



Titel: Miljøfarlige forurenende stoffer i fisk i søer – prøveindsamling.			
Dokumenttype: Teknisk anvisning	TA. nr.: S09	Version: 3	Oprettet: 07.09.2011
Forfattere: Liselotte Sander Johansson Peter Wiberg-Larsen Fagdatacenter for Ferskvand Institut for Bioscience	Gyldig fra: 07.09.2011		
	Sider: 15		
	Sidst ændret: 13.07.2018		
TA henvisninger http://bios.au.dk/raadgivning/fagdatacentre/fdcfersk/	TA S05 – Fiskeundersøgelser i søer dTA 04 - Biologisk effektmonitoring i fisk og muslinger, impo- og intersex i snegle samt miljøfarlige stoffer i biota –fisk og muslinger- og i marint sediment		

Indhold

Indhold.....	1
1 Indledning.....	2
2 Metode.....	3
2.1 Tid, sted og periode.....	3
2.2 Udstyr.....	3
2.3 Procedure.....	3
2.3.1 Indsamling og bearbejdning i felten.....	3
2.3.2 Ved fangst af udelukkende hundestejler eller andre meget små fisk.....	4
2.3.3 Opbevaring af prøver.....	4
2.3.4 Dissektion.....	4
3 Databehandling.....	5
4 Kvalitetssikring.....	6
5 Referencer.....	7
6 Bilag.....	8
Bilag 6.1 Følgeskema til analyse for MFS i fisk i søer.....	9
Bilag 6.2 Behandling/dissektion af fisk til analyse for indhold af miljøfarlige forurenende stoffer samt lipid- og tørstofindhold.....	10
Bilag 6.3 Prioriteringsnøgle til udvælgelse af fisk til analyse af MFS	13
7 Oversigt over versionsændringer.....	14

1 Indledning

Denne tekniske anvisning har til formål at bidrage til undersøgelse af forekomsten af miljøfarlige forurenende stoffer (grupperne dioxiner og furaner, perflourerede forbindelser, samt stofferne heptachlor, heptachlorepoxyd og kviksølv) i fisk i søer. Der beskrives, hvordan fiskene udvælges til analyse, samt hvordan prøverne skal håndteres fra prøveindsamling til analyse på laboratoriet.

De miljøfarlige forurenende stoffer (MFS) forekommer både i vand, sediment og biota og kan i høje koncentrationer have betydeligt negativ effekt på organismene i søer.

2 Metode

2.1 Tid, sted og periode

Prøveindsamlingen foretages i perioden 15. august til 15. september i forbindelse med allerede planlagte fiskeundersøgelser (se Teknisk Anvisning nr. S05). I enkelte tilfælde foretages der ikke fiskeundersøgelse i søer, hvor MFS undersøges. Se afsnit 2.3.1.

2.2 Udstyr

Se Teknisk Anvisning nr. S05 for udstyr til fiskeundersøgelser. Derudover medbringes:

- Rilsanposer til opbevaring af fiskene i fryser. Hvis der *kun* skal analyseres for kviksølv kan der anvendes almindelige plastikfryseposer
- Mærkater til hver pose
- Køletaske med frosne køleelementer

2.3 Procedure

Proceduren omfatter indsamling af prøver og behandling af prøver inden hjemtransport. Der skal foretages analyse i en puljet prøve bestående af lever- (perfluorerede forbindelser) eller muskelvæv fra mindst fem fisk inden for samme art og størrelsesgruppe. Hvis prøven består af meget små fisk (f.eks. hundestejler eller smelt) skal der anvendes flere fisk til analyse (se afsnit 2.3.3). **OBS** – antallet af fisk er vejledende. Af hensyn til repræsentativiteten skal der til den puljede prøve så vidt som overhovedet muligt indsamles fem fisk, men i alle tilfælde skal det efter aftale med laboratoriet vurderes, om der opnås tilstrækkeligt materiale (muskelvæv og lever) til analyse af alle stofferne. I tilfælde, hvor der *kun* findes mindre individer end den angivne størrelsesgruppe kan det derfor være nødvendigt at indsamle mere end fem fisk. Der henvises til bilag 6.3, hvor prioriteringen af fisk, der skal indsamles, er beskrevet.

2.3.1 Indsamling og bearbejdning i felten

Fiskene indsamles ved fiskeundersøgelser, der er beskrevet i Teknisk Anvisning nr. S05. Det kan i sjældne tilfælde forekomme, at der skal analyseres for MFS i fisk i søer, hvor der ikke foretages fiskeundersøgelser. Her må man vha. elektrofiskeri, fiskeri på stang, udsætning af enkelte net og/eller ruser eller andet forsøge at fremskaffe de fornødne fisk til analyse. Indsamling af fisk til analyse for MFS foretages før de øvrige registreringer i fiskeundersøgelsen, således at disse fisk kan komme på køl hurtigst muligt.

Der anvendes kun intakte fisk. I alle tilfælde skal rygmuskulaturen og de indre organer være uskadede. Hvis fiskene ikke er døde ved røgtningen af garnet, aflives de umiddelbart efter fangst (ved slag i hovedet med totenschläger el.lign. eller ved at brække hovedet bagover så rygsøjlen brydes).

Til analyserne anvendes så vidt muligt kun aborre i størrelsen 20-25 cm. Kun i nødstilfælde anvendes mindre eller større individer eller andre arter. Se bilag 6.3. Aborren findes i de fleste danske søer og optræder som rovfisk, når den opnår en størrelse af ca. 10-15 cm. I mangel på aborre anvendes der andre rovfisk - gedde eller sandart. Hvis der ikke findes rovfisk i fangsten, kan der vælges andre arter i følgende prioriteringsrækkefølge: skalle>rudskalle>hundestejle>smelt. I brakke søer prioriteres skrubbe, hvis den forekommer i mindst fem individer og dernæst hundestejle. Hvis der findes aborre vælges altid denne art, uanset størrelse.

Der indsamles fem individer med en forklængde mellem 20 og 25 cm. Hvis der ikke findes tilstrækkeligt med fisk af denne størrelse, vælges de største, inden for samme art, i fangsten. Se bilag 6.3. Hvis hundestejle eller andre fiskearter i samme størrelse anvendes, skal der udtages flere til analyse (se afsnit 2.3.2).

Fiskene lægges enkeltvis (flere, hvis der anvendes hundestejler) i hver sin pose. Art, forklængde og vægt af den enkelte fisk noteres på en mærkat og lægges i posen. Feltskemaet (bilag 6.1) udfyldes.

2.3.2 Ved fangst af udelukkende hundestejler eller andre meget små fisk

I tilfælde af, at der *kun* forekommer hundestejler (eller *kun* små individer af andre arter) på en given lokalitet, indsamles de største individer. Der skal indsamles ca. 100 g som samles i én pose. **OBS** – den endelige mængde skal aftales med analyselaboratoriet, se afsnit 2.3. Feltskemaet (bilag 6.1) udfyldes.

2.3.3 Opbevaring af prøver

De indsamlede fisk opbevares i kølekasse ved 5-10°C under hjemtransport. Ved hjemkomst samles de fem (evt. flere – se bilag 6.3) enkelte poser med fisk i en større pose/ beholder og nedfryses straks til -18°C.

Frosne fisk kan opbevares i op til 1 år ved -18°C.

Fisk afhentes af analyselaboratoriet. Sørg generelt for kortest mulig transporttid og for at isolere transportkassen, således at fiskene ikke kan nå at tø op undervejs.

Analyselaboratoriet skal sørge for, at prøverne bliver analyseret eller kommer på frost straks efter modtagelsen.

2.3.4 Dissektion

Udtagning af muskelprøve og evt. lever til analyse foretages af analyselaboratoriet. Til orientering vedlægges beskrivelse af dissektion, bilag 6.2.

3 Databehandling

3.1 Beregninger

Ingen særlige – ud over analyselaboratoriets beregning af koncentrationer.

3.2 Data og koder

Data indrapporteres i MFSBase og overføres til ODA.

4 Kvalitetssikring

4.1 Kvalitetssikring af metode

Den tekniske anvisning skal nøje følges på alle punkter, herunder hvad angår planlægning af prøveindsamling, udvælgelse af fisk, prøvetagning, prøvehåndtering, transport og opbevaring, prøveforberedelse og -forsendelse.

4.2 Kvalitetssikring af data og dataaflevering

Oplysninger fra følgeskemaet (bilag 6.1) indtastes i et samlet regneark for hele landet. Dette regneark udarbejdes af MST/FKG. FKG foretager en godkendelse/kvalitetssikring af udvalget af fisk og giver derefter besked til enheder og laboratoriet, når fiskene er klar til afhentning.

Analyselaboratoriet er ansvarlig for at levere kvalitetssikrede resultater i overensstemmelse med analyseforskrifter og intern kvalitetskontrol. Men derudover skal rekvirenten kontrollere, at de modtagne resultater er i overensstemmelse med de truffe aftaler om omfang og detektionsgrænser, samt om resultaterne er sandsynlige ud fra kendskabet til lokale forhold og tilsvarende undersøgelser. Se endvidere dT04 – Biologisk effektmonitoring i fisk og muslinger, impo- og intersex i snegle samt miljøfarlige stoffer i biota – fisk og muslinger – og i marint sediment (forventes opdateret i efteråret 2018).

5 Referencer

Ingen

6 Bilag

Bilag 6.1 Følgeskema til analyse af MFS i fisk fra søer.

Bilag 6.2 Behandling/dissektion af fisk til analyse for MFS

Bilag 6.3 Prioriteringsnøgle til udvælgelse af fisk til analyse for MFS

Bilag 6.2 Behandling/dissektion af fisk til analyse for indhold af miljøfarlige forurenende stoffer samt lipid- og tørstofindhold.

Der skal analyseres stoffer inden for grupperne dioxiner og furaner, perfluorerede forbindelser samt stofferne heptachlor, heptachlorepoxyd og kviksølv. Endvidere skal tørstofindholdet og lipidindholdet bestemmes. Der indleveres minimum fem fisk. I nødstilfælde kan det accepteres at aflevere færre – se bilag 6.3. Ved samling af væv fra flere fisk af samme art opnås en puljet prøve, der giver en "middelværdi" af koncentrationen af de enkelte stoffer. Endvidere skal det sikres, at der opnås tilstrækkeligt materiale til analyse af de angivne stoffer. Perfluorerede forbindelser måles i lever; de øvrige stoffer måles i muskelvæv. OBS – laboratoriet skal oplyse, hvor mange fisk/hvor meget materiale (muskelvæv og/eller lever), der skal bruges til analyse af alle stofferne.

Fiskene dissekeres i delvist frossen (ikke fuld optøet) tilstand. Dels er dissektionen nemmere, dels undgås det, at indre organer (fx lever, galde) går i stykker og begynder at opløses, hvilket kan kontaminere muskelvævet og påvirke analysen.

Dissektion af lever (hvis perfluorerede forbindelser skal måles)

Først udtages leveren fra hver af de indleverede fisk. Ved dissektion af leveren skal man sikre sig, at den ikke kontamineres af andre organer som f.eks. galden, der kan indeholde højere koncentrationer af visse stoffer. Fiskens åbnes ved at klippe op fra gattet til munden langs bugens midtlinje og derefter klippe lodret op langs gællelåget (ikke for dybt – kun skindet) og åbne ind til organpakken ved at trække skindflappen op mod ryggen. Leveren sidder forrest i bughulen (bag hjertehulen). Hvis galdeblæren sprænges, må fisken kasseres. Den samlede/puljede prøve af lever *fra samme art* og fra samme station samles og homogeniseres. Der udtages to delprøver, en til tørstofbestemmelse (evt. ved frysetørring) og en til nedfrysning og senere analyse af lipid. Den resterende samleprøve anvendes til perfluorerede forbindelser og opbevares enten frossen eller frysetørret, alt efter hvad laboratoriets målinger af disse forbindelser kræver.

Udtagning af muskelprøve

Så vidt som overhovedet muligt må der ikke anvendes fisk under 15 cm, og for aborre, skrubber og ålekvabber er mindstemålet 18 cm. Se den tekniske anvisning for ønskede størrelser for de enkelte arter. Fisk under mindstemålene må ikke iblandes puljede prøver, men kan evt. analyseres for enkelte aftalte stoffer, hvis der ikke er nok prøvemateriale på en station i de ønskede størrelsesintervaller. Dette skal i givet fald aftales med Miljøstyrelsen, før analyserne påbegyndes.

Udtag prøve (minimum 20 g fra hver fisk, men afhænger af laboratoriet) af væv fra højre (fisken vendes med ryggen opad og hovedet fremad) rygmu-

skel, umiddelbart under den første rygfinne. Sørg så vidt muligt for at udtage vævet fra samme del af rygmusklen på hver af de enkelte fisk. Dette sikrer optimal ensartethed, idet vand- og fedtindhold kan variere signifikant i forskellige dele af muskelvævet, og derved indvirke på koncentrationen af de stoffer, som ønskes målt. Undgå at få overhud eller subkutant fedt med i prøven (OSPAR 2012, HELCOM 2017), da koncentrationen i dette kan afvige fra det i muskelvævet. Prøven udtages derfor under den mørkfarvede, ydre del af musklen. Hvis der ikke er nok muskelvæv på højre side kan venstre side også udtages; dette noteres for prøven.

Muskelvæv fra de indleverede fisk samles til en samleprøve til analyse af kviksølv og, fra og med 2019, af dioxiner og furaner samt stofferne heptachlor og heptachlorepoxyd. Samleprøven homogeniseres og der fratages en delprøve til bestemmelse af tørstof. Fra og med 2019 nedfryses en delprøve til lipidbestemmelse. Resten fryses eller frysetørres – se nedenfor - og anvendes til analyser for de miljøfarlige stoffer. Samleprøven kan med fordel uddeles i beholdere særskilt rengjort for de enkelte analyseparametre inden nedfrysning eller frysetørring, efter hvad laboratoriets metoder for de enkelte analyser foreskriver.

Undgå kontaminering af vævsprøverne

Det er vigtigt, at dissektionen foregår under så rene forhold som muligt for at undgå en kontaminering af prøven – helst i en såkaldt ren bænk (laminar flow bænk), hvor luften filtreres for partikler gennem et filter. Arbejdet bør derfor udføres i det laboratorium, der skal udføre analysen.

Brug en ren rustfri stål skalpel og farveløse pincetter af polyætylen eller teflon. Bær talkumfri handsker (fordi talkum kan indeholde metaller), brug fx. nitril handsker fra AnsellEdmont.

Skyl skalpellen/pincetten mellem hver prøve således: Vask i acetone eller alkohol og skyl efter med demineraliseret vand (Milli-Q vand eller af tilsvarende kvalitet).

Nye instrumenter af rustfrit stål kan være overtrukket med et limlag. For at fjerne dette skal de derfor behandles enten i en varmeovn ved 460°C nogle timer eller ved 250 °C i 24 timer. Hvis dette ikke er muligt, rengøres instrumentet omhyggeligt med opvaskemiddel, hvorefter det skylles i rigeligt demineraliseret vand (Milli-Q vand eller af tilsvarende kvalitet). Det anbefales at anvende sterile skalpeller, da de er pakkede enkeltvis uden lim.

Analyse på hele små fisk (hundestejler m.v. under 10 cm)

Fisken aftørres eller skylles med milliQ vand for at sikre, at der ikke er støv på den hele fisk før homogenisering. Selve homogeniseringen foretages i blender eller med "ultrathorax" før frysetørring. Der kan evt. udføres kuglemølle formaling efter frysetørring af den hele fisk for at rehomogenisere før prøveudtagning til analyse.

Opbevaring af prøver inden analyse

De dissekerede prøver eller hele fisk skal opbevares mørkt og dybfrosne (-20°C) eller frysetørrede i rilsanposer (til kviksølvanalyse kan plastikposer anvendes). Prøver til kviksølvanalyse kan opbevares dybfrosne i op til et år.

Referencer

OSPAR Commission 2012: JAMP Guidelines for Monitoring Contaminants in Biota. Update 2010. Revision 2012

<https://www.ospar.org/documents?d=32414>

HELCOM 2017. COMBINE Manual, part D Programme for monitoring of contaminants and their effects. <http://www.helcom.fi/action-areas/monitoring-and-assessment/manuals-and-guidelines/combine-manual>

Bilag 6.3 Prioriteringsnøgle til udvælgelse af fisk til analyse af MFS

Bilag til TAS09 Miljøfarlige forurenende stoffer i fisk i søer – prøveindsamling

Forklaring til tekst i nøglen:

"Mindst" betyder, at der iflg. laboratoriets anvisninger skal opnås *tilstrækkeligt* materiale til at der kan foretages analyser på alle stoffer.

"Tilstrækkeligt" betyder i forhold til laboratoriets anbefalinger.

"Supplerende prøve": Ud over anvisningen i nøglen foretages der efter bedste evne et udvalg af fisk, bestående af en af de i nøglen lavere prioriterede arter og/eller størrelser, således at der, hvis overhovedet muligt altid leveres en pulje med *tilstrækkeligt* materiale. Den *supplerende prøve* skal bestå af fisk af samme art og med så ensartet størrelse så muligt, så tæt på de 20-25 cm som muligt. I forbindelse med kvalitetssikringen (se afsnit 4.2) afgør FKG, hvilke fisk, der skal sendes til analyse.

	Findes der			Valg	
1	Aborrer, <i>mindst</i> 5 individer på 20-25 cm	ja		<i>Mindst</i> 5 aborrer i intervallet 20-25 cm	
		nej		Gå til 2	
2	Aborrer, <i>mindst</i> 5 individer >15 cm	ja		<i>Mindst</i> 5 aborrer >15 cm, så tæt på intervallet 20-25 cm som muligt.	
		nej	Findes der 1-4 aborrer >15 cm	ja	De tilstedeværende aborrer > 15 cm, uanset størrelse og antal samt en <i>supplerende prøve</i> .
				nej	Gå til 3
3	Aborrer <15 cm i <i>tilstrækkeligt</i> antal	ja		Et antal, så der opnås <i>tilstrækkeligt</i> materiale til analyse samt en <i>supplerende prøve</i> .	
		nej	Findes der aborrer	ja	De tilstedeværende aborrer samt en <i>supplerende prøve</i> .
				nej	Gå til 4
4	Anden rovfiskeart (enten gedde sandart eller ål), <i>mindst</i> 5 individer på 20-25 cm	ja		<i>Mindst</i> 5 individer af samme art i intervallet 20-25 cm	
		nej		Gå til 5	
5	Enten gedde, sandart eller ål, <i>mindst</i> 5 individer >15 cm	ja		<i>Mindst</i> 5 individer af samme art >15 cm, så tæt på intervallet 20-25 cm som muligt.	
		nej	Findes der 1-4 individer af enten gedde, sandart eller ål >15 cm	ja	De tilstedeværende individer > 15 cm af samme art, uanset størrelse og antal samt en <i>supplerende prøve</i> .
				nej	Gå til 6
6	Enten gedde, sandart eller ål <15 cm i <i>tilstrækkeligt</i> antal	ja		Et antal, så der opnås <i>tilstrækkeligt</i> materiale til analyse samt en <i>supplerende prøve</i> .	
		nej	Findes der gedde/sandart/ ål?	ja	De tilstedeværende individer af den mest forekommende rovfisk, bland ikke arter, samt en <i>supplerende prøve</i> .
				nej	Gå til 7
7	Enten skalle eller rudskalle, <i>mindst</i> 5 individer på 20-25 cm	ja		<i>Mindst</i> 5 individer af samme art i intervallet 20-25 cm	
		nej		Gå til 8	
8	Enten skalle eller rudskalle, <i>mindst</i> 5 individer >15 cm	ja		<i>Mindst</i> 5 individer af samme art >15 cm, så tæt på intervallet 20-25 cm som muligt.	
		nej	Findes der 1-4 individer af enten skalle eller rudskalle >15 cm	ja	De tilstedeværende individer > 15 cm af samme art, uanset størrelse og antal samt en <i>supplerende prøve</i> .
				nej	Gå til 9
9	Enten skalle eller rudskalle <15 cm i <i>tilstrækkeligt</i> antal	ja		Et antal, så der opnås <i>tilstrækkeligt</i> materiale til analyse samt en <i>supplerende prøve</i> .	
		nej	Findes der skalle/rudskalle?	ja	De tilstedeværende individer af den mest forekommende art, bland ikke arter samt en <i>supplerende prøve</i> .
				nej	Gå til 10
10	Skrubber, <i>mindst</i> 5 individer på 20-25 cm	ja		<i>Mindst</i> 5 skrubber i intervallet 20-25 cm	
		nej		Gå til 11	
11	Skrubber, <i>mindst</i> 5 individer >15 cm	ja		<i>Mindst</i> 5 skrubber >15 cm, så tæt på intervallet 20-25 cm som muligt.	
		nej	Findes der 1-4 skrubber >15 cm	ja	De tilstedeværende skrubber > 15 cm, uanset størrelse og antal samt en <i>supplerende prøve</i> .
				nej	Gå til 12
12	Skrubber <15 cm i <i>tilstrækkeligt</i> antal	ja		Et antal, så der opnås <i>tilstrækkeligt</i> materiale til analyse samt en <i>supplerende prøve</i> .	
		nej	Findes der skrubber	ja	De tilstedeværende skrubber samt en <i>supplerende prøve</i> .
				nej	Gå til 13
13	Hundestejler, <i>mindst</i> 100 g	Ja		<i>Mindst</i> 100 g hundestejler	
		Nej		De tilstedeværende hundestejler	

7 Oversigt over versionsændringer

Version	Dato	Emne:	Ændring:
1	07.09.2011		Ingen
2	09.06.2017	Puljing af prøver, afsnit 2.3	Det er beskrevet, at muskelvæv fra fire individer samt en puljet prøve af disse fire prøver skal analyseres, i alt fem prøver.
		Valg af fiskeart til analyse, afsnit. 2.3.1	Beskrivelsen af, hvilke fisk, der skal vælges, hvis der ikke findes aborre i 20-25 cm størrelse er tydeliggjort. Skrubbe er tilføjet som mulighed i brakke søer
		Antal fisk til analyse, afsnit 2.3.1	Antallet af fisk, der skal sendes til analyse er nedsat fra fem til fire, se ovenfor.
		Kvalitetssikring, afsnit 4.2	Henvisning til DT04 er tilføjet
		Dissektion, bilag 6.2	Nyt bilag, som beskriver metode til udtagning af muskelprøve er tilføjet.
3	13.07.2018	Udvidelse af analysepakke	Ud over kviksølv skal der fra 2019 analyseres for stoffer indenfor grupperne dioxiner og furaner, perflourerede forbindelser samt stofferne heptachlor, heptachlorepoxyd analyseres. Rettelser i henhold til dette er foretaget.
		Indsamling	Fra 2018 skal der ikke foretages analyser på individuelle fisk. Kun på puljede prøver. Rettelser i henhold til dette er foretaget.
		Valg af fisk	Der er udarbejdet en prioriteringsnøgle til udvælgelse af fisk (bilag 6.3)

Version	Dato	Emne:	Ændring:
3		Kvalitetssikring	Oplysninger fra følgeskemaet skal af hver enhed indtastes i et fælles regneark. Inden prøverne afhentes af analyselaboratoriet foretager FKG en godkendelse/kvalitetssikring af det samlede udvalg af fisk.
		Dissektion, bilag 6.2	Perflourerede stoffer skal analyseres i lever fra 2019, Bilaget er opdateret i henhold til dette og der er foretaget en generel opdatering.