



Titel: Miljøfarlige stoffer i muslinger			
Dokumenttype: Teknisk anvisning	TA nr.: M22	Version: 2	Oprettet: 21.05.2013
Forfatter: Martin M. Larsen	Gyldig fra: 21.05.2013		
	Sider: 13		
	Sidst ændret: 12.10.2017		
TA henvisninger	M25 – M28		

## Indhold

1 Indledning.....	1
2 Metode .....	2
2.1 Tid, sted og periode.....	2
2.2 Udstyr .....	3
2.3 Procedure .....	3
2.3.1 Depurering (udsanding) .....	4
2.3.2 Måling af skallængden .....	5
2.3.3 Dissektion og vejning.....	5
2.3.4 Opbevaring og transport af dissekeret materiale .....	6
2.4 Tjekliste .....	7
2.5 Vedligehold af instrumenter .....	7
2.6 Særlige forholdsregler - faldgruber.....	7
3 Databehandling .....	8
4 Kvalitetssikring .....	9
4.1 Kvalitetssikring af metode .....	9
4.2 Kvalitetssikring af data og dataaflevering .....	9
5 Referencer .....	10
6 Bilag .....	12
6.1 Relaterede TA'er .....	12
7 Oversigt over versionsændringer.....	13

## **1 Indledning**

Denne tekniske anvisning er udarbejdet for at sikre sammenlignelighed af målinger udført med det formål at undersøge forekomsten af miljøfarlige stoffer generelt i det marine miljø. Den beskriver prøveindsamling til analyse af miljøfarlige stoffer i bentiske organismer (muslinger).

Muslinger indsamles i specielt udvalgte områder. Biologiske variable (længde, vægt, etc.), som kan være af betydning ved en senere bedømmelse af resultatet, måles og noteres. Prøven dissekeres, det specifikke organ forbehandles og opløses, og koncentrationen af miljøfarlige stoffer bestemmes (kvantificeres).

## 2 Metode

### 2.1 Tid, sted og periode

Muslinger indsamles i perioden 1. september - 30. november iht. HELCOM- og OSPAR-anbefalinger.

Den samme art skal bruges hvert år i det samme område, se også *tabel 1*. Det tilstræbes, at der anvendes blåmuslinger, da der er forskelle på akkumulationen af stoffer i de enkelte arter, som gør tolkning af data vanskeligere efterfølgende. Der udarbejdes hvert år en MFS-programoversigt med stationer til årets MFS-program. Hvis det allerede ved udarbejdelsen af programoversigten vides, at der ikke findes blåmuslinger, angives den art, der skal indsamles (fx sandmuslinger i Ringkøbing Fjord). Med den valgte størrelse angivet i *tabel 1* vil de indsamlede muslinger normalt være 1-2 år gamle, men der kan være store forskelle i tilvæksten afhængig af salinitet og fødetilgængelighed.

Ved hver prøvetagning skal der indsamles så mange levende muslinger (dog mindst 10 stk.), at det til én delprøve er muligt at dissekere ca. 100 g hele bløddele fra de indsamlede muslinger, svarende til ca. 300 g levende muslinger.

Der udtages 1 delprøve på de fleste stationer, og 1-3 delprøver på stationer, der anvendes til tidstrendanalyser (antal fremgår af det årlige prøvetagningsprogram).

**Tabel 1** Arter og antal delprøver pr. station.

Art	Antal delprøver	Størrelse
<i>Mytilus edulis</i> (blåmusling)	1-3 delprøver pr. station (se årets MFS-programoversigt)	30-50 mm <sup>1)</sup>
<i>Limecola balthica</i> (østersømusling) <sup>2)</sup>	1 delprøve pr. station (se årets MFS-programoversigt)	20-35 mm <sup>1)</sup>
<i>Mya arenaria</i> (sandmusling) <sup>3)</sup>	1-3 delprøver pr. station (se årets MFS-programoversigt)	min. 20 mm

<sup>1)</sup> Optimal størrelse. Hvis der kun findes større muslinger (fx i områder med søstjerner) tages disse. I nogle områder med lav salinitet kan det være svært at finde muslinger i den angivne størrelse, her tages muslinger ned til 20 mm, men der skal så indsamles op til 500 for at få tilstrækkeligt prøvemateriale.

<sup>2)</sup> For Østersøen (HELCOM) er *Limecola balthica* (tidligere *Macoma balthica*) også en accepteret art, hvis der ikke findes blåmuslinger eller sandmuslinger på en station. I dette tilfælde er anbefalingen fra HELCOM, at prøverne tages i september.

<sup>3)</sup> Indsamles, hvor der ikke forefindes *Mytilus edulis*, fx i Ringkøbing Fjord og nogle steder i Limfjorden. Manglende nyrekruttering af muslinger (specielt i Ringkøbing Fjord) gør det dog svært at holde samme størrelse og alder.

## 2.2 Udstyr

- Muslingeskraber ved indsamling fra skib eller båd, hvis muslinger ikke indsamles af dykker
- Rilsanposer til indsamling af muslinger
- Rilsanposer eller prøvebeholdere fra analyselaboratoriet til de dissekerede muslinger efter homogenisering og uddeling
- Vanddunk til indsamling af vand fra stationen til depurering (10 liter/prøve)
- Helglas-akvarier til depurering
- Temperaturindikator til at sætte direkte på akvarieglaset (for at undgå kontaminering fra et alm. termometer), hvis akvariet ikke er opstillet i temperaturkontrolleret skab/klimarum
- Beluftningsanlæg med filtre
- Rustfri stålskalpel og limfri blade til dissektion til analyse af miljøfarlige stoffer (kan også bruges til tungmetaller, hvis delprøven udtages sammen med de miljøfarlige stoffer)
- Rustfri stålskalpel med titanium eller et keramisk materiale til metalanalyse
- Pincet af rustfrit stål til miljøfarlige stoffer (kan også bruges til tungmetaller, hvis delprøven udtages sammen med de miljøfarlige stoffer)
- Evt. farveløse pincetter af polyætylen eller teflon til tungmetaller
- Talkumfri handsker (pulverfri nitrilhandsker)
- Laminar flow-bænk eller grundigt rengjort særskilt lokale
- Filtreringsudstyr til havvand, herunder glødet CF/G filter
- Fryser (-18 °C) til opbevaring af dissekerede muslingebløddede.

## 2.3 Procedure

Muslingerne indsamles med muslingeskraber eller ved dykker og med hånden ved lavvande på vadeflader eller under 1 m's dybde. Muslingerne sorteres i passende længdeintervaller på stationen.

Ved placering af stationer skal det overvejes, hvilke kilder der er i nærheden, og om stationen skal anvendes til generel vurdering af vandområdet eller en specifik forureningskilde. Prøver tæt på kysten kan være påvirket af vandløb og afstrømning fra marker, hvilket skal tages med i vurderingen af resultaterne. Til gennemgang af potentielle kilder kan fx anvendes Sanitary surveys, der dog især er møntet på mikrobiologisk forurening og derfor beskriver de nærmeste forureningskilder med fokus på *E. coli* i de enkelte områder (se fx Larsen et al 1917a-c).

Hvor det ikke er muligt at finde muslinger inden for det i *tabel 1* angivne størrelsesinterval, indsamles muslingerne så tæt som muligt på dette interval. Muslingerne skal dog være mindst 20 mm (ca. en fingerbredde), da mindre muslinger giver <0,1 g kød og derfor vil kræve for mange muslinger til at være praktiske at dissekere og måle/veje.

Muslingerne lægges i rilsanposer og holdes fugtige med en vædet klud eller tang fra lokaliteten.

Muslingerne skal være laboratoriet i hænde senest 24 timer efter, at de er indsamlet. Transporttemperaturen må ikke overstige 15 °C (anvend fx køle taske med frostelementer). Muslingerne kan opbevares op til 48 timer forudsat, at de anbringes på køl (fx i køleskab ved 3-7 °C) senest 24 timer efter indsamlingen – dvs. i praksis ved ankomsten til laboratoriet. Depureringen skal være startet senest 48 timer efter indsamlingen. Hvis muslingerne har åbnet sig under transport og/eller lugter råddent, skal de kasseres.

Temperaturen i transportkassen skal måles ved ankomsten til laboratoriet, så det kan dokumenteres, at transporttemperaturen på maksimum 15 °C ikke er overskredet. Hvis temperaturen overskrides under transporten, skal muslingerne kasseres. Mindst én gang om året skal transporttemperaturen dokumenteres ved brug af et min./maks. termometer eller termologger, der følger muslingerne i transportkassen.

Bemærk, at en mindre overskridelse af transporttiden kan tillades forudsat, at temperaturen i kølekassen ikke overtiger 15 °C, og transporttiden notes og rapporteres sammen med analyseresultaterne. I dette tilfælde holdes specielt øje med, at muslingerne er lukkede ved ankomst til laboratoriet og åbner sig under depureringen.

Udtag 10 liter vand fra prøvetagningsstationen til depurering/udsanding.

### **2.3.1 Depurering (udsanding)**

- Vandet fra prøvetagningsstationen renses for partikler ved at filtrere det gennem et glødet GF/C-filter eller ved at lade partiklerne sedimentere i prøvetagningsbeholderen og derefter forsigtigt dekantere vandet ned i akvariet.
- Helglasakvariet skylles først med sedimentfrit vand fra prøvetagningsstedet og fyldes derefter med sedimentfrit vand fra samme sted.
- De levende muslinger placeres i helglasakvariet. Hvis de er beskidte, skal de vaskes med vand fra lokaliteten først, så vandet i akvariet ikke fra starten er fyldt med partikler. Hvis muslingerne er meget snavsede, kan de først vaskes under vandhane (demineraliseret vand eller koldt hanevand for at undgå evt. kontaminering fra varmtvandsanlægget) og så skylles med vand fra lokaliteten, så længe muslingerne holder sig lukkede, mens de skylles under vandhanen.
- Muslingerne skal blive i akvariet i ca. 20 timer ved samme temperatur som på prøvetagningsstedet ( $\pm 5$  °C). En temperaturindikator kan sættes på ydersiden af glasset til overvågning af temperaturen, hvis

akvarierne ikke er i temperaturstyrede rum. Den forventede vandtemperatur i oktober er 10-15 °C og i november 5-10 °C, men depurering mellem 5 og 10 °C kan accepteres for hele perioden. Hvis temperaturen er mere end 5 °C lavere end *in situ*-temperaturen kan depureringsperioden evt. udvides til maks. 36 timer for at kompensere for den lavere aktivitet af muslingerne.

- Vandet iltes med luft, der ikke indeholder partikler og olie (dvs. filtret luft fra akvariepumpe eller fra olie-fri kompressor).
- Efter depurering kan muslingerne opbevares i køleskab i ren rilsanpose med en fugtig klud til dagen efter, hvis det ikke er muligt at disseker muslingerne straks.

### 2.3.2 Måling af skallængden

Samtlige muslingers længde (afrundet til hele mm) måles med en skydelære. Længden noteres i en logbog. Længden kan måles før eller efter dissektionen, hvis skallerne er intakte. Skallerne skal gemmes (se nedenfor).

For at kunne beregne konditionsindeks ved den efterfølgende databehandling skal sammenhængende længde, skalvægt og bløddelsvægt bestemmes.

Der findes mange forskellige former for indekser:

- $\frac{\text{vægt}(\text{bløddele})}{\text{vægt}(\text{skal})}$ , som er det simple konditionsindeks
- $\frac{\text{vægt}(\text{skal})}{\text{længde}(\text{skal})}$ , benævnt skalindeks (se TA M28)
- $\frac{\text{vægt}(\text{tørrede bløddele})}{\text{længde}(\text{skal})^3}$ , benævnt konditionsindekset CI (se Dolmer 2013), som indikerer bløddelsvægten i forhold til en repræsentation af skalvolumen.

### 2.3.3 Dissektion og vejning

Inden dissekering vaskes og skylles hænderne omhyggeligt og tørres i et rent håndklæde. Håndlotion må ikke anvendes. Hvis der anvendes handsker, skal det være pulverfrie nitril-handsker.

Prøvehåndteringen og dissekeringen skal udføres i et rent lokale egnet til formålet. Hvis der findes forhøjede koncentrationer, der tilskrives dissektionen, skal dissektionen udføres i en såkaldt ren bænk (laminar flow-bænk), hvor luften filtreres for partikler gennem et filter. Renheden af lokalet kan dokumenteres med en partikeltæller (<10.000 partikler større end 1 µm/m<sup>3</sup>, svarende til ISO 6 eller klasse 1000 rent rum) eller ved at suge luft igennem et rent filter under en dissektionsseance og analysere filtret som blindprøve

sammen med analyseserien. Det anbefales, at kontrollere renheden før eller sammen med første hold prøver hvert år.

Muslinger åbnes levende med så lidt skade som muligt på bløddelene. Dette gøres ved at løsgøre adduktormusklen fra indersiden ved at vride den øvre og nedre skaldel fra hinanden med tommel- og pegefinger, og indføre skalpellen forsigtigt for at overskæres adduktormuskel. Ved overskæringen af adduktormuskel og den efterfølgende dissekering skal man være opmærksom på ikke at skrabe noget af perlemorslaget af, da dette kan kontaminere prøven.<sup>oo</sup>

Muslingen stilles på højkant og drænes på et rent sugende underlag i ca. 5 minutter.

Muslingen dissekeres derefter så hurtigt som muligt. Hele bløddele til en delprøve puljes i én beholder, og vægten af bløddelen i den enkelte musling registreres ved at veje beholderen løbende med mindst 0,01 grams nøjagtighed. Vægten noteres i en logbog eller elektronisk.

Skallerne tørres, hvorefter de vejes, og vægten (samt længde, hvis ikke målt tidligere) noteres i en logbog.

Skalpellen/pincetten skal skylles mellem hver prøve. Det anbefales at vaske skalpellen/pincetten i acetone eller alkohol og demineraliseret vand.

#### **2.3.4 Opbevaring og transport af dissekeret materiale**

De dissekerede bløddele skal opbevares dybfrosne (-20 °C) eller frysetørrede i hertil velegnede beholdere (se *tabel 2*). Prøver til metal-, dioxin- og organotinanalyser kan opbevares dybfrosne i op til et år og op til to år for metaller, hvis prøverne er frysetørrede.

Prøver til PAH skal dog analyseres så hurtigt som muligt og senest inden 4 måneder.

Prøverne skal transporteres dybfrosne eller frysetørrede. Som ved transport af levende muslinger kan et min./maks.-termometer anvendes – eller bedre en temperaturlogger – til at kontrollere temperaturen under længere transport. Frosne prøver må ikke optøs under transporten, og temperaturen ved ankomst til laboratoriet skal være <-5 °C. Prøver, der er tøet op, kan ikke anvendes.

**Tabel 2** Oversigt over egnede prøvebeholdere til lagring af vævsprøver.

Parameter/stofgrupper	Beholder og låg	Rensningsprocedure
Organiske stoffer (Polyaromatiske kulbrinter (PAH), dioxiner og organotin)	Glas/aluminium Rilsanposer	Beholderen skal vaskes med en detergent, skylles, glødes og straks inden brug skylles med et organisk opløsningsmiddel (fx hexan/acetone). Rilsanposer kan bruges direkte uden rensning.
Metaller	Glas/polyethylen Rilsanposer	Beholderen skal vaskes i 10 % v/v HNO <sub>3</sub> og derefter skylles tre gange med demineraliseret vand. Rilsanposer kan bruges direkte uden rensning.

## 2.4 Tjekliste

- Indsamling af muslinger og vand fra stationen
- Depurering/udsanding
- Dissektion og puljning af muslinger fra station
- Homogenisering før uddeling til analyse (foretages typisk på analyselaboratoriet)

## 2.5 Vedligehold af instrumenter

Akvarier og pumper til depurering rengøres og kontrolleres. Skift blade jævnlige ved dissektion.

## 2.6 Særlige forholdsregler - faldgruber

Under depuration skal man være særlig opmærksom på, at iltningen ikke bidrager med metal-/olieforurening.

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 mindst 2 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. Det anbefales at anvende skalpeller pakket enkeltvis uden lim.



### **3 Databehandling**

For en udførlig beskrivelse af databehandlingen henvises til datateknisk anvistning DT04 - Biologisk effektmonitoring i fisk og muslinger, impo- og intersex i snegle samt miljøfarlige stoffer i biota (fisk og muslinger) og i marint sediment (se [her](#)).

## **4 Kvalitetssikring**

### **4.1 Kvalitetssikring af metode**

Prøvetagning kvalitetssikres ved at udtage dobbelt- eller tredobbeltprøver på hver tidstrendstation.

For sikring af analysekvaliteten deltages i interkalibreringer på internationalt niveau mindst en gang om året (OSPAR anbefaler QUASIMEME (QUAISMEME 2017)), der kører 2 gange om året med relevante prøver af fisk og skaldyr for danske farvande og er akkrediteret.

### **4.2 Kvalitetssikring af data og dataaflevering**

For en udførlig beskrivelse af kvalitetssikringen henvises til bilag til datateknisk anvisning DT04 - Biologisk effektmonitoring i fisk og muslinger, im- og intersex i snegle samt miljøfarlige stoffer i biota (fisk og muslinger) og i marint sediment (se [her](#)).

## 5 Referencer

Bekendtgørelse nr. 900 af 17. august 2011. Bekendtgørelse om kvalitetskrav til miljømålinger.

<https://www.retsinformation.dk/Forms/R0710.aspx?id=138231>

Dolmer P, Christensen HT, Christoffersen MO., Hansen FT., Møhlenberg F, Lisbjerg D, Stage B, Landes A, Nielsen P, Tørring D (2013) Kulturbankeprojekt med udlægning af blåmuslinger produceret på langline.

Charlottenlund: DTU Aqua. Institut for Akvatiske Ressourcer. (DTU Aqua-rapport Nr. 273-2013).

([http://orbit.dtu.dk/files/93520415/273\\_2013\\_Kulturbankeprojekt\\_med\\_udlaegning\\_af\\_blaamuslinger\\_produceret\\_paa\\_langline\\_1.pdf](http://orbit.dtu.dk/files/93520415/273_2013_Kulturbankeprojekt_med_udlaegning_af_blaamuslinger_produceret_paa_langline_1.pdf))

Hedges JI & Stern JH (1984) Carbon and nitrogen determinations of carbonate-containing solids. *Limnology and Oceanography* 29(3):657-663.

HELCOM COMBINE manual 2017

<https://helcom.fi/action-areas/monitoring-and-assessment/monitoring-guidelines/combine-manual/>

Larsen MM, Jakobsen HH, Göke C, Hendriksen NB, Rømer JK, Mohn C & Schultz AC (2017a). Sanitary survey af produktionsområder i Løgstør Bredning. Aarhus Universitet, DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi, 128 s. - Teknisk rapport fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi nr. 99.

(<http://dce2.au.dk/pub/TR99.pdf>)

Larsen MM, Jakobsen HH, Göke C, Hendriksen NB, Rømer JK, Mohn C & Schultz AC (2017b) Sanitary survey rapport 2: Nissum Bredning. Aarhus Universitet, DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi, 112 s. - Teknisk rapport fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi nr. 100.

(<http://dce2.au.dk/pub/TR100.pdf>)

Larsen MM, Jakobsen HH, Göke C, Hendriksen NB, Rømer JK, Mohn C & Schultz AC (2017c). Sanitary survey rapport 3: Venø Bugt, Kås, og Salling. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 138 s. Teknisk rapport fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi nr. 104.

(<http://dce2.au.dk/pub/TR104.pdf>)

Loring DH & Rantala RTT (1992) Manual for the geochemical analyses of marine sediments and suspended particulate matter. *Earth Science Reviews* 32:235-283.

OSPAR (2012) JAMP Guidelines for monitoring contaminants in biota. Update 2010. Revision 2012 (<https://www.ospar.org/convention/agreements>; <https://www.ospar.org/documents?d=32414>).

QUASIMEME (2017) Programme 2017 ([http://www.quasimeme.org/gfx\\_content/documents/Brochure%20quasimeme%202017.pdf](http://www.quasimeme.org/gfx_content/documents/Brochure%20quasimeme%202017.pdf))

Quevauviller P (Ed) (1995) Quality Assurance in Environmental Monitoring: Sampling and Sample Pretreatment. VCH Publishers, Inc., Weinham and New York, 306 pp.

Quevauviller P, Roose P, Vereet G (Eds) (2011) Chemical Marine Monitoring: Policy Framework and Analytical Trends. John Wiley & Sons, Ltd., 466 pp. Chicester/GB

## **6 Bilag**

### **6.1 Relaterede TA'er**

TA M24 Miljøfarlige stoffer i sediment

TA M25 Miljøfarlige stoffer i fisk

## 7 Oversigt over versionsændringer

Version	Dato	Emne	Ændring
2	12.10.2017		Tekstændringer og justeringer i forbindelse med tilpasning til NOVANA-overvågningsprogram.
2	12.10.2017	2.1 Tid, sted og periode	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Periode for indsamling udvidet</li> <li>• <i>Limecola balthica</i> (Østersømusling) – ny brugbar art til undersøgelser</li> <li>• Størrelsesinterval øget</li> <li>• Tabel 1 revideret iht. ovenstående</li> </ul>
2	12.10.2017	2.3 Procedure	Krav til temperatur og tid ved transport/opbevaring af muslinger tilføjet.
2	12.10.2017	2.3.4 Opbevaring og transport af dissekeret materiale	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Revideret mht. relevante stofgrupper</li> <li>• Revideret mht. prøvebeholdere</li> <li>• Tabel 2 revideret iht. ovenstående</li> </ul>
2	12.10.2017	3 Databehandling	Der henvises til datateknisk anvisning DT04.
2	12.10.2017	4.2 Kvalitetssikring af data og dataaflevering	Der henvises til datateknisk anvisning DT04.
2	12.10.2017	Tidligere 6.1 Kodelister	Slettet
2	12.10.2017	6.1 Relaterede TA'er	Tidligere benævnt "6.2".