

Fredrik Ljunghager
Miljöövervakningsenheten
Havs- och vattenmyndigheten
Gullbergs strandgata
411 04 Göteborg
fredrik.ljunghager@havochvatten.se

Undersökningar av fisk som provtagits nära Nord Stream-läckan

BAKGRUND

Den 26 september skedde ett misstänkt sabotage mot naturgasledningarna Nord Stream 1 & 2 i närheten av Bornholm. Stora mängder naturgas hann frisättas från ledningarna innan media rapporterade att läckagen hade upphört den 1 oktober (Nord Stream 2) respektive den 2 oktober (Nord Stream 1). SVA fick tisdagen 30 september 2022 förfrågan om vi kunde göra undersökningar av fisk från området kring läckorna. Proverna kunde samlas in i samband med SLU:s provfiske BIAS som skulle gå av stapeln veckan efter. Det fanns inte möjlighet för SVA att delta i expeditionen och genomföra obduktioner, så SVA efterfrågade formalinfixerade organ (gäle, njure, lever) samt blodutstryk från hjärtblod. Vidare efterfrågades bilder av alla provtagna fiskar samt morfometriska data och halens koordinater.

Naturgas består till största delen av metangas men mindre mängder av andra alkaner (kolväten) och spår av andra gaser som koldioxid, kväve, vätesulfid och helium. Metan är en inert gas, vilket innebär att den inte reagerar med omgivningen, inklusive djurs vävnader. Detta innebär att den inte i sig är giftig, men den kan ändå ha negativa effekter på levande organismer då den tränger undan syre i luften eller vattnet, vilket kan leda till syrebrist och symptom relaterade till detta. En allmän syrebrist kan ge upphov till diffus degeneration och vävnadsdöd i kroppens olika organ, direkt beroende på minskad tillgång på syre eller till följd av en försurning av blodet (respiratorisk acidosis).

Utsvämning av (metan)gas i vattnet leder också till gasöversättning, vilket leder till att en ökad mängd gas tas upp av fiskars gälar, varvid blodet översättas med gas och gasblåsesjuka (motsvarar dykarsjuka hos människor) uppstår. Gasblåsesjuka innebär att embolier (proppar) av gas fastnar i kärl, främst i kapillärer, de minsta kärlen, men om större gasbubblor förekommer drabbas även arterioler eller artärer. Proppen stoppar blodflödet vilket leder till akut syrebrist i den vävnad som försörjs av kärlet och en infarkt uppstår. Omfattande proppbildning är direkt dödlig medan en låggradig proppbildning under en längre tids gasöversättning leder till bland annat försämrat immunförsvar på

grund av en kronisk lågradig syrebrist i fiskens kropp. Detta på grund av att gälarna alltid drabbas vid gasblåsesjuka (**Bild 1**), och en minskad cirkulation genom gälfilamenten hämmar gälarnas syreupptagande förmåga.

Syrebrist samt gasblåsesjuka är därför de två tillstånd som metangas/naturgas i

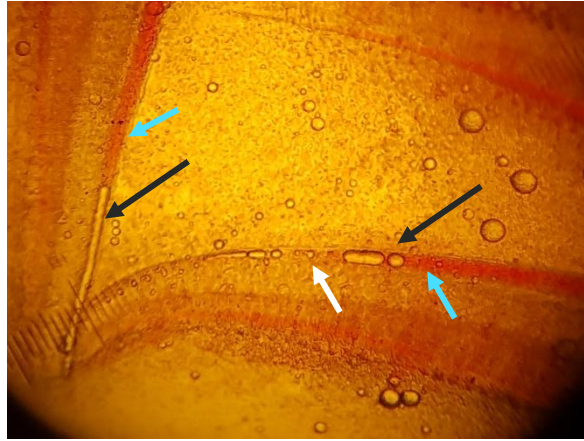


Bild 1. Luftembolier (svarta pilar) i gälfilamenten vid gasblåsesjuka hos regnbåge. Notera blod i kärnen före embolierna (blå pilar) medan blod inte kunnat ta sig förbi embolierna utan kärlet är tomt efter embolierna (vit pil). Direktmikroskopi av färskt preparat. Foto: SVA

vattnet kan förväntas ge på fisken. I tillägg till detta kan man förvänta sig att fisk som befann sig nära Nord Stream i samband med sabotaget påverkades av den tryckvåg som explosionerna gav upphov till. Explosioner/tryckvågor kan ge upphov till frakturer på kotpelaren samt blödningar eller sönderslitningar i olika organ. Observationer som SVA gjort i samband med undersökningar av fisk som dödat av fiske med sprängmedel inkluderar bristningar i ögats lins, bristning av simblåsan, blödningar i olika organ samt avslitning av aorta och förblödning.

METODER

Fisken fångades genom trålning, där varje tråldrag varade ca 30 min. GPS-koordinater för start samt stopp för respektive drag och medeltråldjup ingick i data SVA erhöll från SLU. SVA erhöll dessutom GPS-positioner för de fyra gasläckorna från Havs- och vattenmyndigheten.

I samband med provtagningen fotograferade SLU varje fisk från höger och vänster sida samt båda sidors gälar exponerades för ytterligare fotografering. Uppenbara inre förändringar fotograferades också. Fotografierna möjliggjorde granskning avseende avvikelser i efterhand.

Vid provtagningen formalinfixerade SLU organbitar (max 0,5 cm tjocklek i en av tre dimensioner) i 4% boraxbuffrad formalin samt genomförde blodutstryk av hjärtblod på objektglas. Proverna skickades efter ankomst till hamn till SVA och bilder samt data avseende fiskarna levererades elektroniskt.

Efter ankomst till SVA genomfördes en renskärning av organbitarna, de placerades i kassetter samt lades i 4% fosfatbuffrad formalin i en vecka. Därefter genomfördes en avkalkning av vävnaden för att luckra upp brosk i gälarna. Organbitarna kunde därefter bäddas, snittas och färgas med Hematoxylin & Eosin enligt rutin vid SVA:s histopatologiska laboratorium. Blodutstryken

fixerades i metanol samt färgades med Diff-Quicklösning. Läsning av snitt och utstryk gjordes i 400 – 1000 x förstoring.

I samband med renskärningen klipptes några fixerade gälfilament loss och lades i 70% etanol. Detta gjordes för att kunna genomföra direktmikroskopi på de fixerade gälbitarna utan användande av dragskåp.

Histopatologisk och cytologisk bedömning gjordes med hjälp av standardiserade mallar som SVA använder vid hälsoundersökning av vildfisk.

Vid bedömning av gälar räknas antalet primära gällameller som är bedömningsbara och därefter bedöms frekvensen av skador (blödningar, ökad förekomst av slemceller, hyperplasi, förekomst av parasiter, förekomst av bakteriell infektion (epiteliocystis) samt korreleras till antalet primärlameller.

Avseende njure bedöms status på nefron (filtrerande enheter) samt interstitium (blodbildande vävnad). Nefronen består av glomeruli (filtrerande kärlnystan) samt tubuli (transport av filtrat, koncentration och utspädning av detsamma). Här räknas totalantalet glomeruli, antalet glomeruli med förändringar, förekomst av hyalina avlagringar i tubuli samt eosinofila granula i tubulicellerna, förekomst av parasiter i tubuli, förekomst av degeneration eller nekros av tubuliceller, samt regeneration av nefron. Interstitiet bedöms avseende degeneration/nekros, blödningar, förekomst av makrofagcentra, förekomst av inflammation samt förekomst av parasiter.

Levern bedöms avseende näringsstatus (vakuolisering), tecken på förfettnings (förekomst av förkrympta/uttryckta kärnor, steatos, fettnekros), inflammation, parasiter, degeneration eller nekros, blödningar, tecken på cellsvullnad samt förekomst av tumörer eller cellförändringar som kan vara begynnande tumörer.

Förändringar som inte finns fördefinierade i mallen men observeras noteras också, oavsett organ.

Blodutstryk bedöms genom differentialräkning av vita blodkroppar samt undersökning av röda blodkroppar med avseende på toxiska förändringar och förekomst av omogna blodceller. I en "normal" vit blodbild bör lymfocyter utgöra >80% av de vita blodkropparna, neutrofiler <10%, trombocyter (blodplättar) <5% och monocyter /makrofager <2%. För att kompensera för potentiellt stresspåslag i samband med fångst, vilket kan öka andelen neutrofiler i blodet, sattes gränsen för normal mängd lymfocyter till $\geq 75\%$. Trombocyter inkluderades inte i räkningen, då de ibland har en tendens att aggregera och därmed kan utgöra en oproportionerlig del av de vita blodkropparna.

Databearbetning

För deskriptiv statistisk bearbetning överfördes data till Stata 15 (Stata Corp., 4905 Lakeway Drive, College Station, Texas, 77845 USA. Utöver ren deskriptiv statistik användes Wilcoxon's rangsummetest för att undersöka samband. Då endast drag 232, "Nord Stream-draget" innehöll mer än 10 provtagna torskar, har data från övriga drag klumpats ihop för statistisk bearbetning, så två grupper om 14 torskar (drag 232) samt 12-15 torskar (övriga drag) jämförts.

RESULTAT

Totalt provtogs 34 fiskar (29 torskar och 5 skrubbskäddor) från åtta drag för SVA:s räkning (**Tabell 1**). Provtagningarna genomfördes den 13/10 (drag 226 - 229), 14/10 (drag 232 - 233) samt 15/10 (drag 235 - 236). Dragens geografiska position framgår av **Bild 2**. Drag 232 genomfördes ca 7 nautiska mil (ca 13 km) från de tidigare gasläckorna. Från detta drag provtogs 14 torskar. Resterande fiskar provtogs längre från platsen för läckorna och utgör referensmaterial för SVA:s undersökningar. Trålningen hade gjorts på medeldjup om ca 53 m för drag 232 och 9 – 43 m för övriga drag.

Tabell 1. Basdata avseende de fiskar som provtagits för SVA:s räkning. Positioner för dragen återfinns i kartan (**Bild 2**).

Fisknr	Art	Längd (mm)	Vikt (g)	Kön	Drag nr.	Lokalnamn
G101	Torsk	320	255	F	226	51 S Heligholmen
G102	Torsk	290	194	F	226	"
G103	Skrubbskädda	240	131	M	227	50 SE Ölands södra udde
G104	Torsk	180	56	M	228	37 SE Ölands södra
G105	Torsk	200	76	M	228	"
G106	Torsk	170	42	F	228	"
G107	Torsk	360	376	M	229	35 SE Utlängan
G108	Torsk	380	340	F	229	"
G109	Torsk	330	228	M	229	"
G110	Torsk	310	260	F	229	"
G111	Torsk	170	58	F	229	"
G112	Skrubbskädda	260	188	M	229	"
G113	Skrubbskädda	330	394	F	229	"
G114	Skrubbskädda	260	172	M	229	"
G115	Skrubbskädda	280	201	M	229	"
G116	Torsk	300	178	M	232	30 NE Fredriksö
G117	Torsk	310	216	M	232	"
G118	Torsk	280	132	M	232	"
G119	Torsk	250	96	M	232	"
G120	Torsk	285	156	M	232	"
G121	Torsk	330	290	F	232	"
G122	Torsk	270	150	M	232	"
G123	Torsk	270	157	M	232	"
G124	Torsk	330	226	M	232	"
G125	Torsk	260	150	M	232	"
G126	Torsk	270	145	M	232	"
G127	Torsk	270	118	M	232	"
G128	Torsk	300	152	F	232	"
G129	Torsk	250	107	M?	232	"
G131	Torsk	280	140	F	233	23 ENE Grisby
G132	Torsk	450	768	F	235	3 NE Hammerodde
G133	Torsk	430	495	M	235	"
G134	Torsk	380	432	F	235	"
G135	Torsk	380	396	M	236	8 E Baskemölla



Bild 2. Positioner för de drag (start- samt slutpunkt) inom **BIASQ4** varifrån SVA fått material för undersökning. Stjärnorna anger positioner för läckorna på Nord Stream 1 & 2 enligt underlag från Havs- och vattenmyndigheten. BY4 och BY5 är två av SMHI:s mätstationer för bland annat vattentemperatur och fytoplankton. Kartunderlag från <https://rl.se/rt90>

Samtliga torskar var relativt små, mellan 170 och 450 mm. Det fanns ingen signifikant storleksskillnad mellan dragen (drag 232 median 275 mm, min 250, max 330 mm, övriga drag median 320 mm, min 170mm, max 450 mm; Wilcoxon rangsummetest $Z=1.4$, $p>0.05$).

Bedömning av fotografier

Samtliga översiktsbilder var av bra kvalitet och kunde bedömas noggrant. Bilderna av gälur var svåra att bedöma på detaljnivå, men en översiktlig bedömning av färg och förekomst av tydliga förändringar kunde göras.

En torsk (drag 232) hade hudblödningar/småsar på buksidorna (**Bild 3A**). Åtta torskar, fem från drag 232 och tre från övriga drag, hade utstående ögon (exoftalmi), varav två (drag 226) även hade framfall av urinblåsa och könsorgan genom kloaken (**Bild 3B**).

Inga tydliga patologiska förändringar noterades på gälarna. Färgen varierade men mest sannolikt beroende på olika tidsspann från död till fotografering. Några fiskar hade bleka spetsar på gälfilamenten eller enstaka filament med stas/blödningar.

För en skrubbskädda hade levern fotograferats. Organet hade blödningar och såg ut att vara sönderfallande (**Bild 3C**).

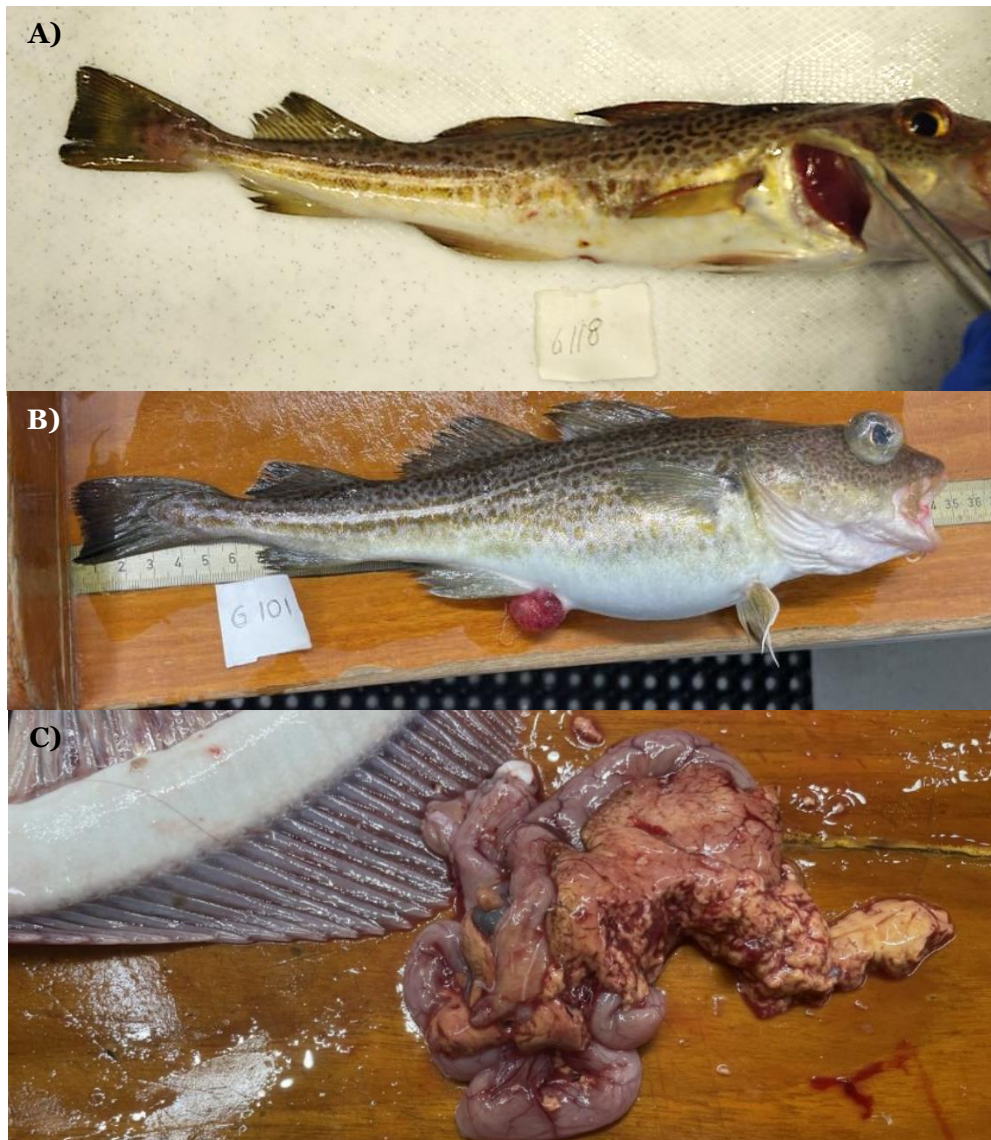


Bild 3. A) Torsk med små hudblödningar/sår. Gälarna har fin färg. **B)** Torsk med kraftig exoftalmi samt framfall av romsäckan. **C)** Lever från skrubbskädda med omfattande blödning

Histopatologisk och cytologisk bedömning

Skrubbskäddornas organ har bedömts men inkluderas inte i denna rapport då det inte fanns några skrubbskäddor provtagna i drag 232, och histopatologiska fynd inte kan likställas mellan arterna p.g.a. olika livsmiljöer, föda m.m.

Gälar

10 gälfilament som efterfixerats i etanol direktmikroskopades men inga uppenbara förändringar i form av gasbubblor (se **Bild 1**) eller hyperplasi noterades. Därför genomfördes enbart en noggrann kontroll av histopatologiskt preparerade gälar.

En sammanställning per individ över histopatologiska fynd på gälarna finns i **Tabell 2**. Tre individer (G106, G108 samt G111) hade gälar utan onormala fynd.

Den totala sjuklighetspoängen för gälar var högre hos fisken i drag 232 (median 8.66, SD 9.25) jämfört med övriga torskar (median 2.63, SD 3.75), Wilcoxon rangsummetest $Z -2.40$, $p < 0.05$.

Akuta förändringar

Inga akuta patologiska förändringar noterades, däremot noterades förekomst av akuta postmortala förändringar i form av epitelcellsknoppning och avlossning, eller avlossning av basalmembranet från kapillärkolumnen hos ett antal fiskar.

Subakuta förändringar (dagar till någon vecka)

Ihoppackning av kapillärkolumnen (eng. pillar column), fortsättningsvis kallas förändringen wire-loops, med sammansmältning av epitelet som en säck runt, noterades också hos ett antal individer. Wire-loops var av varierande grad, från mild till hela sekundärlamellen (**Bild 4A-C**) samt från mindre områden av ett gälfilament till mer än 50%. Enstaka individer hade mild hyperplasi av de drabbade sekundärlamellerna. Både antalet individer med wire-loops samt graden av ihoppackning var signifikant högre hos torsken från drag 232 (median 0.12, SD 0.19) än från de andra dragen (median 0, SD 0.10), Wilcoxon rangsummetest $Z -2.22$, $p < 0.05$.

En ökad mängd slemceller, oftast låggradig på sekundärlamellerna noterades hos ett antal individer (**Bild 4D, E**). Förändringen var associerad med hyperplasi i vissa fall men förekom utan samtidig hyperplasi hos andra torskar. Det fanns ingen skillnad i ökad förekomst av slemceller mellan torsken från drag 232 och övriga torskar.

Några torskar hade också förekomst av bakteriell infektion (epiteliocystis), i alla fallen enstaka cystor på ett eller ett par filament. Hos två torskar noterades jätteceller i kryptorna mellan sekundärlamellerna (**Bild 4D**). Detta är typiskt för herpesvirusinfektion orsakad av Gadeid herpesvirus-1 (GaHV-1).

Kroniska förändringar

Förekomst av parasitinfektion noterades hos ett antal torskar. Hos sju torskar noterades xenom med amorf massa (oidentifierade parasiter), och hos fem torskar sågs mikrosporidiecystor och/eller xenom (sannolikt *Loma morhua*, **Bild 4F**). Två fiskar från drag 232 hade massiv infektion med mikrosporidier.

Hyperplasier (vävnadstillväxt) förekom hos 15 torskar. Hyperplasierna var oftast av mild grad men kunde involvera stora delar av den gälbit som undersöktes. Massiv hyperplasi sågs hos torskar med mikrosporidiosis då det fanns stora xenom-bildningar samt granulom med degenererade mikrosporidiexenom, vilket indikerar att infektionen pågått en längre tid. Det fanns ingen signifikant skillnad i graden av kroniska förändringar mellan torsken från drag 232 och övrig torsk.

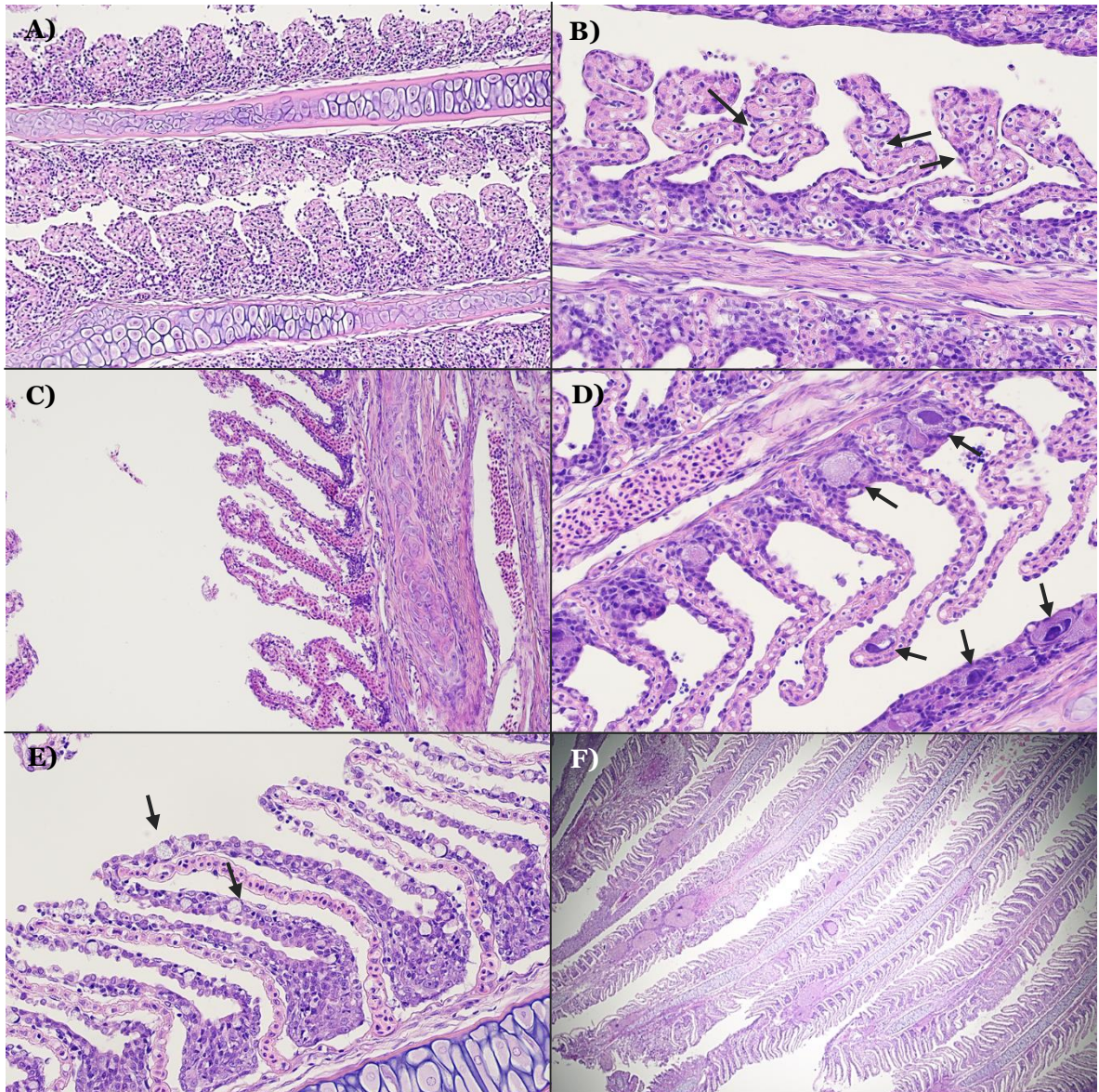


Bild 4. **A)** Två gälfilament med kraftig wire-looping av sekundärlamellerna. **B)** Närbild av måttlig wirelooping med begynnande sammansmältning av epitel (pilar). **C)** Lindrig wire-looping, torsk provtagen 2018. **D)** Riklig förekomst av jätteceller, infekterade med herpesvirus (pilar), samt måttlig förekomst av slemceller på sekundärlamellerna. **E)** Lindrig-måttlig hyperplasi av sekundärlameller samt intralamellär vävnad. Måttlig förekomst av slemceller på sekundärlamellerna (svart pil). **F)** Kraftig förekomst av mikrosporidixenom, granulom efter degenererade xenom samt måttlig-kraftig hyperplasi.

Njure

Prov från njure saknades från tre torskar, i stället var gaskörtel av misstag provtagen. En sammanställning per individ över fynd i njurarna finns i **Tabell 2**. Den totala sjuklighetspoängen för njure var högre hos fisken från drag 232 (N=14, median 186.4, SD 67.5) än fisken från övriga drag (N=12, median 134.4 SD 60,9), Wilcoxon rangsummetest Z 2.06, $p < 0.05$.

Akuta förändringar

Akut degeneration av tubuli (akut nefros, **Bild 5A**) observerades hos totalt 22 torskar, varav samtliga 14 torskar från drag 232 hade degeneration till någon grad. Skillnaden var signifikant, med mer omfattande degeneration hos torsken i drag 232 (median 90, SD 48.5) än hos övriga fiskar (median 10, SD 37.8), Wilcoxon rangsummetest Z 3.19, $p < 0.01$.

Subakuta till kroniska förändringar

Förekomst av olika förändringar i glomeruli noterades i form av ödem i kapseln, kompakta glomeruli eller i princip upplösta glomeruli. Det fanns inga tecken i tubuli på akuta skador i glomeruli. Endast hos två fiskar bedömdes samtliga glomeruli som normala. Det fanns inga statistiska skillnader mellan torsken i drag 232 och övriga torskar.

Regeneration av tubuli noterades i någon grad hos samtliga torskar utom en. Det fanns inga statistiska skillnader mellan torsken i drag 232 och övriga torskar. Den torsk som inte hade några regenererande tubuli hade generellt mycket få nefron, glomeruli som inte såg ut att vara kopplade till ett tubulisystem samt hyalina avlagringar i de få glomeruli och tubuli som fanns.

Makrofagcentra observerades i varierande grad men hos samtliga torskar. Det fanns ingen skillnad i mängden makrofagcentra mellan torsken i drag 232 och övriga torskar.

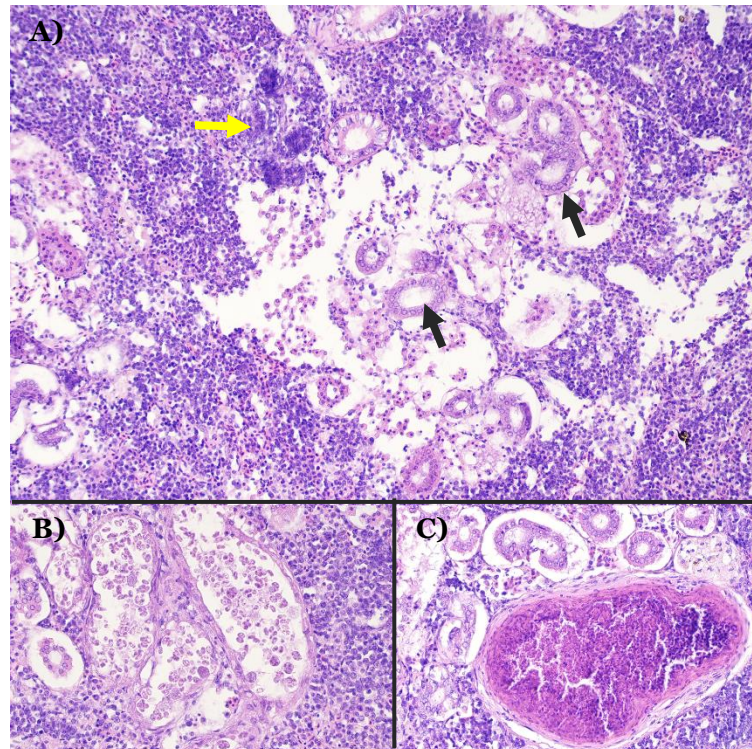


Bild 5. A) Område med fattande degeneration av tubuli. Normala tubuli (svart pil) och regenererande nefron (kraftigt lila, gul pil) ses i anslutning till skadan. **B)** Tubuli med massiv coccidieinfektion. **C)** Parasitärt granulom i anslutning till tubuli.

Parasiter och/eller parasitgranulom i interstitet noterades (**Bild 5C**) hos 11 torskar. Hos två torskar noterades coccidier i tubuli. Den ena torsken hade ett par coccidier i tubulilumen utan tecken på infekterade tubuliceller, medan den andra hade en massiv infektion av coccider i olika livsfaser och med total destruktions av det infekterade epitelet (**Bild 5B**).

Lever

Inga tecken på sjukliga förändringar utöver de som normalt kan förväntas och observeras hos torsk i samband med vår övervakning (exempelvis fettdegeneration, parasitförekomst) noterades. Därmed har ingen statistisk bearbetning av data gjorts.

Blodutstryk

Blodutstryk saknades från en individ från hal 232. En översikt över fördelningen av olika fynd per torsk finns i **Tabell 2**.

Röda blodkroppar

Hos samtliga torskar bedömdes de mogna röda blodkropparna normala och det fanns inga tecken på toxisk påverkan. Förekomst av omogna stadier av röda blodkroppar (>1% av cirkulerande röda blodkroppar) noterades hos åtta torskar, varav tre från hal 232. Andelen proerythrocyter var då 2 - 5%. Enstaka erythroblaster noterades hos en av dessa torskar samt hos en torsk som hade enstaka proerythrocyter.

Vita blodkroppar

Lymfocyter utgjorde 73 – 100% av den räknade fraktionen vita blodkroppar. Övriga blodkroppar utgjordes av monocyter, inklusive den aktiva formen makrofager utom hos två torskar där även enstaka neutrofiler noterades. Makrofager noterades i den räknade fraktionen hos tolv torskar, och utgjorde då 1 – 9% av den totala mängden vita blodkroppar. Fem torskar hade förekomst av omogna lymfocyter (prolymfocyter) i blodet, där dessa utgjorde 1 - 4% av den räknade fraktionen vita blodkroppar (två torskar från hal 232, två torskar från andra hal), samt 62 och 66% av den bedömda fraktionen vita blodkroppar, där båda torskarna kom från hal 232. En av de två senare torskarna var den torsk som hade hudblödningar, medan den andra torsken inte hade några yttre tecken på sjukdom.



Tabell 2. Fynd på gälar, njure och blodutstryk från torsk provtagen inom BIAS för SVA:s räkning. Gråskuggat område representerar torsk från provtagningspunkten närmast Nord Stream-läckorna. Skala för förekomst: (+) enstaka, +=lindrig, +=måttlig, +++=riklig/kraftig, +++=mycket riklig/kraftig.

Fisknr	Gälar					Njure					Blod			
	slemceller	Wire-loops	Hyperplasi	bakterie (E) ^a virus (V) ^b	Parasiter	% glomeruli med förändring	Degeneration tubuli	Regeneration tubuli	MMC	Parasiter interstitiellt (I) tubulärt (T)	% lymfocyter ^c	% monocyter ^c	% Pro- lymfocyter ^c	% Pro- erythrocyter ^d
G101		+									76	24		
G102		+++		E (+)					Njure saknades		95	5		3
G104				E (+)					Njure saknades		81	19		
G105				V +		28	+	++	+	I +	99	1		
G106						46	++	++	+		92	8		
G107	+	+				24	+	+++	+++	I +	92	8		
G108						61	+	+	++		73	27	3	2
G109		+				11	+	+++	++	I ++	92	8	2	5
G110	(+)	+				10	+++	+	++		96	4		
G111						0	+++	++	++		85	15		
G116					Parasitxenom +	4	++	++	+++	I ++	93	7		
G117		++		E (+)		35	++	+++	++		96	4		
G118	++	+++				59	+++	+	++	I +	93	7	66	3
G119	++	+++	+		Parasitxenom +	48	++++	++	++	I ++	100	0		
G120		+	(+)			16	+	+++	+++	I +++	96	4	62	
G121		++				56	+++	+	+	T ++++	93	7		
G122		+	(+)			43	+++	+	+	I +	89	11		2
G123	++	+++	+		Mikrosporidier +++	3	+++	+	++		96	4		
G124	++	+	+++		Mikrosporidier ++++	2	++	+	++		90	10		
G125		++	(+)		Parasitxenom +	5	++	++	++		94	6		
G126	++	+	+		Parasitxenom +	0	+++	++	++		80	20		
G127	+		+		Mikrosporidier ++	18	++++	++	++		84	16	4	2
G128	(+)		+++		Mikrosporidier +	17	+++	+	+++				Blodutstryk saknades	
G129		+	+		Parasitxenom ++	7	+++	++	++	I ++, T (+)	91	9	1	
G131	+		+	V +++		11		+	++		82	18		
G132	+	+	++		Parasitxenom +	27		++	++		89	11		
G133	++		++		Mikrosporidier +	32		+	+++		96	4		
G134	++	+	+			36	+		+	I +	75	25		3
G135	+		+		Parasitxenom +	3		+	++	I ++++	86	12		2

^a Epiteliocystis; ^b jätteceller, förekommer vid herpesvirusinfektion; ^c % av 100 räknade vita blodkroppar, kolumnen monocyter inkluderar även makrofager;

^d % av 100 räknade röda blodkroppar

DISKUSSION

Inte bara tiden från exponering, utan även vattentemperaturen påverkar den hastighet vävnadsskador läker av hos fisk. Detta beror på att fiskens kroppstemperatur är densamma som vattnets. Vid vintertemperaturer (runt 0 - 5°C) är fiskens metabolism mycket låg och immunförsvaret nedgraderat, medan temperaturer runt 20°C innebär en för många arter i våra svenska vatten maximal metabolism med snabba immunreaktioner. Vattentemperatur från området (Data från SMHI, <https://sharkweb.smhi.se/hamta-data/>) har hämtats för området. Mätdata finns för den 18 september och den 21 oktober. Den 18 september var vattentemperaturen ca 17°C vid ytan och ca 8°C på 80 meters djup, med ett köldstråk på 5.5°C vid 40 meters djup på station BY4, mellan läckorna och Bornholm. Den 21 oktober finns data från 30 NE Frederiksö, den position som anges för drag 232. Där var då yttemperaturen ca 13.5°C och temperaturen på 70 m djup ca 7.8°C. Temperaturen har därmed varit relativt låg, vilket innebär att det sannolikt är ett par dagars fördröjning i tid från exponering till att skador börjar läka av, jämfört med de standardtider som anges för ca 20°C (Ferguson, 2006). Då BIAS-provtagningen genomfördes två och en halv till tre veckor efter sabotaget och läckan hade upphört en och en halv till två veckor innan provtagningen är det relevant att leta efter subakuta till tidiga kroniska förändringar i organen.

Exoftalmi är en klassisk förändring vid akut gasblåsesjuka. Förändringarna är vanligt förekommande på fisk som tas upp snabbt från djupt vatten, och motsvarar vår dykarsjuka, dvs gasembolier uppstår i blod och vävnader på grund av gasövermättnad när trycket förändras snabbt (gasen hinner inte ventileras ut). De fall av exoftalmi som noterades här bedöms vara relaterade till fångsten.

Subakuta förändringar (wire-loops) som inte kunde förklaras av uppenbar förekomst av patogener (virus, bakterier eller parasiter) noterades i högre grad på gälarna hos torsk från drag 232 än hos övriga torskar. SVA har tidigare sett förändringen men i mycket låg grad (**Bild 4C**). Många av gälarnas och njurarnas svar på exponering för fysikaliska och kemiska förändringar, toxiner eller patogener är generella. Det innebär att man utifrån förekomst av till exempel akut degeneration av epitelceller på sekundärlamellerna eller ökad mängd slemceller på gälarna inte kan avgöra vad som orsakat ökningen. Wire-looping av kapillärkolumnen beskrivs med en mening i Ferguson (2006) och då kopplat till infektionen BKD som drabbar laxfisk, och sannolikt orsakad av bildningen av antigen-antikroppkomplex. Ursprungsreferensen har inte gått att återfinna, då den inte finns med i texten och inte går att uttyda av kapitlets referenslista. Det har inte heller gått att hitta andra beskrivningar av denna förändring som följd av infektiösa tillstånd. Syrebrist som inte är direkt dödande orsakar en relativ tillväxt av sekundärlamellerna, genom den interlamellära vävnaden minskar i omfattning för att öka den syreupptagande ytan på sekundärlamellerna (Sollid et al., 2003). Experiment med syrebrist har visat att sekundärlamellerna också kurvar sig för att öka ytan för syreupptag (Bagherzadeh Lakani et al., 2013; Li et al., 2022). Wire-looping till den grad att lamellerna packas och epitelet minskar i yta, vilket noterades här, åstadkommer motsatt effekt då ytan som kan ta upp

syre minskas. S-liknande kurvning noterades hos många fiskar men noterades inte som en förändring såvida det inte övergått i någon grad av packning.

Det kan inte uteslutas att syrebrist är orsak till de förändringar som observerades i det undersökta materialet och att sekundärlamellerna hos vissa fiskar kurvats så hårt att sammansmältningar i stället har skett. Det kan inte säkerställas att förändringarna orsakats av att metan trängt undan syre i vattnet, men det kan inte heller uteslutas. Östersjön har ett antal syrefattiga områden, och förändringarna kan vara orsakade av en allmänt syrefattig miljö. Något som talar för detta är att torskar utanför området uppvisade liknande förändringar och att det också i låg grad noterades även 2018.

Den akuta vävnadsdegeneration som observerades i njuren är relativt ospecifik, det vill säga den kan orsakas av syrebrist eller olika giftiga substanser, t ex algtoxiner och uppstår inom timmar till dagar efter att fisken exponerats, beroende på exponeringens omfattning i tid och koncentration. Förändringarna bör därmed inte vara relaterade till Nord Stream-läckorna även om gälförändringarna skulle vara det. Enligt SMHI:s algrapport för oktober -22 ([algsit22_10.pdf \(smhi.se\)](#)) förekom ett antal olika fytoplankton vid mätstation BY5, strax söder om drag 232 vid mätningen 21 oktober, dvs cirka en vecka efter BIAS. Ingen av de detekterade arterna var dock potentiellt giftig. I rapporten för september ([algsit22_9.pdf \(smhi.se\)](#)) noteras dock hög förekomst av den potentiellt giftiga arten *Prorocentrum cordatum* samt viss förekomst av ytterligare två potentiellt giftiga arter vid mätningen den 18 september. Det är därför inte omöjligt att giftiga fytoplankton funnits i området under veckan innan provtagningarna, och att algtoxiner orsakat njurskadorna.

Njurens nefron har en bra läkförmåga. Så länge membranet som tubulicellerna fäster till är intakt kan nya epitelceller börja bildas inom 1 - 2 veckor beroende på vattentemperatur. Njuren kan också nybilda nefron även hos vuxen fisk, och hög förekomst av nybildade nefron hos vuxen fisk indikerar att njuren varit utsatt för skada. Nybildningen påbörjas runt 2 – 4 veckor efter en skada. Vi noterade en måttlig till kraftig nybildning hos många torskar, men det fanns ingen signifikant skillnad mellan de två grupperna, varför en kraftig nybildning inte kan kopplas till skador orsakade av Nord Stream-läckan. Torskens storlek var relativt liten, men i tidigare provtagning i samma område (SVA 2022) var torsk på ca 400 mm 7 år enligt åldersbestämning (otoliter). Detta innebär att nybildningen i denna undersökning inte torde kunna härledas till att torsken är ung och har en njure under tillväxt.

Viss regeneration av röda blodkroppar noterades, men inte på en sådan nivå att en föregående process med nedbrytning av röda blodkroppar eller annan orsak som kräver ökad blodbildning kan misstänkas. Även den vita blodbildningen bedömdes i stort som normal. Förekomsten av monocyter var högre än vad som anges som standard, men detta noteras även vid provtagningarna BITSQ1 (Östersjön) och IBTSQ3 (Västerhavet) som SVA deltar i. Cytoplasman i torskens och skäddornas vita blodkroppar tar generellt upp mycket färg och det kan därför påverka bedömningen (neutrofiler tar generellt upp extremt lite färg i cytoplasman). Olika färgningar har testats utan annat resultat, och för laxblod

som färgas med samma metodik finns inga problem att identifiera neutrofiler. Två torskhar hade extremt mycket prolymfocyter, vilket indikerar en pågående infektion som kräver antikroppbildning.

Ett drag varade ca 30 minuter, därefter tog det ca 30 min innan trålen var tömd. Fisken skulle därefter sorteras innan fisk för provtagning erhålls och samtliga prover från ett drag togs ut innan de fixerades, då formalinhantering av arbetsmiljöskäl måste genomföras i ett speciellt laboratorium med dragskåp. Det är inte omöjligt att en fördröjd tid från död till fixering av organen lett till att vävnader som är känsliga för syrebrist, börjat degenerera. Tecken på postmortal degeneration sågs i gälarna, där sådana förändringar sätter in redan runt dödsögonblicket.

Det är viktigt att betänka att provtagningarna genomförts ca 7 nautiska mil (ca 13 km) från läckorna. Även om detta inte är något gigantiskt avstånd finns inga belägg för att de provtagna fiskarna befunnit sig närmare läckorna än så under den aktuella tidsperioden. Mätningar av metangasmättnad i vattnet har inte heller kunnat göras då SMHI, som deltog i BIAS, saknade utrustning för detta. Om metangas funnits i vattnet på det avståndet från läckorna är det sannolikt i låga halter, sannolikt så låga att det inte inverkar på fiskens hälsa, vilket är i linje med att inga uppenbara fynd som kan relateras till en påverkan från läckorna kunde påvisas. Fisk som befunnit sig i direkt anslutning till läckan har sannolikt påverkats kraftigt, både av själva detonationen och den gasövermättnad som skapats. Fisk som inte skadats dödligt/allvarligt av tryckvågen har sannolikt flytt från området, då fiskar har ett välutvecklat luktsinne vad gäller gaser. Det är sannolikt att fisk i hunnit påverkas till viss grad även av gasövermättnaden, men radien för en negativ hälsoeffekt på de olika fiskbestånden kan inte utredas fullständigt. På sidan [Gas impact on fish and other marine organisms \(offshore-environment.com\)](http://Gas%20impact%20on%20fish%20and%20other%20marine%20organisms%20(offshore-environment.com)) står att vid studier av gasolyckor i Asovhavet uppmättes metangashalter på 4-6 mg/L i direkt anslutning till läckan, 0.07 – 1.4 mg/L 200 m från läckan och 0.35 mg/L 500 m från läckan i vindriktningen. Ingen nedre gräns för påverkan på högre marina organismer (t.ex. fiskar) anges på denna sida, som är ett utdrag ur boken ”Environmental impact of the Offshore Oil and Gas Industry”, av Stanislav Patin. SVA har inte tillgång till boken och fullständiga referenser anges inte på sidan, varför det inte gått att spåra ursprungsartiklarna.

SLUTSATS

Inga bevisat negativa hälsoeffekter kopplade till gasläckorna på Nord Stream 1 och 2 har påvisats i de provtagna fiskarna. För att bedöma om de förändringar som noterades på gäle är orsakade av läckorna eller en potentiell infektion, samt för att undersöka eventuella långsiktiga effekter av gäl- och njurförändringarna bedömer SVA att vi behöver följa upp torskarnas hälsa med avseende på gäle och njure under SVA:s standardiserade provtagning av torsk (BITSQ1, IBTSQ3) åtminstone under 2023.

REFERENSER

Bagherzadeh Lakani, F., Sattari, M., Sharifpour, I., Kazemi, R. (2013). Effect of hypoxia, normoxia and hyperoxia conditions on gill histopathology in two weight groups of beluga (*Huso huso*). *Caspian J Environ Sci* 11: 77-84

Ferguson (ed)., 2006. Systemic pathology of fish, Second edition, Scotian Press, London, UK

Li, X., Ling, C., Wang, Q., Feng, C., Luo, X., Sha, H., He, G., Zou, G., Liang, H. (2022). Hypoxia Stress Induces Tissue Damage, Immune Defense, and Oxygen Transport Change in Gill of Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*):

Evaluation on Hypoxia by Using Transcriptomics. *Front Mar Sci, Sec. Global Change and the Future Ocean* 9: DOI: [10.3389/fmars.2022.900200](https://doi.org/10.3389/fmars.2022.900200)

Sollid, J., De Angelis, P.M., Gundersen, K., Nilsson, G.E. (2003). Hypoxia Induces Adaptive and Reversible Gross Morphological Changes in Crucian Carp Gills. *J Exp Biol* 206: 3667-73

SVA, 2021. Hälsoövervakning av vildlevande fisk, kräftdjur och blötdjur 2021, Rapport till Havs-och vattenmyndigheten [Rapport: Hälsoövervakning av vildlevande fisk, kräftdjur och blötdjur 2020 - SVA](#)

SVA, 2022. Hälsoövervakning av vildlevande fisk, kräftdjur och blötdjur 2021, Rapport till Havs-och vattenmyndigheten [Rapport: Hälsoövervakning av vildlevande fisk, kräftdjur och blötdjur 2021 - SVA](#)