

Titel: Miljøfarlige stoffer i fisk			
Dokumenttype: Teknisk anvisning	TA. nr.: M25	Version: 2	Oprettet: 21.05.2013
Forfattere: Martin M. Larsen og Jakob Strand	Gyldig fra: 15.09.2017		
	Sider: 16		
	Sidst ændret: 15.09.2017		
TA henvisninger	M22 - M26 - S09		

0 Indhold

1	Indledning	1
2	Metode	2
2.1	Tid, sted og periode	2
2.2	Udstyr	4
2.3	Procedure for indsamling og dissektion af fisk	4
2.3.1	Procedure for indsamling	4
2.3.2	Procedure for dissektion	6
2.3.3	Aldersbestemmelse	7
2.3.4	Dissekering af lever	8
2.3.5	Dissekering af muskelvæv	9
2.4	Tjekliste	9
2.5	Vedligehold af instrumenter	9
2.6	Særlige forholdsregler i faldgruber	9
3	Databehandling	10
4	Kvalitetssikring	11
4.1	Kvalitetssikring af metode	11
5	Referencer	12
5.1	Anbefalet litteratur	12
6	Bilag	13
6.1	Behandling/dissektion af fisk til analyse	13
6.2	Prøvemængder til analyser for stofgrupper	14
6.3	Reviderede TA'er	15
7	Oversigt over versionsændringer	16

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 og prøveindsamling vedrørende miljøfarlige stoffer i fisk og er specielt udarbejdet med henblik på bestemmelse af metaller og organiske stoffer.

Udgået dokument -
Se senere version

2 Metode

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

For fisk anvendes lever og muskelvæv til analyse, idet mange stoffer opkoncentreres i disse væv. Leveren fungerer som "renseorgan" og tilbageholder de fleste organiske stoffer, men for fx kviksølv ses højere koncentrationer i muskelvævet end i leveren. Valg af vævstype til analyse for de enkelte stofgrupper er baseret på erfaringerne fra OSPAR og HELCOM og tilpasset EU's Vandrammedirektiv siden 2014 (EU, 2014), men under hensyntagen til at bevare tidsserier.

2.1 Tid, sted og periode

Fiskene indsamles i perioden primo september til ultimo december. For ålekvabber følges dog perioden angivet i TA M26, hvis fiskene også indsamles til biologisk effektmonitoring. Hunfisk kønsbestemmes ved tilstedeværelse af rogn (ålekvabber har dog levende unger, og ålekvabber hanner har penisstruktur ved gattet). Da opkoncentrering af miljøfarlige stoffer er forskellige mellem hanner og hunner pga. overførsel af nogle stoffer til rogn ved gydning, er det vigtigt, at organer puljes kønsvis.

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

De fiskearter, der kan anvendes i MFS-overvågningen, fremgår af Tabel 1. På grund af klimatiske forhold kan der ske ændringer i bestandene inden for programperioden, således at størrelsesintervallet ikke kan overholdes hvert år. Størrelserne er fastsat ud fra det ønskede aldersinterval og kønsmodning af fiskearten (eller mindstemålene for fiskeri). Ved fangst af større fisk end fastsat kan der derfor være ældre fisk iblandt, som dermed kan have højere indhold af MFS på grund af bioakkumulering. Hvis der derfor ikke kan fremskaffes nok fisk (dvs. væv) til at gennemføre analyserne, skal laboratoriet underrettes, og det skal vurderes, om enten detektionsgrænsen kan hæves, eller om antallet af analyseparametre skal reduceres. Kontrollér derfor altid med laboratoriet antallet af fisk der skal indfanges for at kunne gennemføre analyseprogrammet for de ønskede parametre.

Ålekvabber, der indsamles til biologiske effekter, indsamles efter retningslinjerne for biologisk effektmonitoring (TA M26). For prøver, der indsamles til MFS analyse, er det bedre, at fiskene fryses direkte efter indsamling og ikke går i hyttefade af hensyn til potentiel forurening fra hyttefadene og havneområdet. Hanner kan genkendes på penisstruktur ved gattet og fryses ned direkte til MFS analyserne. Bemærk, at der kræves dispensation for at fange hunner, da ålekvabber er en truet art, og hunner er fredet i drægtighedsperioden (15/9-31/1), ligesom mindstemålet for fangst af ålekvabber er 23 cm (Fiskeriringen, 2011). Der indsamles vævsprøver fra hanner frem

for hunner for at minimere indflydelsen af kønsvariation på analyseresultaterne (Dahllöf & Strand 2010, Larsen & Strand 2011).

Table 1 Anvendelige fiskearter til analyse af muskel og leverprøver

Art	Størrelse	Alder ¹⁾	Køn ²⁾	Antal fisk ³⁾⁵⁾	
				pr 5 g lever	pr 20 g muskel
Foretrukne arter:					
Fladfisk					
Skrubbe <i>Platichthys flesus</i>					
eller Rødspætte <i>Pleuronectes platessa</i> ⁴⁾	250-300 mm ⁵⁾	2-3 år	♀	2	2
Ålekvabbe:					
<i>Zoarces viviparus</i>	230-300 mm ⁶⁾	2-3 år	♀	ca. 20	ca. 10
Alternative arter:					
Sortmundet kutling					
<i>Neogobius melanostomus</i>	230-280 mm	2-3 år	♂	ca. 5	ca. 5
Aborre					
<i>Perca fluviatilis</i>	200-250 mm	2-5 år	♂	2	2

1) Kalenderår, dvs. en fisk født 1. december bliver ca. 1 januar. Bestemmes ved hjælp af øresten eller for aborre ved slæp prøve bag brystfinne.

2) Foretrukne køn til analyse; ♀: hunner, ♂: hanner.

3) Organer skal holdes kønsadskilte under dissektion og efterfølgende analyse og skal puljes fra mindst 12 fisk af samme køn for at sikre en repræsentativ analyse fra området.

4) *P. platessa* indsamles på R1035 i Nordøen, hvor der findes lange tidsserier. Kan anvendes hvis der ikke findes skrubber, men i andre dansk farvand forekommer skrubber oftest og foretrækkes.

5) Ca. 150 mm i Nordsøen, da man har erfaring for, at kun denne størrelse kan fanges årligt. Bemærk at i Nordsøen kan der fanges flere fisk end her angivet for at opnå tilstrækkelig prøve mængde, da fisken er mindre.

6) Bliver sjældent over 300 mm. Hvis der skal laves biologiske effektundersøgelser, se TA M26 for særlige forhold vedr. ålekvabber.

7) Under 150 mm er aborren ikke en rovfisk og derfor på et lavere trofisk niveau, som ikke kan anvendes i overvågning. Se teknisk anvisning S09 for yderligere oplysninger. I brakvand opnås 25 cm fisk på 3-5 år, og større fisk vil derfor ofte være ældre og dermed have højere indhold af fx Hg og andre biomagnifiserende stoffer.

2.2 Udstyr

Til fiskeri anvendes passende fiskeudstyr:

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

Bestemmelse af mål og vægt

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

Til dissektion

- knive, skalpeller af rustfrit stål, der ikke giver afsmitning (individuel indpakkede skalpelblade)
- laboratorievægt (min. 3 decimaler) til udveining af individuelle lever-/muskelpøver
- grovvægt (præcision min. 1 g) for vejning af evt. ikke feltvejede fisk
- lineal/målebræt (præcision min. 0,5 cm) for måling af evt. ikke feltmålte 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 ombord eller fjernes fra nettet, fx fra olie på skibsdækket eller opbevaring i fræret nyttefad ved indsamling over flere dage,
- at der indsamles et tilstrækkeligt antal fisk, så tydeligt syge eller beskadnede fisk ikke udtages til analyse. De kan evt. fremsendes i separat beholder til laboratoriet eller andre eksperter med anmærkning "ikke til analyse" for nærmere identifikation af sygdommen,
- at fisken vaskes med vand fra stedet for at fjerne evt. materiale, der sidder fast på fiskens skind,
- at der findes rene = kontamineringsfri beholdere ombord til opbevaring af fisken (fx Rilsan® poser).

Prøven/holderen 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 (evt. start og slut dato)
- prøvenummer og type af prøve
- navn på prøvetager

Skriveredskaber og eventuelle etiketter, der bruges ved mærkning, skal kunne modstå fugt (brug fx blyant).

Det optimale er at veje (til nærmeste hele g) og længdebestemme fisken (til mm eller mindst 5 mm niveau), mens den er frisk. Hvis det ikke er muligt, eller fiskene samles i poser (max 5 fisk per pose), noteres det på posen, at vægt og længde ikke er bestemt, så laboratoriet er klar over, at dette skal gøres før dissektionen.

Vægt og længde registreres i en logbog og påføres de individuelle beholdere.

Af dyreetiske hensyn skal fisken slås ihjel med et stumpt instrument eller en kniv igennem hovedet umiddelbart efter fangst.

Ikke-dissekerede fisk skal opbevares nedfrosne (< -20 °C) indpakket med højst 5 fisk pr pakke for at sikre, at nedfrysningen går så hurtigt som muligt, og at man ved dissektionen sikrer, at fiskene optøes til et passende niveau før dissektion, dvs. at de sidste ilke er helt optøet før de dissekeres. Herved bevares fiskens indre organer bedst muligt intakte, samtidig med, at man at sammenhæng mellem analyserne af fisken og dens længde-/vægtmål bevares.

Velegnet materiale til indpakning af fisk er

- for organiske analyser: Rilsan®poser eller aluminiumsfolie/stanniol. Plastrmateriale må 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. De stanniol indpakkede fisk kan samles i rene plasticposer (fryseposer).
- for metalanalyser: Rilsan®poser eller almindelige rene plasticposer (fryseposer)

Det anbefales, at bruge Rilsan®poser (diffusionstætte nylonposer), da de kan bruges til både metaller og organiske analyser.

De frosne prøver skal opbevares i en større beholder for at undgå, at fisken beskadiges. Fiskene må ikke tøs og genindfryses undtagen, når de udtages til dissektion.

Frosne fisk til metal- og organiske analyser kan opbevares i op til 1 år. Fersk fisk skal opbevares og transporteres ved 5-15 °C og kun i meget kort tid over 10°C. En temperaturdatalogger eller et min./maks.-termometer bør bruges til at kontrollere temperaturen under længerevarende transporter.

For ålekvabber, som udtages samtidig med udførelsen af biologisk effektundersøgelser, skal udvælgelse af stationer og prøvetagningsudstyr følge den tekniske anvisning for disse (TA M26).

I områder, hvor ålekvabbe og fladfisk er udkonkurreret af sortmundet kutling, kan sidstnævnte indsamles i stedet for. Aborre må kun anvendes til analyse, hvis de andre arter ikke forefindes i området.

2.3.2 Procedure for dissektion

Før fiskene dissekeres, skal hver fisk måles og vejtes. Antallet af fisk, hvorfra lever og/eller muskler skal puljes, noteres, og middelværdi for længde og vægt samt dertil knyttet standardafvigelse, maksimum og minimum værdier rapporteres for hver pulje. Bemærk at væv til analyse skal puljes fra mindst 12 fisk af samme køn for at sikre en repræsentativ analyse fra området.

Laboratorieforhold og forholdsregler ved fiskedissektion er de samme som for muslinger (M22), og gennemføres som beskrevet nedenfor.

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

Prøvehåndteringen og dissekeringen skal gøres i en såkaldt ren bænk (laminar flow-bænk), hvor luften filtreres for partikler gennem et filter.

Skalpellen/pincetten skal skylles mellem hver fisk. Det anbefales at vaske skalpellen/pincetten i acetone eller alkohol og demineraliseret vand (Milli-Q eller vand af tilsvarende kvalitet).

En frossen fisk dissekeres, inden den er helt optøet, så det undgås, at indre organer, som fx leveren går i opløsning. Hvis fisken optøs, kan væske indeholdende kontaminanter sive ud fra fx leveren eller gallen til det omkringliggende væv og herved kompromittere analysen.

Fiskearter, hvor fedtindhold i leveren kan være meget højt, fx torsk og sortmundet kutling, skal dissekeres direkte og bør ikke først nedfryses, for at undgå at leveren begynder at opløses. De arter, der indgår i NOVANA, har normalt ikke så højt fedtindhold i leveren, at dette er nødvendigt.

Ved dissektion af fladfisk udtages øresten først, 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.

Analyselaboratoriet oplyser den nødvendige prøvemængde for de enkelte analyser, og disse lægges sammen for at beregne minimums antallet af fisk pr. station. Ved homogenisering er der et vist tab (ca. 5 g), som skal indregnes antallet af fisk for at opfylde laboratoriets prøvemængde krav.

Følgende stofgrupper analyseres i muskel: Hg, øvrige metaller (undtagen i fladfisk tidstrensstationen R1035), fedt, Polychlorerede biphenyler (PCB) og chlorerede pesticider, Bromerede flammehæmmere (BDE), dioxiner, furaner og dioxinlignende PCB'er.

Følgende stofgrupper analyseres i lever: Organotinforbindelser (TBT), polyflourerede forbindelser (PFAS). For tidstrens i fladfisk fra R1035 endvidere metaller, PCB og BDE

2.3.3 Aldersbestemmelse

Fisks kalenderalder bestemmes ved, at årringerne i fiskens øresten tælles under lys (evt. i lysmikroskop)

For Fladfisk udtages ørestenen forsigtigt med en kniv ved at skære ned i en lige linje fra gællerne og skære øregangen over, hvori ørestenen ligger. For fladfisk er det nemmest at udtage ørestenen før andre organer, da snittet er en del af den videre dissektion.

Øresten i ålekvalber og sortmundet kutling findes ved at skære ned midt i kraniet og vride kraniet til hver sin side, hvorefter ørestenene kan findes i to hulrum bag øjenhulene. De kan udtages forsigtigt med pincet. For ålekvalber og kutling er det sikrest at udtage øvrige organer før øresten for at undgå forurening af andre organer.

Ørestenen skylles forsigtigt med lidt vand og 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.

Aldersbestemmelsen foretages ved at tælle de mørke og hvide striber, der markerer sommer og vinter tilvæksten. Dette kan gøres i godt lys med lup eller i mikroskop. Alderen af hvert individ noteres, og gennemsnittet beregnes. En let polering kan lette genkendelsen af årringerne.

Aborrens alder kan bestemmes på skælprøver taget fra aborrens side umiddelbart bag ved brystfinnen. Der tages 3 – 5 skæl fra hver fisk for at finde et med tydelige vækstringe (se fx denne anvisning <http://www.aborre.dk/artikler/alder/>).

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. Leverene puljes efter køn, hvor hunner foretrækkes for fladfisk (OSPAR anbefaling), og hanner foretrækkes for ålekvabber, sortmundet kutling og aborre (Tabel 1).

Skrubbens kropshule åbnes ved et snit (eller klippes med en saks) tværs hen over fiskens bug fra gattet (endearmsåbning) til gællen på den højre side hos højrevendte fisk (venstre side hos venstrevendte fisk). Kropsvæggen løftes væk, så man kan se organpakken. Galdeblæren (grønligt vedhæng til leveren) klippes forsigtigt fra uden, at den sprænges og forurener leveren. I tilfælde af forurening kasseres fisken fra puljen (både lever og filet).

For skrubber/rødspætter anvendes en leverpulje, hvor der analyseres for PFOS. Ved tidligere tidstrend-stationer (Nordsøen, Storebælt, Øresund og Hjelm Bugt) anvendes lever desuden til analyse for metaller (undtagen Hg), PCB og BDE for at føre tidstrends for disse stoffer videre.

Ålekvabbe, sortmundet kutling og aborre åbnes ved at klippe op fra gattet til munden langs bugens midtlinie, og derefter klippe lodret op langs gællelåget (ikke for dybt – kun skinde) og åbne ind til organpakken ved at trække skindflappen op mod ryggen. Leveren sidder forrest i bughulen (bag hjertehulen for aborre). I ålekvabben er leveren lille og skæres forsigtig fri uden, at galdeblæren sprænges. I sortmundet kutling ligger leveren yderst på organpakken og er nem at skære fri. Hvis galdeblæren sprænges må fisken kasseres. Se M26 for dissektion af ålekvabber, der også skal anvendes til biologiske effekt undersøgelser.

For ålekvabber analyseres puljede leverprøver fra hanner, hvor der analyseres for metaller (undtagen Hg), TBT og perfluorerede forbindelser som PFOS. Hvis der ikke er nok hanner, kan nogle af analyserne udføres i en puljet leverprøve fra hunner. Prioriteringen af hvilke stofgrupper, der i givet fald analyseres i hanner og hunner, foretages på basis af den samlede prøvemængde for hvert køn. PFOS analyseres dog så vidt muligt i hanner. Resultaterne afleveres for hvert køn for sig.

En lever fra ålekvabbe vejer normalt 0,2 – 0,5 g, fra sortmundet kutling: 1-2 g, for fladfisk og aborre: 2-5 g. Det omtrentlige antal fisk, der som minimum skal indfanges til analyse af leverprøver, kan derfor anslås ud fra den gennemsnitlige leverbægt og vægten af den puljede leverprøve, der er nødvendig til at gennemføre analyserne (se Tabel 1 og 2).

2.3.5 Dissekering af muskelvæv

Muskelvæv dissekeres 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 disse. Derfor skal det undgås, at skindet omkring prøvetagningsområdet kommer i kontakt med de indre organer.

Fra fladfisk og aborre kan der normalt udtages store mængder muskel (>10 g pr. fisk), hvorimod sortmundet kutling ofte ligger på 2,5-5 g pr fisk og ålekvabber 1,5 – 3 g pr fisk. Det kan derfor være nødvendigt at udtage både højre og venstre sides muskel for at få nok prøvemateriale. Det omtrentlige antal fisk, der som minimum skal indfanges til analyse af muskelvæv, kan derfor anslås ud fra den gennemsnitlige muskelvægt og vægten af den puljede muskelprøve, der er nødvendig til at gennemføre analyserne (se Tabel 1).

2.4 Tjekliste

Udtagning af fisk

- Er der udtaget nok fisk?
- Er fiskene raske at se på (evt. søge 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 afferskning. Anvend ikke unødige rengøringsmidler eller andre midler, som kan interferere med analyserne (fx tjæring/antibegræningsmaling).

2.6 Særlige forholdsregler - faldgruber

Hold skibet rent under prøvetagning.

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

3 Databehandling

For længde, vægt, organvægte og alder på fisk i puljen beregnes middelværdi, standard afvigelse samt minimum og maksimum for hver pulje (hanfisk og hunfisk hver for sig hvis der udtages væv af både hanner og hunner). Køn og længde/vægt dataene indgår i afrapporteringen.

Udgået dokument -
Se senere version

4 Kvalitetssikring

En udførlig beskrivelse af kvalitetssikringen findes i den datatekniske anvisning DT04.

4.1 Kvalitetssikring af metode

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

Udgået dokument -
Se senere version

5 Referencer

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

EU 2014: COMMON IMPLEMENTATION STRATEGY FOR THE WATER FRAMEWORK DIRECTIVE (2000/60/EC). Guidance Document No. 32 on Biota Monitoring (the Implementation of EQS biota) under the Water Framework Directive. - Technical Report - 2014 - 083.

Fiskeriringen (2011) (aktiv hjemmeside august 2017): http://www.fiskeriringen.dk/Informationer/Fredningstider_mindstem%C3%A5l

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 - National 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.

Faxneld, S., Danielsson, S. & Nyberg, E. 2014: Distribution of PFAS in liver and muscle of herring, perch, cod, eelpout, arctic char, and pike from limnic and marine environments in Sweden. - Report no. 9. Swedish Museum of Natural History, Department of Environmental Research and Monitoring. 33 pp. <http://nrm.diva-portal.org/smash/get/diva2:767385/FULLTEXT01.pdf>.

OSPAR 2005: 2005 Assessment of data collected under the Co-ordinated Environmental Monitoring Programme (CEMP). OSPAR Commission. - Assessment and Monitoring Series, Publication Number 2005/235, 115 pp. <http://www.ospar.org/documents?v=7017>.

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

6 Bilag

6.1 Behandling/dissektion af fisk til analyse

Dette bilag er fælles med vandløb og søer (TA S09) og beskriver i større detalje udtagning af muskelvæv.

Udtagning af muskelprøve fra større fisk

Procedure:

Hvis der skal analyseres for andet end kviksølv i fisken, 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 undgås, 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, men afhænger af laboratoriet) 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 væv- 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 overhud eller subkutan fedt med i prøven (OSPAR 2012, HELCOM COMBINE 2008), da koncentrationen i dette kan afvige fra det i muskelvævet. Prøven udtages derfor under den mørkefarvede, 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 nedfrys ses 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 rustfrie 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 kviksølv-analyse 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 Prøvemængder til analyse for stofgrupper

Der kan anvendes mange forskellige metoder til ekstraktion og analyse af de enkelte stofgrupper, og i nogle tilfælde kan samme forbehandling anvendes til flere stofgrupper. Nedenfor er angivet en oversigt over prøvemængder, der blev anvendt i NOVANA og de tidlige NOVANA programmer. Da der til stadige er sker udvikling i analyseinstrumenter og ekstraktionsteknikker, skal tabellen kun tages som et groft fingerpeg på prøvemængder, nogle ekstraktionsteknikker kræver mere og andre mindre prøvemateriale, og følsomheden på de instrumenter, der anvendes til at detektere indholdet af de enkelte stoffer, kan også variere meget (ofte vil mere følsomme instrumenter være væsentligt dyrere og mere vedligeholdelseskrævende for at fungere optimalt). Prøvemængden spiller direkte ind på de opnåelige detektionsgrænser for de fleste analyser, dvs. hvis der ikke er nok prøvemateriale bliver detektionsgrænsen dårligere.

Ved homogenisering af prøverne skal man normalt regne med et tab af prøvemateriale, som sidder tilbage og vaskes af homogenisatoren. Hvis der dissekeres på et laboratorium, og delprøver sendes til andre laboratorier for analyse kan dette give et yderligere tab af prøvemateriale ved uddelingen. Generelt kan der regnes med et tab på ca. 5 g ved homogeniseringen med ultrathorex eller tilsvarende systemer.

Prøvetagningsmængder og foretrukne organer til analyser for at opnå NOVANA-detektionsgrænser. BEMÆRK at disse mængder er laboratorieafhængig og derfor skal afklares med laboratoriet før fiskeriet igangsættes. For metaller bestemmes tørstof sædvanligvis på hele prøvemængden og den (fryse)tørrede rest anvendt til selve analysen.

Matrix	Lever	Muskel
Hg inkl. Tørstof		5 g
Øvrige metaller incl. tørstof	(2 g) ¹⁾	10 g
Organotinforbindelser	5 g	
Polychlorede Biphenyler (PCB) og chlorerede pesticider inkl. fedt	(10 g) ¹⁾²⁾	30 g ²⁾
Bromerede flammehæmmere (BDE)	(10 g) ¹⁾²⁾	30 g ²⁾
Dioxin, furaner og dioxinlignende PCB'er ³⁾		30 g
Polyflourerede forbindelser (PFAS)	5 g	
Total mængde incl. spild	15 (eller 32 g) ¹⁾	110 g

¹⁾Kun hvor analyser af lever fra flodfisk skal fortsættes af lensyn til tidstrenden (på R1035).

²⁾Måles både BDE og PCB, kan denne mængde halveres, hvis laboratoriet anvender fælles ekstraktionsmetode.

³⁾Bemærk at hvor det er forskellige laboratorier, der foretager analyserne, skal hvert laboratorium have den angivne mængde til deres analyse (eller mere hvis laboratoriet kræver det).

6.3 Relaterede TA'er

- TA M22 Miljøfarlige stoffer i muslinger
- TA M24 Miljøfarlige stoffer i sedimenter
- TA M26 Biologisk effektmonitoring i fisk
- TA S09 Kviksølv i fisk (gældende for søer)
- TA DT04 Datateknisk Anvisning

7 Oversigt over versionsændringer

Version	Dato	Emne:	Ændring:
2	15.09.2017		Gennemgående revision af hele TA'en sikrer, at brødtekst er i overensstemmelse med nedestående versionsændringer
2	15.09.2017	Forside	<ul style="list-style-type: none"> • Jacob Strand tilføjet som forfatter • Henvisning til TA S09 Kviksølv i fisk
e	15.09.2017	2.1 Tid, sted og periode	<ul style="list-style-type: none"> • Periode for indsamling af fisk udvidet • Sortmundet kutling og aborre anført som alternative arter • Tabel 1 revideret
2	15.09.2017	2.3.1 Procedure for indsamling	Sortmundet kutling og aborre anført som alternative arter
2	15.09.2017	2.3.2 Procedure for dissektion	Tabel 2 revideret herunder krav til øget mængde (vægt) af puljet væv til analyse
2	15.09.2017	2.3.3 Aldersbestemmelse	<ul style="list-style-type: none"> • Afsnit tidligere benævnt 2.3.3 til Dissekering af øresten • Sortmundet kutling og aborre anført som alternative arter
2	15.09.2017	2.3.4 Dissekering af lever	Sortmundet kutling og aborre anført som alternative arter
2	15.09.2017	2.3.4 Dissekering af muskelvæv	<ul style="list-style-type: none"> • 2.3.4. ændret til 2.3.5 • Sortmundet kutling og aborre anført som alternative arter
2	15.09.2017	Kodelister	6.2 Kodelister i version 1 slettet
2	15.09.2017	6.2 Relaterede TA'er	<ul style="list-style-type: none"> • Afsnit 6.3 i version 1 • Tilføjet: TA S09 Kviksølv i fisk