Somateria mollissima*) pull från sydvästra Island (kontroll) och från Stockholms skärgård. Resultat från poolat material från undersökningar under 2005 och 2006. Wilcoxon-Mann-Whitney-testet. n = antalet syskongrupper.

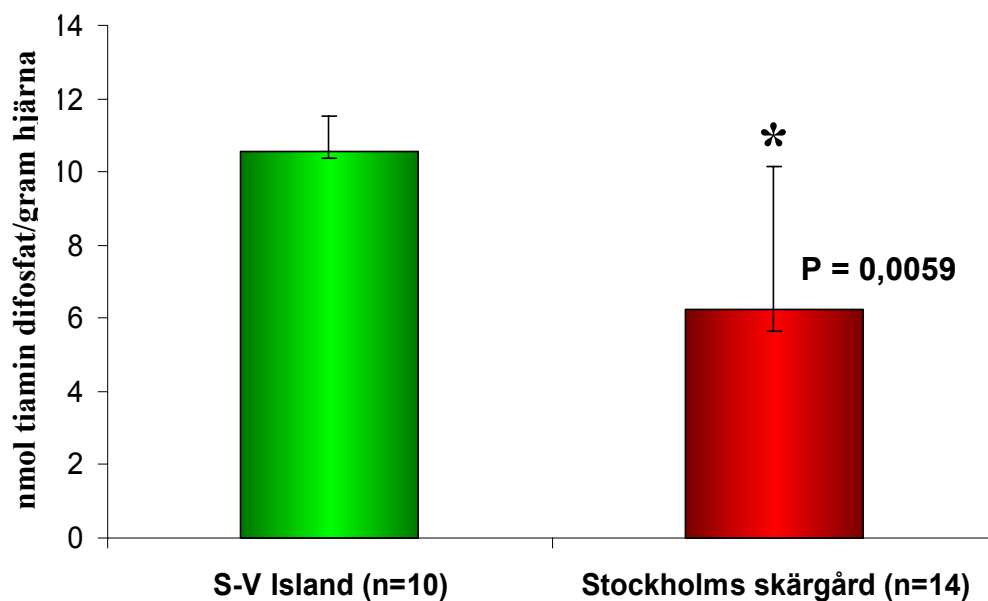


Figur 16. Koncentrationen av fritt tiamin (T) (ej fosforylerat) i helhjärnan hos ejderpull (*Somateria mollissima*) på Island (kontroll) och i Stockholms skärgård. Resultat från poolat material från undersökningar under 2005 och 2006. Students t-test. n = antalet syskongrupper.

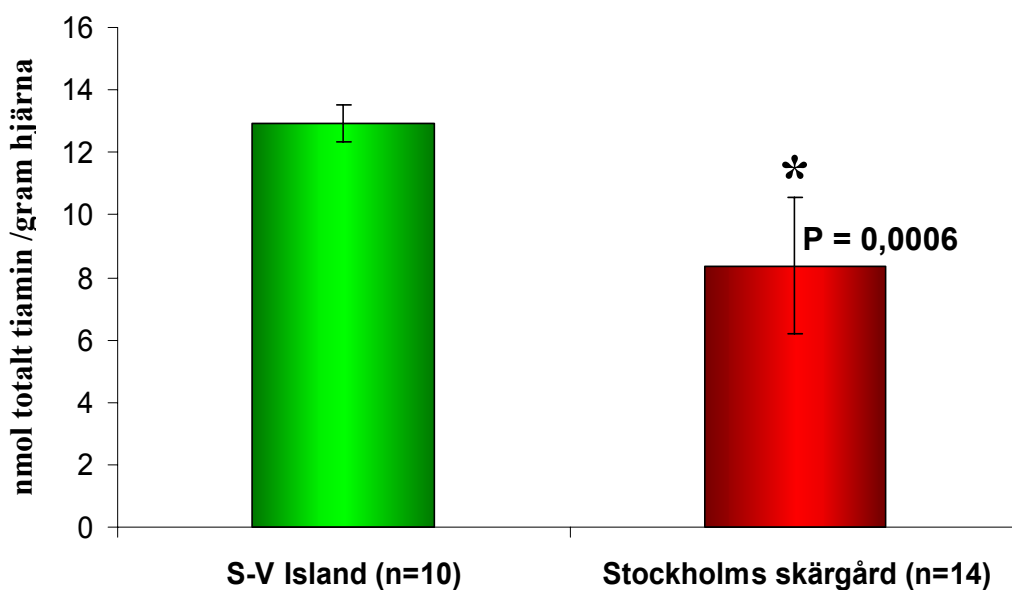
Tiaminkoncentrationen i helhjärnan hos ejderpull är signifikant lägre, i Stockholms skärgård jämfört med sydvästra Island. Detta gäller för alla former av tiamin som har analyserats (Figs. 16–18). Tiaminmonofosfat presenteras i Fig. 17, där kan observeras att den ger den högsta signifikanta avvikelsen ($P = 0,0001$) jämfört med de andra formerna (Fig. 16 och 18). Att just monofosfatformen uppvisar den högsta signifikanta avvikelsen bland tiaminets olika former är ett intressant faktum som är i linje med den konstaterade bristen (se Inledning, Tiamin). Fritt tiamin (ofosforylerat) redovisas i Fig. 16, även för denna form kan observeras en tydlig signifikant minskning ($P = 0,0003$) i ejderpull hjärnor från Stockholms skärgård jämfört med sydvästra Island.



Figur 17. Koncentrationen av tiaminmonofosfat (TMP) i helhjärnan hos ejderpull (*Somateria mollissima*) på sydvästra Island (kontroll) och i Stockholms skärgård. Resultat från poolat material från undersökningar under 2005 och 2006. Students t-test. n = antalet syskongrupper.



Figur 18. Koncentrationen av tiamindifosfat (TDP) i helhjärnan hos ejderpull (*Somateria mollissima*) på sydvästra Island (kontroll) och i Stockholms skärgård. Resultat från poolat material från undersökningar under 2005 och 2006. Wilcoxon-Mann-Whitney-testet. n = antalet syskongrupper.



Figur 19. Summa koncentrationen av fritt tiamin (T), tiaminmonofosfat (TMP) och tiamindifosfat (TDP) i helhjärnan hos ejderpull (*Somateria mollissima*) på sydvästra Island (kontroll) och i Stockholms skärgård. Resultat från poolat material från undersökningar under 2005 och 2006. Students t-test. n = antalet syskongrupper.

Tiamindifosfat, formen av tiamin som utgör kofaktor för ett antal, för överlevnad, essentiella enzymer redovisas i Fig. 18. Även här kan observeras en kraftig minskning

utgörande mer än 40 %, med hög signifikans ($P = 0,0059$), i ejderpull från Stockholms skärgård jämfört med sydvästra Island. I ett generellt jämförande perspektiv bör denna minskning betraktas som extremt kraftig. Vidare laborativa studier bör genomföras för att bestämma den exakta tröskeleffekten för lägsta koncentration av tiamindifosfat för neurologisk död, gällande för denna art och utvecklingsstadium, dvs. ejderpull ca 1–2 dygn efter kläckning. Summan av de olika formerna av tiamin (T+TMP+TDP) redovisas i Fig. 19.

Tabell 2. Koncentrationen av fritt tiamin (T) (ofosforylerat), tiaminmonofosfat (TMP), tiamindifosfat (TDP) och summan av dessa (T+TMP+TDP) i diencephalon hos ejderpull (*Somateria mollissima*) hjärna. Ejdrar från sydvästra Island (2006) utgjorde kontroll till de undersökta ejdrarna i Stockholms skärgård (2006). n = antalet syskongrupper.

Variabel	Sydvästra Island (n=4)	Stockholms skärgård (n=14)	P-värde	Sign.&
Tiamin (ofosforylerat) [nmol/g]	0,574 ± 0,293	0,263 ± 0,074	0,0558 ^a	—
Tiaminmonofosfat [nmol/g]	2,631 ± 0,581	2,120 ± 0,169	0,0099 ^b	Ja
Tiamindifosfat [nmol/g]	12,012 ± 2,344	9,837 ± 0,794	0,0142 ^b	Ja
Summa-tiamin (T+TMP+TDP) [nmol/g]	15,221 ± 2,915	12,271 ± 0,971	0,0078 ^b	Ja

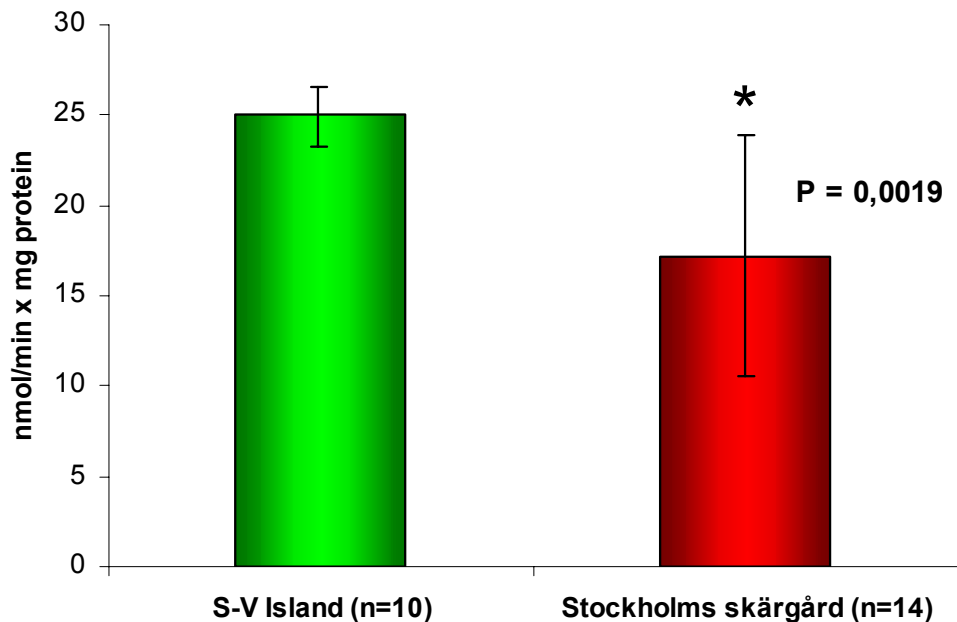
^a Wilcoxon-Mann-Whitney-testet.

^b Students t-test.

Under år 2006 har vi också börjat analysera vissa specifika regioner i hjärnan. Målsättningen har varit att ytterligare förbättra strategin för att studera tiaminbrist i vilda fåglar. Regioner i hjärnan som eventuellt drabbas mer specifikt än andra är hypotalamus, thalamus och cerebellum. Thalamus och hypotalamus är lokaliserade till diencephalon, följaktligen började vi söka ett eventuellt mer specifikt drabbat område i hjärnan i denna region. Resultaten presenteras i Tabell 2. Analysresultaten har indikerat att högre koncentrationer av alla former av tiamin (T, TMP och TDP) föreligger i denna region av hjärnan, både på sydvästra Island och i Stockholms skärgård. I denna region av hjärnan visar tiaminmonofosfat den mest signifikanta ($P = 0,0099$) nedgången, analogt med resultaten från hela hjärnan (se ovan). Att signifikansen (P-värde) i skillnad mellan sydvästra Island och Stockholms skärgård är lägre för analyserna i diencephalon (jämfört med helhjärna) kan observeras vid jämförelse (Figs. 16–19 med Tabell 2). Dock, eftersom antalet (n=4) analyser än så länge är betydligt lägre för sydvästra Island så bör vidare

analyser utföras innan en slutgiltig utvärdering av diencephalon kan göras. Vidare studier bör också inkludera andra regioner av hjärnan såsom cerebellum.

Kemiska analyser av tiamin och dess olika fosforylerade former är en utmärkt strategi och arbetssätt att studera och, i förekommande fall, fastställa förekomst av en tiaminbrist. Men, när man börjar studera ej tidigare undersökta arter och deras vävnader, så föreligger ingen information om de ”naturliga” värdena för koncentrationer av tiamin och dess olika former. En möjlighet är då att göra som vi har presenterat ovan, dvs. jämföra med individer från arten i ett antaget opåverkat (alternativt mindre påverkat) område.

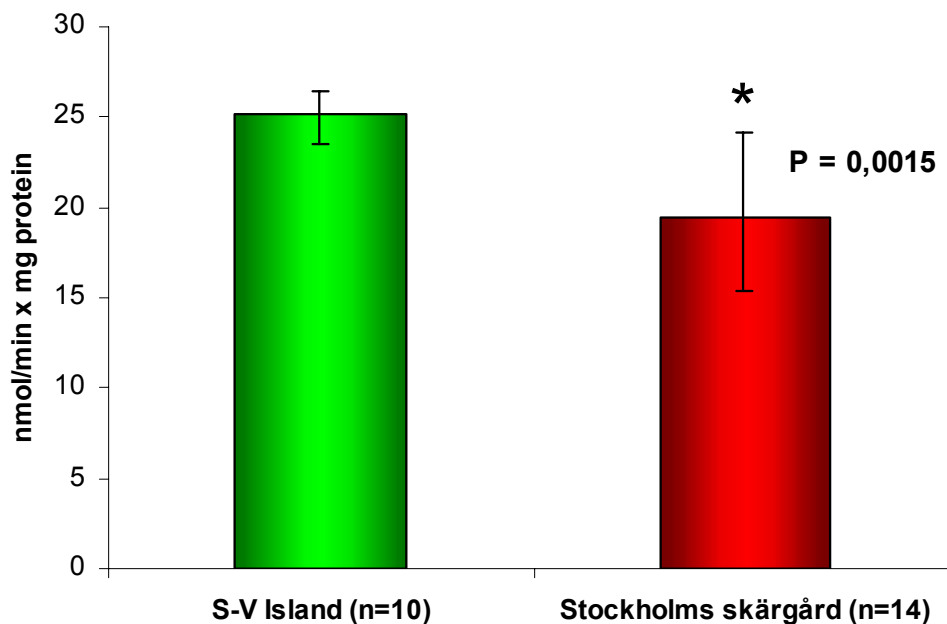


Figur 20. Aktivitet för transketolas i levern (S9) hos ejder (*Somateria mollissima*) pull på sydvästra Island (kontroll) och i Stockholms skärgård. Resultat från poolat material från undersökningar under 2005 och 2006. Wilcoxon-Mann-Whitney-testet. n = antalet syskongrupper.

En kompletterande strategi är att analysera de tiaminberoende enzymerna, för att därigenom analysera den biokemiska/cellulära bristen av detta vitamin. Av de välkända tiaminberoende enzymerna, transketolas, pyruvatdehydrogenas och α -ketoglutaratdehydrogenas (se ovan) har vi valt att arbeta med transketolas och α -ketoglutaratdehydrogenas. Bakgrunden är framför allt att pyruvatdehydrogenas också regleras genom fosforylering av proteinet (förutom tillgången på tiamindifosfat), ett

faktum som gör att den aktiviteten kan bli svårtolkad som biomarkör för en brist av tiamin.

I Fig. 20 presenteras den signifikanta ($P = 0,0002$) skillnaden i aktivitet för transketolas i levern (S9) mellan kontrollfåglar, ejderpull från sydvästra Island, och ejderpull från Stockholms skärgård. Aktiviteten har här analyserats genom tillsats av substrat och analys av bildad produkt *in vitro* med utnyttjande av en supernatantfraktion från fågelns lever, utan tillsats av någon kofaktor. Jämfört med Island uppvisar således ejderpull från Stockholms skärgård en 35 procentig reduktion av transketolas i levern.

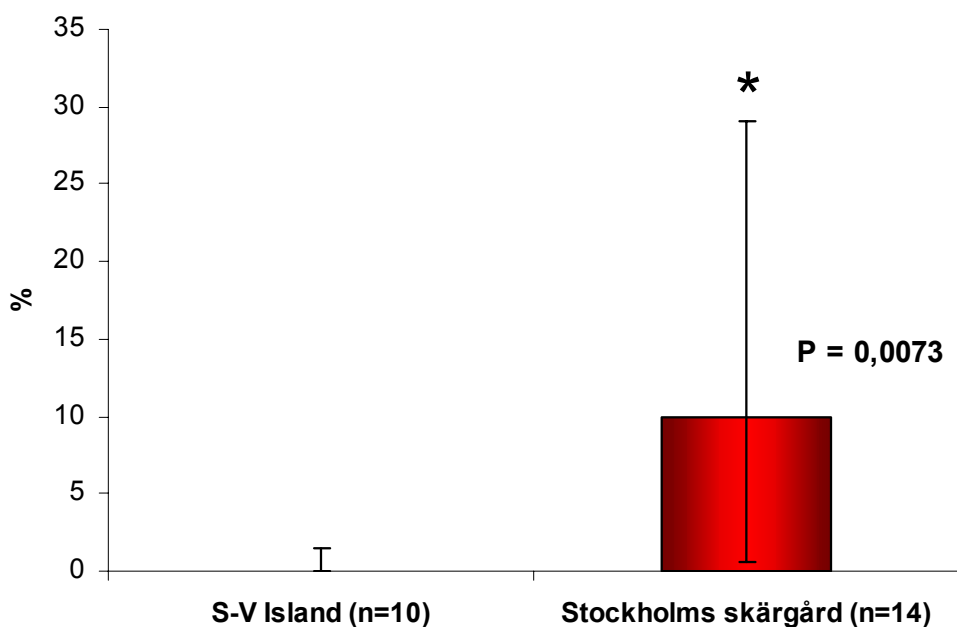


Figur 21. Aktivitet för transketolas i levern (S9) efter mätande tillsats av tiamindifosfat (TDP) *in vitro* hos ejder (*Somateria mollissima*) pull på Island (kontroll) och i Stockholms skärgård. Resultat från poolat material från undersökningar under 2005 och 2006. Wilcoxon-Mann-Whitney-testet. n = antalet syskongrupper.

Aktiviteten för transketolas kan också analyseras efter mätande koncentration av tiamindifosfat *in vitro*. Detta redovisas i Fig. 21. Aktiviteten har här analyserats genom tillsats av substrat och analys av bildad produkt *in vitro* med utnyttjande av en supernatant fraktion från fågelns lever, med tillsats av mätande koncentration av tiamindifosfat. Den signifikanta skillnaden i detta fall kan anses bero på en nedreglering av enzymets (apo- och holoform) koncentration i cellerna i ejderpull från Stockholms skärgård, en effekt som är välkänd för detta enzym efter en tid av tiaminbrist i den drabbade vävnaden.

Nedregleringen på cirka 28 procent i detta fall, orsakad av tiaminbristen, kan bero på minskad cellulär syntes av enzymet, alternativt ökad nedbrytning, eller en kombination av dessa två händelser.

Även om enzymet transketolas nedregleras i mängd i cellerna vid situationer av tiaminbrist, så följer inte nedregleringen helt den minskande tiaminkoncentrationen i cellerna. Resultatet blir att vid en tiaminbrist i en vävnad/cell uppkommer ett överskott av enzymet i förhållande till tillgängligt tiamin, således bildas ett apoenzym. (Apoenzym innebär att enzymet förekommer inaktivt i cellen, eftersom det inte finns den nödvändiga kofaktorn tiamin difosfat i enzymet som är essentiellt för att det skall vara aktivt.) Genom att analysera aktiviteten före och efter tillsats av tiamin i kyvetten kan delmängden apoenzym uppskattas (latens) och beräknas i vävnaden. Resultat från detta analysarbete redovisas i Fig. 22. Resultaten visar tydligt ($P = 0,0019$) att i ejderpull från Stockholms skärgård är medelvärdet för latensen cirka 20 procent, en siffra som kan anses att vara mycket allvarlig för fortsatt funktion och överlevnad för individen, om den inte får ett tillskott av tiamin i dess vävnader snarast.



Figur 22. Latens för transketolas uttryckt i procent som går att finna i levern (S9) vid tillsats av tiamindifosfat in vitro. Analyserat i ejder (*Somateria mollissima*) pull på sydvästra Island (kontroll) och i Stockholms skärgård. Resultat från poolat material från undersökningar under 2005 och 2006. Wilcoxon-Mann-Whitney-testet. n = antalet syskongrupper.

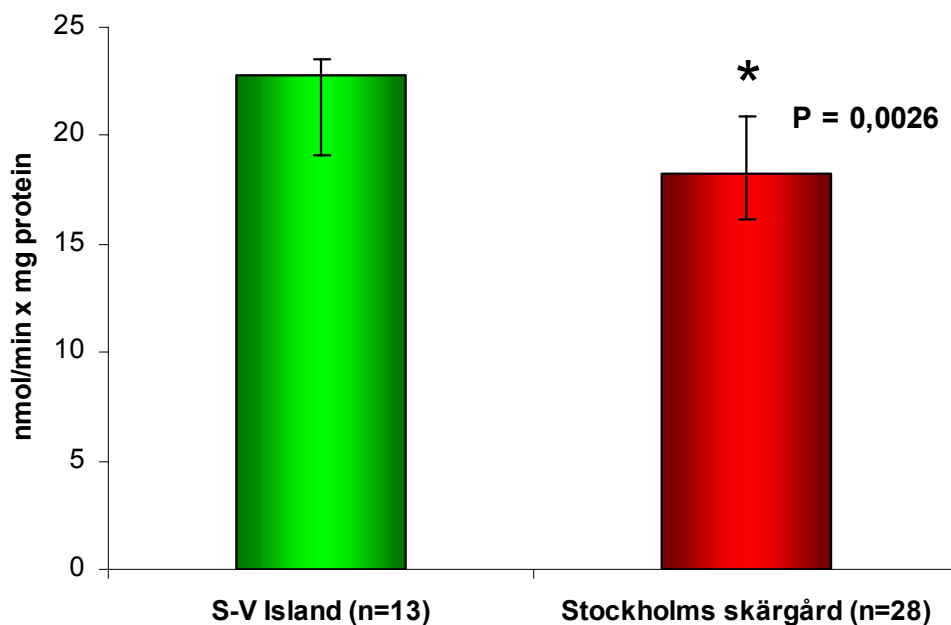
Generellt och i ett jämförande perspektiv med många litteraturuppgifter rörande minskning av aktiviteten för transketolas och dess ökande latens som här har observerats i ejderpull från Stockholms skärgård mycket allvarlig. Faktum är att under fältobservationer och i samband med insamlandet av biologiskt material för analys så har vi vid upprepade tillfällen observerat förlamade, döende och nyligen döda ejderpull i direkt anknytning till ejderboet. Exempel på döende ejderpull i neurotoxiska symptom (typ. liggande på sidan eller ryggen, skakande, roterande och oförmögna att inta normal position) redovisas i Fig. 23.



Figur 23. Ejder (*Somateria mollissima*) pull från Sverige, fotograferade i boet, uppvisande neurotoxiska skador som leder till döden (Fotografier: P.-Å. Hägerroth och L. Balk)

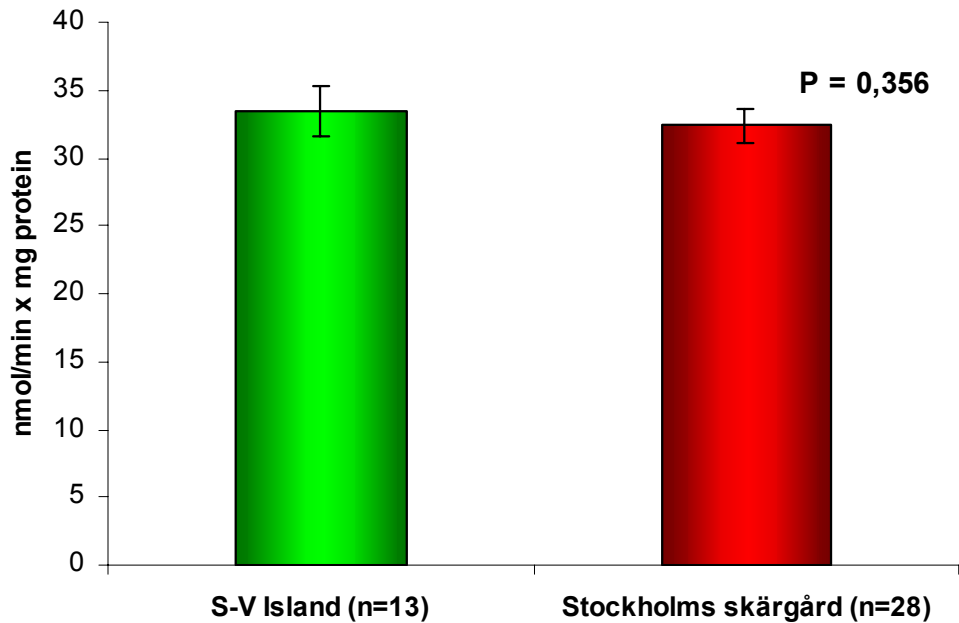
Det råder mycket liten tvekan angående det faktum att dessa djur dör till följd av en brist på tiamin. Det faktum att även enzymet α -ketoglutaratdehydrogenas uppvisar resultat som påvisar tiaminbrist stärker ytterligare detta faktum. I Fig. 24 redovisas skillnaden i aktivitet i levern (9000g pellet, mitokondriefraktion) mellan kontroll fåglar (ejderpull) från sydvästra Island och från Stockholms skärgård. Aktiviteten har här analyserats genom tillsats av substrat och analys av bildad produkt *in vitro* med utnyttjande av en mitokondriefraktion från fågelns lever, utan tillsats av någon kofaktor. Jämfört med Island uppvisar ejderpull från Stockholms skärgård en 20 procentig reduktion av aktiviteten för α -ketoglutaratdehydrogenas i levern. När aktiviteten analyseras med tillsats av tiamindifosfat *in vitro*, som redovisas i Fig. 25, framträder att det inte är någon skillnad mellan Stockholms skärgård och sydvästra Island. Dessa resultat är i god överensstämmelse med vad som är känt sedan tidigare studier för detta enzym, α -

ketoglutaratdehydrogenas nedregleras inte i samma utsträckning som transketolas i samband med tiaminbrist. Detta innebär att enzymet förekommer i formen av ett apoenzym i mitokondrierna, där det kan omformas *in vitro* till ett holoenzym i samband med tillsats av tiamindifosfat och detergent (underlättar membranpassage) för rekonstitution av full enzymatisk aktivitet. Avsaknad av statistisk skillnad ($P = 0,356$) mellan sydvästra Island och Stockholms skärgård för detta enzym är således vad som kan förväntas för denna enzymatiska aktivitet när tiamindifosfat tillsätts *in vitro*.



Figur 24. Aktivitet för α -ketoglutaratdehydrogenas i levern hos ejder (*Somateria mollissima*) pull på sydvästra Island (kontroll) och i Stockholms skärgård. Resultat från poolat material från undersökningar under 2005 och 2006. Wilcoxon-Mann-Whitney-testet. n = antalet syskongrupper.

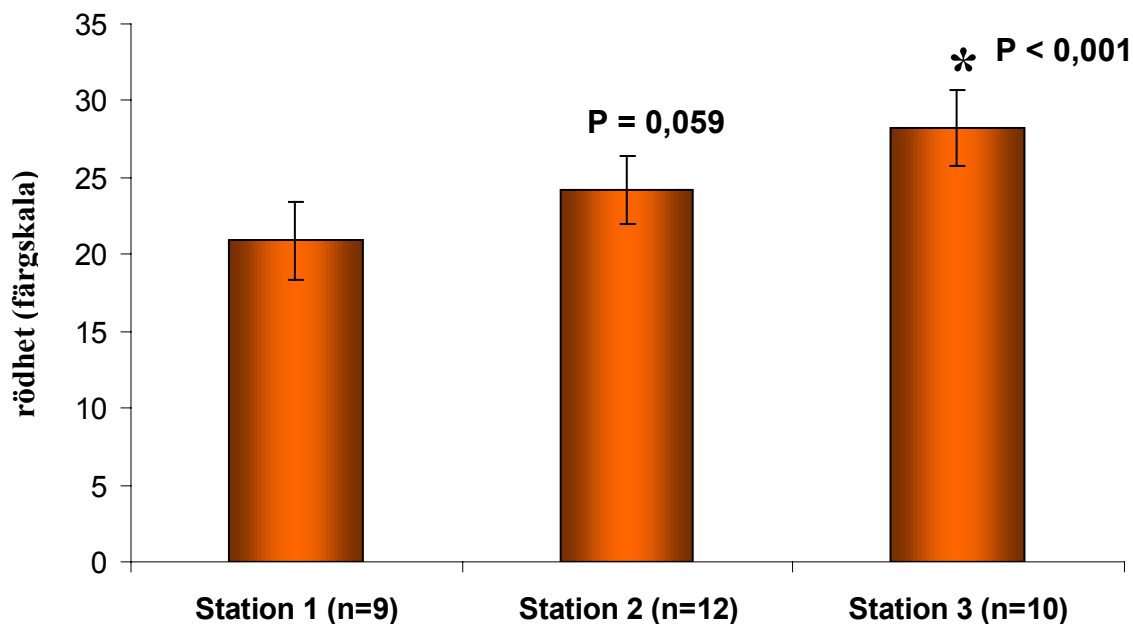
Eftersom enzymet α -ketoglutaratdehydrogenas inte nedregleras i mängd i cellerna vid situationer av tiaminbrist (i motsvarande utsträckning som för transketolas) så kan latensen, dvs. procent andelen apoenzym uppskattas efter *in vitro* analyser. Genom att analysera aktiviteten före och efter tillsats av tiamindifosfat i kyvetten kan mängden apoenzym uppskattas (latens) och beräknas i vävnaden. Resultat från detta analysarbete visar att i ejderpull från Stockholms skärgård har en signifikant ($P = 0,011$) högre latens än ejderungarna på sydvästra Island (visas ej).



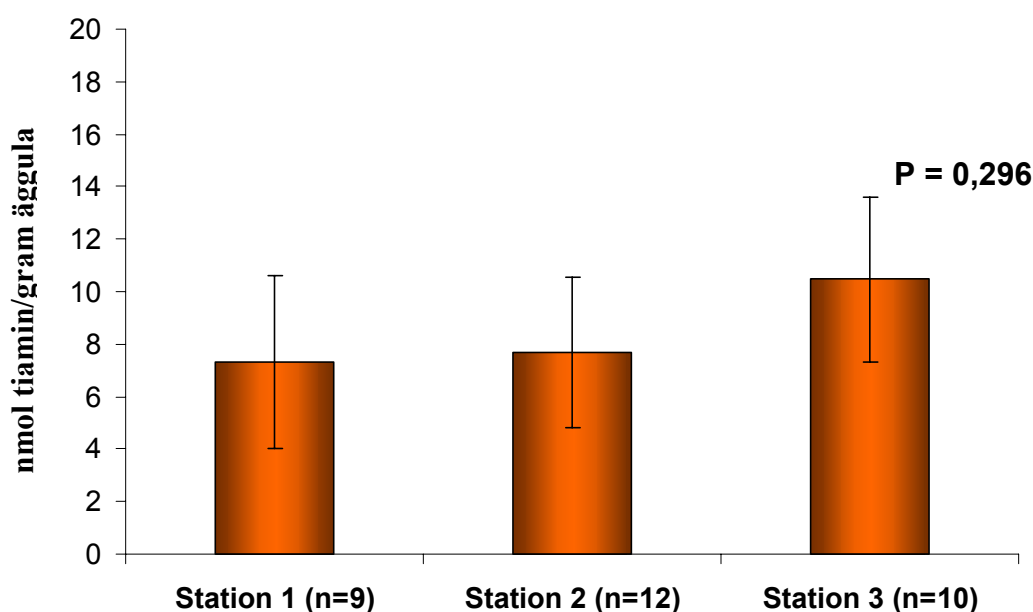
Figur 25. Aktivitet för α -ketoglutaratdehydrogenas i levern (S9) efter mätande tillsats av tiamindifosfat (TDP) *in vitro* hos ejder (*Somateria mollissima*) pull på sydvästra Island (kontroll) och i Stockholms skärgård. Resultat från poolat material från undersökningar under 2005 och 2006. Students t-test. n = antalet syskongrupper.

3.2 Jämförelse mellan stationerna utmed gradienten i Stockholms skärgård

Resultaten av rödheten på äggulan följde väl gradienten, dvs. en signifikant minskning observerades när man närmade sig Stockholm (Fig. 26). Vid analyser av tiamin i äggulan från ejderägg utmed den analyserade gradienten kunde observeras, dels mycket låga halter vid samtliga stationer, dels att inga signifikanta skillnader mellan stationerna kunde observeras (Fig. 27). För variablerna yttre äggvolym ($P = 0,912$), skalvikt ($P = 0,811$) och skaltjocklek ($P = 0,394$) kunde ej heller några signifikanta skillnader observeras mellan stationerna (visas ej). Ejderpull uppvisade dessutom motsvarande kroppsvikt ($P = 0,199$), leverindex ($P = 0,890$) och gulesäcksindex ($P = 0,932$) vid alla tre undersökta stationer. Blodglukos ($P = 0,978$), blodhemoglobin ($P = 0,822$), hematokrit ($0,722$) och följaktligen hemoglobin i erythrocyter ($0,939$), uppvisade alla motsvarande analysresultat från de olika stationerna (visas ej).



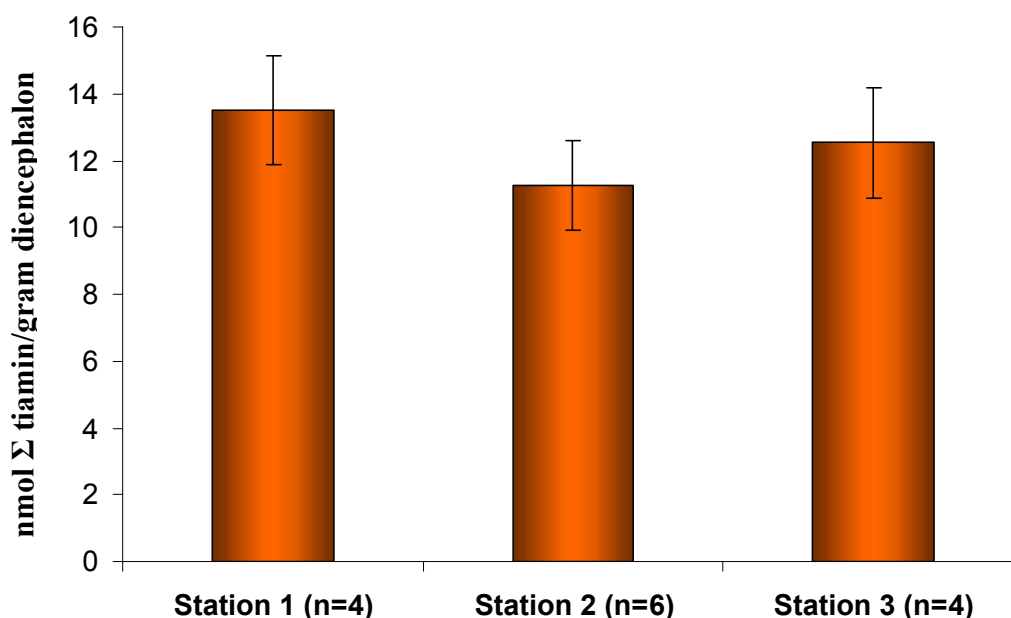
Figur 26. Rödheten hos gulan från ägg av ejder (*Somateria mollissima*) från tre stationer, inre mellan skärgården (Station 1) yttre mellanskärgården (Station 2) och ytterskärgården (Station 3). “n” står för antalet analyserade syskongrupper.



Figur 27. Koncentrationen av tiamin i äggulan hos ägg från ejder (*Somateria mollissima*) utmed en gradient i Stockholms skärgård under häckningssäsongen 2006. Undersökningarna utfördes vid tre lokaler, inre mellanskärgården (Station 1) yttre mellanskärgården (Station 2) och ytterskärgården (Station 3). n = antalet syskongrupper.

För variabeln summa tiamin (T+TMP+TDP) koncentration i diencephalon, som den presenteras i Tabell 2 (ovan), kan i Fig. 28 motsvarande resultat observeras uppdelat på de

tre stationerna som undersöktes 2006. Resultaten indikerar att ingen signifikant skillnad mellan stationerna kan observeras. Statistisk utvärdering av transketolasaktiviteten i lever hos dessa ejderpull utmed gradienten visade också att ingen statistisk skillnad mellan stationerna kunde påvisas. Vidare statistisk analys av det fria tiaminet (ofosforylerat) indikerade att den yttre stationen uppvisade en signifikant ($P = 0,033$) högre halt av detta tiamin (visas ej), dock är vidare studier nödvändigt innan någon säker skillnad utmed gradienten kan hävdas för denna variabel. I sammanfattning, skillnaderna mellan stationerna i gradienten utanför Stockholm, ser ut att vara signifikant lägre, än jämförelsen till kontrollområdet på sydvästra Island.



Figur 28. Summa koncentrationen av fritt tiamin (T), tiaminmonofosfat (TMP) och tiamindifosfat (TDP) i diencephalon hos ejder (*Somateria mollissima*) pull i Stockholms skärgård under 2006. Undersökningarna utfördes vid tre stationer, inre mellanskärgården (Station 1) yttre mellanskärgården (Station 2) och ytterskärgården (Station 3) n = antalet syskongrupper.

3.3 Bakomliggande orsaker till den konstaterade tiaminbristen

Att utröna den bakomliggande orsaken/källan till den konstaterade tiaminbristen hos ejdern har ej ingått i målsättningen för denna undersökning. Syftet har varit att, om möjligt, fastslå att en tiaminbrist sannolikt även har drabbat ejdern. Den geografiska spridningen av tiaminbristsjukdomen indikerar att skillnaderna mellan kontrollområdet på

Island och Stockholms skärgård är omfattande. Samtliga analyserade variabler som pekar på en tiaminbrist i Stockholms skärgård har visat med hög statistisk signifikans att tiaminbristen är en realitet för denna fågelart. Kemiska analyser av tiamin, enzymatiska nedregleringar av tiaminberoende enzymer och analyser av latenser (andel enzym utan tiamin analyserat *in vitro*), visar alla tydligt att ejdern är svårt drabbad.

Resultaten från lokalerna utmed gradienten från Stockholm (mellanskärgården ut till ytterskärgården) visar att skärgårdsområdet är relativt lika drabbat av tiaminbristen. Även om inte ett graderat svar erhöles för tiaminbristsjukdomen, i linje med vad många biologiska effektmarkörer har visat i tidigare studier, och vad det röda pigmentet även uppvisade i denna studie, så är det rimligt att antaga att antropogen verksamhet i stockholmsområdet (såväl som på andra orter) kan utgöra en orsak/källa för denna tiaminbrist.

Sjukdomens karaktär; dess uppkomst, symptombild, utbredning, drabbade arter och resulterande i en mycket onaturlig död i neurotoxiska symptom, visar bortom rimligt tvivel att sjukdomen kan vara antropogent orsakad. Däremot bör man vara öppen i nuläget att ansvarig(a) substans(er) ej nödvändigtvis måste tillhöra den klassiska gruppen av stabila organiska miljögifter som anrikas i näringsväven. Tiaminbristen kan induceras av ett orsakande ämne, som verkar direkt på den drabbade individen, och/eller genom otillräcklig överföring av tiamin mellan trofinivåerna i näringsväven. Ett antropogent utsläpp som indirekt orsakar dessa effekter efter kemisk transformation i miljön är bara en, av många, teoretiska möjligheter.

Forskning som syftar till att verkligen förstå den bakomliggande orsaken, med hjälp av experimentell bevisning, till denna sannolikt antropogent och kemiskt framkallad tiaminbristsjukdom är mycket önskvärd.

4 Osäkerhet

Osäkerheten i dessa undersökningar ligger ej i utförandet eller i dess slutsatser. Med hjälp av erkända och vetenskapligt publicerade metoder för kemiska analyser av tiamin, enzymatiska nedregleringar av tiaminberoende enzymer och analyser av latenser (andel enzym utan tiamin analyserat *in vitro*) har vi erhållit experimentella resultat som visar att ejdern är drabbad av en tiaminbristsjukdom. Eftersom vi har anledning att befara att jämförande kontrollmaterial till Stockholms skärgård kanske ej går att finna i närområdet så har vi använt oss av ejder från Island. Antagandet att ejder från sydvästra Island kan utgöra ett kontrollmaterial till våra mätningar i Stockholms skärgård har visat sig att vara korrekt eftersom stora signifikanta skillnader erhöles mellan regionerna. En viss osäkerhet kan dock fortfarande gälla när det gäller Island som ett helt opåverkat bakgrundsområde eftersom vi inte helt kan utesluta en eventuell påverkan av kemiska agenser också i denna region. Om så skulle vara fallet så blir konsekvensen för de erhållna resultaten i Stockholms skärgård snarast en underskattning av tiaminbristsjukdomen för ejdern i området.

Sammanfattningsvis, analyserna med efterföljande statistiska beräkningar och utvärderingar har visat med stor statistisk signifikans att ejdern är drabbad av en tiaminbristsjukdom. Därmed råder ingen osäkerhet. Däremot, ansvarig antropogen verksamhet/substans för framkallande av den kemiska sjukdomen är osäker och kräver därför vidare omfattande experimentella studier.

5 Slutsatser

Studier av arten ejder (*Somateria mollissima*) presenterade i denna rapport visar att ejder är drabbad av en tiaminbristsjukdom av okänd orsak. Vidare studier är mycket önskvärda för att klarlägga hur många sjöfågelarter som nu kan vara drabbade av denna sjukdom. I ett historiskt perspektiv kan dessa störningar vara av mycket allvarlig karaktär. Om de vikande populationerna av flera fågelarter som observeras i Stockholms skärgård har ett samband med den observerade överdödligheten i detta neurotoxiska syndrom, står vi inför ett problem som måste förstås och lösas omgående, alternativt acceptera att ett uthålligt ekosystem ej går att skydda och upprätthålla. Studierna indikerar att ingen stark/brant gradient föreligger för dessa negativa biologiska effekter från Stockholms centrala delar. Dock, vidare studier är nödvändiga för att förstå olika antropogena utsläpp och deras omvandling i miljön, allt för att bringa klarhet i olika antropogena utsläpp och deras inverkan på denna allvarliga bristsjukdom.

Slutsatser i punktform:

- Ejdern (*Somateria mollissima*) har visat sig drabbad av tiaminbrist i Stockholms skärgård.
- Analyser utmed en gradient i Stockholms skärgård indikerar att ejdern är likvärdigt drabbad vid alla stationer.
- Vidare studier av möjliga sjöfågelarter drabbade av tiaminbrist i skärgården är mycket önskvärda.
- En miljöövervakning av denna tiaminbristsjukdom bör initieras omgående i både fågel och fisk. Eftersom kunskapen om tiaminbrist i fisk är grundad i relativ stor detalj (M74), bör fisk också ingå.

6 Åtgärder och ansvar

Åtgärder för att minska eller förhindra den miljöpåverkan som beskrivs i detta arbetsmaterial går ej att peka ut för närvarande. Anledningen till detta faktum är givetvis att vi inte vet vilken substans eller substansgrupp som är ansvarig för den uppkomna tiaminbristen hos de vilda fåglarna. Följaktligen kan ej heller någons specifika ansvar för detta pekas ut. Det skall dock understrykas att det mest sannolika är att ett kemiskt agens, antropogent orsakat, är ansvarigt för att fåglarna dör under uppvisande av neurologiska skador på ett mycket onaturligt sätt.

Den mest ansvarsfulla åtgärden som samhället nu kan göra är att skyndsamt tillsätta tillräckliga resurser (personella och ekonomiska) som kan bringa full klarhet kring dessa specifika miljöstörningar. I ett jämförande perspektiv anser vi att det är mycket svårt/omöjligt och finna motsvarande prioriteringsbehov för andra miljöstörningar som för de skador som beskrivs här.

7 Erkännanden

Gunnar Hjertstrand tackas för ovärderlig hjälp i samband med insamlande och transport av biologiskt material från olika lokaler i Stockholms skärgård under både år 2005 och 2006. Göran Altstedt tackas också för ett fantastiskt arbete när det gäller logistik och all annan hjälp i samband med insamlande och transport av biologiskt material från olika lokaler i Stockholms skärgård.

8 Referenser

- Ahlbom, J. och Fagergren K. (2004) Levande Skärgårdsnatur, Årsrapport 2003. [Skärgårdsstiftelsen]
- Åkerman, G. and Balk, L. (1995) "A reliable and improved methodology to expose fish in the early embryonic stage." *Marine Environmental Research*, 39, 155–158.
- Åkerman, G. and Balk, L. (1998) "Descriptive studies of mortality and morphological disorders in early life stages of cod and salmon originating from the Baltic Sea." *American Fisheries Society Symposium* 21:41–61.
- Åkerman, G., Tjärnlund, U., Noaksson, E. and Balk, L. (1998) "Studies with oxythiamine to mimic reproduction disorder among fish early life stages." *Marine Environmental Research*, 46:(1–5) 493–497 .
- Åkerman, G., Amcoff, P., Tjärnlund., Fogelberg, K., Torrissen, O. and Balk, L. (2003) Paraquat and menadione exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) –Studies of effects on the pentose-phosphate shunt and thiamine levels in liver and kidney. *Chemico-Biological Interactions* 142, 269–283.
- Amcoff, P., Åkerman, G., Börjeson, H., Tjärnlund, U., Norrgren, L. and Balk, L. (2000) "Hepatic activities of thiamine-dependent enzymes, glucose-6-phosphate dehydrogenase and cytochrome P4501A in Baltic salmon (*Salmo salar*) yolk-sac fry after thiamine treatment." *Aquatic Toxicology* 48, 391–402.
- Amcoff, P., Åkerman, G., Tjärnlund, U., Börjeson, H., Norrgren, L. and Balk, L. (2002) "Physiological, biochemical and morphological studies of Baltic salmon yolk-sac fry with an experimental thiamine deficiency: Relations to the M74 syndrome." *Aquatic Toxicology* 61, 15–33.
- Anonym, Länsstyrelsen Blekinge. "Fåglar och fågeldöd i Blekinges skärgård 2003", Rapporter Länsstyrelsen Blekinge län ISSN 1651-8527 2003, 6, 12 sidor.
- Balk, L., Hägerroth, P.-Å., Åkerman, G., Hanson, M., Tjärnlund, U., Hansson, T., Hallgrimsson, G.T., Zebühr, Y., Broman, D., Mörner, T. and Sundberg, H. 2009. Wild birds of declining European species are dying from a thiamine deficiency syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 106, 12001–12006.

- Brown, S., and Honeyfield D. (2002) “Early mortality syndrome workshop”, June 26, 2002, Ann Arbor, MI., Great Lakes Fishery Commission Research Status Report. 24 pp.
- Cooke., A.S. (1973) “Shell thinning in avian eggs by environmental pollutants.” *Environmental Pollution* (1970) 4 (2):85–152, 1973.
- Cramp, S., Simmons, K.E.L. and Perrins, C.M. (2006) *Handbook of the birds of Europe the Middle east and North Africa, The Birds of the Western Palearctic, 1977–1994, Volumes I–IX.* Oxford University Press, Oxford, UK.
- DeRoode, D.F., Balk, L., Koeman, J.H. and Bosveld, A.T.C. (2000) “Development of a bioassay to test the possible role of thiamine disturbance as a mechanism behind pollution induced reproductive failures in birds” *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 39:(3), 386–391.
- Desholm, M., Christensen, T.K., Scheiffarth, G., Hario, M., Andersson, Å., Ens, B., Camphuysen, C.J., Nilsson, L., Waltho, C.M., Lorentsen, L-M., Kuresoo, A., Kats, R.K.H., Fleet, D.M. and Fox, A.D. (2002). “Status of the Baltic/Wadden Sea population of the Common Eider *Somateria m. mollissima*.” *Wildfowl* 53, 167–203.
- Ekman, E., Åkerman, G., Balk, L. and Norrgren, L. (2003) “Nanoinjection as a tool to mimic vertical transmission of *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*.” *Diseases of Aquatic Organisms*, 55; 93–99.
- Ekman, E., Åkerman, G., Balk, L. and Norrgren, L. (2004) “Impact of PCB on resistance to *Flavobacterium psychrophilum* after experimental infection of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* eggs by nanoinjection.” *Diseases of Aquatic Organisms* 60(1), 31–39.
- Ericson, P.G.P. (1987) ”Osteology of the eider : *Somateria mollissima* (L.) : a study of sexual, geographic and temporal morphometric variation in the eider skeleton.” Thesis, Studies of The Museum of National Antiquities, Stockholm, Sweden.
- Gilman, A.P. (1978) “Natural and induced thiamine deficiency in the herring gull (*Larus argentatus*).” Thesis, The faculty of Graduate Studies, The University of Guelph, Canada.
- Hansson, T., Lindesjö, E., Förlin, L., Balk, L., Bignert, A. and Larsson, Å. (2006a) “Long-term monitoring of health status in perch (*Perca fluviatilis*) in the Baltic Sea indicates decreased gonad weight and increased hepatic EROD activity.” *Aquatic Toxicology*, 79, 341–355.

- Hansson, T., Schiedek, D., Lehtonen, K.K., Vuorinen, P.J., Liewenborg, B., Noaksson, E., Tjärnlund, U., Hanson, M. and Balk, L. (2006b). "Biochemical biomarkers in adult female perch (*Perca fluviatilis*) in a chronically polluted gradient in the Stockholm recipient (Sweden)." *Marine Pollution Bulletin*, 53, 451–468.
- Hansson, T., Hanson, M., Zebühr, Y. and Balk, L. In prep. "Biochemical, cytochemical, and cytological biomarkers in adult female perch (*Perca fluviatilis*) in a chronically polluted gradient in the Stockholm recipient (Sweden)."
- Heddi, A., Lefebvre, F. and Nardon, P. (1993) "Effect of endocytobiotic bacteria on mitochondrial enzymatic activities in the Weevil *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae)." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 23 (3), 403–411.
- Kankaanpää, H., Vuorinen, P.J., Sipiä, V. and Keinänen M. (2002). "Acute effects and bioaccumulation of nodularin in sea trout (*Salmo trutta m. trutta* L.) exposed orally to *Nodularia spumigena* under laboratory conditions. " *Aquatic Toxicology* 61, 155–168.
- Karlsson, L., Ehnbo, S. and Walinder, G. (2005). "A comparison between ringing totals at Falsterbo, SW Sweden, ringing totals at Ottenby, SE Sweden, and point counts from the Swedish breeding bird census during 20 years (1980–1999)." *Ornis Svecica* 15, 183–205.
- Linderöth, M., Hansson, T., Liewenborg, B., Sundberg, H., Noaksson, E., Hanson, M., Zebühr, Y. and Balk, L. (2006). "Basic physiological biomarkers in adult female perch (*Perca fluviatilis*) in a chronically polluted gradient in the Stockholm recipient (Sweden)." *Marine Pollution Bulletin* 53, 437–450.
- Lindström, Å. och Svensson, S. (2004) "Övervakning av fåglarnas populationsutveckling", Årsrapport för 2003, Ekologiska institutionen, Lunds universitet, Lund, rapport 68 sidor.
- Lindström, Å., and Svensson, S. (2006) "Monitoring population changes of birds in Sweden." Annual report 2005. 1–68. Department of Ecology, Lund University.
- Ljunggren, L., Sandström, A., Johansson, G., Sundblad, G. and Karås, P. (2005) "Rekryteringsproblem hos Östersjöns kustfiskbestånd." *Fiskeriverket Informerar*, Finfo 2005:5, 54 sidor. (ISSN 1404-8590)
- Lowry, O.H., Roseborough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) "Protein measurement with Folin phenol reagent" *Journal of Biological Chemistry* 193, 265–275.

- Mancinelli, R., Ceccanti, M., Guiducci, M.S., Sasso, G.F., Sebastiani, G., Attilia, M.L. and Allen, J.P. (2003). "Simultaneous liquid chromatographic assessment of thiamine, thiamine monophosphate and thiamine diphosphate in human erythrocytes: a study on alcoholics." *Journal of Chromatography B* 789, 355–363
- Mörner, T., Uhlhorn, H., Ågren, E., Bernodt, K., Mattsson, R., Bröjer, C., Nilsson, K., Gavier-Widén, D., Jansson, D.S., Christensson, D.A., Petersson, L. and Neimanis, A. (2005) "Onormalt hög dödlighet bland trutar och annan sjöfågel i Sverige." *Svensk Veterinärtidning* 8–9:11–18.
- Nakagawasai, O. (2005) "Behavioral and neurochemical alteration following thiamine deficiency in rodents: relationship to functions of cholinergic neurons." *Yakugaku Zasshi* 125 (7) 549–554.
- Ross, J.P., Hinterkopf, J.P., Honeyfield, D.C., Carbonneau, D., Woodward, A., Sepulveda, M.S. and Gross, T.S. (2002) "Thiamine Status and Mortality of Adult American Alligators (*Alligator mississippiensis*) in Central Florida in Lakes Griffin and Woodruff During 2000 and 2001." Abstract from Great Lakes Fishery Commission. Research status report, Early mortality syndrome workshop, Ann Arbor, MI, June 26 2002.
- Sepulveda, M.S., Wiebe, J.J., Honeyfield D.C., Rauschenberger, H.R., Hinterkopf, J.P., Johnson, W.E. and Gross, T.S. (2004) "Organochlorine pesticides and thiamine in eggs of Largemouth bass and American alligators and their relationship with early life-stage mortality." *Journal of Wildlife Diseases* 40(4), 782–786.
- Smeets, E.H.J., Muller, H., and de Wael, J. (1971) "A NADH-dependent transketolase assay in erythrocyte hemolysates." *Clinica Chimica Acta* 33, 379–386.
- Söderberg, K. och Gårdmark, A. "Kustfisk och fiske" *Bottniska viken 2003, Årsrapport från den marina miljöövervakningen*, 19–21. [ICES]
- Spannhof, L., Hase, K.P., Mehl, M. and Plantikow, A. 1978. Wirkung gleichzeitigen thiamin- und sauerstoffmangels auf den physiologischen Zustand von Forellensetzlingen. *Fischerei-Forschung Wissenschaftliche Schriftenreihe* 16 (3): 21–24.
- Tate, J.R. and Nixon, P.F. (1987) "Measurement of Michaelis constant for human erythrocyte transketolase and thiamine diphosphate." *Analytical Biochemistry* 160, 78–87.
- Tyler C. (1961). "Egg shells. XVI. Variations in shell thickness over different parts of the same shell." *Journal of The Science of Food and Agriculture* 12, 459–470.

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



ISSN: 1653-9168