



Titel: Miljøfarlige stoffer i fisk			
Dokumenttype: Teknisk anvisning	TA nr.: M25	Version: 1	Oprettet: 21.05.2013
Forfattere: Martin M. Larsen	Gyldig fra: 21.05.2013		
	Sider: 15		
	Sidst ændret:		
TA henvisninger	M22 – M26		

0 Indhold

1 Indledning	1
2 Metode	2
2.1 Tid, sted og periode.....	2
2.2 Udstyr	3
2.3 Procedure for indsamling og dissektion af fisk	4
2.3.1 Procedure for indsamling	4
2.3.2 Procedure for dissektion	5
2.3.3 Dissekering af øresten	6
2.3.4 Dissekering af lever.....	7
2.3.4 Dissekering af muskelvæv	7
2.4 Tjekliste	8
2.5 Vedligehold af instrumenter	8
2.6 Særlige forholdsregler - faldgruber	8
3 Databehandling	9
4 Kvalitetssikring	10
4.1 Kvalitetssikring af metode	10
5 Referencer	11
5.1 Anbefalet litteratur	11
6 Bilag	12
6.1 Behandling/dissektion af fisk til analyse for kviksølvindhold	12
6.2 Kodelister	13
6.3 Relaterede referencer	14
7 Oversigt over versionsændringer	15

1 Indledning

Denne tekniske anvisning er udarbejdet for at sikre sammenlignelighed af målinger udført med det formål at undersøge forekomsten af miljøfarlige stoffer i det marine miljø. Den beskriver prøvetagningsstrategi, prøveindsamling og rapportering af data vedrørende miljøfarlige stoffer i fisk og er specielt udarbejdet med henblik på bestemmelse af metaller og organiske stoffer.

Udgået dokument
se nyere version

2 Metode

Se TA M22 for en generel beskrivelse af principperne for biomonitoring.

For fisk anvendes specielt lever og muskelvæv til analyse, idet mange stoffer opkoncentreres i henholdsvis lever og muskelvævet. Leveren fungerer som "reNSEorgan" og tilbageholder de fleste organiske stoffer, men for fx kviksølv ses højere koncentrationer i muskelvævet end i leveren. Valg af organ for de enkelte stofgrupper er baseret på erfaringerne fra OSPAR og HELCOM og på ønsket om at bevare tidsserier.

2.1 Tid, sted og periode

Prøver indsamles i oktober – januar, imens hunfiskene har rogn (skruber/rødspætter) eller unger (ålekvabber).

Prøver kan indsamles med net fra såvel et forsknings/overvågningsskib som et kommercielt skib eller ved brug af en motorjolle og bundgarnsnet eller ruser.

Hvilke fiskearter, som er aktuelle i overvågningsprogrammet, fremgår af Tabel 1. Disse arter er valgt, da de opfylder de basale krav, der er beskrevet ovenfor. På grund af klimatiske forhold kan der ske ændringer i bestandene indenfor programperioden, således at størrelsesintervallet ikke kan overholdes hvert år. Hvis det ikke kan fremskaffes nok prøver underrettes laboratoriet, og det vurderes om detektionsgrænsen kan hæves, eller om der skal skeeres antallet af analyseparametre med det tilgængelige prøvemateriale.

Ålekvabber indsamles efter retningslinjen for biologisk effektmonitoring (TA M26). Der indsamles prøver fra hanner fremfor hunner for at minimere indflydelsen af individvariationerne på analyseresultaterne (Dahllöf & Strand 2010, Larsen & Strand 2011).

Tabel 1 Arter i det marine overvågningsprogram.

Art	Antal#	Størrelse	Alder***	Køn	Vævstype#
Fladfisk:					
Platichthys flesus	min. 20	250-300 mm ##	2-3 år	Hunkøn (foretrækkes)	Muskel og lever
Pleuronectes platessa*	min. 20	250-300 mm	2-3 år	Hunkøn (foretrækkes)	Muskel og lever
Ålekvabbe:					
Zoarces viviparus	min. 25	230-280 mm**	2-3 år	Hunkøn (foretrækkes)	Muskel og lever
#	For fisk analyseres 10 lever og tilhørende muskler for metaller (Hg analyseres i muskel), og 10 lever analyseres for PCB. Øvrige organiske emner analyseres i puljede prøver af filet fra 25 fisk af samme størrelse. Bemærk, at det er nødvendigt at indsamle flere end de nødvendige 20 fisk til analysen, hvis man ikke kan kønsbestemme fisken inden dissektion. Hvis leveren er stor nok til, at alle analyser kan gennemføres i samme lever, er dette at foretrække.				
##	Ca. 150 mm i Vadehave, da man har erfaring for, at kun denne størrelse kan fanges årligt.				
*	Kun på udvalgte stationer/positioner, hvor der findes lange tidsserier.				
**	Se M26 for særlige forhold vedr. Ålekvabber.				
***	Kalenderår, dvs. en fisk født 1. december bliver 1 år 1. januar. Bestemmes ved hjælp af øresten.				

2.2 Udstyr

Til fiskeri anvendes passende fiskeudstyr:

- evt. båd
- Åluser, bundgarn, skrab el. lign.

Bestemmelse af mål og vægt

- målebræt/målebånd, der er kontrolleret til bestemmelse af længde (præcision min. 0,5 cm)
- vægt, der er kontrolleret til bestemmelse af vægt (præcision min. 1 g)

Til dissektion

- knive, skalpeller af rustfrit stål, der ikke giver afsmitning
- laboratorievægt (min. 3 decimaler) til udvejning af individuelle lever-/muskelprøver
- grovvægt (præcision min. 1 g) for vejning af evt. ikke feltvejede fisk

- lineal/målebræt (præcision min. 0,5 cm) for måling af evt. ikke felt-målte fisk

2.3 Procedure for indsamling og dissektion af fisk

2.3.1 Procedure for indsamling

Ved indsamling af prøver skal det i alle tilfælde, hvad enten det er fra skib, jolle, ruse eller net, sikres:

- at prøven ikke bliver udsat for ekstra kontaminering, når den tages om bord eller fjernes fra nettet, fx fra olie på skibsdækket
- at fisk, der er tydeligt syge eller beskadigede, ikke udtages til analyse. De kan fremsendes i separat beholder til laboratoriet med anmærkning "ikke til analyse" for nærmere identifikation af sygdommen.
- at fisken renses med vand fra stedet for at fjerne evt. materiale, der sidder fast på fiskens skind
- at der findes rene = kontaminationsfri beholdere om bord til opbevaring af fisker (fx plast- eller rilsanposer)
- at hver fisk til analyse kommes i hver sin beholder

Prøve/Beholderen skal mærkes på en unik måde, så den nemt kan identificeres senere.

Som minimum skal der registreres følgende oplysninger i en logbog:

- stationsnummer
- position fastlagt med GPS
- prøvetagningsudstyr
- indsamlingsdato
- prøvenummer og type af prøve
- navn på prøvetager

Den pen og eventuelle etiketter, der bruges ved mærkning, skal kunne modstå fugt.

NB! Hvis fisken ikke dissekeres med det samme, skal den vejes til det nærmeste gram og måles til den nærmeste mm, inden den nedfryses. Resultatet skal registreres i en logbog og påføres de individuelle beholdere.

Ikke dissekerede fisk skal opbevares nedfrosne ($< -20\text{ °C}$) indpakket enkeltvis i et velegnet materiale. Velegnet materiale er:

- for organiske analyser: Aluminiumsfolie/stanniol alternativt rilsanposer. Plastmateriel må principielt ikke bruges, uden at det er testet for en evt. kontaminering. Ved anvendelse af stanniol skal den blanke side pakkes ind mod fisken, da den matte side er sprøjtet med anti-statisk middel, der kan kontaminere prøven
- for metalanalyser: Almindelige rene plasticposer inkl. rilsanposer

Fiskene skal fryses ned enkeltvis for at sikre, at nedfrysningen går så hurtigt som muligt. Herved bevares fiskens indre organer mest muligt intakte, samtidig med at man kan bevare sammenhæng mellem analyserne af fisken og dens længde-/vægtmål. Ålekvabber kan dog fryses 5 ad gangen.

De frosne prøver skal opbevares i en større beholder for at undgå, at fisken beskadiges.

Frosne fisk til metal- og organiske analyser kan opbevares i op til 1 år. Fersk fisk skal opbevares og transporteres ved $5-15\text{ °C}$, helst ved $< 10\text{ °C}$. En temperaturdatalogger eller et min./maks. termometer kan bruges til at kontrollere temperaturen under længere transporter.

For ålekvabber udtages fisk typisk samtidig med udførelsen af biologisk effektundersøgelserne, og udvælgelse af stationer og prøvetagningsudstyr følger derfor den tekniske anvisning for disse (TA M26).

2.3.2 Procedure for dissektion

En frosen fisk skal dissekeres, inden den er helt optøet, da dette er betydeligt nemmere, end hvis fisken er helt optøet, og man undgår derved, at indre organer, som fx leveren går i opløsning.

Hvis fisken bræks, kan væske indeholdende kontaminanter sive ud fra fx leveren eller gællen til det omkringliggende væv og herved kompromittere analysen.

Fiskearter, hvor fedtindhold i leveren kan være meget højt, fx torsk, skal dissekeres direkte og ikke først nedfryses, for at undgå at leveren begynder at opløses.

Dissekeringen skal gøres under forhold som beskrevet i den TA M22. Det er specielt vigtigt, at det 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.

Ved dissektion udtages først øresten (for skrubber), derefter indre organer (fx lever), herefter bestemmes køn ved at se efter, om der er sperm ("bukser") eller rogn i bugen, og til sidst udtages muskelprøven, evt. efter aftørring af skællene for rester fra indvoldene.

For at opfylde detektionsgrænserne er der angivet et vejledende minimumskrav til prøvemængder i Tabel 2. Analyselaboratoriet oplyser den nødvendige mængde. Ved homogenisering er der et vist tab (ca. 5 g), som er indregnet i den puljede vægt.

Hvis der for fisk under ca. 10 cm ikke kan påregnes at være nok prøvemateriale efter dissektion, anvendes hele fisk, der homogeniseres. Erfaringen viser, at det er bedst at homogenisere den frosne fisk med ultra-turex eller blender i glas og rustfrit stål, frem for at homogenisere tørrede fisk. Det må forventes, at der er større afvigelser på dobbeltbestemmelserne på hele fisk end ved organer, pga. den større inhomogenitet i udgangspunktet.

Tabel 2 Prøvetagningsmængder og foretrukne organer til forskellige analyser for at opnå NOVANA detektionsgrænser (min. mængde for enkeltbestemmelser i parentes)

Matrix	Lever	Filet
Hg inkl. TS		10g (5g)
Øvrige metaller incl. Cr	10 g (2 g)	
TBT	10 g (2 g)	
PCB inkl. fedt	10 g (5 g)	
BDE	20 g (10 g)*	
Dioxin		50 g (30 g)
PFOS	10 g (5 g)	
Total mængde	65 g (25 g)	100 g (40 g)

*hvor der måles både BDE og PCB, kan denne mængde halveres.

2.3.3 Dissekering af øresten

Fladfisks kalenderalder bestemmes ved, at årringene i fiskens øresten tæles. Ørestenen udtages forsigtigt med en kniv ved at skære ned i en lige linje fra gællerne og skære øregangen over, hvori ørestenene ligger. Ørestenen placeres i en mærket beholder, fx i dertil indrettede papirkuverter eller i en glas- eller plasticbeholder. Det kan være svært at finde ørestenene, ligesom der er en risiko for at skære dem over i forsøget på at lokalisere dem.

2.3.4 Dissekering af lever

Ved dissekering af leveren skal man sikre sig, at den ikke kontamineres af andre organer som fx gallen, der kan indeholde højere koncentrationer af visse stoffer. Hele leveren skal homogeniseres (se næste afsnit), inden eventuelle delprøver kan udtages.

Til metalanalyser kan leveren også frysetørres, inden den homogeniseres (se næste afsnit), og eventuelle delprøver kan udtages.

For skrubber/rødspætter anvendes leveren fra 10 individer til analyser for PCB og klorerede pesticider, og en puljet prøve af 10 lever fra fisk i samme størrelsesinterval analyseres for metaller, BDE og perfluorerede forbindelser. BDE kan eventuelt analyseres i et sammenstik af de 10 individprøver udtaget til PCB. Der udtages så vidt muligt fisk af hunkøn til analyserne for PCB og af samme køn til sammenstikket. Dette kan kræve væsentligt flere end 20 fisk, Hvis der ikke er nok hunner kan nogle af analyserne udføres i en pulje af hanner. Prioriteringen, af hvilke stofgrupper, der i givet fald analyseres i hanner og hunner, foretages på basis af den samlede prøvemængde for hvert køn. Resultaterne afleveres for hvert køn for sig.

For ålekvabber analyseres kun puljede prøver fra mindst 25 hanner, og leverne analyseres for metaller, PCB og andre organoklorforbindelser, bromerede flammehæmmer (BDE) og perfluorerede forbindelser som PFOS. Hvis der ikke er nok hanner, kan nogle af analyserne udføres i en pulje af hunner. Prioriteringen af hvilke stofgrupper, der i givet fald analyseres i hanner og hunner, foretages på basis af den samlede prøvemængde for hvert køn. Resultaterne afleveres for hvert køn for sig.

For de puljede prøver skal der være ca. 25 g lever i alt, som efter homogenisering uddeles med 5 g til hver af analyserne PFOS, TBT og metaller samt 10 g til BDE og lipidanalyse.

2.3.4 Dissekering af muskelvæv

Muskelvæv dissekteres efter Bilag 6.1 til denne tekniske anvisning (fælles for marin og ferskvand). For fisk, hvor der også skal udtages andre organer, udtages muskelvævet efter udtagning af prøver fra de indre organer for at undgå afsmitning til indre organer. Derfor skal det så vidt muligt undgås, at skindet omkring prøvetagningsområdet kommer i kontakt med disse.

2.4 Tjekliste

Udtagning af fisk

- Er der udtaget nok fisk?
- Er fiskene raske at se på (evt. syge fisk anvendes ikke til analyse hvis muligt)?
- Er der tilstrækkeligt med fisk af det specificerede køn til at gennemføre analyserne? Hvis ikke fremsendes alle fisk, og det vurderes hvilke analyser, der ønskes gennemført på hvilket køn.

2.5 Vedligehold af instrumenter

Almindelig rengøring af net efter brug, inklusiv afrensning. Anvend ikke unødige rengøringsmidler eller andre midler, som kan interferere med analyserne (fx tjæring/antibegroningsmaling).

2.6 Særlige forholdsregler - faldgruber

Hold skibet rent under prøvetagning.

Undlad at stå i områder, hvor nedslag fra evt. skorsten/udstødning forekommer.

Udgået dokument
se nyere version

3 Databehandling

En udførlig beskrivelse af databehandlingen vil blive udarbejdet i en separat datateknisk anvisning knyttet til denne tekniske anvisning.

Udgået dokument
se nyere version

4 Kvalitetssikring

En udførlig beskrivelse af kvalitetssikringen vil blive udarbejdet i en separat datateknisk anvisning knyttet til denne tekniske anvisning.

4.1 Kvalitetssikring af metode

Prøvetagning kvalitetssikres ved at føre skemaer over fangster og bestemme længde/vægt for hvert individ.

Udgået dokument
se nyere version

5 Referencer

Dahllöf, I. & Strand, J. 2010: Miljøfarlige stoffer i ålekvalbe - Delrapport I. By- og Landskabsstyrelsen (Naturstyrelsen), Miljøministeriet. 38 s.

HELCOM COMBINE manual 2008

http://www.helcom.fi/groups/monas/CombineManual/en_GB/Contents/

Larsen, M. L & Strand, J. (2011). Miljøfremmede stoffer i muslinger, fisk og Sediment. Kapitel 12 I: Hansen, J.W. & Petersen, D.L.J. (red.) 2011: Marine områder 2010. NOVANA. Tilstand og udvikling i miljø og naturkvaliteten. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi. 120 s. - Videnskabelig rapport fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi nr. 6. <http://www2.dmu.dk/Pub/SR6.pdf>

OSPAR 2012: JAMP Guidelines for Monitoring Contaminants in Biota, agreement 1992-2, opdateret 2012.

http://ospar.org/documents/dbase/decrees/agreements/99-02e_JAMP%20contaminants%20biota%20rev%202012.doc

5.1 Anbefalet litteratur

Phillips, J.H.D. & Rainbow, S.P. (1994). Biomonitoring of Trace Aquatic Contaminants. Chapman and Hall, Alden Press Ltd, Oxford.

Quevauviller, Ph, Koose P. Viret, G. (Ed.) 2011: Chemical Marine Monitoring. Policy Framework and Analytical Trends. John Wiley & Sons, Ltd., , 466 pp. Chichester, GB.

6 Bilag

6.1 Behandling/dissektion af fisk til analyse for kviksølvindhold

Dette bilag er fælles med vandløb og søer.

Udtagning af muskelprøve fra større fisk

Procedure:

Hvis der skal analyseres for andet end kviksølv i fisker, kontrolleres det i de relevante tekniske anvisninger, om der er yderligere særlige forholdsregler før dissektionen påbegyndes.

Dissektion

Fiskene dissekeres i delvist frossen (ikke fuld optøet) tilstand. Dette gør dels dissektionen nemmere, dels undgår, at indre organer (fx lever og galde) går i stykker og begynder at opløses, hvilket kan kontaminere muskelvævet og påvirke analyseresultatet.

Udtag en prøve (minimum 10 g) af muskelvævet fra højre rygmuskel umiddelbart under den første rygfinne. Sørg så vidt muligt for at udtage vævet fra samme del af rygmusklen på de enkelte fisk. Dette sikrer optimal ensartethed, idet vand- og fedtindhold kan variere signifikant i forskellige dele af muskelvævet, og det kan derved indvirke på koncentrationen af de stoffer, som ønskes målt. Undgå at få overlæder eller subkutant fedt med i prøven (OSPAR 2012, HELCOM COMBINE 2008), da koncentrationen i dette kan afvige fra det rene muskelvævet. Prøven udtages derfor under den mørkfarvede, ydre del af musklen.

De udtagne prøver af muskelvæv frysetørres og homogeniseres. Hold prøver fra de enkelte fisk adskilt. En delprøve til evt. analyse for lipid til normalisering nedfryses uden frysetørring. Hvis der ikke er nok muskelvæv på højre side, kan venstre side også udtages, dette noteres for prøven. Alternativt for mindre fisk anvendes hele fisken (se nedenfor).

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 bæk (laminar flow-bæk), hvor luften filtreres for partikler gennem et filter. Arbejdet bør derfor udføres i det laboratorium, der skal udføre analysen.

Brug en ren rustfri stålskalpel og farveløse pincetter af polyethylen eller teflon. Bær talkumfri handsker (talkum kan indeholde metaller), brug fx nitrilhandsker fra AnsellEdmont.

Skyl skalpellen/pincetten mellem hver prøve således: vask i acetone eller 96 % ethanol, 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. Anvend ikke syrevask, da det vil forårsage korrosion af det rustfri stål og give metalforurening ved anvendelsen.

Analyse af hele små fisk (hundestejler mv.)

Procedure:

Fisken aftørres eller skylles med Milli-Q 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 (ved -20 °C) eller frysetørrede i almindelige plastikposer. Prøver til kviksølvanalyse kan opbevares dybfrosne eller frysetørret i op til et år. Ved gamle frosne prøver kontrolleres, at de indre organer er intakte under dissektionen. Hvis de ikke er, kan prøven være kompromitteret, og resultatet skal markeres som sådan.

6.2 Kodelister

http://www2.dmu.dk/1_Om_DMU/2_tvaer-funk/3_fdc_mar/vejledning/Biotasporstof.asp

6.3 Relaterede TA'er

TA M22 Miljøfarlige stoffer i muslinger

TA M24 Miljøfarlige stoffer i sedimenter

TA M26 Biologisk effektmonitoring i fisk

Udgået dokument
se nyere version

7 Oversigt over versionsændringer

Version	Dato	Emne:	Ændring:

Udgået dokument
se nyere version